

令和元年6月12日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08073

研究課題名(和文) 中枢性浸透圧感知における新規TRPV1分子の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of newly discovered TRPV1 molecule functions in osmoreception

研究代表者

澁谷 泉 (SHIBUYA, Izumi)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：50162649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：中枢性浸透圧受容分子として注目されているTRPV1関連分子についてその脳内局在と細胞機能について解析を行った。バゾプレシンニューロンの細胞体が存在する視床下部視索上核においてはTRPV1\_SON、TRPV1ともに腹側のバゾプレシン領域に著明な信号が観察された。TRPV1\_SONはHEK293細胞に単独で発現しても、TRPV1と共発現しても浸透圧応答を起こさなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ほ乳類、鳥類における体液浸透圧、体液量調節機構は多くのこれら動物種が水から離れて生活するため、極めて精巧であり、全体重の約60-70%と膨大な容積を占める大量の水とその浸透圧を±数%以内で制御している。体液浸透圧の増加を中枢神経系がどのような機構で感知しているかについては現在で不明であるが、その候補分子として新規に発見されたTRPV1\_SONの脳内分布と機能を解析した。今回の研究でTRPV1\_SONは検索した全ての組織でTRPV1と共発現していたが、単独でもTRPV1との共発現においても浸透圧感知機能を示さなかった。TRPV1が浸透圧感知分子ある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cellular functions and molecular distribution of TRPV1-related molecules, which are known as the key molecule for central osmolality sensing. mRNAs for TRPV1\_SON and TRPV1 were both expressed in the ventral vasopressin-neuron region of the supraoptic nucleus. When expressed in HEK293 cells either alone or in combination with TRPV1, TRPV1\_SON did not show a response to osmolality increase.

研究分野：獣医生理学、神経生理学

キーワード：浸透圧受容 TRPV1バリエント TRPV1 視索上核 脳室周囲器官

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

体液浸透圧、ならびに体液量の恒常性の維持機構は、水中から陸に上がって生活する劇的な進化の過程で、地球上の生命体が獲得してきた生命維持に必須な極めて重要な機構である。実際、獣医学領域において重要な位置を占めるほ乳類、鳥類における体液浸透圧、体液量調節機構は多くのこれら動物種が水から離れて生活するため、極めて精巧であり、全体重の約 60~70% と膨大な容積を占める大量の水とその浸透圧を ± 数% 以内で制御している。この制御に最も重要な役割を果たす機構が視床下部—下垂体後葉系から分泌される抗利尿ホルモンであるアルギニンバゾプレシン (AVP) とその制御系である。AVP は視床下部の室傍核 (PVN) と視索上核 (SON) で合成され、下垂体後葉で分泌されて、全身循環へと入る。AVP は腎・集合管の受容体に作用し、水チャネル (AQP) の尿管上皮細胞・細胞膜への動員を促進することにより、水再吸収促進、体液量保持を起こす。これに加えて、AVP 分泌刺激が生じる状況下においては浸透圧刺激が大脳皮質を介して飲水行動を誘発することが知られており、視床下部の PVN や SON、さらにはその 2 つの神経核にシナプス入力を送る視床下部の部位を一般に『飲水中枢』と呼ぶ。飲水中枢はその本体が不明なだけでなく、浸透圧感知機構ネットワークの神経回路の解明は現時点でもなされていない。これらの解明には、まず、それらニューロンネットワークが共通に有する中枢性浸透圧感知の分子実体解明が不可欠である。体性感覚や視覚、嗅覚、味覚、あるいはグルコース濃度感知などの生命機能維持に重要な情報感知に関与する生体分子の多くが分子同定されている現在において、生命維持に不可欠な中枢性浸透圧感知分子の本体が不明であることは驚くべきことと言わざるを得ない。我々はこれまでの研究により、1) RT-PCR 法により SON に既存の TRPV1 分子の全長を含む mRNA が発現していること、2) TRPV1 分子の免疫陽性細胞が AVP 陽性細胞と同一であること、さらには、3) SON ニューロンの高浸透圧誘発性細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇が TRPV1 の選択的アンタゴニストである Capsazepin で可逆的に抑制されること 4) TRPV1 のアゴニストである Capsaicin が体温に近い温度でのみ AVP ニューロンの細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を上昇させることを見いだした (Moriya et al. Cell Calcium, 2015)。加えて我々は SON に TRPV1 の N 端を欠く新規 TRPV1 スプライスバリエーションを発見し、視索上核由来分子ということで TRPV1\_SON と命名した。これまで得られた結果から、我々は、中枢性浸透圧感知分子は TRPV1 を分子の一部にもつが、TRPV1 のみで構成される分子ではなく、TRPV1 と他の TRP 関連分子が複合体を形成していると推定した。また、新たに我々が発見した TRPV1\_SON についてはその機能だけでなく発現組織すら不明であり、今後の研究が待たれる。

### 2. 研究の目的

現時点で中枢性浸透圧感知分子 (Central Osmoreceptor) の実体解明がなされていないことは、その分子が制御することが予想される『飲水中枢』の機構解明には不可欠である。我々はこれまでに中枢性浸透圧感知分子の分子実体を解明するために、ラットの視索上核 (SON) を用いて細胞生理学的、電気生理学的、分子生物学的解析を行い、カプサイシン受容体である TRPV1 関連分子が中枢性浸透圧感知機能を担う分子である結果を得てきた。本研究では、それらの成果を踏まえて、我々が最近発見し、命名した新規分子である TRPV1\_SON (NCBI Accession # LC008303) の中枢性浸透圧感知における機能と、中枢神経系における分布様式を解明し、現在もなお不明な浸透圧感知機構の解明をめざすものである。

### 3. 研究の方法

同時進行で以下の 3 種の手法を用いて未知の TRPV1\_SON の機能と脳内局在を検索する。

#### (1) TRPV1\_SON と TRPV1 の共発現細胞におけるイオンチャネル機能解析

TRPV1 および TRPV1\_SON ベクターを作成し、HEK293 細胞に発現させ、その機能解析をパッチクランプ法および Fura-2 を用いた細胞内  $Ca^{2+}$  濃度画像解析法で行う。発現効率は、GFP および RFP を発現ベクターに組み込むことにより確認する。刺激としては、カプサイシン、高浸透圧、低 pH、43 °C までの温度ランブ刺激を用いる。

加えて、TRPV1\_SON と TRPV1 を数個のアミノ酸で連結したタンデム分子、いわゆるコンカテマーを発現するベクターを設計し、同様の機能解析を行う。

#### (2) TRPV1\_SON および TRPV1 の in situ ハイブリダイゼーション法を用いた局在同定

TRPV1\_SON は、蛋白翻訳配列は TRPV1 と同一であるために、TRPV1 と区別して局在を同定するためには、TRPV1 分子には含まれない mRNA 塩基配列の存在部位を in situ ハイブリダイゼーション法で解析する必要がある。この目的のために TRPV1\_SON のエクソン 6 番の 5' 側に存在するイントロン領域に着目したプローブを作成し、ラットの視床下部を中心に mRNA の局在を解析する。

#### (3) TRPV1\_SON と TRPV1 の共発現細胞を用いた蛋白質解析

HEK293 細胞に TRPV1 と TRPV1\_SON ベクターを単独、あるいは共に導入する。細胞から得た Lysate を SDS-PAGE に泳動後、TRPV1 抗体を用いたウェスタンブロットを行う。同様の細胞にビオチン処理し、それらの細胞から得られた Lysate をアビジンカラムで精製した後に、ウェスタンブロットを行い、細胞膜に発現している分子を同定する。ラット SON および脳室

周囲器官の組織から Lysate を作成 し、Blue Native PAGE に泳動後、抗 TRPV1 抗体で蛋白質を検出する。それにより、AVP ニューロンに発現する TRPV1 複合体の分子量を推定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 平成 28 年度

TRPV1 ならびに、本研究室で新たに発見したそのスプライスバリエーションである TRPV1 の機能を HEK293 細胞にそれぞれの分子を単独で発現、あるいは共発現させてパッチクランプ法および細胞内  $Ca^{2+}$  濃度画像解析法にて解析した。共発現ベクターは 2 種の分子を Gly20 で構成されるリンカーで結合する構造を採用した。その結果、TRPV1 発現細胞においてのみ TRPV1 アゴニストである Capsaicin に応答がみられた。さらに TRPV1 発現細胞においては、マニトール 50mM による浸透圧増加刺激に対しても応答が観察された。しかし、TRPV1\_SON 発現細胞および TRPV1 と TRPV1\_SON の共発現細胞では、Capsaicin に対しても浸透圧増加に対しても反応は観察されなかった。さらに、今回作成したコンカテマー分子が細胞膜に発現することはアビジン-ビオチン反応を用いたウェスタンブロットで確認した。

コンカテマー作成において分子間にリンカーを挿入したことの妥当性を確認するために、TRPV1 を同様のリンカーで結合したベクターも作成し、HEK293 細胞に発現させて TRPV1 単独発現細胞と Capsaicin 応答性、浸透圧応答性を被検して差がないことを確認した。これらの結果は、TRPV1 が浸透圧感知分子であること、および TRPV1\_SON はおそらくは Dominant negative 分子として TRPV1 の機能を抑制することを示唆している。

一方、TRPV1 単独発現細胞での Capsaicin 誘発電流と浸透圧増加によって誘発される電流の逆転電位はほぼ 0mV で一致していたが、視索上核ニューロンにおいて観察された Capsaicin あるいは浸透圧増加誘発電流の逆転電位(約-40 mV)とは大きく異なっており、中枢性浸透圧感知分子の分子実体が TRPV1 単独でホモテトラマーを形成する分子では無いことも示唆した。

TRPV1 と TRPV1\_SON の mRNA のラット脳における分布を in situ hybridization 法を用いて解析する手法を確立し、浸透圧感知機能を有する中枢部位である視索上核(SON)と脳弓下器官(SFO)において両者のシグナルを得た。さらに SON では腹側のバゾプレシンニューロン領域にシグナルが集結していた。これらの結果は 2015 年に Cell Calcium に我々が発表した論文において SON ニューロンのうちバゾプレシンニューロンのみが浸透圧刺激に反応し、オキシトシンニューロンは応答しないという結果によく一致していた。

##### (2) 平成 29 年度

平成 28 年度に引き続き、TRPV1 ならびに、TRPV1 の機能を HEK293 細胞に単独で発現させてパッチクランプ法および細胞内  $Ca^{2+}$  濃度画像解析法にて解析した。TRPV1 発現 HEK293 細胞におけるマニトール誘発電流と Capsaicin 誘発電流は逆転電位がほぼ一致したものの、Capsaicin 電流の速い脱感作がマニトール電流ではみられないことが判明した。一方、TRPV1\_SON 発現細胞および TRPV1 と TRPV1\_SON の共発現細胞では、環境温度 36 °C で行っても、Capsaicin に対しても浸透圧増加に対しても膜電流反応も細胞内  $Ca^{2+}$  濃度変化も観察されなかった。

TRPV1 と TRPV1\_SON の発現が In Situ Hybridization 法で明らかになった脳弓下器官(SFO)と脳室上衣細胞において浸透圧感受性および Capsaicin 感受性を解析した。単離 SFO ニューロンにおいて、50mM マニトール刺激、Capsaicin 刺激により膜電流応答は観察されなかった。さらに細胞内  $Ca^{2+}$  濃度にも影響がなかった。

視索上核、弓状核以外の脳ならびに周囲組織でも in situ hybridization 法を用いて TRPV1\_SON の発現領域を解析した結果、第 3 脳室ならびに側脳室の上衣細胞で TRPV1 の強い発現が見いだされた。TRPV1\_SON も共発現していた。ラット脳から単離した脳室上衣細胞で浸透圧反応、Capsaicin 応答を観察したが、いずれの刺激にも応答は観察されなかった。

視索上核(SON)の TRPV1 発現細胞の組織学同定をより詳細に行うために、TRPV1 の N 端認識交代と、グリアマーカーである GFAP の交代を用いて二重染色を行った。バゾプレシンニューロンが多数存在することが知られる SON の腹側領域に、TRPV1 の免疫陽性が確認されたが、それら TRPV1 陽性ニューロンは GFAP 免疫陽性は観察されなかった。GFAP 陽性シグナルは上衣細胞ならびに SON 内のアストロサイト様細胞に観察された。これらの結果は、TRPV1 分子がバゾプレシンニューロンに局在しているという我々の以前の電気生理学的証拠を支持している。

##### (3) 平成 30 年度

他研究室の報告で、マウス由来の TRPV1 の N 端を一部欠く変異体である N-TRPV1 を HEK293 細胞に発現すると浸透圧応答を生じるという報告がなされた(Zaelzer et al., Cell Reports 2015)。この成果は浸透圧感知分子が何であるかだけでなく、全長 TRPV1 が視索上においてニューロンではなくグリアにのみ存在するという点でも本研究の in situ hybridization や細胞生理学的解析の結果と大きく異なっている。平成 30 年度は、ラット視索上核ならびに背根神経節組織を用いて Real time RT-PCR を実施し、全長 TRPV1 と TRPV1\_SON の発現量比較を行った。その結果、視索上核においても背根神経節においても TRPV1\_SON は TRPV1 に比較して数オーダー発現量が少ないことが判明した。これらの結果は、中枢性浸透圧感知分子の本体は全長 TRPV1 である可能性を示唆している。TRPV1\_SON は TRPV1 の機能調節をドミナントネガティブ分子として抑制的に調節しうる可能性はあるものの、TRPV1\_SON 単独でイオンチャネルとして機能す

る可能性は極めて低いと考察した。

また、浸透圧感知機能を有していることが知られる脳室周囲器官(SFO)を単離し、浸透圧応答、Capsaicin 応答、アンジオテンシン II(AII)応答を Fura-2 による細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度変化を指標に解析した。SFO ニューロンは浸透圧増加(+50 mOsm)および Capsaicin に対してまったく応答しなかった。一方、AII は50%以上の SFO ニューロンで細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇を引き起こした。AII は従来報告されていた最小有効濃度である 1nM よりも遙かに低濃度である 1pM で細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇を生じた。pM レベルの AII によって生じる  $Ca^{2+}$ 応答は繰り返され細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度が増加減少を繰り返さず、いわゆる  $Ca^{2+}$ オシレーションであった。約半数の SFO ニューロンにおいては刺激がない状況下でも自発的に  $Ca^{2+}$ オシレーションが生じており、pM レベルの AII を作用させることで濃度依存性にオシレーションの振幅と頻度の両者が増加することが判明した。

RT-PCR 法により下垂体中葉組織においても TRPV1 および TRPV1\_SON の両者が発現することを明らかにした。下垂体中葉細胞での自発性分泌機序について細胞内  $Ca^{2+}$ 画像解析法ならびにパッチクランプ法を用いて解析した。下垂体中葉細胞における著明な自発性  $Ca^{2+}$ 依存性ペプチド分泌は自発性の  $Ca^{2+}$ 流入に起因することが我々のこれまでの研究成果により明らかとなっていたが、今回、この  $Ca^{2+}$ 流入機構を維持する機構の候補としてこれまで報告のないカチオン電流を発見した。このカチオン電流は TRPV1 選択的阻害薬である Capsazepin では影響を受けなかったが、TRPV1 により高い親和性を持ち、その近縁分子にも広く抑制作用を有する Ruthenium red で抑制されたことから TRPV 関連分子である可能性が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

(1) Izumisawa Y, Tanaka-Yamamoto K, Ciriello J, Kitamura N, Shibuya I. Persistent cytosolic  $Ca^{2+}$  increase induced by angiotensin II at nanomolar concentrations in acutely dissociated subfornical organ (SFO) neurons of rats. *Brain Res*. 査読有り、印刷中、2019 doi: 10.1016/j.brainres.2019.05.014.

(2) Kayano T, Sasaki Y, Kitamura N, Harayama N, Moriya T, Dayanithi G, Verkhatsky A, Shibuya I. Persistent  $Na^+$  influx drives L-type channel resting  $Ca^{2+}$  entry in rat melanotrophs. *Cell Calcium*. 査読有り、79:11-19. 2019 doi: 10.1016/j.ceca.2019.02.001.

(3) Warita K, Aoki R, Kitamura N, Shibuya I, Hosaka YZ. The precursor osteoblast-like cell, MC3T3-E1 cell line, enhances sodium-calcium exchanger 1 (Ncx1) gene expression by stretch stimuli prior to osteoblast differentiation. *J Vet Med Sci*. 査読有り、81(4):508-512. 2019、doi: 10.1292/jvms.18-0766.

(4) Izumisawa Y, Tanaka-Yamamoto K, Ciriello J, Kitamura N, Shibuya I. The cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration in acutely dissociated subfornical organ (SFO) neurons of rats: Spontaneous  $Ca^{2+}$  oscillations and  $Ca^{2+}$  oscillations induced by picomolar concentrations of angiotensin II. *Brain Res*. 査読有り、1704:137-149. 2019 doi: 10.1016/j.brainres.2018.10.005.

(5) Kitamura N, Nagami E, Matsushita Y, Kayano T, Shibuya I. Constitutive activity of transient receptor potential vanilloid type 1 triggers spontaneous firing in nerve growth factor-treated dorsal root ganglion neurons of rats. *IBRO Rep*. 査読有り、5:33-42. 2018 doi: 10.1016/j.ibror.2018.08.002.

(6) Matsushita Y, Kitamura N, Higuchi M, Hosaka YZ, Shibuya I. Neuron-like cells in the chick spinal accessory lobe express neuronal-type voltage-gated sodium channels.

Biomed Res. 査読有り、39(4):189-196. 2018 doi: 10.2220/biomedres.39.189.

(7) Matsushita Y, Manabe M, Kitamura N, Shibuya I. Adrenergic receptors inhibit TRPV1 activity in the dorsal root ganglion neurons of rats. PLoS One. 査読有り、13(1):e0191032. 2018 doi: 10.1371/journal.pone.0191032.

(8) Imada T, Nakamura S, Hisamura R, Izuta Y, Jin K, Ito M, Kitamura N, Tanaka KF, Mimura M, Shibuya I, Tsubota K. Serotonin hormonally regulates lacrimal gland secretory function via the serotonin type 3a receptor. Sci Rep. 査読有り、7(1):6965. 2017 doi: 10.1038/s41598-017-06022-4.

(9) 澁谷 泉, 北村 直樹, 疼痛のメカニズム～痛覚の発生・伝導機構と痛みの種類～ 臨床獣医、査読無し、34(12):8-15. 2016

〔学会発表〕(計 14 件)

(1) Yumi Matsushita, Miki Manabe, Naoki Kitamura, Izumi Shibuya. TRPV1 inhibition by  $\alpha_2$  adrenergic receptors on peripheral sensory neurons causes analgesia. FAOPS, 2019

(2) Naoki Kitamura, Erika Nagami, Yumi Matsushita, Tomohiko Kayano, Izumi Shibuya. NGF induces constitutive activity of TRPV1 triggering spontaneous firing in sensory neurons. FAOPS, 2019

(3) 泉澤有, 北村直樹, 澁谷泉. 脳弓下器官におけるアンジオテンシン II による持続性  $Ca^{2+}$  濃度上昇機構. 第 161 回日本獣医学会学術集会, 2018

(4) 高原栄美香, 北村直樹, 澁谷泉. ラット TRPV1 とその N 端欠損バリエーションとの機能比較. 第 161 回日本獣医学会学術集会, 2018.9

(5) 松下有美, 北村直樹, 樋口雅司, 保坂善真, 澁谷泉. 鶏脊髄 accessory lobe 内の神経様細胞には機能的な神経型電位依存性  $Na^+$  チャンネルが発現している. 第 161 回日本獣医学会学術集会, 2018

(6) Yumi Matsushita, Miki Manabe, Naoki Kitamura, Izumi Shibuya. Noradrenaline Inhibits Trpv1 Current Through  $\alpha_2$  Adrenergic Receptor in The Dorsal Root Ganglion Neurons of Rats. International Symposium in Veterinary Science, 2018

(7) Yumi Matsushita, Miki Manabe, Naoki Kitamura, Izumi Shibuya. Noradrenaline suppresses TRPV1 currents by activation of  $\alpha_2$  adrenergic receptors in sensory neurons. Neuroscience, 2017

(8) Yumi Matsushita, Miki Manabe, Naoki Kitamura, Izumi Shibuya. Noradrenaline inhibits TRPV1 through  $\alpha_2$  adrenergic receptors in rat dorsal root ganglion neurons (体性感覚ニューロンの TRPV1 活性に対する  $\alpha_2$  受容体を介した noradrenaline の抑制作用). The 94<sup>th</sup> Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (第 94 回日本生理学会大会), 2017

(9) 青木 亮, 中島 純一, 北村 直樹, 澁谷 泉, 割田 克彦, 保坂 善真. 伸展刺激が骨芽細胞の分化に及ぼす影響. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016

(10) 川見 明日香, 北村 直樹, 澁谷 泉. 鶏 Accessory lobe ニューロンにおける電位依存性  $Ca^{2+}$  電流の runup 現象への G 蛋白質の関与. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016

(11) 松下 有美, 真鍋 美樹, 北村 直樹, 澁谷 泉. Capsaicin 誘発電流に対する noradrenaline の抑制作用への脱リン酸化反応の関与. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016

(12) 大荒 恵理, 中島 純一, 北村 直樹, 保坂 善真, 澁谷 泉. ラット視索上核および脳室周囲器官における TRPV1 の探索. 第 159 回日本獣医学会学術集会, 2016

(13)中島 純一,守屋 大樹,北村 直樹,浅野 淳,澁谷 泉.ラット視索上核ニューロンに発現する TRPV1 関連分子の機能解析.第 159 回日本獣医学会学術集会,2016

(14)真鍋 美樹,松下 有美,北村 直樹,澁谷 泉. TRPV1 の抑制を介した  $\alpha_2$ adrenaline 受容体作動薬による鎮痛作用.第 159 回日本獣医学会学術集会,2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:保坂 善真

ローマ字氏名:(HOSAKA, Yoshinao)

所属研究機関名:鳥取大学

部局名:農学部

職名:教授

研究者番号(8桁):00337023

研究分担者氏名:北村 直樹

ローマ字氏名:(KITAMURA, Naoki)

所属研究機関名:鳥取大学

部局名:農学部

職名:准教授

研究者番号(8桁):80301951