

令和元年6月13日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08494

研究課題名(和文) 酸素感受性TRPチャネルを介した新規脳虚血耐性機構の解明

研究課題名(英文) Roles of oxygen-sensitive TRP channels in cerebral hypoxia

研究代表者

黒川 竜紀 (Kurokawa, Tatsuki)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：40527701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳は虚血状態に弱いため、低酸素状態を素早く感知し応答することが必要である。しかし、これまで脳内における局所的な酸素分圧の感知・応答機構はまだ分かっていない。本研究では、アストロサイトに着目し、脳内低酸素応答機構の解明を目指した。大脳皮質から単離したアストロサイトにおいて低酸素刺激によりATPを放出することが確認され、このATP放出はTRPA1阻害剤AP-18処置したアストロサイトもしくはTRPA1ノックアウトマウス由来アストロサイトでは確認されなかった。このことより、大脳皮質由来アストロサイトにおいて、TRPA1が酸素センサーとして機能していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳虚血とは、脳の循環血液量が減少し、機能障害を生ずる状態である。脳は虚血状態に非常に弱いことから、低酸素状態を素早く感知し虚血状態を打破するための応答が必要である。しかし、脳内における局所的な酸素分圧の感知・応答機構はまだ分かっていない。本研究では、脳内において酸素感受性イオンチャネルであるTRPA1チャネルが、酸素センサーとして働いていることを見出した。本研究の成果は、虚血性細胞障害に対する治療戦略を考える上で、標的にすべき細胞、分子を明確にすることが求められていることから、疾病の予防・治療戦略の確立にも影響を与えると予想される。

研究成果の概要(英文)：The brain is highly vulnerable to O₂ deprivation. It is understood that specialized O₂-sensing elements have evolved to monitor and ensure adequate oxygenation of the arterial blood supplying the central nervous system (CNS) with O₂. However, peripheral chemoreceptors are unable to directly monitor local pO₂ changes, which results from variable levels of neuronal activity or blood perfusion within CNS. Here, we have found that oxygen-sensitive TRPA1 channels is activated by hypoxia in astrocytes. This induces Ca²⁺ influx that triggers release of ATP from astrocytes to potentiate the activity of the respiratory center. These results suggest that astrocytic TRPA1 plays a specific role in hypoxia adaption of respiratory depth.

研究分野：生理学

キーワード：イオンチャネル 低酸素応答 TRPチャネル カルシウム

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

1. 研究開始当初の背景

酸素 O_2 は、我々好気性生物の生存に必須の物質である。特に脳は、数分の虚血状態でも死に至ることから酸素がない状態に非常に弱い器官である。脳がこのような緊急事態に対応するためには、体内に取り込む O_2 の分圧を鋭敏に感知し、組織への O_2 の供給を迅速に制御する機構が必要である。旧来より、生体における O_2 分圧の感知には動脈の血中 O_2 濃度を感知する頸動脈小体のグロムス (glomus) 細胞が重要であると考えられてきた。グロムス細胞では、複数の経路を介して低酸素環境が K^+ チャネルの活性を抑制することで脱分極によるグロムス細胞からの神経伝達物質放出を促す。この酸素濃度情報が中枢へと伝わることにより、呼吸・心機能・血流が増進すると考えられている。しかし、頸動脈小体以外では、気管、肺、心臓において感覚神経や迷走神経が低酸素環境あるいは虚血時の組織における O_2 の低下を感知することが報告されているが、その重要性は十分には認識されていない。

近年、脳における酸素受容器としてアストロサイトが注目されている。アストロサイトは、神経伝達物質の取り込みやシナプス周辺のイオン環境など脳の環境を適切に維持する一方で、神経細胞と脳血管の双方に接して神経伝達や脳血流といった脳の重要な機能を制御している。これらの制御にはアストロサイト内の Ca^{2+} 濃度上昇が重要であり、例えば Ca^{2+} 濃度上昇によりグルタミン酸、アデノシン三リン酸 (ATP)、D-セリンを放出したり、血管拡張因子を作り出したりすることにより、脳内の血流の増加や減少を調節していると考えられる。しかし、これまでの研究では、酸素センサーの実体を含むアストロサイトにおける脳内酸素濃度感知機構については不明である。

TRP (Transient Receptor Potential) チャネルは、各々が特徴的な活性化の物理的・化学的感受性を示すセンサーチャネル群である。これまでの研究で、TRPA1 は高い酸化感受性を示し、低酸素もしくは高酸素刺激に応じて活性化されることや、TRPA1 が迷走神経における酸素センサーとして、体外の低酸素あるいは高酸素環境に呼吸機能を適応させることが報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、アストロサイトにおける TRP チャネルを介した脳内低酸素応答機構の解明を目指す。そのために、TRP チャネル欠損マウスを有効利用し、以下の項目を中心に研究を展開することで、低酸素環境の感知から応答まで理解を深める。

(1) 酸素センサー分子の同定

アストロサイトの酸素センサーとして、TRPA1 を第一候補として研究は始める。TRPA1 欠損マウスを用いて、アストロサイトにおける低酸素応答を比較することで、酸素センサー分子の同定を行う。TRPA1 が酸素センサーでない場合は、TRPM7 など他の TRP チャネルに照準を変える。TRPM7 は無酸素かつグルコースを除去させた状態では、細胞が産生する活性酸素種や活性窒素種によって TRPM7 が活性化されることにより細胞死が引き起こされることが報告されている。

(2) 低酸素刺激によるグリオトランスミッター放出機構

アストロサイトでは、グルタミン酸、ATP、D-セリンなど様々な生理活性物質 (グリオトランスミッター) を放出することが知られており、周辺のニューロンと双方向的にシグナル伝達物質を放出することで、低酸素刺激に応じて直接呼吸調節を行っている可能性が考えられる。そこで、TRP 欠損マウスでは、グリオトランスミッターの放出や各種生成物質にどのように影響を与えるか評価する。

(3) 低酸素刺激による脳血流制御機構

アラキドン酸から産生されるエポキシエイコサトリエン酸 (epoxyeicosatrienoic acid: EET) やプロスタグランジン E2 (prostaglandin E2: PGE2) など細動脈血管拡張に結びつくメディエーターの放出に着目し、アストロサイトによる直接的脳血流制御を解明する。

(4) 低酸素応答における遺伝子発現機構

TRP 欠損マウスにおいて、赤血球増殖 (erythropoietin: EPO など) や血管新生 (vascular endothelial growth factor: VEGF など)、解糖系の亢進 (lactate dehydrogenase A: LDHA など) など、支配遺伝子について発現や機能を評価する。

3. 研究の方法

アストロサイトにおける低酸素環境感知・応答機構について解明するため、酸素センサー分子の同定、低酸素刺激によるグリオトランスミッター放出機構、低酸素刺激による脳血流制御機構、低酸素応答における遺伝子発現機構の4つの課題について研究を進める。基本的には、TRP 欠損マウスを用いて、アストロサイトにおける低酸素応答や放出物質を野生型と比べることで研究を進める。酸素センサーとしては TRPA1 をターゲットして始めるが、進行具合によっては TRPM7 もターゲットして研究を進める。

(1) 酸素センサー分子の同定

アストロサイトにおける酸素センサー分子の同定について、TRP チャネルを中心に行う。まず、マウスより単離したアストロサイトにおける TRPA1 の発現を RT-PCR およびウェスタンブロット法により確認する。また、TRPA1 に特異的な活性化剤 (AITC など) や阻害剤 (AP-18 や HC-030031 など) を用いて細胞内 Ca^{2+} イメージング法および電気生理学的手法により、ア

ストロサイトにおける TRPA1 の機能的な発現を確認する。次に、低酸素刺激に応じた TRPA1 の活性化を細胞内 Ca^{2+} イメージング法および電気生理学的手法により評価する。低酸素刺激は、予め N_2 ガスにより酸素分圧が 10% に制御された溶液を用いる。TRPA1 が酸素センサーでない場合は、TRPM7 について評価する。TRPM7 は低酸素環境を感知し、細胞内に Mg^{2+} を透過することが知られている。

(2) 低酸素刺激によるグリオトランスミッター放出機構

代表的なグリオトランスミッターであるグルタミン酸、ATP、D-セリンについて、TPRA1 欠損マウスを用いて、低酸素刺激における放出を評価する。グルタミン酸や D-セリンは NMDA 型グルタミン酸受容体に、ATP は代謝型 ATP 受容体 (P2X 受容体) 活性化を介してシナプス伝達を制御する。グリオトランスミッターの放出は、低酸素培養後各種アッセイキットを使う方法やガス制御装置を装備したプレートリーダーを用いて、TRP 欠損マウスを評価する。

(3) 低酸素刺激による脳血流制御機構

言語など様々な活動によって、大脳皮質で局所的に血流が増加することが知られているが、ニューロンは血管に直接接していないため、この反応には直接関わっていないと考えられる。一方、ニューロンからグルタミン酸を受け取ったアストロサイトは、 Ca^{2+} 濃度振動を起こし、血管に接している周囲のアストロサイトへ伝播することで血管を拡張させる。本研究では、低酸素刺激に応じて酸素センサーより細胞内に流入した Ca^{2+} により血管が拡張されると仮定し、そのシグナル経路の解明を目的とする。まずは TRP 欠損マウスを用いて、アラキドン酸から産生されるエポキシエイコサトリエン酸 (epoxyeicosatrienoic acid: EET) やプロスタグランジン E2 (prostaglandin E2: PGE2) など細動脈血管拡張に結びつくメディエーターの放出に着目する。

(4) 低酸素応答における遺伝子発現機構

低酸素に曝露されると、赤血球増殖 (erythropoietin: EPO など) や血管新生 (vascular endothelial growth factor: VEGF など)、解糖系の亢進 (lactate dehydrogenase A: LDHA など) などに関連するタンパク質が誘導される。この遺伝子発現には、低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible factor: HIF) が中心的な役割をしており、プロリン水酸化酵素 (prolyl hydroxylase: PHD) を酸素センサーとして HIF は低酸素環境下で細胞内に誘導され転写因子として機能する。本研究では、まず PHD 非依存的な HIF 制御の可能性を確かめるために、TRP 欠損マウスのアストロサイトにおいて、低酸素曝露時の HIF 関連タンパク質の発現について RT-PCR やウェスタンブロット法により解析する。また、HIF 関連タンパク質以外の発現を確認するため、野生型と TRP 欠損マウスのアストロサイトにおいてマイクロアレイ解析により、網羅的に新規関連遺伝子の探索を行う。

4. 研究成果

平成 28 年度は、アストロサイトの酸素センサーとして、TRPA1 が機能しているかをマウスのアストロサイト細胞株 C8-D1A 細胞を用いて検証した。RT-PCR 法により、C8-D1A 細胞に TRPA1 が発現していることを確認した。また、細胞内 Ca^{2+} イメージング法により、TRPA1 の特異的な活性化剤である AITC による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が確認され、さらにこれは TRPA1 の特異的な阻害剤である AP-18 により阻害されたことから、C8-D1A 細胞には機能的な TRPA1 が発現していることが確認出来た。次に、10% O_2 により低酸素刺激を行うと、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が確認され、さらに AP-18 により阻害されたことから、C8-D1A 細胞において TRPA1 は酸素センサーとして働き、細胞内へ Ca^{2+} シグナルを伝えることが解明された。同様の現象は、マウスより単離したアストロサイトでも観察され、TRPA1KO マウスより単離したアストロサイトでは低酸素刺激による、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が確認されなかった。

平成 29 年度は、マウスの大脳皮質から単離したアストロサイトにおいて、TRPA1 が酸素センサーとして機能しているかを検証した。低酸素刺激を行うと細胞内 Ca^{2+} イメージング法において細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が確認され、さらにこれは TRPA1 の特異的な阻害剤である AP-18 により阻害されたことから、大脳皮質由来アストロサイトには機能的な TRPA1 が発現していることが確認出来た。また、TRPA1 遺伝子を欠損させた TRPA1 ノックアウトマウスから単離したアストロサイトでは、酸素刺激に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、野生型に比べて半分になっていた。このことから、大脳皮質由来アストロサイトで TRPA1 は酸素センサーとして機能しているが、TRPA1 ノックアウトマウスでは他の補償的な低酸素感知機構が働いている可能性が示唆された。さらに、大脳皮質から単離したアストロサイトにおいて低酸素刺激により ATP を放出することが確認され、この ATP 放出は AP-18 処置したアストロサイトもしくは TRPA1 ノックアウトマウス由来アストロサイトでは確認されなかった。以上のことより、大脳皮質由来アストロサイトにおいて、TRPA1 が酸素センサーとして機能していることが示唆された。

平成 30 年度は、酸素センサーである TRPA1 がミトコンドリア制御タンパク質との機能的連関により、酸素濃度依存的にミトコンドリアの活性を調節する仮説を検証した。TRPA1 が豊富に発現している後根神経節 (DRG) を用いて、内在性の TRPA1 がミトコンドリアへの局在を検討した。マウスより DRG を急性単離し、TRPA1 抗体を用いて免疫染色を行うと、ミトコンドリアに TRPA1 由来のシグナルを確認することが出来た。次に、ミトコンドリア局在型 Ca^{2+} インジケーターやミトコンドリア膜電位測定色素 JC-1 を用いることにより、TRPA1 はミトコンドリア呼吸鎖構成タンパク質と複合体を形成することで、ミトコンドリア内への Ca^{2+} 取り込

み・放出経路として機能していることが明らかとなった。さらに、ミトコンドリア局在型の活性酸素種 (ROS) センサーを用いることにより、TRPA1 はミトコンドリア内の ROS 産生に係ることが示唆された。最後に、TRPA1 による代謝制御を調べるために、ピルビン酸脱水素酵素(PDH)のリン酸化を評価したところ、TRPA1 チャンネルを介した Ca²⁺流入が PDH の活性を制御することが示唆された。以上より、TRPA1 がミトコンドリア局在タンパク質と相互作用することで、ミトコンドリアの Ca²⁺取り込み・放出を担う分子として働き、ROS 産生やエネルギー代謝変換などミトコンドリアを機能的に制御する可能性が明らかとなった。

以上より本研究では、脳内において酸素感受性イオンチャンネルである TRPA1 チャンネルが、酸素センサーとして働いていることを見出した。本研究の成果は、虚血性細胞障害に対する治療戦略を考える上で、標的にすべき細胞、分子を明確にすることが求められていることから、疾病の予防・治療戦略の確立にも影響を与えると予想される。本研究では、研究代表者が途中で異動したため、研究期間中にすべての課題を行うことが出来なかった。今後は、課題 (3) と (4) を進め、「アストロサイトにおける TRP チャンネルを介した脳内低酸素応答機構」の全体的な理解へつなげていく。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)すべて査読有

Liu Y, Wang P, Ma F, Zheng M, Liu G, Kume S, Kurokawa T, Ono K. Asparagine-linked glycosylation modifies voltage-dependent gating properties of CaV3.1-T-type Ca²⁺ channel. *J. Physiol. Sci.* 69, 335-343 (2019) doi: 10.1007/s12576-018-0650-4

Horton JS, Shiraishi T, Alfulajj N, Small-Howard AL, Turner HC, Kurokawa T, Mori Y, Stokes AJ. TRPV1 is a component of the atrial natriuretic signaling complex, and using orally delivered antagonists, presents a valid therapeutic target in the longitudinal reversal and treatment of cardiac hypertrophy and heart failure. *Channels*, 13, 1-16 (2019) doi: 10.1080/19336950.2018.1547611

Kurokawa T*, Kiyonaka S*, Nakata E, Endo M, Koyama S, Mori E, Tran NH, Dinh H, Suzuki Y, Hidaka K, Kawata M, Sato C, Sugiyama H, Morii T, Mori Y. DNA origami scaffolds as template for functional tetrameric Kir3 K⁺ channels. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 57, 2586-2591 (2018) *)Contributed equally to this work doi: 10.1002/anie.201709982

Numata T, Tsumoto K, Yamada K, Kurokawa T, Hirose S, Nomura H, Kawano M, Kurachi Y, Inoue R, Mori Y. Integrative approach with electrophysiological and theoretical methods reveals a new role of S4 positively charged residues in PKD2L1 channel voltage-sensing. *Sci. Rep.* 7, 9760 (2017) doi: 10.1038/s41598-017-10357-3

Hirano M, Takada Y, Wong CF, Yamaguchi K, Kotani H, Kurokawa T, Mori MX, Snutch TP, Ronjat M, Waard M, Mori Y. C-terminal splice variants of P/Q-type Ca²⁺ channel CaV2.1 α 1 subunits are differentially regulated by Rab3-interacting molecule proteins. *J. Biol. Chem.* 292, 9365-9381 (2017) doi: 10.1074/jbc.M117.778829

Mori Y, Takahashi N, Kurokawa T, Kiyonaka S. TRP channels in oxygen physiology: distinctive functional properties and roles of TRPA1 in O₂ sensing. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 93, 464-482 (2017) doi: 10.2183/pjab.93.028

Ogawa N, Kurokawa T, Fujiwara K, Polat OK, Badr H, Takahashi N, Mori Y. Functional and structural divergence in Human TRPV1 channel subunits by oxidative cysteine modification. *J. Biol. Chem.* 291, 4197-4210 (2016) doi: 10.1074/jbc.M115.700278

Sakata S, Miyawaki N, McCormack TJ, Arima H, Kawanabe A, Ozkucur N, Kurokawa T, Jinno Y, Fujiwara Y, Okamura, Y. Comparison between mouse and sea urchin orthologs of voltage-gated proton channel suggests role of S3 segment in activation gating. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 2972-2983 (2016) doi: 10.1016/j.bbame.2016.09.008

[学会発表](計8件)

Tatsuki Kurokawa. DNA origami scaffolds as templates for Kir3.1/3.4 heterotetrameric channels. The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会) (2019)

黒川竜紀. シス테인酸化修飾による TRPV1 チャンネル活性化機構. 第13回トランスポーター研究会年会(招待講演) (2018)

南瞭子, 黒川竜紀, 山口香織, 高橋重成, 森泰生. 胎盤での酸素センシングにおける TRPA1 チャンネルの寄与. 第95回日本生理学会大会 (2018)

Tatsuki Kurokawa, Makoto Uchiyama, Tasuku Kimura, Nozomi Ogawa, Masanori Tohnishi, Hiroshi Takeshima, Itaru Hamachi, Shigeki Kiyonaka and Yasuo Mori. Characterization of protein domains important for the flubendiamide action in the

lepidopterous ryanodine receptors. 20th International Symposium on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease (国際学会) (2017)

黒川竜紀, 白石拓也, 浜野智, 高橋重成, Maximillian Ebert, 坂口怜子, 森泰生. 酸素センサーチャンネル TRPA1 によるミトコンドリア機能制御の機構解明. 生理学研究所研究会 (2017)

小川臨, 黒川竜紀, 藤原研司, Onur Kerem Polat, Heba Badr, 高橋重成, 森泰生. システイン酸化修飾による TRPV1 チャンネルサブユニットの構造的・機能的制御. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術大会 (招待講演) (2016)

黒川竜紀, 内山誠, 木村祐, 森恵美子, 清中茂樹, 森泰生. リアノジン受容体を中心としたジアミド系殺虫剤抵抗性獲得機構の解明. 第 89 回日本生化学会大会 (2016)

黒川竜紀, 小川臨, 藤原研司, Onur Kerem Polat, Heba Badr, 高橋重成, 森泰生. システイン酸化修飾による TRPV1 チャンネルの構造的・機能的多様性. 第 94 回日本生理学会大会 (2017)

〔図書〕(計 1 件)

黒川竜紀, 森泰生. レドックス状態変動への生体適応を担う TRP チャンネル 実験医学増刊「レドックス疾患学」 36, 685-691 (2018)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ: <http://www.med.oita-u.ac.jp/pathophysiology/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。