

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：31602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659321

研究課題名(和文) 侵害性機械刺激受容体の同定とトランスジェニックフライを用いた機能解析

研究課題名(英文) Identification of frog cutaneous nociceptors and functional analysis of them using transgenic flies

研究代表者

古山 昭 (FURUYAMA, Akira)

奥羽大学・歯学部・助教

研究者番号：80364454

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カエルではカプサイシンによって機械性痛覚過敏のみが誘導され、熱刺激に対しては痛覚過敏が誘導されないことを明らかにした。P2X受容体拮抗阻害剤の皮下投与により、カプサイシン誘導性の機械性異所痛が抑制されたことから、ATP-P2X受容体システムがカエル機械性痛覚過敏誘導において重要な役割を果たすことが示唆された。ハエ味覚ニューロンに微小機械刺激を加えるためのナノ振動刺激装置を作成した。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was revealed that capsaicin induces mechanical allodynia but does not induce thermal allodynia in frog. It was suggested that ATP-P2X system might play an important role in induction of mechanical allodynia in frog, because P2X antagonist suramine blocked capsaicin-induced mechanical allodynia. We devised the nano oscillating impression equipment which used the elastic hinge mechanism to apply minute mechanical stimulation for taste organs (taste hairs) of the fly.

研究分野：行動生理学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：機械性侵害受容体 ショウジョウバエ カエル TRPV1 TRPV4

1. 研究開始当初の背景

(1) 種々の TRP チャンネルホモログが侵害刺激受容体として機能していることが明らかにされつつある。しかし、侵害性機械刺激に対する受容体については、TRPV1、TRPV4 等が候補として挙げられているものの特定には至っていない。

(2) カエルでは TRPV1 や TRPV4 とは異なる受容体が、侵害性機械刺激およびカプサイシンの受容体として機能していることが強く示唆される。

2. 研究の目的

カエル侵害性機械刺激受容体候補遺伝子をクローニングし、その遺伝子を強制発現させたショウジョウバエ味覚器に機械刺激を加えて応答を確認する。侵害性受容体を含む種々の機械刺激受容体の応答閾値を刺激強度 - 周波数平面にマッピングし、機械刺激弁別の分子的基礎を解明する。

3. 研究の方法

(1) ネットアイツメガエル (*X. tropicalis*) 背根神経節から完全長 cDNA ライブラリを作成する。

(2) この cDNA ライブラリから、カプサイシン感受性を手がかりにした機能的スクリーニングにより、侵害性機械刺激受容体候補遺伝子を単離する。

(3) ショウジョウバエ味覚器を用いた機械刺激受容体の機能評価実験系を確立する。

(4) 2 で得られた侵害性機械刺激受容体候補遺伝子が真に機械受容器であることを、3 で開発した評価実験系で確認し、その応答閾値を刺激強度 - 周波数平面にマッピングする。

(5) カエルの痛覚反応は押しつけるとフィラメント特異的な荷重が先端部にかかる Fon Frey フィラメントで足の裏を刺激することによって行った。刺激は最大 10 回連続で行い、1 回目の刺激で払いのけ反射が生じた場合は Response score として 10 点を加え、2 回目で応答した場合は 2 点、以下反応が生じる刺激回数が増えるごとに Response score を 1 点ずつ減らし、10 回の刺激でも応答がない場合を 0 点とした (図 1)。

4. 研究成果

(1) カエルではカプサイシンによって機械性痛覚過敏のみが誘導され、熱刺激に対しては痛覚過敏が誘導されないことを明らかにした。

カプサイシン投与後の機械性痛覚過敏

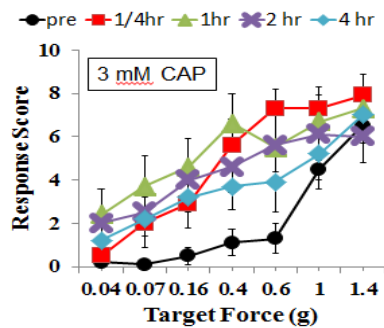


図 1.カプサイシン投与による機械性痛覚過敏

(2) P2X 受容体ブロッカー suramine の皮下投与により、カプサイシン誘導性の機械性痛覚過敏が抑制されたことから (図 2) ATP および P2X 受容体を介した末梢での痛覚過敏誘導システムの存在が示唆された。

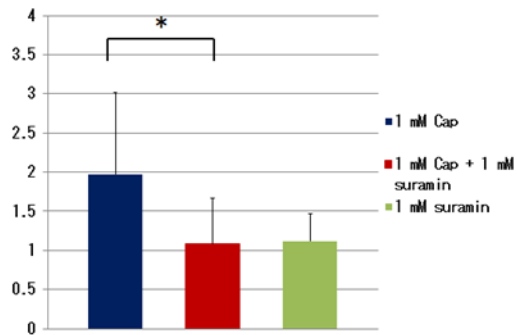


図 2 . 薬剤非投与側脚の応答を 1 とした 0.4g 刺激に対する相対応答スコア値

(3) ハエ味覚ニューロンに微小機械刺激を加えるためのナノ振動刺激装置を作成した (図 3)。刺激周波数、刺激強度を精密にコントロールするため、 piezo素子を用いて、機械刺激プロ - 簿先端を 200 nM ~ 1 μM の振幅で、100 ~ 1000Hz で駆動できるように、調整した。

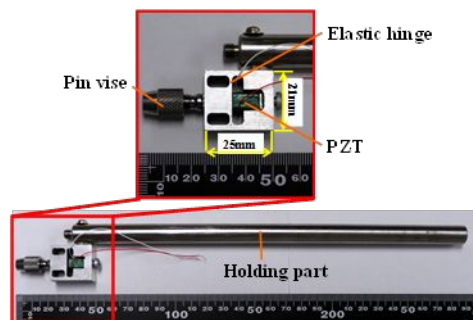


図 3 . ナノ振動刺激装置外観

(4) ハエの甘味受容体 Gr5a を発現する味覚器に UAS/GAL4 システムを用いてマウス TRPV4 を強制発現させた。RT-PCR では目的のバンドが見られ、転写は行われていることが示された。しかし、TRPV4 の選択的アゴニス

トである GSK1016790A に対してハエは嗜好性を全く示さず、TRPV4 の機能的発現は見られなかった。Gr5a ニューロンに活性化 K チャンネル Kir2.1-EGFP を発現させたところ、味細胞に EGFP の蛍光が見られ、異所性チャネルタンパク質遺伝子が翻訳過程を経てタンパク合成が行われることが示された。しかし、このハエは糖に対する吻伸展反射の閾値が野生型のハエとほぼ同じであり、活性化 K チャンネルの機能的発現は認められなかった。以上の結果より、ハエ味覚ニューロンは外部から導入した膜タンパク質遺伝子については、転写・翻訳は行われるがタンパク質の機能発現は行われないことから、味覚ニューロンにおける膜タンパク質の機能的発現にはタンパク質の翻訳後修飾が必要とされる可能性がある。パラミトイル化などの翻訳後修飾は、タンパク質の細胞膜への局在に影響することが知られている。Gr5a や Gr61a といった味覚受容体タンパク質では 5' 端に複数のシステイン残基が存在するが、このようなシステイン残基はパラミトイル化の標的部位になりやすい。今後は、マウス TRPV4 遺伝子の 5' 端をショウジョウバエ Gr5a 遺伝子と組み替えたキメラコンストラクトを作成し、TRPV4 の機能的発現を検証するなどの追加実験を行い、ショウジョウバエ味覚器に外部膜タンパク質を効率的に発現させ機能解析するための実験形構築を進める予定である。

(5) ネットアイツメガエルの cDNA から、capsaicin 感受性機械刺激受容体遺伝子を機能的にスクリーニングするには、培養細胞に遺伝子を導入し、カプサイシンに対する反応をカルシウムイメージングで測定する過程が不可欠である。しかしながら、齋藤と古山で分業の意思統一が不十分だったため、培養細胞を用いた機能的スクリーニング実験を行うことができなかった。現在、ネットアイツメガエルおよびアフリカツメガエルの TRPV1 遺伝子 TALEN を作成済みであり、ゲノム編集により TRPV1 遺伝子をノックアウトし、機械的痛覚の発生・維持における TRPV1 の機能を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) You-Hong Jin, Motohide Takemura, Akira Furuyama, Norifumi Yonehara
Pain Research and Treatment, vol. 2012, Article ID 915706, 8 pages.

(2) Adachi R, Sasaki Y, Morita H, Komai M, Shirakawa H, Goto T, Furuyama A, Isono K. J Neurogenet. 26:198-205, 2012

〔学会発表〕(計 3 件)

服部敬介、増澤徹、木村隆之、古山昭：
日本機械学会 第 25 回バイオエンジニアリング講演会、2013 年 01 月 09 日 - 11 日、つくば市
古山昭、大須賀謙二、米原典史、宗形芳英：第 54 回歯科基礎医学会学術大会、2012 年 09 月 14 日 - 16 日、郡山
Akira furuyama, Norifumi Yonehara;
日本比較生理生化学会第 34 回大会
2012 年 7 月 6 日 - 8 日 葉山

〔図書〕(計 1 件)

You-Hong Jin, Motohide Takemura, Akira Furuyama and Norifumi Yonehara;
Pain Research and Treatment, vol. 2012, Article ID 915706, 8 pages.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古山 昭 (FURUYAMA Akira)
奥羽大学・歯学部・助教
研究者番号：80364454

(2) 研究分担者

齋藤 茂 (SAITO Shigeru)
大学共同利用機関法人自然科学研究機構
(岡崎共通研究施設)・細胞生理学研究部・助教
研究者番号：50422069

磯野 邦夫 (ISONO Kunio)
東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・産学連携研究員
研究者番号：70124550

増澤 徹 (MASUZAWA Toru)

茨城大学・工学部・教授
研究者番号： 4 0 1 9 9 6 9 1

(3) 連携研究者

米原 典史 (Yonehara Norifumi)
奥羽大学・歯学部・教授
研究者番号： 7 0 1 2 4 5 3 4