

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 03 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23800035

研究課題名（和文）レドックス感受性イオンチャネルの生理的意義

研究課題名（英文）Physiological significance or redox-sensitive ion channels

研究代表者

高橋 重成 (TAKAHASHI NOBUAKI)

京都大学・先端医工学研究ユニット・助教

研究者番号：70604635

研究成果の概要（和文）：酸素（O<sub>2</sub>）は、好気性生物においてエネルギー産生源として必要不可欠であるが、同時に毒性をも示す。そのため、生体には呼吸活動を介して外界 O<sub>2</sub> の取り込みを厳密に制御するシステムが備わっている。しかし、生体内 O<sub>2</sub> センサーの分子実体は未だ明らかにされていない。申請者らは transient receptor potential (TRP) チャネルの酸化感受性を網羅的に評価した結果、TRPA1 チャネルが極めて高い酸化感受性を示すことを明らかにし、また比較的穏やかな酸化剤である O<sub>2</sub> によって活性化することを見出した。興味深いことに、TRPA1 の O<sub>2</sub> に対する容量反応曲線は逆ベル型を示しており、高 O<sub>2</sub> および低 O<sub>2</sub> 刺激によって活性化する。高 O<sub>2</sub> による TRPA1 の活性化にはシステイン残基の酸化が重要であり、また低 O<sub>2</sub> による活性化にはプロリン水酸化酵素の阻害が関与する。Trpa1 遺伝子欠損マウスを用いた実験により、本マウスでは高 O<sub>2</sub> ガスおよび低 O<sub>2</sub> ガス吸入に伴う呼吸反射が抑制されており、その結果として高 O<sub>2</sub> 障害である急性肺障害や低 O<sub>2</sub> 障害である肺高血圧症がさらに悪化した。このように、TRPA1 は生体内 O<sub>2</sub> センサーとして機能し、体内に取り込む O<sub>2</sub> 供給量を調節していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Oxygen (O<sub>2</sub>) intake is tightly controlled to minimize the risk of oxidative damage while securing energy production in aerobic organisms. The O<sub>2</sub> sensors for respiratory mechanisms to protect against O<sub>2</sub> toxicity, however, are still elusive. Our systematic evaluation of redox sensitivity of TRP cation channels reveals that the TRPA1 channel senses O<sub>2</sub> availability. Hyperoxia sensing is based upon disparate mechanisms: while prolyl hydroxylases (PHDs) exert O<sub>2</sub>-dependent inhibition on TRPA1 activity in normoxia, direct O<sub>2</sub> action overrides the inhibition via the prominent sensitivity of TRPA1 to cysteine-mediated oxidation in hyperoxia. Interestingly, in hypoxia, TRPA1 is activated through relief from the same PHD-mediated inhibition. In Trpa1-deficient mice, ventilatory responses to hyperoxia and hypoxia are severely impaired. As a consequence of their defects, pulmonary inflammation and hypertension are abnormally induced in normoxia, and are aggravated in hyperoxia and hypoxia, respectively. Thus, TRPA1 is an O<sub>2</sub> sensor that regulates O<sub>2</sub> supply *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：神経化学・神経薬理学

キーワード：TRP チャンネル、酸素

### 1. 研究開始当初の背景

分子状酸素 ( $O_2$ ) の発見者のひとりである Joseph Priestley は、“For as a candle burns much faster indephlogisticated than incommon air, so we might live out too fast, and the animal powers be too soon exhausted in this pure kind of air.” という名文を残している。即ち、 $O_2$  が我々の生命活動に必要不可欠である一方、毒性をも示すことを 18 世紀後半に彼は既に認識していたのである。その後の研究により、生体に取り込まれた  $O_2$  は ATP 産生に重要な電子伝達系にて最終電子受容体として働くだけでなく、一部が過酸化水素などの活性酸素種に変化する「 $O_2$  毒性」をも示すことが明らかになった。このような  $O_2$  の示す生理的両義性に対応するために、好気性生物は体内に取り込んだ  $O_2$  の分圧を鋭敏に感知し、組織への  $O_2$  供給を精密に制御する仕組みを備えている。

哺乳動物における血中  $O_2$  濃度の感知には、頸動脈分岐部に存在する頸動脈小体のグロムス細胞が重要であると考えられてきた。グロムス細胞における低  $O_2$  感受機構としては、 $BK_{Ca}$ 、 $TASK$ 、 $K_V$  などの  $K^+$  チャンネルの関与が報告されている。低  $O_2$  状態においてこれらの  $K^+$  チャンネルは活性が抑制され、外向き  $K^+$  電流が減少すると細胞膜が脱分極し、電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルを介した細胞内への  $Ca^{2+}$  流入が誘導される。その結果、グロムス細胞からドーパミンなどの神経伝達物質が放出され、頸動脈洞神経を興奮させる。この求心性の情報が呼吸中枢である延髄において統合され、横隔神経を介した呼吸活動が促進する。 $K^+$  チャンネルの低  $O_2$  感受機構には、Heme oxygenase により産生される一酸化炭素 (CO)、ATP、活性酸素種、硫化水素等、複数報告されているが、未だにどの機構が支配的な役割を果たしているのかは明らかになっていない。

全身に張り巡らされている感覚神経および求心性迷走神経は、温度や血圧の変化など様々な生体内外の情報をモニターすることにより、生体の恒常性を維持している。特に、気管や肺あるいは虚血時の心臓における  $O_2$  濃度の低下はこれらの末梢神経が感知するという報告がなされている。しかし、末梢神経における  $O_2$  感受機構は未だに謎が多く、その多くは明らかにされていない。

原初的な生物においては、 $O_2$  毒性を避ける応答・行動様式（「 $O_2$  忌避」）が知られている。例えば、線虫では感覚神経を介して高  $O_2$  状

態を感知し、忌避する。また、昆虫においては  $O_2$  毒性を低減させるため、断続的な呼吸様式をとり、体内に取り込む  $O_2$  供給量を調節している。しかし、無脊椎動物に比べると、脊椎動物においては全くと言って良いほど高  $O_2$  感受機能に関する研究が進められていない。このように、脊椎動物における高  $O_2$  感受機能を担う分子実体の探索は酸素生物学におけるフロンティア領域である。

*trp* (transient receptor potential) は受容器電位変化が一過的 (transient) であるショウジョウバエ変異株の原因遺伝子として同定された。以来、脊椎動物に多くの *trp* 遺伝子産物 TRP のホモログが発見され、相同性から 6 つのファミリー [canonical (C), vanilloid (V), melastatin (M), polycystic kidney disease (P), mucolipin (ML), ankyrin (A)] に分類されている。TRP はホモあるいはヘテロ四量体形成によりイオンチャンネルを形成すると考えられている。TRPC ファミリーはショウジョウバエ TRP と最も相同性が高いグループであり、チャンネル活性化は受容体刺激後によるホスホリパーゼ C の活性化と関連する。TRPV ファミリーは唐辛子の辛み成分であるカプサイシンに反応して活性化する TRPV1 およびそのホモログである。このファミリーの一部は熱による温度上昇、pH や浸透圧の変化などの物理的・化学的な刺激で活性化されるという特徴を共有している。TRPM ファミリーはメラノーマ (悪性黒色腫) 細胞の腫瘍の悪性度に反比例して発現量が減少する TRPM1 およびそのホモログである。TRPM8 は TRPV ファミリーとは対照的に低温あるいはそれを模倣する化合物であるメントールで活性化される。TRPA ファミリーは、アミノ末端に多くのアンキリンリピート構造を有する。哺乳動物種においては今のところ 1 種類の TRPA ファミリー (TRPA1) しか同定されておらず、マスタードオイルなどに含まれる刺激性化学物質や低温により活性化される。感覚神経及び迷走神経の末梢側神経終末に発現する TRPV1 と TRPA1 は、内因性炎症関連物質や外因性侵害物質を感知し、疼痛、咳、呼吸活動の変化などの生体防御反応を惹起させることが知られている。このように、TRP チャンネルは細胞内外の様々な物理的あるいは化学的变化を感知するセンサーとして機能しているチャンネルである。

申請者らは数種類の TRP チャンネルが酸化剤によって活性化すること、またこれらの TRP チャンネルはそれぞれ特有の酸化還元電

位を感知することを見出している(Yoshida *et al. Nature Chem. Biol.* 2006; Takahashi *et al. Channels* 2008)。中でも TRPA1 が極めて高い酸化感受性を有することに着目して、比較的穏やかな酸化剤である O<sub>2</sub> によっても活性化することを見出している。興味深いことに、TRPA1 の O<sub>2</sub> に対する容量反応曲線は逆ベル型を示しており、高 O<sub>2</sub> (> 20% O<sub>2</sub>) および低 O<sub>2</sub> (< 18% O<sub>2</sub>) によって活性化する。高 O<sub>2</sub> 状態下における TRPA1 の活性化にはシステイン残基の酸化が重要であり、また低 O<sub>2</sub> 下における活性化には O<sub>2</sub> 依存的なプロリン水酸化酵素(PHD)の阻害が関与することを見出している。

以上の研究状況を踏まえ、申請者は TRPA1 が生体における O<sub>2</sub> センサーとして機能し、体内への O<sub>2</sub> 供給を制御しているのではないかと着想した。

## 2. 研究の目的

申請者は初期的な実験から、喉頭、気管、肺に投射する神経である上喉頭神経や迷走神経に TRPA1 が発現していることを見出している。つまり生体は、頸動脈小体に加えて、このような外界と体内との境界面においても、O<sub>2</sub> 分圧の変化を感知している可能性が考えられる。本研究では wild type (WT) マウス、*Trpa1* knockout (KO) マウスを用いて、様々な *in vivo* 実験を駆使して上記仮説を実証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

具体的には以下の項目に関して評価を行った。

(1) TRPA1 が呼吸活動に与える影響の評価: TRPA1 を特異的に活性化させるような化合物をネブライザにてエアロゾル化させ、マウスに吸入させた際の呼吸活動の変化を評価した。

(2) TRPA1 が大気中の O<sub>2</sub> 分圧の変化を感知し、体内に取り込む O<sub>2</sub> の量を調整していることの証明: 吸入 O<sub>2</sub> 濃度を変化させた際の上喉頭神経活動、迷走神経活動、また呼吸活動、血中 O<sub>2</sub> 濃度の変化を測定した。

(3) 高 O<sub>2</sub> 障害、低 O<sub>2</sub> 障害の評価: 高 O<sub>2</sub> および低 O<sub>2</sub> 環境下でマウスを長期間飼育し、その際に認められる障害を評価した。

上記全ての実験には、TRPA1 阻害剤である AP18 をネブライザにてエアロゾル化させ、マウスへ吸入させるという薬理的な実験も行った。

## 4. 研究成果

### (1) 2011 年度

申請者らは様々な酸化還元電位を有するケミカルライブラリーを構築し、酸化還元電位に依存した TRP チャネルの活性化を見出している。この実験結果を基に、TRPA1 を特異的に活性化されると思われる酸化剤を吸入させ、その際の呼吸活動を測定することで、TRPA1 の呼吸活動における関与を実証した。測定方法としてはネブライザにて酸化剤をエアロゾル化させ、これを Whole Body Plethysmography (Terada *et al. J. Appl. Physiol.* 2008) に接続することで呼吸活動の変化を計測した。本測定に関しては、マウスの呼吸測定のエキスパートである桑木共之教授(鹿児島大学)との研究協力体制を確立し、共同研究を進めた。その結果、TRPA1 の特異的活性化剤である cinnamaldehyde をエアロゾル化し、WT マウスに吸入させたところ、有意な呼吸活動の減少が認められた。一方、このような減少は TRPA1 の特異的阻害剤である AP18 を同時処置することにより、減弱した。さらに、*Trpa1* KO マウスにおいても同様の実験を行った結果、cinnamaldehyde をエアロゾル化し、吸入させた際に生じる、呼吸活動の低下が有意に抑制されていた。以上のことから、気管や肺における TRPA1 の活性化は呼吸活動を負に制御することが明らかになった。

*Trpa1* KO マウスを用いて、高 O<sub>2</sub> および低 O<sub>2</sub> ガス吸入に伴う呼吸活動の変化を Whole Body Plethysmography にて評価した。その結果、WT マウスにおいては高 O<sub>2</sub> ガス吸入に伴い呼吸活動が減少した一方、*Trpa1* KO マウスではそのような減少が認められなかった。また、低 O<sub>2</sub> ガスを WT マウスに吸入させたところ、呼吸活動の増大が惹起された一方、*Trpa1* KO マウスでは 10% O<sub>2</sub> ガス吸入にともなう呼吸活動の増大は WT マウスと同等認められたが、比較的穏やかな低 O<sub>2</sub> (15% O<sub>2</sub> ガス) 吸入に伴う呼吸活動の増大が認められなかった。以上より、TRPA1 は高 O<sub>2</sub> ガス吸入に伴う呼吸活動の減少、および穏やかな低 O<sub>2</sub> ガス吸入に伴う呼吸活動の増大に重要な機能を担うことが明らかになった。

### (2) 2012 年度

高 O<sub>2</sub> および低 O<sub>2</sub> ガスを吸入させた際の上喉頭神経、迷走神経、舌咽神経活動の計測を行い、*Trpa1* KO マウスでは高 O<sub>2</sub> ガスと低 O<sub>2</sub> ガスに伴う迷走神経活動が野生型マウスに比べて有意に減少することを見出した。また、動脈血 O<sub>2</sub> 濃度を計測したところ、*Trpa1* KO マウスでは高 O<sub>2</sub> ガス吸入により血中 O<sub>2</sub> 濃度が WT マウスに比べて更に増大し、また低 O<sub>2</sub> ガス吸入により血中 O<sub>2</sub> 濃度が WT マウスに比べて更に減少した。つまり、*Trpa1* KO マウスでは体内に取り込む O<sub>2</sub> 供給量の調節が損なわれていることが示された。

本現象を更に裏付けるため、高 O<sub>2</sub> 障害、低 O<sub>2</sub> 障害の評価を行った。WT および *Trpa1* KO マウスを 90% 以上の O<sub>2</sub> 分圧下で 3 日間飼育し、高 O<sub>2</sub> 障害である急性肺障害を評価した。具体的には、気管支肺洗浄液 (BALF) 中の免疫細胞の数および肺における免疫細胞の浸潤を評価した結果、*Trpa1* KO マウスではこれら全てのパラメータが増大していた。即ち、*Trpa1* KO マウスでは急性肺障害が憎悪化していた。一方、WT および *Trpa1* KO マウスを 15% O<sub>2</sub> で約一週間程飼育し、低 O<sub>2</sub> 障害である肺高血圧症を評価した。具体的には、右心室圧、肺細動脈の肥厚を評価した結果、*Trpa1* KO マウスではこれら全てのパラメータが増大していた。即ち、*Trpa1* KO マウスでは肺高血圧症が憎悪化していた。このように、*Trpa1* KO マウスでは体内に取り込む O<sub>2</sub> 供給量の調節が損なわれているため、結果として急性肺障害や肺高血圧症が憎悪化することが明らかになった。

以上、本研究は酸化還元電位という化学物質の性質に基づき、細胞内タンパク質の特性を定量的に評価し、最終的にはマウス個体レベルにおける生理応答を評価したものである。このような方法論は今まで報告例がなく、独創的である。

低 O<sub>2</sub> を感知する器官としては頸動脈小体が最も詳細に研究されているが、低 O<sub>2</sub> を感知する部位はこれ以外にも多数存在していることが示唆されている (Howe *et al.* *J. Physiol.* 1981)。本研究では喉頭・気管という体内への入り口部分においても低 O<sub>2</sub> を感知しているのではないかと推察し、実証するものである。これは生理学上極めて大きな発見であると言える。また、体内の低 O<sub>2</sub> 化 (虚血) は疼痛など様々な病態生理に関わっていることが知られている。このため、TRPA1 の創薬への応用が期待される。

線虫、ハエにおいては (高) O<sub>2</sub> 忌避性に関して盛んに研究がなされている (Hetz *et al.* *Nature* 2005) が、哺乳動物においてはほとんど研究がなされていない。本研究は、哺乳類においても高 O<sub>2</sub> 感知が行われていることを示したものであり、進化の面でも非常に興味深い。

このように、本申請は化学物質の性質からスタートし生理機能解明に迫る研究であり、その波及効果は化学、生物学全体にまで及ぶものと期待される。

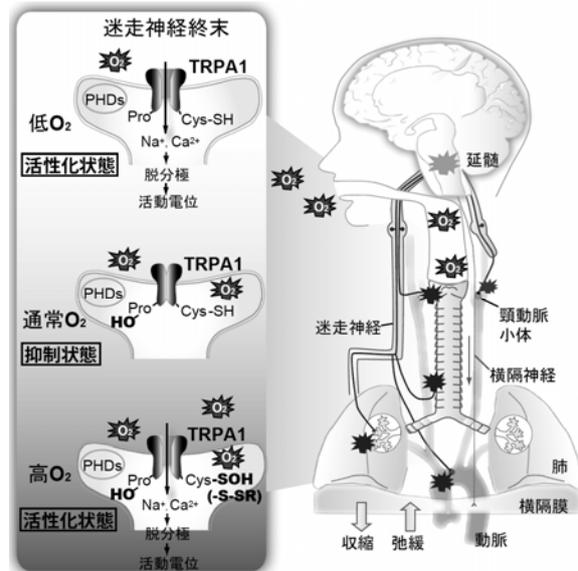


図. TRPA1 による生体内 O<sub>2</sub> センシング機構

## 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 4 件) 全て査読有

- ① Numata T, Ogawa N, Takahashi N, Mori Y. TRP channels as sensors of oxygen availability. *Pflugers Arch.* in press. <http://link.springer.com/article/10.1007%2F00424-013-1237-9>
- ② Takahashi N, Kozai D, Mori Y. TRP channels: sensors and transducers of gasotransmitter signals. *Front Physiol.* 3, 324, 2012. doi: 10.3389/fphys.2012.00324.
- ③ Takahashi N, Mori Y. TRP Channels as Sensors and Signal Integrators of Redox Status Changes. *Front Pharmacol.* 2, 58, 2011. doi: 10.3389/fphar.2011.00058.
- ④ Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S, Numata T, Kozai D, Mizuno Y, Yamamoto S, Naito S, Knevels E, Carmeliet P, Oga T, Kaneko S, Suga S, Nokami T, Yoshida J, Mori Y. TRPA1 underlies a sensing mechanism for O<sub>2</sub>. *Nature Chem Biol.* 2, 701-711, 2011. doi: 10.1038/nchembio.640.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Nobuaki Takahashi, Yasuo Mori. "Nitric-oxide directly activates TRP channels via oxidative cysteine modification", Biophysical Society 57th Annual Meeting, Philadelphia, USA, February, 4<sup>th</sup>, 2013.
- ② 高橋重成, 吉田卓史, 山本伸一郎, 眞本

達生, 飯沼ゆり子, 原雄二, 森泰生.  
「TRPC5 チャンネル複合体による  $\text{Ca}^{2+}$  動員および NO 産生の制御」 第 85 回日本生化学会大会, 福岡市, 2012 年 12 月 15 日

- ③ 高橋重成 「TRP チャンネルによる新たな生体内酸素感受機構」 岐阜薬科大学 大学院薬学研究科特別講義 (主催者: 足立哲夫), 岐阜市, 2012 年 5 月 28
- ④ Nobuaki Takahashi, Tomoyuki Kuwaki, Shigeki Kiyonaka, Tomohiro Numata, Yasuo Mori. “Sensing of  $\text{O}_2$  availability by TRPA1 regulates  $\text{O}_2$  intake”, 第 89 回日本生理学会大会, 松本市, 2012 年 3 月 30 日
- ⑤ 高橋重成, 森泰生. 「TRPA1 は体内への酸素供給を制御する酸素センサーである」 第 18 回 MPO 研究会, 熊本市, 2011 年 10 月 28 日

[図書] (計 4 件)

- ① 植田誉志史, 高橋重成, 森泰生. 「新たな酸素センサー／チャンネルによる低酸素応答制御」 *血管医学* 13, 341–349, 2012.
- ② 植田誉志史, 高橋重成, 森泰生. 「TRPA1 チャンネルを介した酸素・活性酸素種センシング」 *実験医学* 30, 2752–2759, 2012.
- ③ 高橋重成, 植田誉志史, 森泰生. 「TRP チャンネルを介する新しい酸素センシング機構」 *実験医学* 30, 1276–1282, 2012.
- ④ 高橋重成. 「TRPA1 チャンネルによる酸素感受性」 *医学のあゆみ* 241, 285–287, 2012.

[その他]

ホームページ等

<http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/mori-lab/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 重成 (TAKAHASHI NOBUAKI)

研究者番号 : 70604635