

発表番号 56 (0533)

Na Channel と Ca channel による高浸透圧感受の分子機序

鈴木 誠 (自治医科大学医学部)

水野 敦子 (自治医科大学医学部)

TRPV (Transient receptor potential vanilloid) は、熱や酸などの環境因子で活性化し、カプサイシン受容体 (VR1, TRPV1) をはじめとする Ca 透過性チャネルのファミリーである。TRPV4 は低浸透圧で活性化されるが、我々は TRPV4 欠損マウス (TRPV4^{-/-}) を作製し、欠損は脳中枢におけるバズプレッシンの分泌に異常を示す事を報告した。一方、Nax タイプの Na チャネルの中枢での分布が TRPV4 と極めて近似しており、Nax 欠損マウスでも口渇の異常が認められている。これら知見から、2種のチャネルが同一の細胞で口渇の機序に関わっている可能性が考えられる。そこで本研究では、「過剰な塩分が Nax により細胞内に取り込まれる事で細胞容積が一過性に増大し、この容積変化を感受して TRPV4 が活性化するのではないか」という仮説を検証した。

最初に、TRPV4^{+/+}、TRPV4^{-/-} マウスを用い絶水実験を行った。96時間までの血漿中浸透圧と、処置後24時間の飲水量を測定した結果、TRPV4^{-/-} では、浸透圧が若干低いものの飲水量に有意差は認められず、口渇の異

常には傾向はあるものの尿崩症ではなく SIADH 様の病態であった。次に、神経細胞由来の cell line N2A から、発現を指標に、TRPV4(+)(-)、NaX(+)(-) の組み合わせの4種類の細胞株を単離した。この株化細胞について Ca 反応性蛍光色素を用い細胞内 Ca の流入を計測した。その結果、TRPV4(+)(-) では、浸透圧物質として、Na を用いてもシュークロースを用いても、NaX の有無に関わらず、高浸透圧による細胞内 Ca の上昇を認めた。さらに機序についてシグナル伝達系の各阻害薬を用いて検討を進めた結果、高浸透圧暴露では、低浸透圧で報告されているのと同様のフォスホオリパーゼ A2 を活性化する系によって TRPV4 が活性化される可能性が示唆された。

本来低浸透圧に反応するとされてきた TRPV4 が、ある神経細胞では高浸透圧でも活性化することが明らかとなった。これは細胞容量の増大とは無関係で、Nax の存在にも依存していなかった。当初の仮説とは異なる結果が得られたが、低浸透圧でも高浸透圧でも細胞によって同じ TRPV4 が活性化するという興味深い結果が得られた。

助成番号 0533

Na channel と Ca channel による高浸透圧感受の分子機序

鈴木 誠 (自治医科大学医学部薬理学)

水野 敦子 (自治医科大学医学部薬理学)

1. 研究目的

我々は、常に体液と異なる溶液の摂取を行い、変動する環境の中で暮らしている。生体はこのような物理的な外環境の変化に、どのように対応しているかという疑問に対する分子生物学的な解答が求められている。近年までの生理学的知見から、細胞内Ca²⁺の上昇がその対応のシグナルになっている事は確実であったが、しかしそのバイオセンサーというべき分子の実体は長らく不明であった。1997年に唐辛子の辛み主成分Capsaicinの受容体(VR1)がクローニングされた⁽¹⁾。VR1は受容体と言うよりは、脂溶性物質Capsaicinに反応するCa²⁺を通す非選択性カチオンチャンネルであることから、センサーとイオンチャンネルを併せ持つバイオセンサー、彼自身の言葉を借りれば“micro-machine”とも言える。これが、熱によって活性化するCa²⁺ channelの最初の報告であろう。このVR1(正式統一名称:TRPV1)をはじめとするTRPファミリーはCa²⁺を通す非選択的カチオンチャンネル群で、動物で50種以上が知られており、シグナル伝達や、Ca、Mg代謝に関わる分子として研究が進んでいる^(2,3)。サブファミリーTRPV(Transient receptor potential vanilloid)は、N末端にアンキリン類似ドメインを、C末端側に6回膜貫通型のイオンチャンネル構造を持ち、熱、酸、浸透圧などの環境因子によって活性化しCa²⁺を通す。

TRPV4は低浸透圧で活性化されるswell-activated channelとして2000年に発表された^(4,5)。Niliusらは、アラキドン酸(AA)代謝産物のひとつ、CytochromeP450による酸化とepoxygenase (EPG)による代謝で産生される epoxyeicosatrienoic acids (EETs)、がswellによるTRPV4のシグナル伝達物質であるとしている^(6,7)。従って、AAカスケードの律速酵素 Phospholipase A₂ (PLA₂)の阻害薬 para-bromophenacyl bromide (pBPB) や、CytochromeP450の阻害薬 miconazoleで、swellによるTRPV4の活性化は阻害される。人工的脂質4 α -phorbol 12,13-didecanoate (4 α PDD)もTRPV4を直接活性化する⁽⁸⁾。これら脂肪酸を介したシグナル伝達系がTRPVでは明らかになりつつある。我々は、このTRPV4欠損(TRPV4^{-/-})マウスを作製し^(9,10)、中枢におけるバソプレッシン(AVP)の分泌に異常があることを報告した⁽¹⁰⁾。TRPV4は、脳の

浸透圧感受部位vascular organ of the lamina terminalis (VOLT), subfornical organ(SFO)に局在する⁽⁴⁾事から、体内の浸透圧調節に関わると当初から予想された。しかし、周知のようにAVPの放出シグナルは高浸透圧に反応するものであって、低浸透圧で放出されるホルモンは知られていない。我々は、TRPV4^{-/-}マウスの腹腔に高張食塩水を投与するとAVP分泌過剰でありSIADH(不適切抗利尿ホルモン分泌症候群)様の病態を示す、つまり、TRPV4が感受するシグナルはAVP放出に対して抑制的に働くと報告した⁽¹⁰⁾。その後Liedtkeらは、絶水試験の結果、TRPV4欠損マウスは尿崩症様を呈すると報告した⁽¹¹⁾。相反する結論であるが、両者ともTRPV4が低浸透圧だけでなく高浸透圧に反応する機構にも関わる可能性を示唆している。

一方、Na channel ファミリーであるNaxもSFOとOVLTに高発現しており、Nax 欠損マウスでは口渇感が喪失する事が知られている^(12,13)。Nax は NaCl の高張液により活性化して Na 電流として観察される。従って、もし両者が同じ細胞に共存するならば、高張のNaClはNaxを介して細胞内に入り、一過性に細胞容積を大きくすることができる。この細胞容積の増大=swellがTRPV4を活性化する trigger になるとすれば非常にユニークな高浸透圧感受のメカニズムが発見された事になる。そこで本研究では、“過剰な塩分が Nax により細胞内に取り込まれる事で細胞容積が一過性に増し、この容積変化を感受して TRPV4 が活性化するのではないか”、という仮説を検証した。

2. 方法

2.1 マウスモデル

12-20週オスのTRPV4^{-/-}マウスと野生型(TRPV4^{+/+})マウス、C57BL/6J系統に8世代以上の戻し交配、明期7時-21時・室温平均23°Cの室内で飼育、群飼、餌・水自由摂取、を用いた。13時から17時に飼育ケージの水びんを取り外して絶水試験開始とし、その24、48、72、96時間後に、マウスをエーテル麻酔し、大静脈より全採血し血漿(一部血清)浸透圧を浸透圧計(FISKE, One-ten)で測定した。また同様のモデル動物を用い、絶

水期間終了時にマウスを個別代謝ケージに移して餌・水を自由摂取させ、24 時間の飲水量を測定した。マウスの取扱は、自治医科大学動物取扱規約に従った。

2. 2 Nax と TRPV4 が発現している細胞株の樹立

TRPV4(+)(-) Nax(+)(-)の 4 種類の組み合わせで発現している細胞株を樹立するために、神経系の細胞株 N2A から TRPV4 と Nax の発現を PCR で確認しながらクローン細胞株を単離した。具体的には、N2A 細胞を 96well プレートに希薄に播種して培養し、シングルコロニーを採取した。各コロニーを 24well プレートに移し増殖させた後に、その一部を用いて RT-PCR 法により TRPV4 および Nax の発現を確認した。

2. 3 細胞内 Ca の測定

細胞内 Ca $[Ca]_i$ は蛍光色素 fluo-3 と fura-red の二つを用いて測定した。蛍光強度はオリンパス社 Fluoview を用いて計測した。両者の蛍光色素は AM 体として 2, 10 μ M で 30 分間培養し、蛍光強度を fluo-3/fura-red = R として測定する。この方法で、 $[Ca]_i = Kd (R_{max}-R)/(R-R_{min})$ 、 $Kd = 323 \pm 40.0$ nM、 $R_{min} = 0.13$ 、 $R_{max} = 3.0$ と計算された。浴液組成は 140 mM NaCl, 5 mM glucose, 1.0 mM CaCl₂, and 5 mM HEPES (pH 7.4) とした。浸透圧は NaCl またはマンニトールを加えて調整した。

2. 4 細胞内流入 Ca の測定

細胞を 3 μ M fura-red AM を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (low glucose) で 15 分 37°C インキュベートした。蛍光強度はオリンパス社 Fluoview を用いて計測した。浴液組成は 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.0 mM MnCl₂, 5 mM glucose, 1.0 mM CaCl₂, and 5 mM HEPES (pH 7.4) とした。浸透圧は NaCl を加えて調整した。Indomethacin, parabromophenacyl bromide (pBPB),

nordihydroguaiaretic acid (Nordy), miconazole, genistein などの薬液は DMSO またはエタノールに溶解したのち凍結保存し、使用直前に調製した。

3. 結果

3. 1 マウスを用いた脱水試験

Liedtke らが報告した⁽¹¹⁾と同様の、48 時間の絶食・絶水による口渴実験の再現を試みたが、マウスでは口渴よりも飢餓が優先されるようで、処置解除直後には餌を求めて水を渴望せず、空腹が満たされた後にはじめて飲水行動をとった。そこで、餌を自由摂取させたまま絶水にすると、口渴により水を渴望するようになった。この予備検討結果から、体重と週齢をマッチさせた 12-20 週齢の雄マウス群を用いて、明期の午後から絶水とし、24、48、72、96 時間後に全採血し血漿浸透圧を測定した。また、絶水処置後 24 時間の飲水量を測定した。この結果を Fig. 1 に示す。72 時間でのみ、血漿浸透圧に有意な差が認められたが、Liedtke らの報告⁽¹¹⁾とは異なり、TRPV4 $^{-/-}$ マウス群では対照群に比較して浸透圧はむしろ低かった。飲水量は、Liedtke らが示したように TRPV4 $^{-/-}$ 群では少ない傾向が認められたものの有意差は得られなかった。以上のことから、TRPV4 欠損マウスが尿崩症である可能性は低く、むしろ SIADH に近い病態であることが明らかとなった。しかし、口渴感 TRPV4 $^{-/-}$ マウスで若干低下している可能性は考えられる。いずれにしても TRPV4 の役割に、高浸透圧の感受、という従来知られていた低浸透圧による細胞容積の増大に反応する性質とは逆のチャネル活性化機構がありうると考えられた。

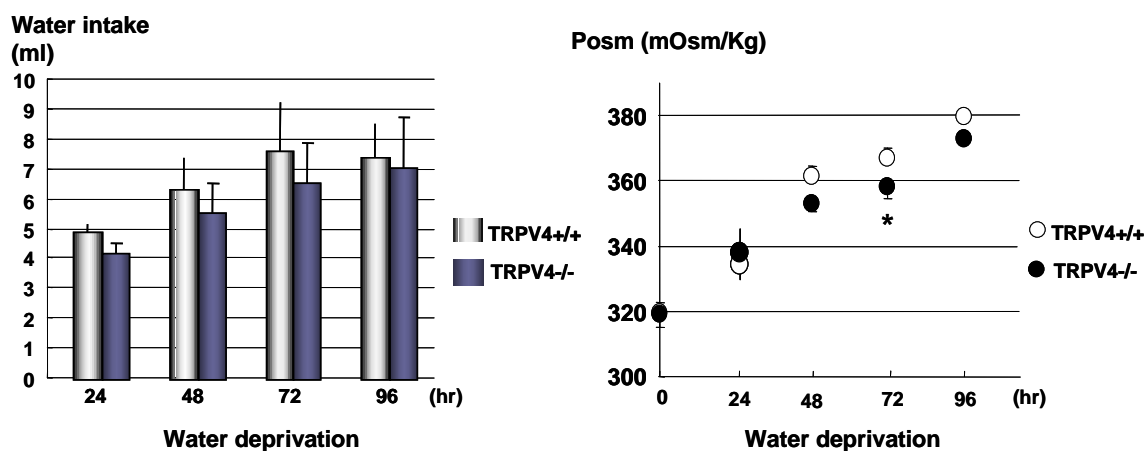


Fig. 1 Plasma osmolality and water intake after water deprivation in TRPV4 $^{+/+}$ and TRPV4 $^{-/-}$ mice.

3. 2 TRPV4 および Nax、陽性、陰性神経細胞のクローニング

高浸透圧感受における TRPV4 と Nax との役割を明らかにするために、神経細胞の cell line である N2A から、TRPV4(+)/(-) Nax(+)/(-) の組み合わせで 4 種類のクローン細胞株を単離した。その結果、TRPV4(+)細胞は活性化薬 4 α PDD により細胞内 Ca が上昇し、機能的にも TRPV4 の活性が認められた。高浸透圧 400 mOsm 下における細胞内 Ca の上昇を検討したところ、TRPV4(+)であれば Nax の存在に関わらず、細胞内 Ca の上昇が認められた。浸透圧は NaCl、シュクロースいずれで調整した場合でも Ca の上昇は同様であった。

3. 3 高浸透圧による細胞内 Ca 上昇の機序

高浸透圧感受により細胞内 Ca が上昇する機序を解明するために、細胞膜における Ca の流入を測定した。今回用いた方法では、Mn が Ca と共に細胞内に流入する事により蛍光色素の退色が観察される。4 α PDD 添加した場合を(+)のコントロール、Vehicle のみを(-)コントロールとした場合、蛍光強度の減衰には有意な差がある。この差は分散分析により、直線の明らかな屈曲として認められる。コントロール区では溶液を変えた後のこのような屈曲が認

められることは無く、本法は感度のよい優れた検出法と考えられる。また 1 分間の蛍光強度は前値に比べ 0.8 までは低下するが、この低下量も 4 α PDD 添加では 0.65 ± 0.06 ($p < 0.01$) と更に低下し統計的に有意であった。そこで、この 2 点を比較し、Ca 流入の判断とした。Fig. 2 に、TRPV4(+)Nax(-)細胞と TRPV4(-)Nax(+)細胞での蛍光色素の強度を示した。ANOVA を用い統計的に明らかな減少が認められたものを白丸それ以外を黒丸とした。高浸透圧により、Ca・Mn が TRPV4 を介して細胞内に流入するために蛍光強度は下がる。TRPV4(+)Nax(-)細胞を用いた 6 回の独立した実験で、細胞数 50 個の解析では、4 α PDD により 16 の細胞に明らかな屈曲が認められた。NaCl を用いた高浸透圧溶液では 50 個の解析のうち 20 の細胞に明らかな屈曲が認められ、有意な低下が認められた。一方、TRPV4(-)Nax(+)細胞では、同様の高浸透圧溶液で屈曲も低下もまったく認められなかった。また低浸透圧 200 mOsm に対しても減衰は認められなかった。従って、高浸透圧により細胞内 Ca が上昇する機序には、低浸透圧におけると同様に、細胞膜上の TRPV4 channel の関与が強く示唆された。

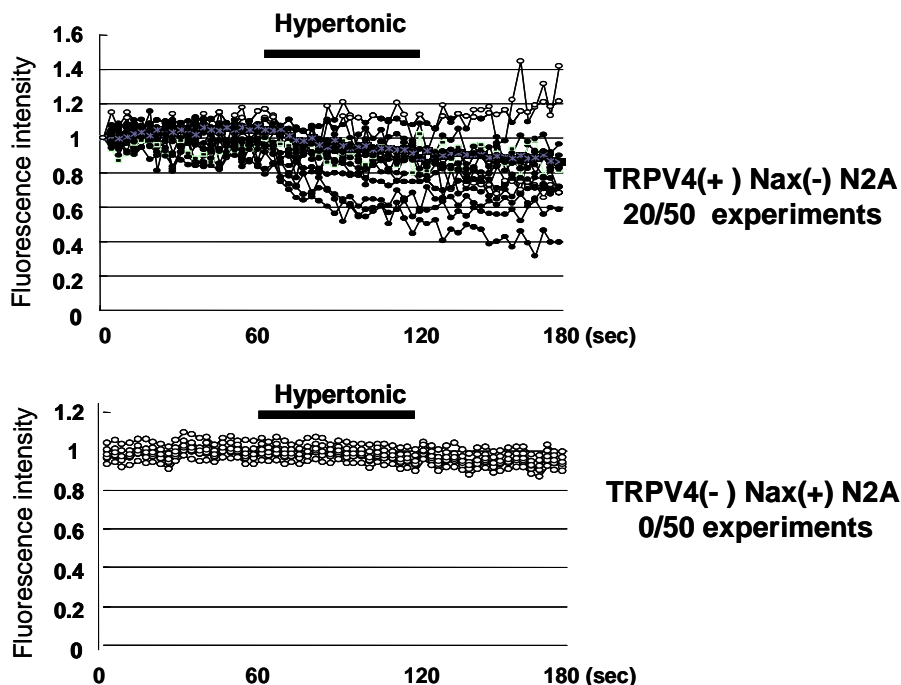


Fig. 2 Ca influx by fluorescence-quenching method with hyperosmolality in TRPV4(+)Nax(-) and TRPV4(-)Nax(+) N2A cell lines.

3. 4 高浸透圧による TRPV4 活性化の機序についての検討

低浸透圧での TRPV4 活性化のシグナル伝達系として、AA カスケード^(6,7)と、チロシンキナーゼの系⁽¹⁴⁾が有力である。TRPV4 の swell による活性化は、当初、チロシンキナーゼの阻害薬である genistein によって阻害されるという報告がなされた⁽¹⁴⁾。その後 Nilius らの精力的な研究で、この結果は否定され、AA 代謝産物が swell による TRPV4 のシグナル伝達であるとされた。従って、pBPB や miconazole により、swell による活性化は阻害される。そこで TRPV4(+)Nax(-)細胞に各阻害薬を添加して30分間インキュベートした後に Ca・Mn の流入法を用いて細胞内への Ca 流入について検討した。4αPDD を +コントロールとし、Vehicle を -コントロールとして解析した。一連の結果を Table 1 に示す。蛍光の減少率を比較すると、pBPB、miconazole、genistein は高浸透圧で低下する蛍光の減少を有意に抑制した。しかし、高浸透圧に反応して明らかな減少を示す細胞の個数については pBPB のみが阻害した。miconazole、genistein では、高浸透圧で Ca の流入が起こる細胞が残存した。これら結果から、高浸透圧による TRPV4 活性化は PLA₂ を介していることが示唆された。

Table 1 Effects of reagents on Ca influx into TRPV4(+) cells

Reagents for preincubation	Attack	Significant decrease	χ^2	Rate of decrease (mean ± SEM)	P<0.05 (ANOVA)
pBPB	Vehicle	0/50	-	0.84 ± 0.028	-
pBPB	4αPDD	18/50	s	0.72 ± 0.032	*
pBPB	Hypertonic	0/50	-	0.82 ± 0.033	-
Genistein	Vehicle	0/50	-	0.93 ± 0.019	-
Genistein	4αPDD	14/50	s	0.81 ± 0.021	*
Genistein	Hypertonic	4/50	s	0.88 ± 0.02	-
Indomethacin	Vehicle	0/50	-	0.92 ± 0.024	-
Indomethacin	4αPDD	25/50	s	0.80 ± 0.021	*
Indomethacin	Hypertonic	32/50	s	0.71 ± 0.041	*
miconazole	Vehicle	0/50	-	0.85 ± 0.022	-
miconazole	4αPDD	16/50	s	0.75 ± 0.033	*
miconazole	Hypertonic	9/50	s	0.77 ± 0.023	-
Nordy	Vehicle	0/50	-	0.82 ± 0.03	-
Nordy	4αPDD	13/50	s	0.75 ± 0.04	*
Nordy	Hypertonic	32/50	s	0.62 ± 0.032	*

4. 考 察

本研究では、体内の浸透圧調節、特に高浸透圧感受の機序における TRPV4 の役割を解明する目的で、“高張の NaCl は Nax を介して細胞内に入り、一過性に細胞容積を大きくする事ができる。この細胞容積の増大 = swell は TRPV4 を活性化し、Ca シグナルとして浸透圧調節に関わる。”という仮説を検証した。マウスの in vivo の実験結果からは、Nax 欠損マウス^(12,13)と同様に、TRPV4 欠損で口渇に異常を引き起こす可能性が示唆された。しかし、我々が以前に示したように TRPV4^{-/-}マウスでは AVP が過剰反応している⁽¹⁰⁾と考えると、口渇の低下も説明できる。また性別や週齢、遺伝的背景も注意深く一致させた今回の絶水実験では、TRPV4^{-/-}マウスの飲水量には低い傾向はあるものの統計学的に有意差が認められなかったことから、TRPV4 は口渇の機序には関わっていない可能性も考えられる。しかし一方で TRPV4^{-/-}マウスの血中浸透圧が、一部の実験群ではあるが正常マウスより若干低いことから、欠損マウスは高浸透圧に異常に反応していることが示唆された。

そこで次に、高浸透圧下で TRPV4 が局在する神経細胞がどのように反応するのかを明らかにするために、TRPV4(+)細胞と TRPV4(-)細胞の単離を試みた。ノックアウトマウスから分離した神経細胞は不均一で、一定の性質を保持した状態での維持ができないので、既存の cell line より単離を行った。用いた N2A 細胞は、マウス後根神経節細胞の腫瘍由来の細胞株で、TRPV4 の発現が期待された。実際に、細胞のサブクローニングにより TRPV4(+)細胞と TRPV4(-)細胞とを単離し得た。驚いたことに、TRPV4(+)細胞は Nax(-)であっても高浸透圧で細胞内 Ca が上昇し、一方 TRPV4(-)細胞はまったく反応しなかった。このことは神経細胞の中には高浸透圧に反応するものがあり、その反応は TRPV4 の存在にのみ依存しており、Nax とは無関係であったことになる。これは、もちろん一つのモデル系であるので、Nax の口渇への関与を否定しているものではない。

さらに興味深いことに、この高浸透圧での反応は、CHO 細胞などで強制発現させた TRPV4 が低浸透圧で活性化される機序と酷似していた。すなわち、Watanabe らがいうように⁽⁶⁾ pBPB でこの高浸透圧に対する活性は完全に抑制されるので、PLA₂ を介して TRPV4 が活性化されていると考えられる。Fig. 3 に高浸透圧が TRPV4 を活性化する機序を示した。高浸透圧は PLA₂ を活性化し、最終的には EETs を産生することで、TRPV4 を活性化する。ただし、Vrien らは genistein はまったく無効である⁽⁷⁾としているが、われわれの今回の実験では一部には抑制

効果が認められた。このことは、PLA₂活性が、AA以外のシグナル伝達系に関与している可能性が指摘されていることと合致しているかもしれない。PLA₂はMAPキナーゼを活性化するとされている。

SwellによりCaの細胞外からの流入が見られる細胞は非常に多く存在する。1980-1990年代、この理由は膜に直接かかる張力に反応したと主張する場合と、浸透圧変化で、何らかのシグナルが伝わったという結果を主張する場合があります、どちらもありえたという事が明らかになりつつある。TRPV4のswellによる活性化は、当初、チロシンキナーゼの阻害薬であるgenisteinによって阻害され、そのリン酸化部位はY253であるという報告がなされた⁽¹⁴⁾。その後Niliusらの精力的な研究で、この結果は否定され、AA代謝産物がswellによるTRPV4のシグナル伝達系であるとされている^(6,7)。AAはPLA₂やエンドカンナビノイド(アナンダミド)の刺激により生成される。アナンダミドはマリファナの受容体(CB1)の内因性刺激物質である。AAはその後サイクロオキシゲナーゼ(COX)やリポキシゲナーゼ(LOX)により、PG、LTが生成されそれぞれの受容体に作用するのはよく知られている。AAはもう一つの代謝経路CytochromeP450(CYP)による酸化も受けてさらにepoxygenaseによりepoxyeicosatrienoic acids (EETs)になる。NiliusらはこのEETsがTRPV4の活性化を起す事を示した⁽⁶⁾。従って、PLA₂阻害薬(pBPB)やCYP阻害薬miconazolでswellによる活性化は阻害される。人

工的脂質4αPDDによる活性化⁽⁸⁾も含め、これらの脂肪酸を介したシグナル伝達系がTRPV4では明らかになりつつある。

結論として、高浸透圧によってTRPV4は活性化された。その機序はNaxを経由した細胞のswellからもたらされる証拠は無く、PLA₂を介したものであった。TRPV4欠損マウスの表現型から、正常ではTRPV4が高浸透圧の刺激を受けた後にはAVP抑制に働いていると考えられた。

5. 今後の課題

TRPV4は低浸透圧にも高浸透圧にも応答するCa透過性チャネルであることが明らかとなった。欠損マウスの表現型から、TRPV4は最低限の生命維持に必須なチャネルではないが、生体内の浸透圧の調節に関わるバイオセンサーを構成している事は確実である。しかしながら、AVP分泌機構のネットワーク内でTRPV4が何処で何を感知しているのかという課題は未だ解けていない。そこで、TRPV4プロモーター下流にマーカー遺伝子を繋いだトランスジェニック動物を作製し、微細な領域でのチャネル分子の発現を増幅し可視化するアプローチが考えられる。一方、PLA₂が浸透圧感受の際のTRPV4活性化の主要な経路にあることは見出ししたが、その機序は未解明である。本研究で分離したTRPV4(+)/(-)株を用いることにより、PLA₂活性化の機序が明らかにされよう。

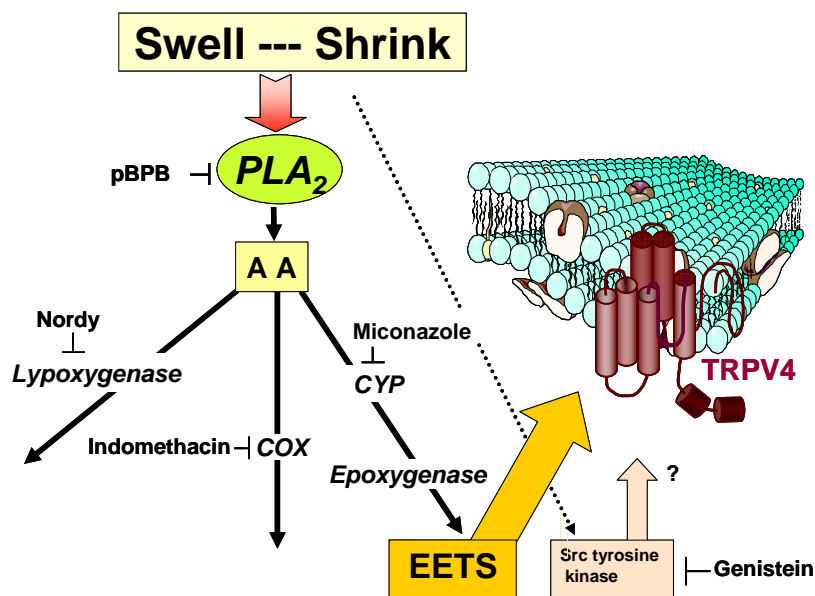


Fig. 3 Mechanism of hyperosmolality-activated Ca influx through TRPV4 channel.

参考文献

1. Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD and Julius D.(1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824.
2. Clapham DE. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426: 517-524.
3. Voets T, Talavera K, Owsianik G, and Nilius B. (2005) Sensing with TRP channels. *Nat. Chem. Biol.* 1: 85-92.
4. Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, and Heller S. (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 27: 525-535.
5. Strotmann R., Harteneck C., Nunnenmacher K., Schultz G., and Plant T.D. (2000) OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat. Cell Biol.* 2: 695-702.
6. Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, and Nilius B. (2003) Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* 424: 434-438.
7. Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Droogmans G, Voets T, and Nilius B. (2004) Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101: 396-401.
8. Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, Hayes P, Vriens J, Cairns W, Wissenbach U, Prenen J, Flockerzi V, Droogmans G, Benham CD, and Nilius B. (2002) Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J. Biol. Chem.* 277: 13569-13577.
9. Suzuki M, Mizuno A, Kodaira K, and Imai M. (2003) Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J.Biol.Chem.* 278: 22664-22668.
10. Mizuno A, Matsumoto N, Imai M, and Suzuki M. (2003) Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285: C96-101.
11. Liedtke W, and Friedman JM. (2003) Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 13698-13703.
12. Hiyama TY, Watanabe E, Ono K, Inenaga K, Tamkun MM, Yoshida S, and Noda M. (2002) Na(x) channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nat. Neurosci.* 5: 511-512.
13. Hiyama TY, Watanabe E, Okada H, and Noda M. (2004) The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Nax sodium channels for the control of salt-intake behavior. *J. Neurosci.* 24: 9276-9281.
14. Xu H, Zhao H, Tian W, Yoshida K, Roullet JB, and Cohen DM. (2003) Regulation of a transient receptor potential (TRP) channel by tyrosine phosphorylation. SRC family kinase-dependent tyrosine phosphorylation of TRPV4 on TYR-253 mediates its response to hypotonic stress. *J. Biol. Chem.* 278: 11520-11527.

0533

Osmosensing mechanism of co-operation of Nax and TRPV4 channel

Makoto SUZUKI and Atsuko MIZUNO

Molecular Pharmacology, Dept. of Pharmacology, Jichi Medical University

Summary

TRPV4 is first reported to be a “hyposmolality-sensing” cation channel. On the following studies with knockout mice (*Trpv4*^{-/-}), we have reported that response of vasopressin to hypertonicity was exaggerated but another group has reported that it was abolished in *Trpv4*^{-/-}. Although controversial in the response, both reports suggest that TRPV4 can be responsive to hypertonic stimuli. To elucidate “hyperosmolality-sensing” in TRPV4 activation, we designed to re-examine the response *in vivo* and investigate whether TRPV4 was sensitive to hyperosmolality in cultured neuronal cells. *Trpv4*^{-/-} and *Trpv4*^{+/+} mice were subjected to dehydration from 24 to 96 hrs. Then plasma osmolality and water intake were measured. There was not remarkable difference in plasma osmolality at any period of dehydration but a significant decrease in plasma osmolality of *Trpv4*^{-/-} at 72 hrs dehydration. Water-crave behavior and amount of water intakes after the dehydrations were not changed. Thus TRPV4 channel may respond to hyperosmolality. Neuronal cell lines with and without TRPV4 and Nax expression were established from the N2A cell line. Hyperosmolality (400 mOsm) induced robust Ca influx in the TRPV4 (+) cells, irrespective of the presence of Nax, while not in the TRPV4 (-) cells. The influx was not modified with indomethacin, partially blocked with genistein, miconazole, and completely blunted with pBPB, a blocker of PLA₂. Therefore, TRPV4 is hyperosmolality-sensing channel through activation of PLA₂ in neuronal cells.