

## 中枢神経細胞の TRPV1 を介した体液浸透圧機構の解明

北村 直樹

鳥取大学農学部共同獣医学科

### 概要

**【研究背景】** 哺乳動物には体液浸透圧をモニターする仕組みが備わっており、 $300 \pm 20$  mOsm/kg に厳密に調節されている。体液の恒常性を維持する上で最も重要な電解質はナトリウムイオンであり、体内でナトリウムイオン量の変動すれば体液浸透圧もそれにともなって同様に変動する。例えば、脱水時には体液中のナトリウムイオン濃度は上昇し、体液は高浸透圧となる。この体液浸透圧の変化は門脈や腸間膜に存在する末梢性浸透圧感知器に加えて中枢神経系でも感知されている。視床下部の視索上核 (supraoptic nucleus, SON) は血液脳関門の血管側に位置しており、血液の浸透圧を直接感知するセンサーとして働いていると考えられている。血漿や脳脊髄液などの細胞外液の浸透圧が上昇すると細胞は収縮し細胞容積の減少、細胞膜の変形を引き起こす。カナダの Bourque 博士らは、マウスの SON ニューロンに非選択性陽イオンチャネルである transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の N 末端が欠損したスプライスバリエント分子 ( $m\Delta$  N-TRPV1) が発現していること、このチャネルが細胞外の浸透圧の上昇に応答して活性化することから、 $\Delta$  N-TRPV1 が哺乳動物の中枢神経系における浸透圧感知分子の実体であると提唱している。TRPV1 は、N 末端と C 末端が細胞質側に存在しており細胞膜を貫通する領域が 6 つあるタンパク質であり、4 量体でイオンチャネルを構成する。我々はラットの SON ニューロンに発現する陽イオンチャネルが高浸透圧刺激による細胞収縮に応答して活性化すること、この反応が非選択的陽イオンチャネルである TRPV1 の阻害薬により抑制されること、ラット SON ニューロンにおいてもマウスのもと同様な TRPV1 の N 末端欠損バリエント ( $r$ TRPV1SON) が発現していることを見出した。さらに、human embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞に強制発現させた TRPV1 の機能を解析したところ、 $r$ TRPV1SON ではなく全長が保持された通常の TRPV1 ( $r$ TRPV1full) が浸透圧感知分子として機能していることを見出した。マウスとラットの TRPV1 分子のアミノ酸配列には 90% 以上の相同性があるので、N 末端が欠損した TRPV1 がマウスとラットで異なる機能を示すことの原因は動物種差だけでは説明できない。そこで本研究では、複数種類の N 末端変異  $r$ TRPV1 分子を人工的に作製し、その細胞生理学的、分子生理学的機能を解析することで、TRPV1 による浸透圧感知の分子機構を解明することを目的とした。

**【実験方法】**  $r$ TRPV1 の N 末端では 6 つのアンキリン様ドメイン (ANK) が 6 回繰り返している。この構造に着目し、1 つ目の ANK より N 末端側の 109 番目のプロリンまでを削った分子 ( $\Delta$  N109) と 110 番目のアルギニンまでを削った分子 ( $\Delta$  N110) をコードする DNA 作製プラスミドベクターに組み込んだ。これらの DNA を HEK293 細胞に導入しチャネルを発現させて、 $Ca^{2+}$  蛍光指示薬 Fura-2 を用いた  $Ca^{2+}$  イメージング法により細胞内  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 濃度変動を記録した。

**【実験成績】** DNA を何も導入していない HEK293 細胞に capsaicin 刺激 ( $1 \mu M$ )、高浸透圧刺激 ( $+50$  mOsm/kg) を適用しても  $[Ca^{2+}]_i$  に変動は見られなかった。 $r$ TRPV1full 発現細胞は capsaicin 刺激に対して急峻な一過性の  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇反応を示した。それらの capsaicin に応答した細胞のうち 40% の細胞は高浸透圧刺激に対しても  $[Ca^{2+}]_i$  上昇反応を示した。 $\Delta$  N109 発現細胞の中には、 $r$ TRPV1full 発現細胞と同様に、capsaicin 刺激と高浸透圧刺激の両者に応答する細胞があった。一方、 $\Delta$  N110 発現細胞では半数の細胞が capsaicin 刺激に対して  $[Ca^{2+}]_i$  上昇反応を示したが、高浸透圧刺激に反応を示す細胞は認められなかった。

**【考察・結論】** TRPV1 の N 末端では 114 および 115 番目のアルギニンが capsaicin 応答に必要であることが報告されているが、 $\Delta N109$  および  $\Delta N110$  発現細胞では rTRPV1full 発現細胞と同様に capsaicin 応答が認められたので、第 1ANK より N 末端側に capsaicin 応答やチャネルの開口にともなう構造変化に必須なアミノ酸ドメインは存在しないと考えられた。 $\Delta N109$  発現細胞では rTRPV1full 発現細胞と同様に浸透圧刺激への  $[Ca^{2+}]_i$  上昇反応が認められたが、 $\Delta N110$  発現細胞では、高浸透圧刺激に対する応答が認められなかった。すなわち、TRPV1 の浸透圧応答には 110 番目のアルギニンが必須であることが明らかになった。このアルギニンが細胞骨格との結合もしくはイオンチャネルのポアの開口に必要な立体構造の形成に関与しているかもしれない。すなわち 1 つ目の ANK が微小管などの細胞骨格と相互作用し、高浸透圧刺激時のチャネルの活性化において重要な働きを担っている可能性がある。以上の成績は、中枢神経系で浸透圧受容器としての機能的な役割を持つのは、N 端欠損バリエント TRPV1 分子ではなく全長が保持された TRPV1 であることを示唆している。

## 1. 研究目的

動物は海水中、淡水中、陸上などその棲息域に適応した機構により巧みに体液恒常性を維持している。水棲動物と比較して陸棲動物では体内への水や塩化ナトリウムをはじめとする塩類の保持が困難であるが、これらを厳密に調整し体液浸透圧を一定に保つことは生存に必要不可欠である。哺乳動物には体液浸透圧をモニターする仕組みが備わっており、常に  $300 \pm 20$  mOsm/kg に厳密に調節されている。体液の恒常性を維持する上で最も重要な電解質はナトリウムイオンであり、体内でナトリウムイオン量の変動すれば体液浸透圧もそれにもなって同様に変動する。例えば、脱水時には体液中のナトリウムイオン濃度は上昇し、体液は高浸透圧となる。この体液浸透圧の変化は門脈や腸間膜に存在する末梢性浸透圧感知器<sup>(1, 2)</sup>に加えて中枢神経系でも感知されている<sup>(3)</sup>。このような体液浸透圧感知器官がどのような機構で機能しているかを理解することは、動物の体液の恒常性維持機構を理解する上での鍵である。

体液浸透圧の恒常性を維持するための水分や塩分を摂取する行動は、体液浸透圧の変化を感知した中枢神経が調節している。視床下部の視索上核 (supraoptic nucleus, SON) は血液脳関門の血管側に位置しており、血液の浸透圧を直接感知するセンサーとして働いていると考えられている<sup>(4, 5)</sup>。In vitro で細胞が細胞外液の浸透圧が上昇するのにもなって収縮するように、体液浸透圧の変化は生体内でも細胞容積の変化、細胞膜の変形を引き起こす。Bourque 博士らの研究グループは、マウスの SON ニューロンに非選択性陽イオンチャネルである transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の N 末端が欠損したスプライ

スバリエント分子 (m $\Delta N$ -TRPV1) が発現していること、このチャネルが細胞外の浸透圧の上昇に反応して活性化することから、m $\Delta N$ -TRPV1 が中枢神経系における浸透圧感知分子の実体であると提唱している<sup>(6, 7)</sup>。TRPV1 は N 末端と C 末端が細胞質側に位置しており細胞膜を貫通する領域が 6 つ、イオンの通るポアを構成する領域が 5 番目と 6 番目の細胞膜貫通領域の間に 1 つあるタンパク質であり、これが 4 量体となりイオンチャネルを構成する。一方我々は、ラットの SON ニューロンに発現する陽イオンチャネルが高浸透圧刺激による細胞収縮に反応して活性化すること、そしてこの反応が非選択的陽イオンチャネルである TRPV1 の阻害薬により抑制されること、ラット SON ニューロンにおいてもマウスのもと同様な TRPV1 の N 端欠損バリエント (rTRPV1SON) が発現していることを見出した<sup>(8)</sup>。さらに、Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) 細胞に強制発現させたラット TRPV1 の機能を解析し、rTRPV1SON ではなく全長が保持された通常の TRPV1 (rTRPV1full) が浸透圧感知分子として機能していることを見出した (未発表)。マウスとラットの TRPV1 分子のアミノ酸配列には 90% 以上の相同性があるので、N 端が欠損した TRPV1 分子がマウスとラットで異なる機能を示すことの原因は動物種差だけでは説明できないと考えられる。そこで本研究では、複数種類の N 端変異 rTRPV1 分子を人工的に作製し、その細胞生理学的、分子生理学的機能を詳細に解析することで、TRPV1 による浸透圧感知の分子機構を解明することを目的とした。

## 2. 研究方法

### 2. 1 発現ベクターの作製

N 末端を欠損させた TRPV1 cDNA 遺伝子を作製するため、我々がクローニングした rTRPV1 の cDNA<sup>(8)</sup>を pIRES2-ZsGreen1 (タカラバイオ) の Multi cloning site (MCS) に組み込んだものをテンプレートに PCR を行った。PCR 産物をインサート DNA の 5' 側に配置した Sac I 認識部位と TRPV1 配列の中程にある EcoO65 I 認識部位で切断処理し、カラム精製した。この精製物をインサート DNA とし TRPV1 が組み込まれた pIRES2 ベクターに再度ライゲーションして N 端配列の長さの異なる rTRPV1 をコードする cDNA を大腸菌 (*E. Coli*, DH5 $\alpha$ , タカラバイオ) に形質転換してクローニングした。その後、サンガー法によって塩基配列のエラーの有無を確認した。シークエンス反応には BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific), シークエンス反応産物の精製には BigDye X Terminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、シークエンサーには ABI 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) を使用した。配列にエラーがないことを確認したプラスミド DNA を発現ベクターとして使用した。pIRES2-ZsGreen1 はカナマイシン耐性遺伝子を含むため、カナマイシン添加培地上ではベクターを取り込んだ大腸菌のみがコロニーを形成する。また、このベクターは MCS の下流に mRNA 内部のリボソーム進入サイトである internal ribosome entry site (IRES) を持っており、リボソームは mRNA の 5' 側から MCS に挿入した分子を翻訳するだけでなく、IRES にも結合してその下流にコードされている蛍光タンパク質である ZsGreen1 も翻訳される。これにより、導入分子を発現している細胞では ZsGreen1 の緑色蛍光が確認でき、プラスミド DNA が導入された細胞を識別することが可能である。

## 2. 2 細胞培養と DNA トランスフェクション

### 2. 2. 1 HEK293 細胞の維持

目的の分子を発現させる株化細胞として HEK293 細胞を使用した。培養液には、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 富士フイルム和光純薬) に非働化 (56°C で 30 分処理) したウシ胎仔血清 (Fetal Bovine Serum, Biosera) と非必須アミノ酸 (富士フイルム和光純薬) をそれぞれ 10% および 1% となるように添加したものを使用した。細胞は培養液 5 mL を入れた 25 cm<sup>2</sup> カルチャーフラスコに播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 5% CO<sub>2</sub>, 37°C の条件で維持培養した。細胞がフラスコ内で 7 ~ 8 割の細

胞密度に増殖したところで TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) を用いてフラスコ底部から剥離させ、新しいカルチャーフラスコに適当な倍率に希釈して播種することで継代した。

### 2. 2. 2 DNA トランスフェクション

DNA トランスフェクション開始の 24 時間以上前に 35 mm シャーレ中に置いた 11 mm 円形カバーガラス (丸 11, No. 0, 松浪硝子) に細胞懸濁液を約 5 ~ 6 割の細胞密度となるように播種した。トランスフェクション試薬には、Lipofectamine 3000 Transfection Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。トランスフェクション開始から 5 時間後に通常の培養液に交換し、トランスフェクションを停止した。トランスフェクション終了から 48 時間以内の細胞を以降の実験に使用した。トランスフェクションした細胞の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) を解析する際には、導入分子を発現していると考えられる ZsGreen1 の蛍光が確認された細胞のみを対象とした。

## 2. 3 細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 測定

### 2. 3. 1 HEK293 細胞への Fura-2/AM ローディング

細胞の接着したカバーガラスが入った 35 mm シャーレに、PBS 1 mL を加えて洗浄した。洗浄に用いた PBS を除去した後、Pluronic F127 (Thermo Fisher Scientific) と Fura-2/AM (Merck) を最終濃度がそれぞれ 0.01% と 3 ~ 5  $\mu$ M になるように添加した標準実験液 (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 10 mM, D-glucose; pH 7.4 に Tris で調整; 約 300 mOsm/kg) を 1 mL 加え、遮光してインキュベーター内で 37°C に保温し 30 分間静置した。

### 2. 3. 2 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 測定実験装置

倒立顕微鏡 (IX-71, オリンパス) のステージに設置したチャンバー (RC-25, Warner Instruments) を、直径 1 mm のポリエチレンチューブで 8 チャンネルペリスタポンプ (Minipuls 3, Gilson) と接続した。細胞を接着させたカバーガラスをチャンバーに乗せ、流速 1.5 mL/min で細胞外液を灌流し、細胞表面の灌流を行った。チャンバーの反対の端にはアスピレーターを設置し、灌流液を吸引除去した。340 nm と 380 nm のフィルターを取り付けたフィルターチェンジャー (C8214, 浜松ホトニクス) を用いて細胞へ 340 nm と 380 nm の励起光を交互に当て、それぞれの励起光照射時に得られた蛍光 (F340, F380) をバンドパスフ

フィルター (500 ± 10 nm, オリンパス) を介して CCD カメラ (ORCA-ER, 浜松ホトニクス) に取り込んだ。CCD カメラで取り込んだデータは PC ソフトウェア (Aqua Cosmos, 浜松ホトニクス) 上で各画素の蛍光強度から蛍光強度比 F340/F380 を計算した。サンプリングレートは 0.2 Hz とした。

### 2. 3. 3 蛍光強度比 F340/F380 の $[Ca^{2+}]_i$ への変換

Aqua Cosmos であらかじめ  $Ca^{2+}$  緩衝液キャリブレーションキット (Thermo Fisher Scientific) を用いて標準曲線を作成しておき、この標準曲線を用いて蛍光強度比 F340/F380 を  $[Ca^{2+}]_i$  (nM) に換算した。 $[Ca^{2+}]_i$  を算出した細胞を含むように興味領域 (Region of interest, ROI) を指定し、ROI 内の平均 F340/F380 を  $[Ca^{2+}]_i$  へ換算し、線画として描画した。

### 2. 4 使用溶液と薬物

$[Ca^{2+}]_i$  測定時には細胞を常時実験液で灌流した。高浸透圧実験液には前述した標準実験液に 50 mM mannitol を添加したものを使用し、灌流液の浸透圧を 50 mOsm/kg 上昇させた。Capsaicin (富士フィルム和光純薬) は 1 mM になるように DMSO に溶解し保存しておき、使用直前に標準実験液で最終濃度 1  $\mu$ M となるように希釈して細胞に適用した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 TRPV1 の N 末端欠損分子の作製

rTRPV1 の N 末端には 6 つのアンキリン様ドメイン (ANK) が 6 回繰り返したアンキリンリピートが存在している (図 1)。そこで ANK に着目し、1 つ目の ANK より N 末端側を削った分子 ( $\Delta$ N109) をコードする DNA を作製するための PCR プライマーを設計した。さらに 1 つ目の ANK の最初のアミノ酸である 110 番目のアルギニンまでを削った分子 ( $\Delta$ N110) をコードする DNA を作製するための PCR プライマーも設計した。これらのプライマーを使用して PCR を行い、目的の N 末端欠損 rTRPV1 分子がコードされているインサート DNA を作製し、これを組み込んだプラスミド DNA (N 末端欠損プラスミド DNA) を作製した。それぞれの DNA を含むプラスミド DNA の MCS には、Sac I 認識配列 (gagctc)、Kozak 配列 (gccacc)、開始コドン (atg) の後に rTRPV1 の N 末端欠損遺伝子の配列を組み込んだ。サンガー法により作製した N 末端欠損プラスミド DNA の

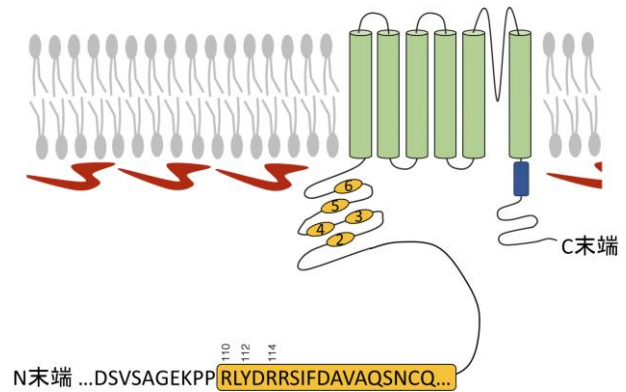


図 1. rTRPV1full の N 末端アミノ酸配列

黄色いボックスはアンキリン様ドメイン。アミノ酸上の数字は N 末端からの数えたポジションを示している。

配列を決定し、 $\Delta$ N109 は N 末端の 110 番目のアミノ酸であるアルギニン (R, 塩基配列 agg),  $\Delta$ N110 は 111 番目のアミノ酸のロイシン (L, 塩基配列 ctg) から始まり、それ以降は rTRPV1full と完全に一致していることを確認した。

### 3. 2 各種 rTRPV1 分子を発現させた HEK293 細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 応答

#### 3. 2. 1 $[Ca^{2+}]_i$ 応答の評価方法

作製した分子の機能を評価するため、HEK293 細胞に各分子をコードするプラスミド DNA を導入し、各種刺激を行いそれぞれの  $[Ca^{2+}]_i$  変動を計測した。TRPV1 は活性化され開口すると、 $Na^+$  や  $Ca^{2+}$  を細胞内へ流入させる非選択的陽イオンチャネルである<sup>(9)</sup>。したがって、HEK293 細胞の膜上に発現した各分子がイオンチャネルを形成し、刺激に応じて開口すれば、 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が起こる。そこで、 $[Ca^{2+}]_i$  イメージング法により、各分子を発現させた HEK293 細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  を経時的に記録しながら各種溶液を適用し刺激を行った。また、 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が導入した分子によるものであることを確認するため、何もトランスフェクションしていない無処置の HEK293 細胞 (untransfected 細胞, UT 細胞) においても同様に  $[Ca^{2+}]_i$  の測定を行った。各溶液の適用時間は、+50 mOsm/kg 溶液は 10 分、capsaicin は 30 秒とし、その適用間隔は 10 分間と設定した。細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  応答を評価するために、刺激前 1 分間の  $[Ca^{2+}]_i$  の平均値と、刺激中から刺激終了後 1 分間までの  $[Ca^{2+}]_i$  の最大値との差を刺激による  $[Ca^{2+}]_i$  増加量 ( $\Delta [Ca^{2+}]_i$ ) とした。刺激直前の  $[Ca^{2+}]_i$  が 200 nM を

超えている細胞は健康ではないと考え解析の対象にできなかった。また、UT 細胞では高浸透圧刺激(+50 mOsm/kg) および capsaicin (1  $\mu$ M) のいずれでも  $\Delta$ [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が 20 nM を超える細胞はなかった(図 2)。そこで、各分子を導入した細胞の capsaicin への応答の大きさのばらつきは、細胞膜表面へのそれぞれの分子の発現量を反映したものであると考え、十分に TRPV1 分子を発現していると考えられる capsaicin への  $\Delta$ [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が 100 nM 以上であった細胞に注目し解析した。高浸透圧刺激(+50 mOsm/kg) に対しては、 $\Delta$ [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が 50 nM 以上のものを[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇反応を示した細胞と判断した。

### 3. 2. 2 高浸透圧刺激および capsaicin に対する UT 細胞および rTRPV1full, $\Delta$ N109, $\Delta$ N110 発現細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の変動

図 2 で、UT 細胞および rTRPV1full 発現細胞の高浸透圧刺激(+50 mOsm/kg) および capsaicin(1  $\mu$ M) に対する [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の経時的変化の典型的な例と、両刺激による  $\Delta$ [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の関係を示した。rTRPV1full 発現細胞では 16 個中 10 個の細胞が capsaicin に応答した。Capsaicin を 30 秒間適用したところ[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は適用開始後 10 ~ 15 秒程度で急速に上昇し、刺激開始から約 20 ~ 30 秒でピークに達した。刺激開始 30 秒後に capsaicin を除去すると基線の値まで速やかに戻る場合や、緩やかに[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> が低下する場合、反応が持続する場合があった。Capsaicin に応答した細胞のうち、4 個(40%)の細胞が高浸透圧刺激に対し [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇反応を示した。高浸透圧刺激を 10 分間行ったところ[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は刺激開始後 20 ~ 30 秒程度で上昇を始め、刺激開始から約 1 分~1 分 30 秒でピークに達し、その後刺激を続けている間は反応が持続した。刺激開始 10 分後に浸透圧を元に戻すと、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> は緩やかに刺激前の値まで戻った。一方、先述したように、UT 細胞は両刺激に応答せず、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇は認められなかった(n = 20)。

一つ目の ANK より N 末端側を欠損させた  $\Delta$ N109 と、さらに 1 個のアミノ酸(アルギニン)を欠損させた  $\Delta$ N110 の機能解析を行った(図 3)。 $\Delta$ N109 発現細胞では 36 個中 21 個の細胞が capsaicin に応答し、そのうち 14 個(67%)の細胞が高浸透圧刺激に対して[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇反応を示した。両刺激時における[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変動はそれぞれ、時間経過や反応の大きさについて、rTRPV1full 発現細胞と同様であ

った。 $\Delta$ N109 発現細胞に高浸透圧刺激および capsaicin 刺激適用時の F340 と F380 の蛍光強度は鏡像関係を保った変動を示しており、蛍光強度比(F340/F380)の変動が [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変動を反映していると考えられた。続いて 110 番目のアルギニンまでを欠損させた  $\Delta$ N110 の機能解析を行った。 $\Delta$ N110 発現細胞では 16 個中 8 個の細胞が capsaicin に応答し、capsaicin に対する[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変動は、時間経過や反応の大きさについて、 $\Delta$ N109 発現細胞と同様であった。一方、 $\Delta$ N109 発現細胞と異なり、高浸透圧刺激に対して [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇反応を示す細胞は認められなかった。

## 4. 考 察

### 4. 1 HEK293 細胞に発現させた各分子の capsaicin に対する応答

UT 細胞は capsaicin に応答しなかったのに対し、rTRPV1full 発現細胞は capsaicin に対して応答した。Capsaicin は TRPV1 チャンネルの細胞内側に存在する固有の結合部位に直接結合することで、チャンネルを開口し電流を生じさせる<sup>(10, 11)</sup>。TRPV1 分子では、アゴニストである capsaicin や resiniferatoxin などのバニロイドの結合部位として、第 2-第 4 細胞膜貫通領域が重要であると考えられているが<sup>(12, 13)</sup>、この他の部位にもバニロイドによるチャンネルの活性化に必要なアミノ酸が存在し、N 末端では 114 および 115 番目のアルギニンが capsaicin 応答に必要であることが報告されている<sup>(11, 14)</sup>。しかし  $\Delta$ N109 および  $\Delta$ N110 発現細胞では rTRPV1full 発現細胞と同様に capsaicin 応答が認められたので、第 1ANK より N 末端側に capsaicin 応答やチャンネルの開口にともなう構造変化に必須なアミノ酸ドメインは存在しないと考えられた。

### 4. 2 HEK293 細胞に発現させた各分子の高浸透圧刺激に対する応答

UT 細胞は高浸透圧刺激に応答しなかったのに対し、rTRPV1full 発現細胞は高浸透圧刺激に対して応答した。この結果は、HEK293 細胞に通常の rTRPV1 を強制的に発現させた TRPV1 発現細胞を用いて [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を測定したところ、細胞外液の浸透圧上昇によって[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> の上昇が引き起こるという報告<sup>(15)</sup>と一致している。また、我々が rTRPV1full 発現細胞についてホールセルパッチクランプ法により機能解析を行ったところ、高浸透圧刺激時に活性

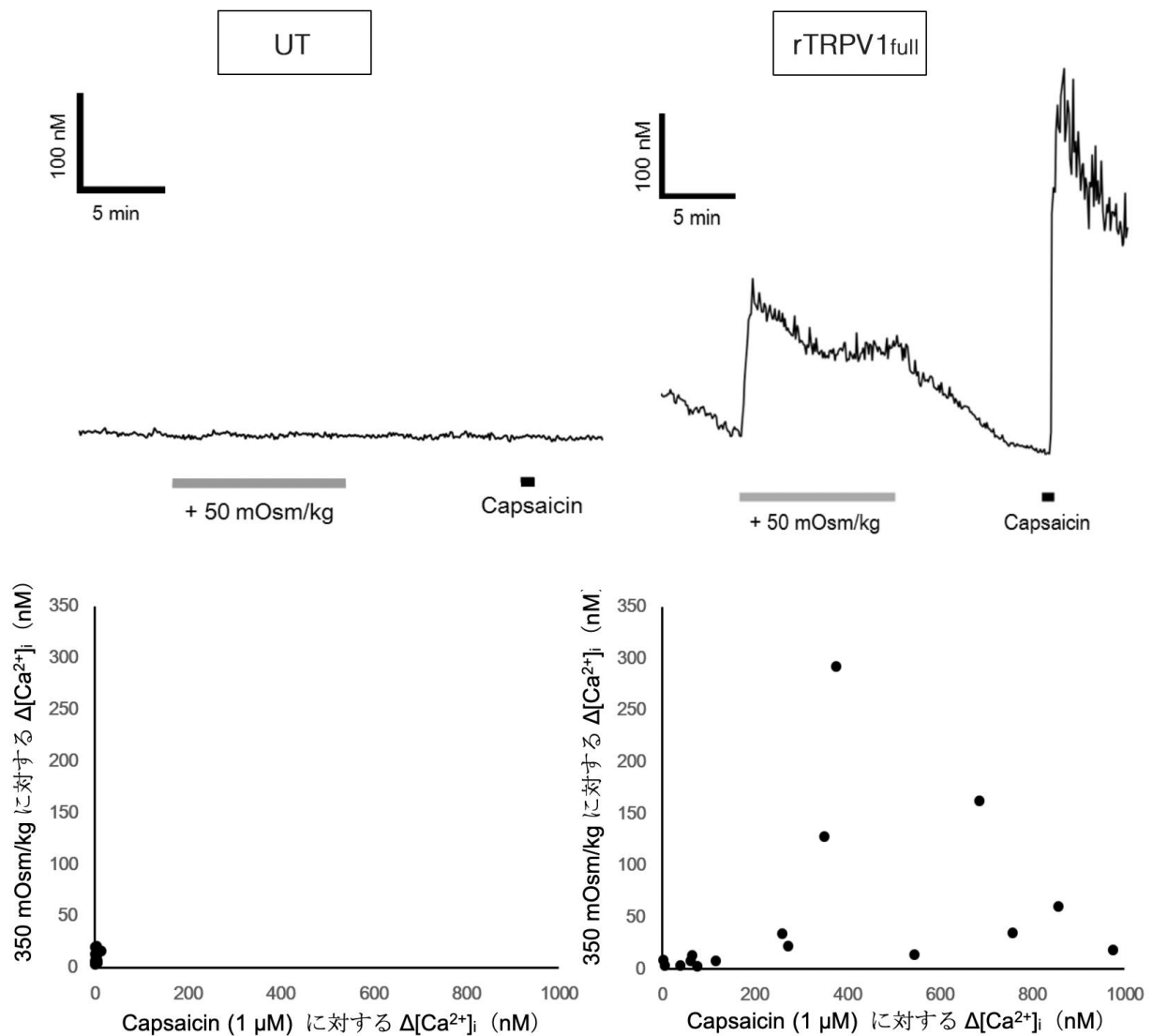


図 2. UT 細胞(左)と rTRPV1full 発現細胞(右)における高浸透圧刺激および Capsaicin に対する  $[Ca^{2+}]_i$  の継時的変化と、両刺激による  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  の関係

高浸透圧刺激 (+50 mOsm/kg), Capsaicin (1  $\mu$ M) 刺激を適用した際の典型的な  $[Ca^{2+}]_i$  の継時的変化(上段)と、両刺激による  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  の関係(下段)を示している。

化されるイオンコンダクタンスの逆転電位の値と capsaicin 電流の逆転電位が一致すること、高浸透圧刺激による内向き電流は選択的 TRPV1 ブロッカーである capsazepine および非選択的 TRP チャンネルブロッカーである ruthenium red の両者によって抑制されること(未発表)を確認している。これらの結果は、高浸透圧刺激に対する電流応答と  $[Ca^{2+}]_i$  上昇反応が TRPV1 チャンネルを介したものであることを示している。

高浸透圧刺激に対する応答は、capsaicin に対する応答と比較して、立ち上がりが緩やかであった。これは、

capsaicin と高浸透圧刺激が TRPV1 を活性化する機構が異なるためであると考えられる。先述したように、capsaicin は TRPV1 チャンネルに存在する特定の結合部位に直接作用することで、速やかにチャンネルを開口し、 $[Ca^{2+}]_i$  を上昇させる<sup>(10)</sup>。一方、高浸透圧条件下では、細胞外の浸透圧上昇により細胞内から細胞外へと水が移動し、細胞容積の減少や細胞膜へかかる張力が低下する。その結果、細胞膜上に発現している TRPV1 チャンネルが細胞膜の伸縮を感知して開口すると考えられる。これまでに細胞膜上に発現している TRPV1 の C 末端と細胞内の微小管との相互

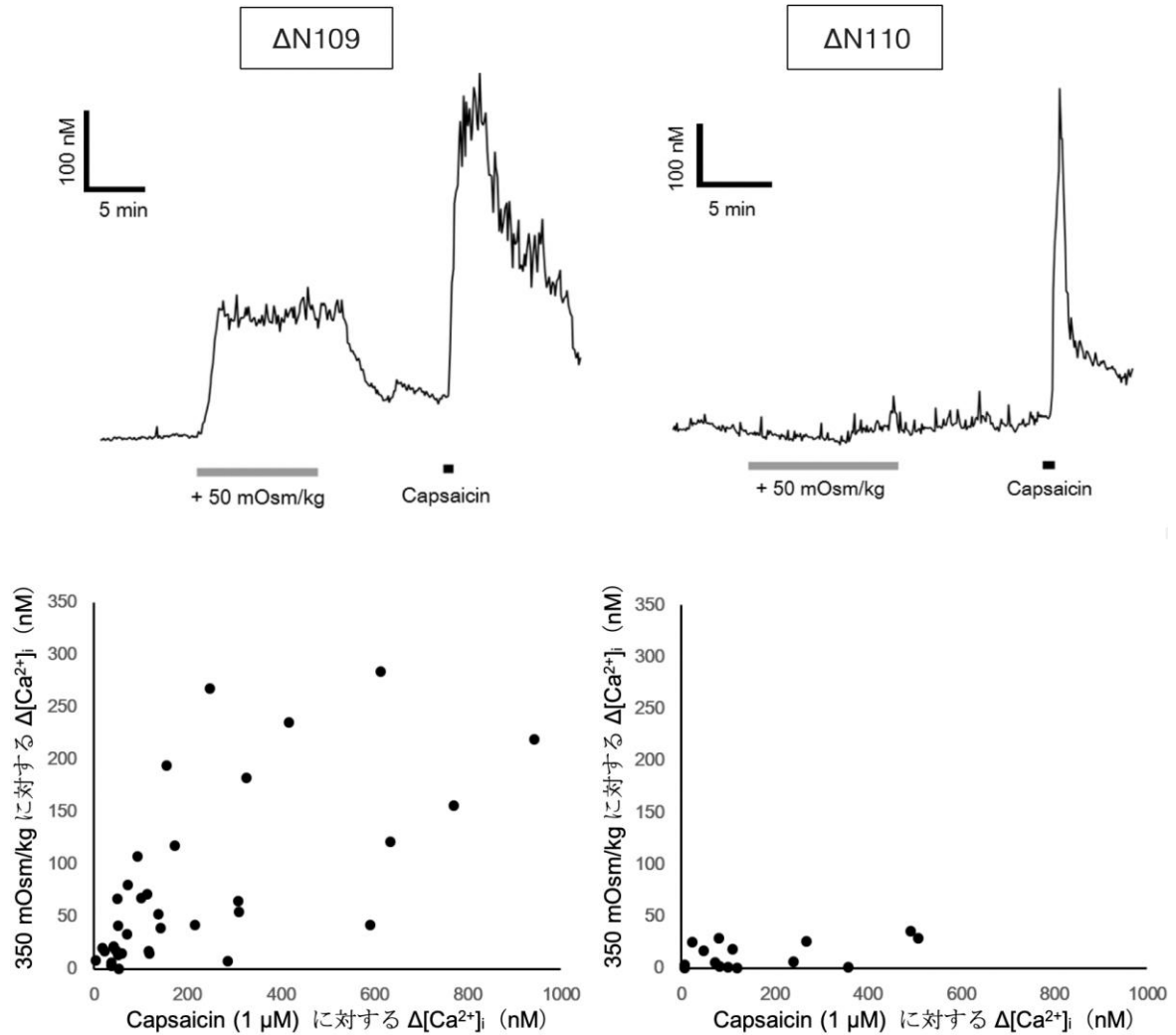


図3.  $\Delta N109$  発現細胞(左)と  $\Delta N110$  発現細胞(右)における高浸透圧刺激および Capsaicin に対する  $[Ca^{2+}]_i$  の継時的変化と、両刺激による  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  の関係

高浸透圧刺激 (+50 mOsm/kg), Capsaicin (1  $\mu M$ ) 刺激を適用した際の典型的な  $[Ca^{2+}]_i$  の継時的変化(上段)と、両刺激による  $\Delta[Ca^{2+}]_i$  の関係(下段)を示している。

作用が変化し、TRPV1 チャンネルが構造変化し開口する可能性があることが報告されている<sup>(16)</sup>。以上のことから、高浸透圧刺激による TRPV1 の活性化には細胞の容積変化や構造変化という間接的な過程が必要であり、それによってチャンネルが開くまでに capsaicin に対する応答と比較して時間がかかり、 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇が緩やかであったと考えられる。

$\Delta N109$  発現細胞では rTRPV1full 発現細胞と同様に浸透圧刺激への  $[Ca^{2+}]_i$  上昇反応が認められた。一方、 $\Delta$

N109 では保持されている 110 番目のアミノ酸(アルギニン)を欠損させた  $\Delta N110$  発現細胞では高浸透圧刺激に対する応答が認められなかった。すなわち TRPV1 の浸透圧応答には N 末端の 1 ~ 109 番目のアミノ酸は必須ではないが、最初の ANK の始まりである 110 番目のアルギニンが必須であることが明らかになった。アルギニンは正電荷を持つアミノ酸であるため、細胞骨格との結合もしくはイオンチャンネルのポアの開口に必要な立体構造の形成に関与しているかもしれない。N 末端と C 末端の両末端ドメインが

細胞膜構造と相互作用していることを示唆する例が報告されている。例えば、TRPV1 と同じ TRP ファミリーに属する NOMPC は、ANK リポドメインを細胞骨格の微小管へと繫留させることで、チャンネルを開閉していることが知られている<sup>(17)</sup>。低浸透圧刺激に応答する TRPV4 チャンネルでは、N 末端と細胞膜のフォスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸(PIP<sub>2</sub>)との相互作用が認められ、N 末端の PIP<sub>2</sub> 結合部位と膜 PIP<sub>2</sub> が結合することによってチャンネルの立体構造が変化し活性化することが知られている<sup>(18)</sup>。また先述したように、TRPV1 では C 末端は細胞骨格と結合し相互作用していることも示唆されている<sup>(16)</sup>。これらの報告は TRP チャンネルの末端ドメインと細胞膜との相互作用がそのチャンネルの活性に影響を及ぼすことを示唆しており、TRPV1 の N 末端においても類似の機構が存在する可能性がある。本研究では rTRPV1 の N 末端に存在する 6 つの ANK の最初のアミノ酸であるアルギニンが欠損すると浸透圧応答が失われた。ANK リポドメインは、ATP やカルモジュリンなどのチャンネル活性を調節する様々な細胞内因子が結合することが知られている<sup>(19)</sup>。このことから、ANK が微小管などの細胞骨格と相互作用しチャンネルの活性化において重要な働きを担っている可能性があると考えられる。

#### 4. 3 中枢神経系における浸透圧感知分子の実体

Bourque 博士らのグループは、マウスの SON ニューロンにおいて、TRPV1 の N 端が欠損したバリエントが浸透圧感知分子であると主張している<sup>(6, 7)</sup>。我々はラット SON 組織にもマウスのものと相同な TRPV1 の N 端欠損バリエントが存在することを明らかにしたが<sup>(8)</sup>、rTRPV1SON を発現させた培養細胞では浸透圧応答が認められず、rTRPV1full を発現させた培養細胞が高浸透圧刺激に応答するという、Bourque 博士らとは異なる知見を得た。すなわち我々は、SON ニューロンの浸透圧感知分子として機能しているのは TRPV1 の N 端欠損バリエント分子ではなく全長が保持された通常の TRPV1 だと考えている。我々はこれまでに、ラット SON に発現している rTRPV1SON についても研究を行ってきたが、rTRPV1SON 発現細胞では高浸透圧刺激や capsaicin に対して活性化が認められず、このラット野生型分子の生理的機能は見いだせていない。これは、rTRPV1SON では N 末端の 5 番目の ANK の途中までが欠損しており、capsaicin 応答、高浸透圧刺激に対して必

要なアミノ酸ドメインが欠落しているためであると考えられる。また、SON 領域および脊髄後根神経節(dorsal root ganglion : DRG) の組織を用いて rTRPV1full と rTRPV1SON を対象にリアルタイム PCR を行ったところ、SON では rTRPV1full mRNA のコピー数は rTRPV1SON mRNA の約 7 倍であり、DRG では約 79 倍であった(未発表)。いずれの組織においても mRNA レベルでは TRPV1SON よりも TRPV1full の発現量が多いことを示しており、タンパク質レベルでも TRPV1full の方が優位に翻訳されており、TRPV1full のホモ四量体が形成されやすいと予想される。すなわち生体内で機能的な役割を持つのは、110 番目のアルギニンを含む N 末端の全長が保持された TRPV1full だと考えられる。

#### 5. 今後の課題

アルギニンの絶対電荷は 20 種類のアミノ酸の中で最も大きいため、110 番目のアミノ酸がアルギニンであること自体に加えて正電荷を持つアミノ酸であることが重要である可能性がある。そこで、今後は 110 番目のアルギニンを電氣的に中性であるアラニン(A)に置換した TRPV1 分子(R110A)やアルギニンよりは小さい正電荷を持つリジン(K)に置換した TRPV1 分子(R110K)を作製し、これらのイオンチャンネルとしての機能を評価する計画である。また、N 末端ドメインが細胞膜と相互作用することにより細胞膜の伸展状況を感じている可能性を検討するために、細胞膜と連絡を持つ細胞膜構成成分や細胞膜裏打ちタンパク質、細胞骨格分子と TRPV1 の N 末端ドメインが物理化学的に結合しているのかを生化学的に検証する計画もある

#### 6. 文 献

1. Choi-Kwon, S. and A.J. Baertschi, Splanchnic osmosensation and vasopressin: mechanisms and neural pathways. *Am J Physiol*, 1991. 261 (1 Pt 1): p. E18-25.
2. Vallet, P.G. and A.J. Baertschi, Spinal afferents for peripheral osmoreceptors in the rat. *Brain Res*, 1982. 239(1): p. 271-4.



3. Bourque, C.W., Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci*, 2008. 9(7): p. 519-31.
4. Oliet, S.H. and C.W. Bourque, Properties of supraoptic magnocellular neurones isolated from the adult rat. *J Physiol*, 1992. 455: p. 291-306.
5. Oliet, S.H. and C.W. Bourque, Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature*, 1993. 364(6435): p. 341-3.
6. Naeini, R.S., et al., An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. *Nature Neurosci*, 2006. 9(1): p. 93-98.
7. Zaelzer, C., et al.,  $\Delta$ N-TRPV1: A Molecular Co-detector of Body Temperature and Osmotic Stress. *Cell Rep*, 2015. 13(1): p. 23-30.
8. Moriya, T., et al., Full-length transient receptor potential vanilloid 1 channels mediate calcium signals and possibly contribute to osmoreception in vasopressin neurones in the rat supraoptic nucleus. *Cell Calcium*, 2015. 57(1): p. 25-37.
9. Caterina, M.J., et al., The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 1997. 389(6653): p. 816-24.
10. Nilius, B. and A. Szallasi, Transient Receptor Potential Channels as Drug Targets: From the Science of Basic Research to the Art of Medicine. *Pharmacol Rev*, 2014. 66(3): p. 676-814.
11. Winter, Z., et al., Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel--an overview of the current mutational data. *Mol Pain*, 2013. 9: p. 30.
12. Elokely, K., et al., Understanding TRPV1 activation by ligands: Insights from the binding modes of capsaicin and resiniferatoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016. 113(2): p. E137-45.
13. Yang, F. and J. Zheng, Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin. *Protein Cell*, 2017. 8(3): p. 169-177.
14. Jung, J., et al., Agonist recognition sites in the cytosolic tails of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem*, 2002. 277(46): p. 44448-54.
15. Nishihara, E., T.Y. Hiyama, and M. Noda, Osmosensitivity of transient receptor potential vanilloid 1 is synergistically enhanced by distinct activating stimuli such as temperature and protons. *PLoS One*, 2011. 6(7): p. e22246.
16. Prager-Khoutorsky, M., A. Khoutorsky, and C.W. Bourque, Unique interweaved microtubule scaffold mediates osmosensory transduction via physical interaction with TRPV1. *Neuron*, 2014. 83(4): p. 866-78.
17. Jin, P., et al., Electron cryo-microscopy structure of the mechanotransduction channel NOMPC. *Nature*, 2017. 547(7661): p. 118-122.
18. Garcia-Elias, A., et al., Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate -dependent rearrangement of TRPV4 cytosolic tails enables channel activation by physiological stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013. 110(23): p. 9553-8.
19. Liao, M., et al., Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 2013. 504(7478): p. 107-12.

## Analysis of TRPV1-Dependent Osmolarity Sensing Mechanisms of Neurons in the Central Nervous System

Naoki Kitamura

Joint Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture,  
Tottori University

### Summary

Sodium ion has the largest contribution to the determination of the body fluid osmolarity, and its homeostasis largely depends on sodium ion concentrations. The osmolarity of the body fluid is monitored by the central nervous system (CNS) in addition to peripheral osmo-sensors. Supra optic nucleus (SON) neurons in the hypothalamus is considered to function as a sensor of the plasma osmolarity. It is reported that SON neurons of mice expressed the N-terminal-truncated variant of transient receptor potential vanilloid 1 (m $\Delta$ N-TRPV1) and it is proposed that m $\Delta$ N-TRPV1 functions as an osmo-sensor in the CNS. On the other hand, we found that rat TRPV1 with the full length (rTRPV1full) but not the N-terminal truncated variant (rTRPV1SON) functions as an osmo-sensing molecule when heterologously expressed in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. To examine the molecular basis of the osmo-sensation by TRPV1, we constructed several N-terminal mutant molecules of rTRPV1 and analyzed cellular and molecular physiology of these molecules.

We constructed mutant rTRPV1 DNAs, in which 5'-terminal residues coding N-terminal amino acids at positions 1-109 ( $\Delta$ N109) and 1-110 ( $\Delta$ N110) are deleted. Constructed DNAs were inserted into a plasmid vector and were transfected into HEK293 cells. Changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) were measured by the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  imaging technique using the fluorescent  $\text{Ca}^{2+}$  indicator, Fura-2.

HEK293 cells transfected with no DNA showed no  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  response to stimulations with capsaicin (1  $\mu\text{M}$ ) and a hypertonic solution (+50 mOsm/kg). Among cells expressing rTRPV1full and  $\Delta$ N109, a part of the cells showed  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rises in response to stimulations with both capsaicin and +50 mOsm/kg.  $\Delta$ N110-expressing cells responded to capsaicin but not to +50 mOsm/kg at all. These results indicate that arginine positioned at 110 of the N-terminal of rTRPV1 is essential for the osmo-sensation. The first ankyrin-like domain containing arginine positioned at 110 may interact with some structure connected to the cell membrane and detected changes in the membrane tension caused by the changes in the extracellular osmolarity. At present, we conclude that TRPV1 with the full length but not the N-terminal truncated variant has a functional role as an osmo-sensing molecule in the CNS.