

食塩摂取による TRPA1 活性化と腸管蠕動運動の促進

柴崎 貢志

長崎県立大学大学院人間健康科学研究科細胞生化学研究室

概要 温度感受性 Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルは、神経細胞に高発現し、温度受容に関わる温度センサーチャンネルである。このチャンネルは世界で初めて明らかとなった痛みの分子実体であり、その発見により痛み研究が飛躍的に発展し、有効な鎮痛薬の開発につながった。この TRPV1 の発見は、新たな痛み機構の解明につながる大きな一歩として脚光を浴び、昨年のノーベル生理学医学賞の受賞となった。

2003 年に、冷刺激により活性化される TRP チャンネルが報告された。TRPA1 である。TRPA1 は、おもに侵害受容性線維に発現し、TRPM8 を活性化する温度よりもさらに低い温度 (< 17°C) で活性化がみられることより、侵害性冷刺激感知に関与すると考えられた。また TRPA1 は、マスタードオイル (MO) やワサビの主成分であるアリルイソチオシアネート (AITC) にも反応することが明らかになった。また、我々は TRPA1 が細胞外のアルカリ pH によって活性化することを明らかにしている。

腸管運動のメカニズムとしては、古くから自律神経による運動調節が知られている。近年、非神経性の粘膜上皮内分泌 (EC) 細胞は腸管内の環境変化を感受し、TRPA1 を介して、小腸腸管運動を調節することが明らかとなっている。腸管 EC 細胞は消化管の粘膜上皮層のわずか数%を占めるマイナーな細胞群であるが、食事性脂質や糖質を感知すると様々なホルモンを分泌することで消化や食欲・代謝を制御する。EC 細胞には TRPA1 が特異的に発現している。TRPA1 はワサビやマスタードに含まれるアリルイソチオシアネート (AITC) によって活性化し、Na⁺、Ca²⁺ イオンを細胞内に流入させる。そして、腸管においては、EC 細胞の TRPA1 活性化に伴いセロトニンが分泌し、腸管蠕動運動が促進する。

腸管の蠕動運動は自律的に生じることが知られている。つまり、腸管を生体から単離しても、腸管内に存在する腸管感覚神経・運動神経・制御細胞 (これが EC 細胞) の 3 者によりコントロールされる。研究実施者は以前に、腸管神経節の抑制性運動神経は TRPV2 (TRPA1 の近縁ファミリー分子) をメカノセンサーとして用いることで腸管の動き具合を感知し、NO を放出することで蠕動運動を制御することを見いだしている。上述した腸管内 EC 細胞による TRPA1 を介した蠕動運動制御機構は、研究実施者の報告とほぼ時を同じくして報告されたものである。現在までのところ、腸管蠕動運動の制御に関しては、この 2 つの報告が全てであり、これらの知見を統合することで、その分子機構をほぼ述べるのが可能になった。しかしながら、どのように TRPA1 が生体内で活性化し、EC 細胞のセロトニン放出を制御するのか？ あるいは、様々な摂食条件で EC 細胞の TRPA1 活性化度合いがどのように異なるのかは全く分かっていない。

TRPA1 は AITC 以外に、細胞外 Ca²⁺ によっても活性化する。TRPA1 は複数のリガンドが作用するとそれぞれのリガンドに対する活性化閾値が低下することで応答性が增強する synergistic effect を有する。つまり、消化しにくい肉などを食べる際に天然塩とマスタード (AITC) などの薬味をつけて味わうことで、TRPA1 の著しい活性化が起こり、腸管蠕動運動が著しく促進すると考えられる。そして、この蠕動運動促進が消化を助けている可能性が高い。味覚への嗜好性に加え、このような生理学的背景事情を有するが故に肉を食べる際に塩と一緒に摂取する行動をする可能性が高いと研究実施者は考えた。

上記の細胞外 Ca^{2+} 環境変化は天然塩を摂取した場合を想定しているが、 Ca^{2+} をほとんど含まない精製塩の場合も、天然塩と同様に腸管内 Na^{+} 濃度が上昇する。TRPA1 は Na^{+} 透過性が最も高いため、この腸管内 Na^{+} 濃度上昇が、TRPA1 活性化の増大をもたらすドライビングフォースになっていると考えられる(細胞外 Na^{+} 濃度が高いほど、TRPA1 を介した Na^{+} 流入・ Na^{+} 依存的電流が大きくなる)。この仮説を検証し、食塩摂取に応じて TRPA1 活性が上昇し、消化吸収を促進していることを明らかにすることを試み、それを実証した。

食塩の摂取は、高血圧などのリスクファクターと考えられて多くの警鐘がなされているが、摂食により生理学的にプラスに働く機能も持っていることを明らかにした。

1. 研究の背景と目的

温度感受性 Transient Receptor Potential (TRP) チャネルは、成体の後根神経節 (DRG) の神経細胞に高発現し、温度受容に関わる温度センサーチャネルである[1, 2]。このチャネルは世界で初めて明らかとなった痛みの分子実体であり、その発見により痛み研究が飛躍的に発展し、有効な鎮痛薬の開発につながった。

この TRPV1 の発見は、新たな痛み機構の解明につながる大きな一歩として脚光を浴び、昨年のノーベル生理学医学賞の受賞となった。その後、TRPV1 との遺伝子相同性に基づいた探索により、多くの TRP チャネルがクローニングされ、これらは大きなファミリーを形成することが明らかになった。TRP チャネルスーパーファミリーは、哺乳類では 6 種類のサブファミリーとして、TRPV (vanilloid)、TRPC (canonical)、TRPM (melastatin)、TRPA (ankyrin)、TRPP (polycystin)、TRPML (mucolipin) を形成し、さらにそれぞれのサブグループはいくつかの分子を持つ。現在では哺乳類では 28 種類、ヒトでは TRPC2 を除く 27 種類のチャネル分子が報告されている。そして現在では、TRP チャネル研究は痛みの分野だけにとどまらない広がりを見せている[3]。

2003 年に、冷刺激により活性化される TRP チャネルが報告された。TRPA1 である。TRPA1 は、おもに侵害受容性線維に発現し、TRPM8 を活性化する温度よりもさらに低い温度 (< 17°C) で活性化がみられることより、侵害性冷刺激感知に関与すると考えられた。また TRPA1 は、マスタードオイル (MO) やワサビの主成分であるアリルイソチオシアネート (AITC) にも反応することが明らかになった [4, 5]。また、我々は TRPA1 が細胞外のアルカリ pH によって活性化することを明らかにしている。

腸管運動のメカニズムとしては、古くから自律神経による運動調節が知られている。近年、非神経性の粘膜上皮内分泌 (EC) 細胞は腸管内の環境変化を感受し、TRPA1 を介して、小腸腸管運動を調節することが明らかとなっている[6]。腸管 EC 細胞は消化管の粘膜上皮層のわずか数%を占めるマイナーな細胞群であるが、食事性脂質や糖質を感知すると様々なホルモンを分泌することで消化や食欲・代謝を制御する。EC 細胞には TRPA1 が特異的に発現している。TRPA1 はワサビやマスタードに含まれるアリルイソチオシアネート (AITC) によって活性化し、 Na^{+} 、 Ca^{2+} イオンを細胞内に流入させる。そして、腸管においては、EC 細胞の TRPA1 活性化に伴いセロトニンが分泌し、腸管蠕動運動が促進する。

腸管の蠕動運動は自律的に生じることが知られている。つまり、腸管を生体から単離しても、腸管内に存在する腸管感覚神経・運動神経・制御細胞(これが EC) の 3 者によりコントロールされる。研究実施者は以前に、腸管神経節の抑制性運動神経は TRPV2 (TRPA1 の近縁ファミリー分子) をメカノセンサーとして用いることで腸管の動き具合を感知し、NO を放出することで蠕動運動を制御することを見いだしている。上述した腸管 EC 細胞による TRPA1 を介した蠕動運動制御機構は、研究実施者の報告とほぼ時を同じくして報告されたものである。現在までのところ、腸管蠕動運動の制御に関しては、この 2 つの報告が全てであり、これらの知見を統合することで、その分子機構をほぼ述べるのが可能になった。しかしながら、どのように TRPA1 が生体内で活性化し、EC 細胞のセロトニン放出を制御するのか? あるいは、様々な摂食条件で EC 細胞の TRPA1 活性化度合いがどのように異なるのかは全く分かっていない。

TRPA1 は AITC 以外に、細胞外 Ca^{2+} によっても活性化される。TRPA1 は複数のリガンドが作用するとそれぞれのリガンドに対する活性化閾値が低下することで応答性が増強する synergistic effect を有する。つまり、消化しにくい肉などを食べる際に天然塩とマスタード(AITC)などの薬味をつけて味わうことで、TRPA1 の著しい活性化が起こり、腸管蠕動運動が著しく促進すると考えられる。そして、この蠕動運動促進が消化を助けている可能性が高い。味覚への嗜好性に加え、このような生理学的背景事情を有するが故に肉を食べる際に塩と一緒に摂取する行動をする可能性が高いと研究実施者は考えた。

上記の細胞外 Ca^{2+} 環境変化は天然塩を摂取した場合を想定しているが、 Ca^{2+} をほとんど含まない精製塩の場合も、天然塩と同様に腸管内 Na^+ 濃度が上昇する。TRPA1 は Na^+ 透過性が最も高いため、この腸管内 Na^+ 濃度上昇が、TRPA1 活性化の増大をもたらすドライビングフォースになっていると考えられる(細胞外 Na^+ 濃度が高いほど、TRPA1 を介した Na^+ 流入・ Na^+ 依存的電流が大きくなる)。この仮説を検証し、食塩摂取に応じて TRPA1 活性が上昇し、消化吸収を促進していることを明らかにすることを試みた。

食塩の摂取は、高血圧などのリスクファクターと考えられて多くの警鐘がなされているが、摂食により生理学的にプラスに働く機能も持っていることを示そうと考えた。本研究では、食事により摂取する食塩が EC 細胞に作用し、腸管蠕動運動の促進により消化と栄養吸収が向上することを分子レベルで解明することに挑んだ。

2. 研究方法

2.1 マウスの灌流固定と小腸組織の調製

動物実験の取り扱いについては文部科学省の定める基本指針に則り、長崎県立大学動物実験規定に従い行った。発泡スチロールに氷とホルマリン(50 mL チューブ)を用意した。ペリスタポンプからホルマリンが流れることを確認したのちに、以下の実験を行った。成体 C57BL/6 マウス(2~4 ヶ月齢)の体重を測定し、体重あたり 1%のネンブタール溶液(in PBS)を腹腔内に注射した。十分に麻酔が効いたことを確認し、発泡スチロール上にペーパータオルを 2 枚用意したのちに、留め針を用いて、マウスを固定した。ジエチルエーテルを染み込ませたペーパータオルを 15 mL チューブの中に入れてマウスの口元にあて、吸

入麻酔とした。腹部の余分な毛を切り落としたのちに開腹した。ろっ骨を切り開いたのちに、露見した心臓の右心房を切り、すぐさま左心室に注射針(26 G)を刺し、ホルマリンをペリスタポンプにて、体内循環させた。体内循環による脱血、固定を確認したのちに、小腸を取り出した。取り出した小腸は、4°Cで1晩、後固定をホルマリン液に浸して行った。その後、DEPC-PBS 液で 30 分×3 回の洗浄を行った。さらに、小腸を 25%スクロース/DEPC-PBS 液に置換し、脱水を行った。この後、小腸組織は OTC コンパウンドに包埋し、凍結保存した。

2.2 *In situ* hybridization

上述した凍結小腸をサンプルとして用い、クライオスタットにて 14 mm の凍結切片を薄切しスライドガラスにのせ、以下の操作を行った。

(1 日目)

染色壺にスライドガラスを並べ、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で 5 分間固定し、DEPC-PBS で 2 回洗浄後、Proteinase K sol'n で 15 分処理をした。その後、4%PFA で再度、5 分間固定をした。DEPC-PBS で 2 回洗浄後、0.1 M TEA (TEA 0.742 g + 180 μ l 10 N NaOH + DEPC-DW 40 mL) , 0.1 M TEA + 無水酢酸 100 μ l でアセチル化させた。スライドガラスを染色壺から取り出し、モイスチャーチャンバーに並べてから、Hybridization buffer (4x SSC/ 0.5 mg/ml Yeast tRNA/1x Denhardt's sol'n/5 mM EDTA/50% formamide) 200 μ l + 合成 RNA プローブ (anti TRPA1) 3 μ l を添加し、スライドガラス上の小腸切片と合成 RNA プローブをパラフィルムで挟み、60°Cで一晩インキュベートした。

(2 日目)

60°Cに温めた 4x SSC にスライドガラスを入れて、パラフィルムを取り除いた。その後、スライドガラスを染色壺にいれ、60°Cに温めた 2x SSC/50%ホルマリン(FA)で 20 分間3回洗浄後、RNase buffer を添加し、室温で 10 分間 2 回洗浄した後、PBS-T で洗浄した。スライドガラスをモイスチャーチャンバーに並べた後、3% BSA blocking reagent 500 μ l を添加し、室温で 1 時間反応させた。ペーパータオル上で溶液を取り除いてから、アルカリホスファターゼ結合型 anti-DIG antibody in blocking reagent 500 μ l を添加し、室温で 2 時間反応させた。スライドガラスを染色壺にいれ、PBS-T で 15 分間 2 回、Staining buffer で 10 分

間洗浄をした後, NBT 4.5 μ l + BCIP 3.5 μ l in Staining buffer 1000 μ l を添加し, スライドガラスを黒いモイスチャーチャンバーに並べた。この暗所条件下で, 室温にて一晩反応した。

(3 日目)

小腸切片にアルカリホスファターゼによる青紫色の発色が起こっていることを肉眼で確認後, 水道水で 4~5 回程度スライドガラスを洗浄した。その後, CC/Mount を 3 滴落とし, カバーガラスをのせ封入をした。

正立顕微鏡(オリンパス BX51)で観察し, CCD カメラ(オリンパス DP81)で撮影を行った。

2. 3 培養用丸ガラスの前処理

1 つの 3.5 cm dish に対して丸ガラス(松波 14 mm 直径)を 4 枚重ならないように並べ, 各ガラスにポリリジン(PLL)溶液を 100 μ l のせ, 1 時間以上コートを行った。その dish に 1 ml の PBS を加えアスピレータで吸引する作業を 2 回繰り返し洗浄し, 細胞培養用のガラスを調製した。

2. 4 マウスからの小腸 EC 細胞の培養

C57BL6/J マウス(8 週齢)から小腸を摘出した。実体顕微鏡下にて, 膜を剥がし, 内容物を取り除いた後で, 小腸を細かく切断した。細かくなった小腸をパパイ(200 U) 1 ml が入ったプラスチック試験管に移し, 30 分間インキュベートした。その後, 組織をパスツールピペットで砕いた。さらにバーナーでパスツールピペットを炙り, 先端を細くしてから組織をさらに砕く操作を行った。50 ml チューブに cell strainer を装着し, 懸濁液をアプライした。その上から DMEM 培地 2 ml をアプライし, 濾過した。濾過液を 15 ml チューブに全量移し 1000 rpm, 5 分で遠心した。遠心した上清はアスピレータで吸引し, 細胞塊を単離した。その後, 細胞塊に DMEM 培地 1.5 ml 加え再懸濁した。細胞培養用ガラスに懸濁液を 100 μ l ずつ播種した。その後, 細胞は CO₂ 5.0%, 37°C 条件下でインキュベートした。翌日, ガラスに播種した細胞に 1 ml の DMEM 培地(組成; 和光 D-MEM(L-グルタミン, フェノールレッド含有) + 10% 牛胎仔血清 + 1% ペニシリン/ストレプトマイシン)を加えた。その後, 1~2 週間培養し, 実験に用いた。

2. 5 実験溶液

Ca²⁺イメージング・電気生理学解析には, 以下の溶液を用いた。細胞外液; 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM グルコース(pH7.4)。

電極内液; 140 mM KCl, 5 mM EGTA, 10 mM HEPES (pH7.4)。

2. 6 Ca²⁺イメージング

マウスの小腸から調製した培養 EC 細胞(14 mm 丸ガラス in 3.5 cm dish)を細胞外液 1000 μ l で洗浄後, 細胞外液 1000 μ l + FuraRed-AM(カルシウム蛍光指示薬) 1 μ l + Pluronic F127 (界面活性剤) 1 μ l を添加し, 37 °C, 30 分間インキュベートした。本カルシウム蛍光指示薬は, 生細胞内へ取り込ませるよう脂溶性を高めたアセトキシメチル(AM)体が用いられている。アセトキシメチル基は細胞内でエステラーゼにより加水分解され, FuraRed となる。FuraRed は励起波長: 480 nm, 蛍光波長: 535 nm / 670 nm で蛍光強度変化を起こす。Ca²⁺濃度が高くなると 535 nm の蛍光強度が低下し, 670 nm の蛍光強度が増加する。そのときの蛍光強度比(R = Fex.670 nm/Fex.530 nm)をとると, 色素の濃度, 光源の強度, 細胞の大きさ等に関係なく Ca²⁺濃度を解析することが出来る。柴崎研究室では, この蛍光変化を測定するために蛍光正立顕微鏡(オリンパス BX51WI), 励起フィルターホイール・吸収フィルターホイール・フィルターホイールコントローラー(Ludl 社), CMOS センサーカメラ(Andor Neo), 蛍光イメージング解析ソフト(Molecular Device 社, MetaFluor)からなる機器をセットアップして, 使用した。

Ca²⁺イメージングを行う際には, 10 sec ごとのインターバルで 10 分間(61 フレーム)のリアルタイムイメージングを行った。実験の途中で, 30 μ M AITC(TRPV4 活性化剤)を投与し, 細胞の Ca²⁺応答を調べた。

2. 7 電気生理学解析

ガラス電極は先端抵抗 4~6 M Ω のものを使用した。Voltage Clamp モードは膜電位 -60 mV にて記録を行った。記録は, Axon 200B アンプ・pClamp10 ソフトウェアを使用し, 5 kHz フィルター, サンプリングレート 10 kHz にて行った。

3. 研究結果

3. 1 TRPA1 は小腸 EC 細胞に発現する

研究実施者は, 小腸における TRPA1 発現を *in situ* hybridization 法で解析した[7]。その結果, 既報に報告されているとおり, 小腸の EC 細胞に TRPA1 が限局して発現していることを確認した(図1)。

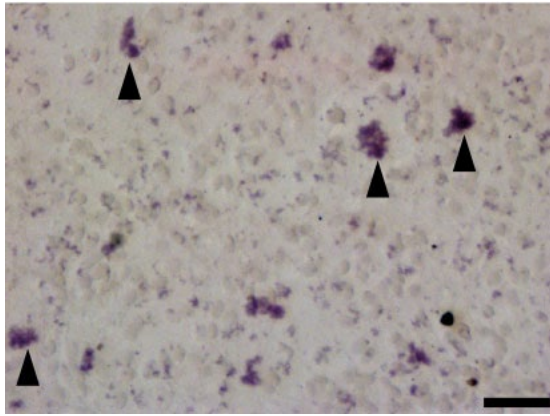


図1 小腸 TRPA1 mRNA 発現
 マウス小腸切片における TRPA1 の mRNA 発現。EC 細胞 (矢頭) に TRPA1 の発現を認める。

3.2 培養 EC 細胞への天然塩摂取(高 Na⁺・Ca²⁺)条件刺激は, TRPA1 の活性化を増強する。

研究実施者はマウス小腸から EC 細胞を単離した後, それを培養してアッセイを行った[8]。天然塩を摂取すると腸管 EC 細胞の細胞外 Na⁺・Ca²⁺環境は, 高 Na⁺・Ca²⁺環境へと変化する。TRPA1 は, 細胞外 Ca²⁺によって活性化するため, この高 Ca²⁺環境は, EC 細胞の TRPA1 活性化を亢進すると予想した。TRPA1 は Na⁺透過性が最も高いため, 腸管内 Na⁺濃度上昇は, TRPA1 活性化の増大をもたらす

ドライビングフォースになっていることも考えられる(細胞外 Na⁺濃度が高いほど, TRPA1 を介した Na⁺流入・Na⁺依存的電流が大きくなる)。この仮説を検証するため, 培養 EC 細胞を用いた Ca²⁺-imaging 実験を行った(図 2, 3)。

正常の細胞外環境(140 mM Na⁺, 2 mM Ca²⁺)において, TRPA1 活性化剤(1 μM AITC)を投与し, TRPA1 活性化能を Ca²⁺-imaging 法にて評価したところ, 培養 EC 細胞では微弱な細胞内 Ca²⁺濃度上昇を認めた(図 2)。一方, 天然塩を摂取したことを想定し, 細胞外環境を高 Na⁺・Ca²⁺条件(165 mM Na⁺, 6 mM Ca²⁺)に変化させると, TRPA1 活性化能が著しく増大した。この Ca²⁺-imaging の結果と一致して, ホールセルパッチクランプ法を用いて, 正常の細胞外環境(140 mM Na⁺, 2 mM Ca²⁺)と高 Na⁺・Ca²⁺条件(165 mM Na⁺, 6 mM Ca²⁺)とで, TRPA1 活性化電流の大きさに違いがあるのかを調べたところ, 高 Na⁺・Ca²⁺条件で TRPA1 活性化電流が有意に増大した。

これらのことから, 食塩摂取には腸管内 EC 細胞の TRPA1 活性化を増大させ, セロトニン放出を介して, 腸管蠕動運動を促進し, 消化吸収を良くするポジティブな効果があると考えられる。現在, 細胞外環境を高 Na⁺・Ca²⁺条件に変化させた場合のセロトニン放出増加・腸管蠕動運動の促進が行っているのかについて解析を行っているところである。

正常細胞外 Na⁺・Ca²⁺濃度

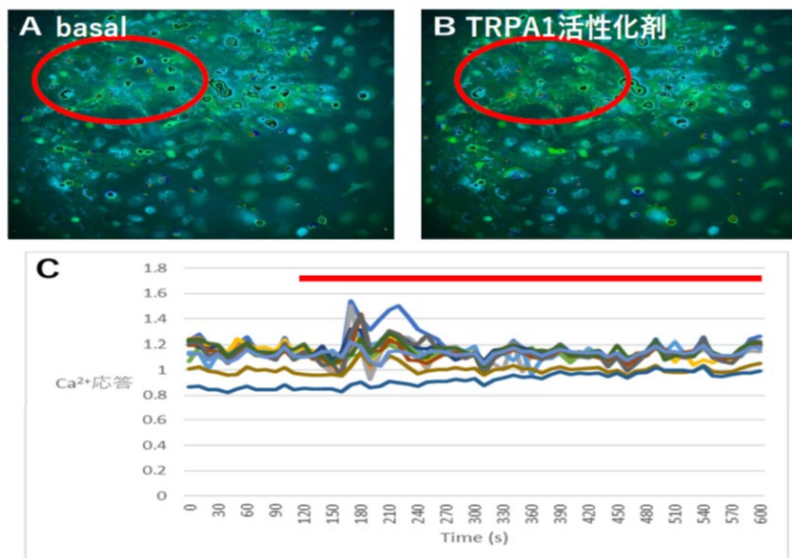


図2 正常環境における EC 細胞の TRPA1 活性化
 正常環境(140 mM Na⁺, 2 mM Ca²⁺)において, TRPA1 活性化剤(1 μM AITC)を投与し, TRPA1 活性化能を Ca²⁺ imaging 法にて評価した。

正常細胞外高 Na^+ ・ Ca^{2+} 濃度

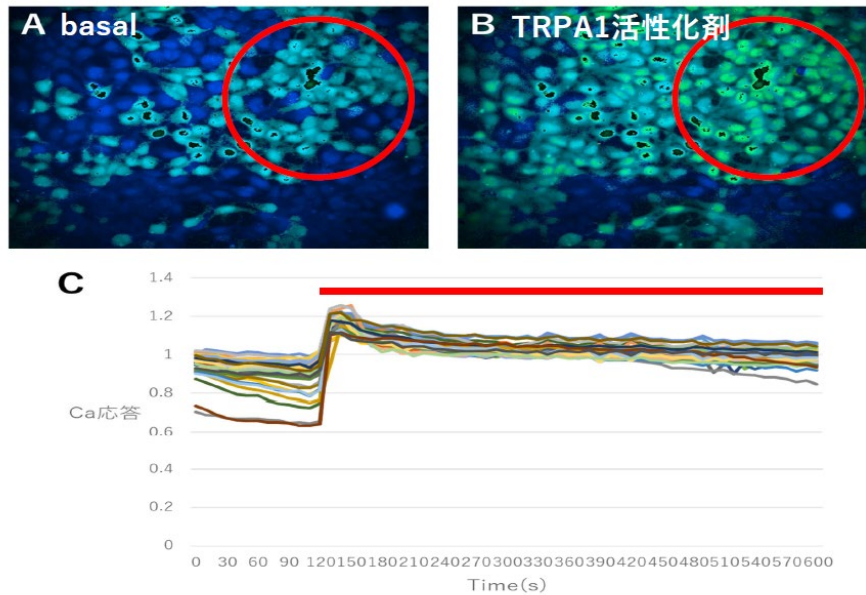


図3 高 Na^+ ・ Ca^{2+} 環境における EC 細胞の TRPA1 活性化
高 Na^+ ・ Ca^{2+} 条件 (165 mM Na^+ , 6 mM Ca^{2+}) において, TRPA1 活性化剤 (1 μM AITC) を投与し, TRPA1 活性化能を Ca^{2+} imaging 法にて評価。

4. 考察

今世紀に入り, 分子生物学・生理学を融合し, 且つ, 最先端の機器を駆使することにより次々とイオンチャネル・センサー分子の新たな機能が同定され続けている[9] [10] [11] [12,13]。そして, 昨年は「TRPV1 分子の発見と温度を感じるメカニズム」と「Piezo 分子の発見と触覚を司るメカニズム」がノーベル生理学医学賞の受賞対象となった。本研究でターゲットにした TRPA1 は, TRPV1 類縁体であり, 医学的・生理学的にその関心が高まっている分子といえる。本研究の結果から, 食塩摂取には腸管内 EC 細胞の TRPA1 活性化を増大させ, セロトニン放出を介して, 腸管蠕動運動を促進し, 消化吸収を良くするポジティブな効果があると考えられた。著者を筆頭に, TRPA1 分子の特性解析を切り口にして進んでいけば, 全く手つかずであった「食塩摂取がもたらす消化促進効果」の分子メカニズムは解明されていくものと期待される。この研究の重要なポイントは研究対象分子が様々な食品成分で活性化する TRPA1 分子だということである。研究が進めば, 効率的な TRPA1 の活性化のさせ方が明らかになり, 消化吸収促進の薬剤開発が可能になるかもしれない。

5. 今後の課題

以上の結果から, 食塩の摂取は, 高血圧などのリスクファクターと考えられて多くの警鐘がなされているが, 摂食により生理学的にプラスに働く機能も持っていることが示された。

これらのことから, 食塩摂取には腸管内 EC 細胞の TRPA1 活性化を増大させ, セロトニン放出を介して, 腸管蠕動運動を促進し, 消化吸収を良くするポジティブな効果があると考えられた。現在はまだ, 細胞外環境を高 Na^+ ・ Ca^{2+} 条件に変化させた場合のセロトニン放出増加・腸管蠕動運動の促進が起こっているのかについて解析を行っている最中である。この解析結果が研究実施者の予想通りであれば, 食塩摂取によるポジティブな効果が明らかに出来る。ただし, 小腸内にわずかにしか存在しない EC 細胞の単離・培養がとても難しいため, かなりの時間がかかると予想される。

このように腸管 EC 細胞と TRPA1 機能の新たな特徴を掘り下げていくことで, 新規の薬剤ターゲットを発見できるかもしれない。

6. 文献

1. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398: 436-441.
2. Shibasaki K, Suzuki M, Mizuno A, Tominaga M (2007) Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 1566-1575.
3. Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, et al. (2003) TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circulation research* 93: 829-838.
4. Suter DM, Miller KE (2011) The emerging role of forces in axonal elongation. *Progress in neurobiology* 94: 91-101.
5. Smith DH (2009) Stretch growth of integrated axon tracts: extremes and exploitations. *Progress in neurobiology* 89: 231-239.
6. Shibasaki K, Murayama N, Ono K, Ishizaki Y, Tominaga M (2010) TRPV2 enhances axon outgrowth through its activation by membrane stretch in developing sensory and motor neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 4601-4612.
7. Naruse K, Yamada T, Sokabe M (1998) Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch. *The American journal of physiology* 274: H1532-1538.
8. Mihara H, Boudaka A, Shibasaki K, Yamanaka A, Sugiyama T, et al. (2010) Involvement of TRPV2 activation in intestinal movement through nitric oxide production in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 16536-16544.
9. Park U, Vastani N, Guan Y, Raja SN, Koltzenburg M, et al. (2011) TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31: 11425-11436.
10. Shibasaki K, Ishizaki Y, Mandadi S (2013) Astrocytes express functional TRPV2 ion channels. *Biochemical and biophysical research communications* 441: 327-332.
11. Shibasaki K, Ikenaka K, Tamalu F, Tominaga M, Ishizaki Y (2014) A novel subtype of astrocytes expressing TRPV4 regulates neuronal excitability via release of gliotransmitters. *The Journal of biological chemistry* 289: 14470-14480.
12. Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, et al. (2010) Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330: 55-60.
13. Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R, Grandl J, et al. (2012) Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature* 483: 176-181.

Promotion of Intestinal Motility by TRPA1 Activation through Salt Intake.

Koji Shibasaki

Laboratory of Neurochemistry, Department of Nutrition Science, University of Nagasaki

Summary

Serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) is abundantly present throughout the gastrointestinal tract and stored mostly in enterochromaffin (EC) cells, which are existed in the mucosal surface. 5-HT released from EC cells stimulate intrinsic and extrinsic nerves, and caused gastrointestinal contractions. EC cells are believed to have the ability to respond to the chemical composition of the luminal contents of the gut; however, the underlying molecular and cellular mechanisms have not been well identified. It was reported that the transient receptor potential (TRP) cation channel TRPA1 is highly expressed in EC cells. TRPA1 agonists, such as allyl isothiocyanate and cinnamaldehyde, stimulate EC cell functions, such as increasing intracellular Ca^{2+} levels and 5-HT release. It has been reported that TRPA1 is activated by various stimuli such as cold ($<17^{\circ}\text{C}$), Allyl isothiocyanate (AITC in Wasabi and mustard oil), extracellular alkaline condition and mechanical stimulus. All TRP channels have unique properties called as synergistic effects. If we apply two different agonists, thresholds of each agonist can be effectively reduced. Thus, we can observe significant TRP channel activation by combination of two different agonists. These backgrounds indicate that TRPA1 can be potentiated by weak alkaline condition. In this study, we examined the possibility by physiological experiments. We prepared cultured EC cells from mouse small intestine, and examined the effects of extracellular high Na^{+} and Ca^{2+} conditions on TRPA1 activation by AITC. AITC-activated TRPA1 currents were significantly potentiated in the high Na^{+} and Ca^{2+} condition compared with those in normal salt condition. These results indicate that high Na^{+} and Ca^{2+} condition significantly enhances the TRPA1 property for AITC responses. We expected that these properties promotes intestinal motility.