

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

日本味と匂学会誌 (2007.12) 14巻3号:489～492.

嗅細胞の軸索に発現するTRPV2の生理的意義

神山直也、松井等、高草木薫、柏柳誠

嗅細胞の軸索に発現する TRPV2 の生理的意義

神山 直也・松井 等・高草木 薫・柏柳 誠

(旭川医大・医・生理学講座・神経機能分野)

目 的

嗅上皮には嗅細胞へと成長する幹細胞があり、成体でも一定の周期で神経細胞死と嗅球へ投射する軸索回路の再構築が行われている¹⁾。軸索の伸長は神経成長因子 (NGF) などの成長因子によって神経細胞内のカルシウムイオン濃度上昇が起こり、これが引き金となって細胞内シグナル因子が活性化されることで進んでゆく。しかしながら細胞膜上で受けたこれら神経成長因子受容体からのシグナルによって機能する、カルシウムイオン濃度上昇をもたらすチャネルについてはよくわかっていない。

前回までに我々は、非選択的陽イオンチャネル TRPV2 mRNA が嗅細胞に発現し、チャネル分子は軸索に限局していることを報告した²⁾。神経栄養因子のひとつであるインスリン様成長因子-I (IGF-I) は TRPV2 のトランスロケーションを制御するとの報告³⁾に基づき、我々はマウス単離嗅細胞を用いて TRPV2 アゴニストである 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) ならびに IGF-I による嗅細胞内カルシウム濃度変化について詳細な検討を行った。

方 法

実験には雄性 C57BL/6 マウス (8-12 週齢) を用いた。嗅上皮における TRPV2 ならびに IGF-I 受容体の mRNA 発現確認は RT-PCR により行った。鼻中隔から粘膜を剥離し、粘膜固有層を実体顕微鏡下で除去したものを嗅上皮組織試料として TRIzol reagent を用いて total RNA を採取した。また、細胞内カルシウム濃度変化の測定には単離した嗅細胞を用いた。100 μm の厚さにスライスした嗅上皮を Ca^{2+} -free Ringer 液中 37°C でインキュベートし、酵素処理を行わずに単離した後、細胞内カルシウム濃度の指示薬として Fluo-4 AM (同仁化学) 2 μM を細胞にロードした。細胞内カルシウム濃度の変化は、蛍光顕微鏡下にて観測中に溶液交換が可能なユニット⁴⁾を用いて、励起波長 488 nm、蛍光波長 505-550 nm で連続的に記録した。2-APB (1 mM、アルファ・エイサー)、IGF-I (25 ng/ml、インビトロジェン) ならびに SKF96365 (20 μM 、シグマアルドリッチ) は normal Ringer 液に溶解し、 Ca^{2+} -free 溶液には 1 mM EGTA 含有 Ca^{2+} -free Ringer 液を用いた。また、溶液を切り替える電磁バルブを操作してから細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が観察されるまでの時間を計測した。

結 果

マウス嗅上皮から抽出した mRNA を用いた RT-PCR の結果、嗅上皮において TRPV2 と IGF-I 受容体がともに発現していることを確認した (図 1)。そこでまず TRPV2 アゴニストである 2-APB 刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度について検討したところ、36 細胞中 31 細胞で細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がみられた。しかし、細胞外液が Ca^{2+} -free の場合には細胞内 Ca^{2+} 濃度上

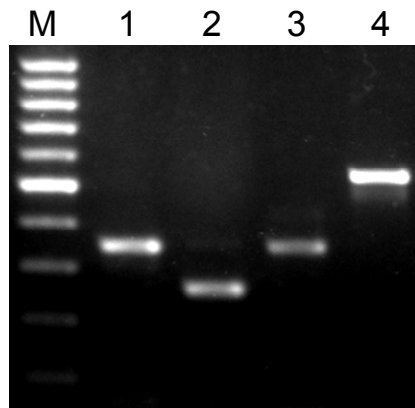


図1 嗅上皮に共存する TRPV2 と IGF-I 受容体の mRNA。粘膜固有層を含まない嗅上皮より抽出した mRNA を用いて RT-PCR を行った。嗅上皮には TRPV2 と IGF-I 受容体が共に存在していた。Lane 1-4 は順に TRPV2 (345 bp)、IGF-I 受容体(260 bp)、olfactory marker protein (347 bp)、 β -actin (531 bp)を示している。M; 100 bp ラダー。

昇は有意に抑制された ($p < 0.001$)。これらのことから、2-APB 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は主に細胞外からの Ca^{2+} 流入によるものであることが示唆された。また、2-APB と同時に TRPV2 の阻害薬である SKF96365 を加えたときの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は 27 細胞中 18 細胞で観察されたものの、その濃度変化は 2-APB 単独群と比べて有意 ($p < 0.01$) に抑制された (図 2A)。このことから 2-APB による嗅細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇に TRPV2 が関与している可能性が示された。

次に、IGF-I 刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度について検討したところ、28 細胞中 24 細胞で細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がみられた。さらに、2-APB 刺激と同様に細胞外液が Ca^{2+} -free の場合には細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇はみられなかった ($p < 0.01$)。これらのことから、IGF-I 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、主に細胞外からの Ca^{2+} 流入によるものであることが示唆された。そこで、IGF-I 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対しても 2-APB と同様に SKF96365 が抑制効果を示すかを検討したところ、SKF96365 は IGF-I による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対しても有意 ($p < 0.01$) に抑制効果を示した (図 2B)。したがって、IGF-I による嗅細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇機構に TRPV2 を介した細胞外からの Ca^{2+} 流入が関与している可能性が示唆された。

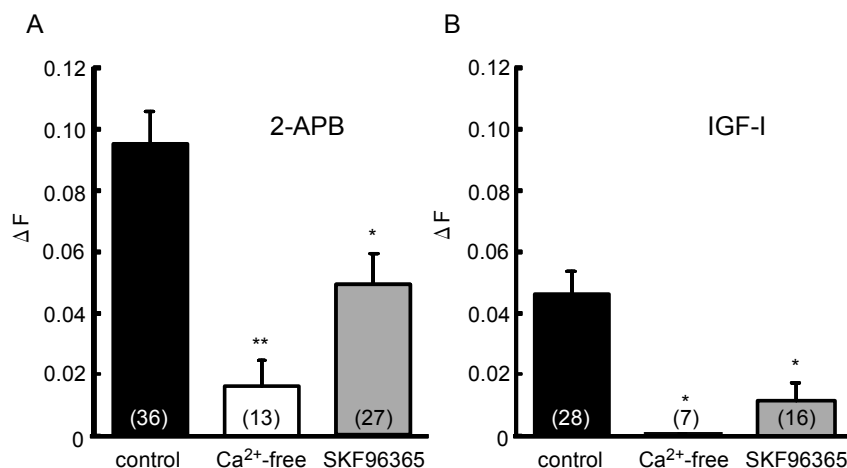


図2 (A)2-APB および(B)IGF-I 刺激に対する単離嗅細胞内 Ca^{2+} 濃度変化(mean + S.E.)。 ()内は例数。*; $p < 0.01$ 、**; $p < 0.001$ 。

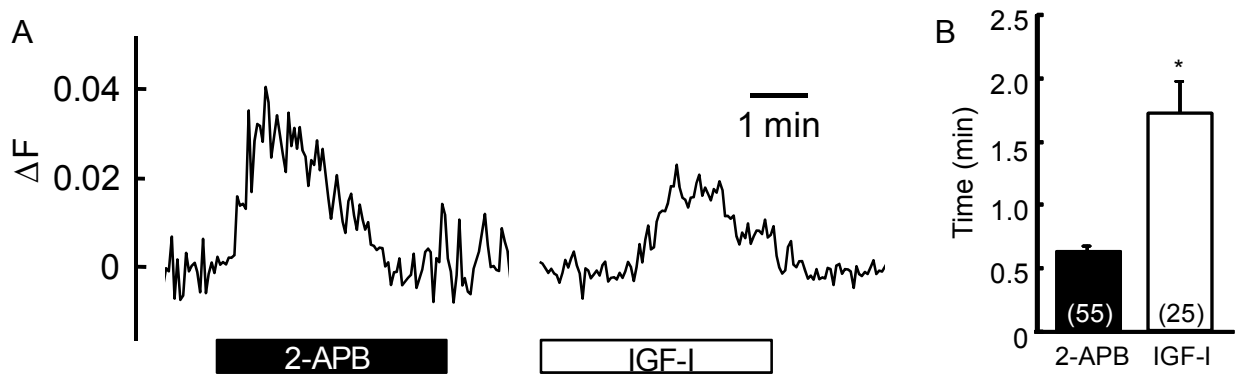


図3 (A) 2-APB および IGF-I の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化トレースならびに(B) 刺激開始から細胞内 Ca^{2+} 濃度変化までの時間 (mean + S.E.)。 () 内は例数。*; $p < 0.001$ 。

また、2-APB 刺激時と IGF-I 刺激時はともに細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がみられたものの、そのトレースを比較したところ溶液を切り替えてから細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がみられるまでの時間について計測したところ、2-APB 刺激の際の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が 0.61 ± 0.06 (mean \pm S.E.) であったのに対して IGF-I 刺激では 1.73 ± 0.25 min と有意 ($p < 0.001$) に長かった (図 3)。

考 察

Suzuki らは成体ラット嗅細胞および嗅神経末に IGF-I 受容体タンパクが発現していることを示している⁵⁾。今回のマウス嗅上皮の RT-PCR の結果から、マウス嗅細胞においても IGF-I 受容体が発現していることが示唆された。また、我々は TRPV2 mRNA がマウス嗅細胞に発現していることを *in situ* ハイブリダイゼーションによって確認している²⁾。これらのことから、Kanzaki らが TRPV2 発現 CHO 細胞で見出した IGF-I による TRPV2 トランスロケーションならびに細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇²⁾が嗅細胞においても見られる可能性が示唆された。

2-APB は TRPV1、TRPV2、TRPV3 を活性化させる一方、TRPV4、TRPV5、TRPV6 は活性化させず、さらに TRPC6 や TRPM8 に対しては抑制的に働くことから TRPV1-3 に対するアゴニストとしては比較的選択性が高いことが示唆されている⁶⁾。単離嗅細胞において 2-APB 刺激によって細胞外からの Ca^{2+} 流入が生じ、さらに TRP ファミリーの阻害薬である SKF96365 によって細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が抑えられたことから、嗅細胞に発現している TRPV2 が Ca^{2+} 流入に関与しているものと考えられる。

一方、IGF-I 刺激によっても細胞外からの Ca^{2+} 流入とみられる嗅細胞内の Ca^{2+} 濃度上昇が観察され、さらにその濃度上昇は SKF96365 によって抑制されたことから、IGF-I は TRP ファミリーを介した Ca^{2+} 流入を引き起こした可能性が考えられる。

TRPV2 に加えて、NGF および上皮細胞成長因子がそれぞれ細胞膜上の TRPV1 および TRPC5 の蛋白発現量が増加させることが報告されている^{3,7,8)}。これらの結果は、これらの成長因子が細胞内の TRP ファミリーを細胞膜表面へ移行させることを示唆している。さらに、これらの細胞膜への移行は、作用させてから数十秒から数分遅れて観察されることが報告されている。今回の我々の結果でも、2-APB を用いて TRPV2 を直接刺激した場合よりも IGF-I で刺激した場合では細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇までの時間が 1 分ほど長くかかっている。

た。以上のことから、嗅細胞において観察される IGF-I 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、TRPV2 のトランスロケーションを介したものである可能性が示唆された。

TRPV2 は 52°C 以上の高温に応答する TRP ファミリーとして知られている⁹⁾が、嗅細胞軸索に発現している TRPV2 の生理的意義については不明であった。我々の今回の結果は、嗅細胞軸索に発現している TRPV2 が IGF-I などの成長因子のシグナルを受けて細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を介し、成体でも常に起こっている嗅神経の再生に関与している可能性を示唆するものであると考えられる。

文 献

- 1) Graziadei PP and Graziadei GA: Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J. Neurocytol.* 8, 1-18 (1979)
- 2) 神山直也, 松井等, 柏柳誠: マウス嗅上皮に発現する TRP チャネル. 日本味と匂学会誌 13, 559-560 (2006)
- 3) Kanzaki M, Zhang Y-Q, Mashima H, Li L, Shibata H and Kojima I: Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat. Cell Biol.* 1, 165-170 (1999)
- 4) Kashiwayanagi M, Tatani K, Shuto S and Matsuda A: Inositol 1,4,5-triphosphate and adenophostin analogues induce responses in turtle olfactory sensory neurons. *Eur. J. Neurosci.* 12, 606-612 (2000)
- 5) Suzuki Y and Takeda M: Expression of insulin-like growth factor family in the rat olfactory epithelium. *Anat. Embryol.* 205, 401-405 (2002)
- 6) Hu HZ, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, Lee LY, Wood JD and Zhu MX: 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem.* 279, 35741-35748 (2004)
- 7) Zhang X, Huang J and McNaughton PA: NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J.* 24, 4211-4223 (2005)
- 8) Bezzerides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A and Clapham DE: Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol.* 6, 709-720 (2004)
- 9) Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ and Julius D: A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398, 436-441 (1999)