

AMCoR

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

日本味と匂学会 (2006) 13:559-560.

マウス嗅上皮に発現するTRPチャンネル

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

神山 直也・松井 等・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⁾。したがって、嗅覚系は軸索伸長の機構を研究する上で非常に優れた実験系であるといえる。

軸索の伸長は一時的に nerve growth factor (NGF) などの神経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。

本研究では非選択的陽イオンチャネルである transient receptor potential (TRP) ファミリーが嗅細胞の軸索伸長過程において細胞内カルシウムイオン濃度調整を担う分子実体ではないかと考え、種々の検討を行った。

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 TRP ファミリーの mRNA 発現確認は RT-PCR により行った。マウスを 4% パラホルムアルデヒド溶液含有りん酸緩衝液 (PFA-PBS) を用いて環流固定した後、組織を取り出し 4% PFA-PBS に 12 時間、0.5M EDTA 溶液に 3 日間、その後 30% ショ糖に 12 時間置くことで脱灰を行い、クリオスタットにより 12 μm の凍結切片を作製した。mRNA の局在を *in situ* hybridization、ならびにタンパクの局在を免疫組織化学染色により確認した。*in situ* hybridization にはジゴキシゲニン標識したプローブを用い、アルカリ性ホスファターゼ結合抗ジゴキシゲニン抗体と反応させ、NBT/BCIP の発色により検出した。免疫組織化学染色は Alexa Fluor 488 もしくは Rhodamine により蛍光標識した二次抗体を用い蛍光顕微鏡により観測した。Insulin-like growth factor I (IGF-I) 受容体と TRPV2 の共発現についての確認は、嗅細胞を単離しコンカナバリン A をコートしたガラススリップの上に接着させ免疫細胞染色を行った²⁾。また、単離嗅細胞の細胞内カルシウム濃度変化を測定した。嗅細胞は Ca^{2+} -free とした Ringer 液中 37 でインキュベートし、酵素処理を行わずに単離した。細胞内カルシウム濃度は指示薬として Fluo-4 AM (同仁化学) 2 μM を細胞にロードし、normal Ringer 液中において蛍光顕微鏡にて励起光 488 nm、検出波長 505-550 nm で観測した。観測には、測定中に溶液交換を行うことのできるユニットを用いた³⁾。

結 果 と 考 察

マウス嗅上皮から抽出した mRNA を用いて TRP ファミリー 22 種 (TRPC1-7、TRPM1-8、TRPV1-6、TRPA1) について RT-PCR を行ったところ TRPC1、TRPC6、TRPM3、TRPM4、TRPM5、TRPM6、TRPM7、TRPV2、TRPV6 ならびに TRPA1 の存在が確認された。次にこれらの mRNA の嗅上皮における局在を確かめるために *in situ* hybridization を行った。TRPV2 (vanilloid receptor-like protein 1: VRL-1、growth factor regulated channel: GRC) mRNA は嗅細胞に局在していたが、特に分化の早い段階にある基底細胞の近傍において、強いシグナルが見られる傾向にあった。一方、嗅細胞のマーカーとして olfactory marker protein (OMP) を用い TRPV2 と共に免疫組織染色を行った結果、TRPV2 タンパクは主に嗅細胞の軸索に存在し、細胞体における発現は低いことが明らかとなった。このことから、TRPV2 は軸索伸長が行われる分化の早い段階に細胞体において mRNA が産生され、タンパクは軸索に発現している可能性が示唆された。

嗅細胞の軸索には成長因子受容体のひとつである IGF-I 受容体 (IGF-IR) が発現しているとの報告があり⁴⁾、TRPV2 を一過的に過剰発現させた CHO 細胞では IGF-I 添加により細胞内カルシウム濃度が上昇することが報告されている⁵⁾。そこで嗅細胞において IGF-IR と TRPV2 がどのように機能しているかを明らかにするため、まず免疫細胞染色を用いて嗅細胞における IGF-IR と TRPV2 のタンパク発現についてより詳細に検討を行った。その結果、IGF-IR および TRPV2 が同一の嗅細胞に共発現していることが認められた。そこで、単離した嗅細胞に対して IGF-I (recombinant, human) を添加し、細胞内カルシウム濃度変化を観測した。その結果、IGF-I 25 ng/ml を作用させたところ、嗅細胞内のカルシウム濃度の上昇が認められた。これらの結果から IGF-I が嗅細胞の軸索成長因子として働き、嗅細胞の軸索において IGF-IR 活性化によって起こる細胞内カルシウム流入が TRPV2 によって引き起こされる可能性が示された。今後、細胞内カルシウム濃度の上昇が小胞体からの放出によるものか、細胞外からの流入によるものかを明らかにし、軸索伸長時の細胞内カルシウム流入における TRPV2 の関与について更なる検討を予定している。

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) Hegg CC, Greenwood D, Huang W, Han P and Lucero MT: Activation of purinergic receptor subtypes modulates odor sensitivity, *J. Neurosci.* 23, 8291-8301 (2003)
- 3) 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)
- 4) Suzuki Y and Takeda M: Expression of insulin-like growth factor family in the rat olfactory epithelium. *Anat. Embryol. (Berl.)* 205, 401-405 (2002)
- 5) 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)