

家畜・家禽におけるTRPV1酸応答の電気生理学的解析

川端二功

緒言

畜産食品は我々の食生活になくてはならない食材であり、世界人口が増加し続ける現代社会においては、環境にも配慮しながら効率的にこれらを生産する必要性が年々増している。効率的な畜産物の生産のためには、家畜・家禽の食性、すなわち味覚受容機構を詳細に理解する必要がある。本研究では特に酸味に着目し、とりわけ口腔内の感覚神経終末に存在し、体性感覚として酸の受容に関わる可能性が考えられるTransient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) を解析対象とした。TRPV1は唐辛子の辛味成分であるカプサイシンの受容体として発見され、カプサイシン以外にも43°C以上の熱や低pHにも応答性を示す多刺激受容体である^[1]。本研究ではニワトリのTRPV1の酸応答性をマウスのTRPV1と比較検討することで、家禽における体性感覚の酸受容の特徴を明らかにし、家禽の効率的な生産につなげることを目的としている。

稲田らは、これまでに酸味受容体候補分子であるPKD1L3/2L1複合体が酸に応答し、とりわけ酸刺激が取除かれた後に初めて活性化される「オフ応答」を示すことを明らかにしている^[2]。危険な食物のシグナルとなる強い酸刺激は、唾液で洗い流された後にも感じる必要性があり、その役割をPKD1L3/2L1が担っていると推察されている。PKD1L3/2L1は味蕾に発現しているが^[3]、一方でTRPV1は味蕾ではなく口腔上皮の感覚神経終末に発現している^[4]。TRPV1は辛味の受容体として機能し、体性感覚として辛味を感じさせていることから、TRPV1の酸応答も体性感覚としての酸味受容に関与していると考えられる。面白いことに、ニワトリのTRPV1は辛味をほとんど受容しない^[5]。従って、動物種間によってTRPV1の酸応答も異なる可能性が考えられるが、それらを検証した研究はほとんどない。

方法

1. ホールセルパッチクランプ

ヒト胎児腎臓由来細胞HEK293Tを、10% FBS (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), ×100 Penicillin-Streptomycin 溶液(和光純薬工業、大阪)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium(高グルコースDMEM, 和光純薬工業)中で37° C、5% CO₂ 濃度で培養した。ホールセルパッチクランプによる電流応答解析のために、1 μg のマウスTRPV1 発現ベクター(mTRPV1/pcDNA3) 又はニワトリTRPV1発現ベクター(cTRPV1/pcDNA3.1(+)) (いずれも岡崎統合バイオサイエンスセンター富永真琴先生より供与)を0.1 μg の蛍光タンパク質EGFP発現ベクター(EGFP/pCAGGS) (群馬大学大学院医学系研究科柴崎貢志先生より供与)とともにHEK293T細胞にScreenFect™A(和光純薬工業)を用いてトランスフェクションし、poly-D-lysine (0.1 mg/ml)でコーティングしたカバースリップ上に細胞をマウントした後、DMEMを追加して35mmディッシュで24-48時間培養した。

カバースリップ上のHEK293T細胞を灌流チャンバーの上にマウントし、140mM NaCl, 5mM KCl, 2mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, 10mM MES, 10mM glucose, pH 6.8の標準バス溶液で灌流した。また各pHの酸刺激溶液は、NaOHを用いて5.4, 5.0, 4.6, 4.2, および 3.8に調整した。細胞内液は140mM KCl, 5mM EGTA, 10mM HEPES, pH 7.4 (KOHでpHを調整)とした。ホールセル電流記録はHEKA社のアンプ及びソフトウェアを用いて記録した(HEKA PC-10 amplifier with HEKA Patchmaster software, HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany)。膜電位は-60 mV に固定した。全ての実験は室温で行った。

2. 細胞内カルシウムイメージング

細胞はパッチクランプと同様にHEK293T細胞を用いた。カルシウムイメージング解析のために、1 μg のマウスTRPV1 発現ベクター(mTRPV1/pcDNA3) 又はニワトリTRPV1発現ベクター(cTRPV1/pcDNA3.1(+))をHEK293T細胞にScreenFect™A(和光純薬工業)を用いてトランスフェクションし、poly-D-lysine (0.1 mg/ml)でコーティングしたカバースリップ上に細胞をマウントした後、DMEMを追加して35mmディッシュで24-48時間培養した。その後、カルシウム蛍光指示薬であるFluo-4 AM(同仁化学研究所、熊本)をメーカープロトコルに従い30

分間負荷した後、カバースリップ上のHEK293T細胞を灌流チャンバーの上にマウントし、共焦点レーザー顕微鏡(A1R, Nikon Co., 東京)を用いて酸刺激溶液前後の蛍光強度変化を計測した。488 nmのレーザーで励起したFluo-4 AMの蛍光画像を4秒に1回取得し、510 nmの蛍光強度を観測した。解析は付属のソフトウェアであるNIS-Elements(Nikon Co.)を用いて行った。

3. 統計解析

データは平均値±標準誤差で表した。群間比較にはunpaired *t*-testを、群内比較にはpaired *t*-testを用いて解析した。

結果

1. ホールセルパッチクランプ法によるマウスおよびニワトリTRPV1の酸応答の比較

マウスTRPV1発現細胞にpH3.8の酸刺激を与えると、初回の刺激で1nA程度の電流が観察された(data not shown)。2回目の酸刺激では脱感作が見られ、電流が半分以下にまで減弱した(data not shown)。一方で、ニワトリTRPV1発現細胞にpH3.8の酸刺激を与えると、マウスTRPV1よりも明らかに小さい初回か100 pA程度の弱い電流が観察された。2回目の酸刺激でも1回目とほぼ同等の電流が見られ、マウスTRPV1のような大きな脱感作は観察されなかった(data not shown)。酸刺激のpHを5.4, 5.0, 4.6, 4.2, 3.8に振った場合の、2回の刺激での電流密度変化について、ニワトリTRPV1とマウスTRPV1のそれぞれの結果を図1に示した。ニワトリTRPV1では繰り返し酸刺激による電流密度の減少(脱感作)は、pH4.6および4.2の刺激の際に有意な変化が見られたが、その変化は小さいものだった。一方でマウスTRPV1では今回試した全てのpH領域で有意な電流密度の減少(脱感作)が観察された。

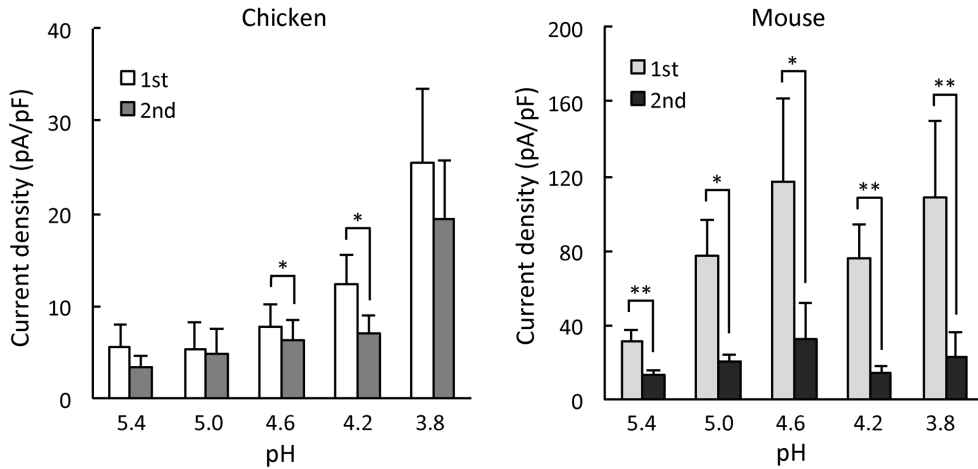


図1 各pH酸刺激時のTRPV1発現細胞で観察されたホールセル電流密度
 (左)ニワトリTRPV1 (右)マウスTRPV1
 Values are means \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by paired t -test (n = 5-9).

2. カルシウムイメージングによるマウスおよびニワトリTRPV1の酸応答の比較

カルシウムイメージング法による解析において、コントロールである空ベクター (pcDNA3.1(+)) をHEK293T細胞にトランスフェクションした細胞ではpH3.8の酸刺激は細胞内カルシウムイオン濃度を全く変化させなかった(図2左)。マウスTRPV1を発現させた細胞では酸刺激により細胞内カルシウムイオン濃度が上昇し、2回目の刺激でその反応が減弱した。一方でニワトリTRPV1を発現させた細胞ではマウスと同様に酸刺激によって細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が観察されたものの、2回目の刺激でも同等の反応性を示した。酸刺激2回目の蛍光強度変化を酸刺激1回目の蛍光強度変化で割った値をマウスTRPV1とニワトリTRPV1で比較すると、有意な違いが観察された(図2)。

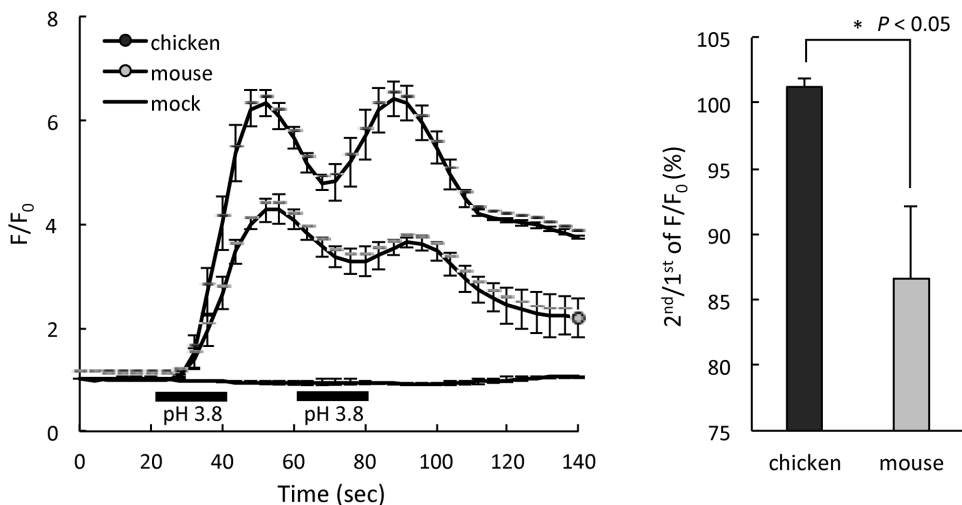


図2 pH3.8の繰返し酸刺激時における細胞内カルシウムイオン蛍光指示薬の蛍光強度変化 (左)ニワトリTRPV1、マウスTRPV1および空ベクター(mock)発現細胞の蛍光強度変化 (右)2回目刺激時の値を1回目刺激時の値で割り、ニワトリTRPV1とマウスTRPV1の蛍光強度変化を比較した図 Values are means \pm SE. * $p < 0.05$ by unpaired t -test ($n = 3$ coverslips). One coverslip data was averaged the data of 6-41 cells.

考察

本研究では、家畜・家禽の中でも特に産業上有用であるニワトリに着目し、ニワトリTRPV1の酸応答性をマウスTRPV1と比較した。酸に対する応答性はマウスTRPV1の方がニワトリTRPV1よりも大きく、観察された電流は大きかった。マウスTRPV1が繰返しの酸刺激により脱感作を示したのに対し、ニワトリTRPV1ではそのような脱感作はあまり見られなかった。これらの結果は、ニワトリTRPV1は酸に対する応答性がマウスと比べて低く、なおかつ脱感作しにくい性質を持つことを示唆している。口腔組織においては、ニワトリでも体性感覚としてTRPV1を介して酸味が受容されるが、その感受性はマウスと比べて低い可能性が考えられた。行動学的解析では、ニワトリはpH2からpH6程度の酸溶液は忌避しないことが報告されており^[6]、そのような酸感受性の低さと今回明らかにしたTRPV1の酸感受性の低さに関連性があると考えられる。

TRPV1はアゴニストが作用するとチャンネルが開き、細胞外からカルシウムイオンやナトリウムイオンが細胞内に流入する。細胞内に入ったカルシウムイオンはカルモジュリンと結合し、

カルシウム-カルモジュリン複合体がTRPV1に結合して脱感作をもたらす機構が報告されている^[7]。同論文でマウスTRPV1におけるカルモジュリン結合部位はC末端の35残基であることが報告されているが、ニワトリTRPV1ではこの部分のシーケンスが異なる。従って、カルモジュリンを介したTRPV1の抑制作用がニワトリTRPV1では惹起されなかったと推察される。

TRPV1は痛みや炎症を感知する受容体の一つであり、今回明らかにしたニワトリTRPV1の特性はニワトリの痛み受容機構の一端を示している。TRPV1のアゴニストであるカプサイシンは痛みを惹起するものの、繰返し投与により脱感作を引き起すため、鎮痛薬として活用されている。これはパラドックスであるが、TRPV1の脱感作機構を逆手に取った創薬戦略である。このような脱感作機構はニワトリではほとんどなかったことから、TRPV1の脱感作機構は動物種によって大きく異なると推察された。哺乳類がTRPV1の脱感作機構を進化のどの段階で獲得したのか、今後の検証が期待される。

カルシウムイメージングを用いたアッセイでは、ニワトリTRPV1の方がマウスTRPV1よりも酸刺激に対する蛍光強度の絶対値が大きかった(図2)。これはパッチクランプで観察された電流の大きさと一見矛盾しているが、今回はカルシウムイメージングのプローブにFluo-4を用いたことに起因していると考えられる。Fluo-4では細胞内カルシウムイオン濃度の絶対値はわからない。Fluo-4は刺激前後の相対値の変化は評価できるので、マウスTRPV1が繰返しでの酸刺激で脱感作し、ニワトリTRPV1が脱感作しなかったということは確認できた。

要約すると、ニワトリTRPV1は酸に応答するが、その応答性はマウスTRPV1よりも小さく、かつマウスTRPV1で観察されるような脱感作機構を有していないことが示唆された。辛味、酸、熱、および痛み等の受容体として機能するTRPV1の酸感受性および脱感作機構を動物種で比較したが、これらの知見がニワトリや哺乳類における体性感覚としての酸味や、炎症時の痛みの伝達のメカニズム解明の一助となれば幸いである。

謝辞

本研究の遂行にあたって貴重な研究助成を賜りました一般財団法人杉山産業化学研究所及びその関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

文献

- [1]M.J. Caterina, M.A. Schumacher, M. Tominaga, T.A. Rosen, J.D. Levine, D. Julius, The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature* 389 (1997) 816-824.
- [2]H. Inada, F. Kawabata, Y. Ishimaru, T. Fushiki, H. Matsunami, M. Tominaga, Off-response property of an acid-activated cation channel complex PKD1L3-PKD2L1, *EMBO Rep* 9 (2008) 690-697.
- [3]Y. Ishimaru, H. Inada, M. Kubota, H. Zhuang, M. Tominaga, H. Matsunami, Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 12569-12574.
- [4]M.A. Kido, H. Muroya, T. Yamaza, Y. Terada, T. Tanaka, Vanilloid receptor expression in the rat tongue and palate, *Journal of Dental Research* 82 (2003) 393-397.
- [5]S.E. Jordt, D. Julius, Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers, *Cell* 108 (2002) 421-430.
- [6]W.F. Fuerst, M.R. Kare, Influence of Ph on Fluid Tolerance and Preferences, *Poultry Science* 41 (1962) 71-&.
- [7]M. Numazaki, T. Tominaga, K. Takeuchi, N. Murayama, H. Toyooka, M. Tominaga, Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (2003) 8002-8006.