

学内グラント 報告書

平成24年度 学内グラント終了時報告書

TRPM1 チャネルを介した網膜内シナプス伝達は
体温で最適化されているのか？

研究代表者 田丸 文信（医学部 生理学）

緒 言

ほ乳類の網膜では、桿体視細胞からの光情報は桿体入力型双極細胞へ伝達され、その後AIIアマクリン細胞を介して、網膜出力細胞である神経節細胞に送られ脳へ伝達される。桿体視細胞が光を受容しグルタミン酸を放出するまでの細胞内カスケードは詳しく調べられているが、桿体入力型双極細胞に関しては不明な点が多い。桿体入力型双極細胞の樹状突起には代謝型グルタミン酸受容体であるmGluR6が発現しており、光刺激によってG蛋白系のカスケードを介して下流の非選択性陽イオンチャネルが開くことはわかっていたが、主要なセカンドメッセンジャーや非選択性陽イオンチャネルそのものが何であるかは不明であった。

しかし近年、TRPチャネルの1つであるTRPM1が桿体入力型双極細胞の樹状突起に発現していること、および、TRPM1を欠損させたマウスでは暗所視における網膜電図のb波（桿体入力型双極細胞由来）が消失してしまうことから、TRPM1チャネルが桿体入力型双極細胞の非選択性陽イオンチャネルであることが報告された^{1,2)}。一部のTRPファミリーには温度感受性があり、チャネル単体で温度感受性があるものとリガンドと共に温度感受性を示すものが知られているが、TRPM1はチャネル単体では温度感受性を示さないことがわかっている³⁾。

我々は予備実験で桿体入力型双極細胞のシナプス後細胞であるAIIアマクリン細胞からEPSCを記録し、温度との関係を調べた。その結果、室温付近ではEPSCはあまり観察されなかったが、体温付近ではEPSCの振幅と頻度が有意に増大した。ほ乳類から網膜電図を記録する際、体温付近でないとb波が観察できないことは古くから知られており、これは我々の予備実験の結果と合致する。すなわち、少なくともほ乳類の桿体入力型双極細胞では、体温がシナプス伝達における重要な因子の1つであることが考えられる。

TRPM1だけをembryoに過剰発現させても温度依存的な開口確率の増大が見られないこと⁴⁾、および、我々の行った2つの予備実験「桿体入力型双極細胞の温度依存性内向き電流の非定常状態におけるノイズ解析では34℃をピークにした凸型のグラフが描けた」と「細胞内蛋白をwash outする記録法（ホールセル・パッチクランプ法）では桿体入力型双極細胞の温度依存性の脱分極が消失した」ことから、温度上昇による代謝の亢進だけでAIIアマクリン細胞のEPSCの振幅と頻度の劇的な増大が起こるとは考えにくく、何らかのTRPM1の細胞内リガンドが存在している可能性が高い。実際に、TRPファミリーの中にはカンナビノイドやアラキドン酸代謝物などの細胞内外の内在性リガンドによって温度感受性が相乗的に増大することが知られている⁵⁾。

以上の先行研究と予備実験の結果から、我々は「桿体入力型双極細胞に発現しているTRPM1チャネルが細胞内リガンドを必要とする温度依存性チャネルであり、それに起因して桿体入力型双極細胞が温度依存的にグルタミン酸を放出することができる」という仮説を立て、検証した。

材料と方法

マウス（野生型とTRPM1欠損マウス）をエーテル麻酔した後、眼球を摘出し、網膜を取り出して厚さ200 μmのスライス標本を作製した。灌流液の温度を変えて、網膜スライス中のAIIアマクリン細胞および桿体入力型双極細胞からホールセル・パッチクランプ法（voltage-clampおよびcurrent-clamp mode）を用いて記録し解析をおこなった。桿体入力型双極細胞からはAmphotericin Bを使用した穿孔パッチクランプ法でも記録をした。実験は全てroom lightの下でおこなった。実験に用いたブロッカー類は以下の濃度で投与した：20-40 L-AP4; 20-50 CNQX; 100 bicuculline; 1 strychnine; 200 meclofenamic acid (in μM)。

結 果

灌流液の温度を18℃から36℃付近へ上げると、杆体入力型双極細胞の膜電位は約22 mV/10℃の割合で脱分極した(17～18℃で-98～-42 mV→29～36℃で-62～-24 mV)⁶⁾。このとき、AIIアマクリン細胞(holding potential = -63 mV)ではEPSCの頻度と振幅が劇的に増大し、流入してくる電荷量が3倍以上になった(98→305 pC)⁶⁾。このEPSCはCNQXで消失することと逆転電位が約0 mVであることから、グルタミン酸入力であることが推測できる⁶⁾。ON型の双極細胞に特異的に発現しているmGluR6のagonistであるL-AP4を投与したところ、AIIアマクリン細胞のEPSCが温度にかかわらずほぼ完全に消失したが、bicucullineやstrychnine, meclofenamic acidの存在下ではほとんど抑制されなかった⁶⁾。これらのことから、実験条件下で見られたAIIアマクリン細胞の温度依存性EPSCは杆体入力型双極細胞由来であると考えられる。

L-AP4の存在下で灌流液の温度を20℃から35℃に上げながら、杆体入力型双極細胞から膜電位の変化を記録した時、ホールセル・パッチクランプ法ではコントロールとほとんど変わらなかったが、穿孔パッチクランプ法では温度を35℃に上げて10 mVほどしか脱分極しなかった⁶⁾。この結果は、杆体入力型双極細胞内にはTRPM1チャネルを閉じさせるためのリガンドが存在している可能性を示唆している。また、TRPM1欠損マウスのAIIアマクリン細胞からEPSCを記録しても、温度によって頻度や振幅は変わらなかった⁶⁾。

以上の結果から、1) AIIアマクリン細胞の温度依存性EPSCは杆体入力型双極細胞由来であること、2) 杆体入力型双極細胞内のmGluR6-TRPM1チャネルのカスケードが温度依存性であり、室温よりも体温付近のほうが神経伝達物質放出量のダイナミックレンジが広いこと、3) TRPM1チャネルの開口確率が細胞内リガンドと温度によって制御されている可能性が高いことがわかった。

考 察

ほ乳類は恒温動物なのでヒトやマウスではTRPM1チャネルの開口確率が大きく変化しているとは考えにくく、杆体入力型双極細胞-AIIアマクリン細胞間のシナプス伝達は体温によって常に最適な状態で働く

ようになっていると思われる。TRPファミリーの中には細胞内リガンドを必要とする温度依存性チャネルが複数存在すること、および本研究結果から、TRPM1チャネルもその1つである可能性が極めて高いことが考えられるが、今回は細胞内リガンドの特定までには至らなかった。TRPM1チャネルについては温度依存性を含め不明な点が多いため、今後は候補となる細胞内リガンド(Gタンパクなど)の特定、および、そのリガンドが温度依存性に及ぼす効果を検証し、杆体入力型双極細胞における温度依存性グルタミン酸放出のメカニズムを解明して、その生理的意義を明らかにしたい。

論文投稿前のため、データの掲載を控えさせて頂きました。

研究成果リスト

- 1) 田丸文信, 戸塚博子, 渡辺修一. 杆体入力型双極細胞からAIIアマクリン細胞へのグルタミン酸放出の制御: 温度依存性TRPM1チャネルの関与?, 第16回視覚科学フォーラム研究会, 2012年8月, 埼玉

引用文献

- 1) Shen Y, Heimel JA, Kamermans M, Peachey NS, Gregg RG, Nawy S. A transient receptor potential-like channel mediates synaptic transmission in rod bipolar cells. *J Neurosci* 2009;29(19):6088-93.
- 2) Koike C, Obara T, Uriu Y, Numata T, Sanuki R, Miyata K, et al. TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(1):332-7.
- 3) Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003;426:517-24.
- 4) 小池千恵子, 瓜生幸嗣, 宮田健太郎, 子安俊行, 谷昭子, 他. 網膜ON型双極細胞におけるTRPM1の機能, 第31回日本神経科学大会, 2008年, 東京
- 5) Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001;413:203-10.
- 6) 田丸文信, 戸塚博子, 渡辺修一. 杆体入力型双極細胞からAIIアマクリン細胞へのグルタミン酸放出の制御: 温度依存性TRPM1チャネルの関与?, 第16回視覚科学フォーラム研究会, 2012年8月, 埼玉