

氏 名 長友克広

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1176 号

学位授与の日付 平成 20 年 3 月 19 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Activation of mouse TRPA1 channel by caffeine

論文審査委員 主 査 教授 富永 真琴  
教授 久保 義弘  
教授 岡村 康司  
教授 廣瀬 謙造(名古屋大学)

Caffeine is a plant alkaloid chemically classified as xanthine derivatives. It is known to exert various pharmacological effects on the central nervous system and muscles by inhibiting adenosine receptors or phosphodiesterase, or by activating ryanodine receptors.

It was reported that application of mM order caffeine to mouse STC-1 cells, established from gastrointestinal endocrine cells, caused an increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ), and it was suppressed by a blocker of phospholipase C (PLC). He observed that the  $\text{Ca}^{2+}_i$  response depended on extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_o$ ) and that it was blocked by TRP (Transient Receptor Potential) channel blockers,  $\text{Gd}^{3+}$  and ruthenium red. These results suggested a possibility that there is a  $\text{Ca}^{2+}$  permeable channel belonging to TRP channel family responding to caffeine, and TRPA1 was raised as a candidate because it is known to require basal PLC activity for the maintenance of the channel function.

He successfully isolated a cDNA encoding mouse TRPA1 (mTRPA1) channel from STC-1 cells by Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), and examined the response of the isolated mTRPA1 channel to caffeine using heterologous expression system. By  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  imaging, responses to caffeine were observed in HEK293T cells expressing mTRPA1. Responses to caffeine application were also recorded electrophysiologically from *Xenopus* oocytes under two electrode voltage clamp and from transfected HEK293T cells by patch clamp. The  $\text{EC}_{50}$  value was in the range of 1-5 mM order, which is approximately equivalent to the concentration of caffeine included in coffee. Other xanthine derivatives, theophylline and theobromine, also evoked responses in HEK293T cells expressing mTRPA1 channel. Rat TRPV1 and rat TRPM8, members of TRP channel family related to TRPA1, did not respond to application to caffeine.

As the  $\text{EC}_{50}$  value of mM order was relatively high, the physiological relevance of the sensitivity of mTRPA1 to caffeine was speculated to be the perception of caffeine intake in the tongue and in the gastrointestinal organs. Therefore, He first examined and confirmed the expression of mRNA encoding mTRPA1 in the tongue, stomach, and intestine by RT-PCR. Next, to examine the expression pattern of mTRPA1 protein, a specific rabbit anti-serum was raised against a peptide antigen corresponding to the amino acid sequence of the N-terminus end of mTRPA1, and was affinity purified by the antigen peptide to decrease the background. In the tongue, the expression of mTRPA1 protein was not detected in the taste buds of circumvallate papilla but in the nerve bundles as well as in their thinner branches. They were speculated to be fibers of sensory neurons such as chorda tympani nerves or glossopharyngeal nerves, because the expression of mTRPA1 protein was also detected in a subpopulation of the soma of sensory neurons in the dorsal root ganglia (DRG) and their nerve fibers. In the small

intestine, the expression was detected in the submucosal region, in the nerve bundles and in their thinner branches.

The response of neurons dissociated from DRG to caffeine was examined by  $[Ca^{2+}]_i$  imaging. Subpopulation of the neurons responding to capsaicin responded to caffeine. This result goes well with the report that TRPA1 is expressed in a fraction of TRPV1 expressing neurons with capsaicin sensitivity. In DRG neurons isolated from TRPA1 knock-out (KO) mice, the response to caffeine characterized by the rapid onset could not be observed.

The above results suggest a possibility that caffeine intake is perceived by the nerve branches of TRPA1 positive sensory neurons projecting e.g. to the tongue and the small intestine. To examine whether or not perception of caffeine actually would occur in the animal, the preference of water versus caffeine containing water was studied by two bottle preference test. Wild-type (WT) mice showed a remarkable negative preference to caffeine containing water, but a significant preference was not observed in the KO mice with no functional TRPA1 channel. These results strongly show that mice perceive caffeine included in the drink through mTRPA1.

As functional differences between orthologues are known for other TRP channels, it is of interest to analyze the caffeine sensitivity of TRPA1 channel of other species. He analyzed the response of human TRPA1 (hTRPA1) channel to caffeine electrophysiologically using HEK293T cells and *Xenopus* oocytes, and observed that caffeine application did not increase hTRPA1 channel current, but decreased the basal current level. When prestimulated by allyl isothiocyanate, other stimulant for TRPA1 channel, the increased response was clearly suppressed by the chase application of caffeine. The results suggest that effects of caffeine on mTRPA1 and hTRPA1 qualitatively differ each other.

In summary, He showed for the first time that mTRPA1 channel on the plasma membrane can be activated by caffeine in heterologous expression systems and also in DRG neurons, demonstrating a novel molecular mechanism of the pharmacological action of caffeine. It was also shown that mTRPA1 channel protein is expressed in the sensory neurons of DRG, in the nerve fibers in the tongue and in the small intestines. He also showed WT mice, but not TRPA1 KO mice, have significant negative preference to caffeine containing water. Taken together, the results demonstrate that the perception of caffeine intake actually occurs in mice and it is mediated by mTRPA1. Finally, He found hTRPA1 is not activated but suppressed by caffeine application, which could give a useful information of the structure-function study of caffeine sensing in TRPA1 channel.

本論文は、植物由来のキサンチン誘導体であるカフェインがTRPA1チャネルを活性化することを様々な実験手技を用いて明らかにしたものである。マウス腸の内分泌細胞由来のSTC-1細胞でmMオーダーのカフェインによって細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が観察され、この上昇が細胞外Ca<sup>2+</sup>依存的に起こり、Gd<sup>3+</sup>、ruthenium red、phospholipase C (PLC)阻害剤によって抑制されたことから、細胞膜に存在するTRPA1チャネルを通して流入したCa<sup>2+</sup>によって細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇がもたらされているものと推測した。

そこで、STC-1細胞のpolyA(+) RNAから逆転写-PCR 法によりTRPA1遺伝子をクローニングして異所性発現系で機能解析を行った。HEK293細胞にTRPA1を強制発現させると、STC-1細胞と同様に1-10 mMのカフェイン投与に応じて細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が観察され、その細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇はGd<sup>3+</sup>やruthenium redによって抑制された。他のキサンチン誘導体theophyllineやtheobromineに対しても応答した。また、TRPA1を強制発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いた解析では、カフェインによって濃度依存的に大きな電流応答が観察された。電流電圧関係は強い外向き整流性を示し、報告されているTRPA1の性質と合致した。HEK293細胞にTRPA1を強制発現させてパッチクランプ法を用いて行った解析でも、5 mMのカフェイン投与で外向き整流性を有するTRPA1活性化と思われる電流応答が観察された。このカフェインによる電流活性化は、感覚神経に発現して侵害刺激受容に関与することが知られている他のTRPチャネルであるTRPV1、TRPM8を発現させた細胞では観察されず、カフェインはTRPA1に特異的に作用しているものと考えられた。

次に、TRPA1の発現を遺伝子レベル、蛋白質レベルで検討した。カフェインは苦味物質として知られており、舌を含めた消化管組織でTRPA1 mRNAの発現を観察したところ、TRPA1遺伝子の発現は舌、小腸、胃で確認された。TRPA1のアミノ末端ペプチドを抗原としてポリクローナル抗体を作製してWestern blot法で解析したところ、TRPA1を強制発現させたHEK293細胞のサンプルでTRPA1のmolecular weightに相当する位置にバンドが観察され、そのバンドが抗原ペプチドによる吸収試験で消失したことから、TRPA1を特異的に認識する抗体が得られたと考えたが、STC-1細胞からはTRPA1蛋白質を検出することはできなかった。この抗体を用いて免疫化学的解析を行い、TRPA1を強制発現させたHEK293細胞でTRPA1と考えられるシグナルを検出したが、STC-1細胞ではシグナルを検出できなかった。マウス後根神経節の染色を行ったところ、一部の小径の細胞での陽性シグナルが観察され、TRPV1陽性細胞とオーバーラップしており、「TRPA1発現細胞はTRPV1も発現する」というこれまでの知見に合致していた。興味深いことに神経線維にも陽性シグナルが観察され、また、舌組織の神経線維、小腸組織でもTRPA1様免疫反応がみられた。こうしたTRPA1の遺伝子レベル、蛋白質レベルでの発現は、急性単離した後根神経節細胞でのCa<sup>2+</sup>-imaging法を用いた解析によって機能的にも確認され、そのカフェインによる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇がTRPA1欠損マウスから調整した感覚神経細胞では観察されなかったことから、TRPA1活性化を介したものであると結論した。

細胞レベルで確認されたカフェインによるTRPA1活性化の生理学的な意義を検討する目的で野生型マウスとTRPA1欠損マウスでカフェイン含有水の嗜好テストを行ったところ、野生型マウスは普通の水をより好んだが、TRPA1欠損マウスではその嗜好性が消失した。

以上のように、長友君は、種々の実験手技を駆使してカフェインが感覚神経や舌に発現しているTRPA1を活性化して忌避行動を惹起することを証明した。本研究はカフェインの新たな作用機序を明らかにした非常に優れた研究であり、今後の当該分野の発展に資するものと考えられる。従って、本論文は学位論文として十分な内容を有しているものと審査委員会において全会一致で判定された。