

氏 名 周 一鸣(Yiming Zhou)

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1566 号

学位授与の日付 平成24年9月28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 A novel alternative splicing variant of mouse TRPA1 regulates
its channel activity under inflammatory and neuropathic pain
conditions

論文審査委員 主 査 教授 鍋倉 淳一
教授 富永 真琴
教授 深田 正紀
教授 水村 和枝 中部大学

論文内容の要旨

This Ph.D. thesis investigated the role of a novel mouse TRPA1 alternative splicing variant. The thesis is mainly divided into 9 chapters: abbreviations, introduction, materials and methods, results, discussion figure legends, references, tables and figures, and acknowledgements. Transient receptor potential (TRP) channels are non-selective cation channels that were originally identified in mutant *Drosophila*. The TRP channel superfamily is divided into seven subfamilies: TRPV (Vanilloid), TRPC (Canonical), TRPM (Melastatin), TRPML (Mucolipin), TRPN (NompC), TRPP (Polycystic) and TRPA (Ankyrin) with 27 TRP channels found in humans. The discovery and characterization of the TRP channel superfamily offers a superior tool for understanding the molecular mechanisms of sensations such as taste, pain, and temperature in the peripheral and central nervous systems. So far many studies have used different experimental methods and techniques to demonstrate that TRP proteins are indeed involved in many different forms of sensations.

TRPA1 is the only member of the mammalian ankyrin subfamily of TRP channels. One intriguing property of the TRPA1 channel is the presence of up to 17 ankyrin repeat domains that could act as multiple binding sites for molecules that modulate channel functions. TRPA1 channel is expressed in many tissues and organs, including sensory neurons, astrocytes, the small intestine and colon. TRPA1 channel is predominately expressed in small-diameter neurons and functions as a nociceptive receptor in the peripheral nervous system in sensory neurons, such as those in the dorsal root ganglion (DRG) and trigeminal ganglion (TG). TRPA1 channel is believed to be involved in many forms of acute and chronic hyperalgesia, with some reports suggesting that nerve growth factor (NGF) regulates chronic inflammatory hyperalgesia by controlling TRPA1 gene expression in sensory neurons.

Alternative splicing of pre-mRNA was discovered more than 30 years ago, when it was found that the same gene encoded two proteins, one was membrane-bound and another was secreted. In eukaryotes, alternative splicing is considered to be a complex cellular

mechanism by which a small number of genes could encode much larger number of proteins. Indeed, more than 95% of human genes are estimated to undergo alternative splicing. The importance of alternative splicing as a regulatory process has been highlighted in many pre-mRNA splicing of regulatory and signaling proteins. Taking into account other post-translational modifications, the number of functional proteins encoded by the genome is surprisingly enormous. Thus, alternative splicing is one of the major sources to increase protein diversity.

Recently, two individual studies identified novel *Drosophila* TRPA1 alternative splicing variants that were expressed in a tissue-specific manner and displayed different chemical and thermal sensitivities. To date there is no report of mammalian TRPA1 alternative splicing, even though there are many instances of alternative splicing variants of other mammalian TRP channels. For instance, an alternative splicing variant of TRPV1, a TRP channel expressed in sensory neurons and involved in nociception, is reported to be a dominant negative isoform and inhibits TRPV1 channel activity by forming a heteromer. However, whether alternative splicing variants of mammalian TRPA1 exist and their physiological and pathological significance in diseases remain to be elucidated.

In this thesis, a novel mouse TRPA1 splicing variant has been found and cloned from mouse DRG neurons. This splicing variant, TRPA1b skips 30 amino acids compared with its full-length isoform, TRPA1a. Multiple experiment methods are applied to examine the physiological and pathological importance of TRPA1a and TRPA1b from mRNA level to protein level and finally to animal model level. Both isoforms, TRPA1a and TRPA1b are confirmed to be expressed in mouse dorsal root ganglion (DRG) and trigeminal ganglion (TG) neurons by RT-PCR analysis. When expressed in HEK293T cells, both isoforms can be translocate to the plasma membrane while co-immunoprecipitation showed that TRPA1a and TRPA1b physically interact with each other. Although TRPA1b do not respond to TRPA1 agonists, TRPA1a and TRPA1b co-expression significantly increases TRPA1a plasma membrane expression and current density in response to AITC, 2-APB, carvacrol and thymol without affecting its single-channel properties. Exogenous TRPA1b over-expression in WT DRG neurons also increases AITC responses, and expression of TRPA1a

with TRPA1b produces larger ATIC responses compared with expression of TRPA1a alone in TRPA1KO DRG neurons. Moreover, expression levels of TRPA1a and TRPA1b mRNA changes dynamically in complete Freund's adjuvant (CFA)-induced inflammatory and a partial sciatic nerve ligation (PSL)-induced neuropathic pain models. In contrast to TRPA1a, whose mRNA expression level changed in the early stages of CFA-induced inflammatory and PSL-induced neuropathic pain conditions, the TRPA1b expression level gradually increases throughout the two-week disease condition period. This up-regulated TRPA1b expression level could maintain the membrane expression of TRPA1a even with the rapidly changed TRPA1a mRNA expression. These results suggest that TRPA1 may be regulated through alternative splicing under inflammatory and neuropathic pain conditions. This thesis could explain how TRPA1 is involved in inflammatory and neuropathic pain and provide a possible mechanism to treat these diseases.

博士論文の審査結果の要旨

本論文は、マウスのTRPA1遺伝子にalternative splicing variantが存在することを発見し、その生理学および病理学的意義を明らかにしたものである。

周一鳴君は、PCR法を用いたマウス後根神経節におけるTRPA1遺伝子の発現を解析する過程で、2つの増幅産物を観察し、小さいサイズのものがエクソン20 (30個のアミノ酸に相当) を欠失したマウスTRPA1遺伝子のalternative splicing variantであることを見だし、これまで報告されていたものをTRPA1a、新たに見いだしたものをTRPA1bと名づけた。2つの遺伝子から翻訳される2つのTRPA1蛋白質を特異的に認識する抗体がないために、TRPA1aにEGFPタグ、TRPA1bにFlagタグを付けたコンストラクトを作成し、HEK293T細胞に強制発現させて抗EGFP抗体および抗Flag抗体を用いて発現を観察したが、単独発現と共発現させたときで両蛋白質の発現に大きな差は見られなかった。そこで、先ず、共免疫沈降法を用いて両蛋白質の結合を検討したところ、両蛋白質の共沈降をいずれの抗体を用いても観察できた。そこで、両蛋白質の結合の意義を明らかにすべく、形質膜における蛋白質の発現をビオチン標識することで検討した。その結果、TRPA1bを共発現させたときにだけTRPA1aの形質膜における発現量が増大したことから、TRPA1bはTRPA1aに結合してTRPA1aの形質膜発現を増大させているものと考えられた。形質膜のTRPA1a量が増大しているのであれば、それをチャンネル電流量として観察できるはずである。そこで、周君はTRPA1a, TRPA1bを発現させたHEK293T細胞にパッチクランプ法を適用してTRPA1チャンネル電流を観察した。TRPA1b単独ではTRPA1の刺激物質allyl isothiocyanate (AITC), 2-APB, carvacrol, thymolによる電流応答を観察できなかったが、TRPA1aとTRPA1bを共発現させるとTRPA1aの単独発現よりも有意に大きな電流を観察できた。AITC, 2-APBによる電流活性化の用量依存曲線を作成すると、両化合物に対する応答ともefficacyが倍増してpotencyに変化がないことが明らかになった。これは、TRPA1bによってTRPA1aの形質膜発現量が増大したことと合致する。それを裏付けるように、インサイドアウト法による単一チャンネル電流記録では、TRPA1bの共発現によるチャンネルキネティクスの変化は観察できなかった。

周君は、このTRPA1bによるTRPA1a活性の増大が感覚神経でも起こるかどうかを、マウス後根神経節細胞を用いてCa²⁺イメージング法で検討した。野生型マウスの後根神経節細胞にTRPA1bを強制発現させることによって、カプサイシン応答 (TRPV1機能) に影響を及ぼすことなく、AITCによる応答を有意に増大させることができた。次に、CFAを用いたマウス炎症性疼痛モデル、座骨神経結紮によるマウス神経障害性疼痛モデルを作成して機械刺激痛覚過敏の発生を確認した。両モデルで、TRPA1欠損マウスでは機械刺激痛覚過敏が野生型マウスより有意に減弱しており、機械刺激痛覚過敏へのTRPA1の関与が明らかとなった。TRPA1b遺伝子は、両モデルにおいて14日目に有意に増加した。そして14日目に採取した患側の後根神経節細胞を用いたCa²⁺イメージング法による解析では、カプサイシンに対する応答は変化せずにAITCに対する応答が有意に増大しており、TRPA1a蛋白質の発現増加によるものと考えられた。

以上のように、周君は、種々の実験手技を駆使してマウスTRPA1のalternative splicing variant, TRPA1bがTRPA1aと結合してTRPA1aの形質膜発現を増大させてTRPA1機能増大をもたらし、そのメカニズムが炎症性疼痛や神経障害性疼痛の発生に関与することを証明した。本研究はマウスTRPA1のalternative splicing variantを発見してその意義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。