Review Article

Physiological significances of TRP–ANO1 interaction

Yasunori Takayama¹, Koji Shibasaki², Hidemasa Furue³,
Daisuke Uta⁴, and Makoto Tominaga¹

¹ Division of Cell Signaling, Okazaki Institute for Integrative Bioscience
(National Institute for Physiological Sciences)

² Department of Molecular and Cellular Neurobiology,
Gunma University Graduate School of Medicine

³ Department of Neurophysiology, Hyogo College of Medicine

⁴ Department of Applied Pharmacology, Graduate School of Medicine
and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama

Abstract

A calcium-activated chloride channel, anoctamin 1 (ANO1), is strongly activated by intracellular calcium increases through activation of transient receptor potential (TRP) channel because these ion channels physically interact with one another on the plasma membrane. The functional interaction occurs when TRP channels and ANO1 are within 20 nm, although ANO1 could be activated by global calcium increases as well. Recently, we obtained data that suggested the significance of the interactions in the choroid plexus and primary sensory neurons. TRPV4 and ANO1 interaction in the apical membrane of choroid plexus epithelial cells could induce water efflux to the ventricle side. This interaction could be important in the homeostatic release of cerebrospinal fluid. That is, TRPV4 could be activated by the combined effects of body temperature and membrane stretch evoked by continuous water influx from the basolateral (capillary) side. Furthermore, TRPV1 and ANO1 interaction enhances TRPV1-mediated pain sensation. TRPV1 and ANO1 are co-expressed in small dorsal root ganglion (DRG) neurons. In our study, ANO1 current was induced by capsaicin application in small DRG neurons. ANO1-dependent depolarization following TRPV1 activation evoked action potentials. Furthermore, capsaicin-evoked pain-related behaviors in mice were strongly inhibited by a selective ANO1 blocker whereas the compound did not completely abolish the behaviors. The significance of these observations is that selective ANO1 inhibition reduces pain sensation. We also investigated non-specific inhibitory effects of chemicals on ion channel activities. We recently found that 4-isopropylcyclohexanol (4-iPr-CyH-OH) has an analgesic effect on burning pain sensation. 4-iPr-CyH-OH, a menthol analogue, is an aliphatic higher alcohol and used as a food- or flavor-additive. This compound inhibits TRPV1 and ANO1 without agonistic effects on TRPV1, TRPA1 or ANO1. Menthol also inhibits TRPV1 and ANO1, however, the TRPM8 agonist activates TRPA1 followed by pain sensation. Therefore, 4-iPr-CyH-OH might be a novel analgesia,

although the effect is non-specific. In fact, 4-iPr-CyH-OH reduced capsaicin-evoked action potentials and pain-related behavior in mice. Moreover, 4-iPr-CyH-OH also inhibited TRPV4 and TRPA1 involved in both pain and itch sensations. These results indicate that 4-iPr-CyH-OH could function globally to reduce skin hypersensitivity. TRP-ANO1 interactions are involved in many physiological mechanisms and these could be pharmacologically controlled.

Keywords

TRP channel; Anoctamin 1; Isopropylcyclohexanol; Acute pain

Received: 7 November 2017

TRP チャネル – アノクタミン 1 相互作用の生理機能

高山 靖規¹／柴崎 貢志²／古江 秀昌³／歌 大介⁴／富永 真琴¹

¹岡崎統合バイオサイエンスセンター（生理学研究所）細胞生理研究部門

²群馬大学 分子細胞生物学講座

³兵庫医科大学 神経生理部門

⁴富山大学大学院 医学薬学研究部 応用薬理学研究室

はじめに

体外環境の変化を知覚することは生存において重要であり、特に侵害性刺激を感じることは時として生命維持に直結する不可欠な生理機能である。末梢の自由神経終末には化学的および物理的刺激の多くを受容する分子機構があるため、一次感覚神経は危機的環境の回避にも重要である。侵害性熱刺激や酸刺激はカプサイシンの受容体である TRPV1 を活性化し、且つそれらの同時刺激は TRPV1 を相乗的に賦活化する⁴⁾。一方、アノクタミン 1 (ANO1) は 2008 年に同定されたカルシウム活性化型陰イオンチャンネルであり、熱感受性を持つことが報告されている⁵⁾。TRPV1 は一次感覚神経において ANO1 と共局在しており、これら二つのイオンチャンネルの相互作用は神経興奮を増強する分

子機構であることを筆者らは明らかにした²⁹⁾。本稿では、TRPV1-ANO1 相互作用について、その発見に至った経緯も踏まえて論じたいと思う。

アノクタミン

アノクタミン (anoctamin, ANO) は TransMEMbrane protein 16 (TMEM16) とも呼ばれる膜タンパク質であり、陰イオンチャンネルとしての機能の他にスクランブラーゼ活性やインターナリゼーションの亢進に寄与している (Fig.1)。ANO の活性化は細胞内カルシウムに依存しており^{3,23,35)}、ANO1 の場合は第 2～第 3 膜貫通領域間の細胞内ドメイン (S2-S3 ドメイン) にグルタミン酸から成るカルシウムボウルを持っている (Fig.1) が、実際のカルシウム結

ANO/TMEM16	Cl ⁻ channel activity	Scramblase activity	Internalization activity
1 / A	+++	-	-
2 / B	++	-	-
3 / C	-	-	+
4 / D	+/-	++	++
5 / E	+/-	-	-
6 / F	+/-	++	+
7 / G	+/-	+	+
8 / H	+/-	-	-
9 / J	+/-	+	+
10 / K	+/-	-	-

Fig.1 Functions of each subtype of ANO molecules (also called TMEM16) and a schematic model of the structure of ANO1. Plus or minus symbols indicate existence or non-existence of each activity, respectively from refs ^{8,26,31}. ANO1 has ten transmembrane regions (TMRs) and a calcium binding site is configured by the 6th to 8th TMRs. Pore region is configured by the 3rd to 6th TMRs.

合部位は第6～第8膜貫通領域によって複合的に形成されている²⁾。10個のサブタイプの内、ANO1とANO2に関しては陰イオンチャネル活性があることがわかっているが、その他のサブタイプが持つチャネル活性については諸説あり明確にはなっていない^{8,26,31)}。真菌の一種である *Nectria haematococca* からクローニングされた ANO ホモログの X 線結晶構造解析によって細かい立体構造が明らかとなり²⁾、また近年、マウス ANO1 がクライオ電子顕微鏡によって解析されたが、哺乳類における ANO1 の全体像は未だ不鮮明である²⁰⁾。ただし、マウス ANO1 も第10膜貫通領域で接合する二量体であるなど生化学的に解析されていた結果と重なる部分もある³²⁾。興味深いことに、二量体の中心でポアが形成されているのではなく、各サブユニットが一つずつポア構造を持つことが機能的解析から示唆されている¹⁵⁾。立体構造解析から、ポアは第3～第6膜貫通領域によって複合的に構成され则认为られているが²⁰⁾、最新の構造解析により第7膜貫通領域もポア形式に関わることが示唆された^{7,21)}。また ANO6 においてこのポア領域は主にリン脂質転移に関わることが示唆されている¹³⁾。

TRPV4-ANO1 相互作用

哺乳類 TRP チャネルファミリーには28のチャネルが存在しており、TRPV サブファミリーには6つのチャネルがある¹⁰⁾。TRP チャネルは TRPM4 と TRPM5 を除いてカルシウム透過性が高く、細胞膜直下ではチャネルから数 μm の範囲で拡散したカルシウムによる影響が生じると考えられる¹⁹⁾。TRPV4 は上皮系細胞に広く発現しているが、神経系の細胞でも機能的発現が確認されており、深部体温下における神経興奮の亢進などに関わっている²⁴⁾。このように多くの組織において機能的に存在する TRPV4 は脈絡叢上皮細胞においても高発現している²⁸⁾。脈絡叢は脳室内に存在し、上皮細胞、軟膜および有窓性毛細血管からなる単層の組織である (Fig.2-A)。上皮細胞頂端側 (脳室側) の強固なタイトジャンクションにより脳脊髄液と血液は分断されているが、トリセルラータイトジャンクションは明白でないため、パラセルラー経路が存在すると考えられる¹²⁾。

脳脊髄液分泌は、上皮細胞の基底外側部 (血管側) から頂端側へイオンが能動的・受動的に輸送されることで生じる。深部体温や細胞膜の

Fig.2 Interactions between the TRP channel and ANO1. **(A)** TRPV4–ANO1 interaction in choroid plexus epithelial cells. The choroid plexus releases cerebrospinal fluid by ion transport (mainly sodium and chloride) from basolateral to apical membranes followed by water movement in monolayer structures formed by epithelial cells, leptomeninges and fenestrated capillaries. TRPV4 is located in the apical membrane of epithelial cells. First, TRPV4 is activated, leading to an influx of calcium. Second, ANO1 is activated by the calcium entering the cell. Finally, water efflux occurs, driven by chloride transport. **(B)** TRPV1–ANO1 interaction on both the peripheral side (free nerve ending) and the central side (presynaptic area) of a DRG neuron. TRPV1 is initially activated and ANO1 is also immediately activated in calcium nano–domains or a global field inside of the cells¹⁴⁾. Opening of the chloride channel induces depolarization ($\Delta\Psi$) because NKCC1 constantly takes up chloride from the extracellular region, although KCC2 expression is undetectable. Therefore, ANO1 activation enhances neuronal activity. TRPV1 interacts with ANO1 in the central side, and the depolarization activates voltage–gated calcium channels followed by transmitter release. Calcium influx through TRPV1 activation itself and calcium release from mitochondria (Mt) are also involved in the transmitter release as shown by previous reports¹⁸⁾.

伸展により活性化する TRPV4 は脈絡叢上皮細胞の頂端側に局在しており、脳脊髄液分泌に伴い上皮細胞が膨張・収縮を繰り返すことで活性化していると考えられる。しかし不可思議なことは、TRPV4 が活性化すると細胞内ヘナトリウムが引き戻されてしまい、脳室への水輸送が抑制される点である。そこで、筆者らはナトリウム流入のカウンターパートとなるイオン動態

が存在するものと仮定して検討を進めた。この仮定において、対象となるクロライドチャンネルには TRPV4 活性化に対する即応性とカチオン流入に打ち勝つ高いクロライド透過性が必要であると考えた。結果として、カルシウム活性化クロライドチャンネルの機能的発現を確認した²⁸⁾。カルシウム活性化クロライドチャンネルのうち、条件から考えて ANO1 である可能性が高いと

推定して、TRPV4とANO1の相互作用に着目して研究を進めたところ、確かにそれらは上皮細胞において機能的に共役することが判明した。また、免疫沈降実験によりTRPV4とANO1のタンパク質間結合が示唆された。このことから、TRPV4活性を介して細胞内に流入するカルシウムによってANO1が活性化され、それによるクロライドイオン流出が駆動力となり、TRPV4と相互作用するアキアポリン4(AQP4)を介した水の流出が生じると考えられた¹⁾。加えて、脈絡叢上皮細胞の頂端側に局在しているAQP1も脳脊髄液分泌に重要であると考えられる²⁵⁾。よって、TRPV4-ANO1相互作用は脳脊髄液分泌の恒常性に関わっていると結論づけた(Fig.2-A)。

TRPV1-ANO1相互作用

TRPV1とANO1がDRGニューロンで共発現することは知られていたが、その相互作用については不明であった⁵⁾。そこで、単離したDRGニューロンにおいてカプサイシン誘発電流がANO1阻害剤で抑制されるか否かを検討したところ、平均しておよそ半減した²⁹⁾。これは、それまでTRPV1電流のみと理解されていた陰性電位での内向き電流の中にはANO1を介したクロライド電流が含まれることを示唆する結果であった。さらに、TRPV1とANO1の物理的相互作用も示唆された。

中枢神経系においてはカリウム-クロライド共輸送体2(KCC2)の発現が豊富であるため細胞内クロライド濃度は低く保たれている。しかしながら、DRGニューロンにおけるKCC2発現は非常に乏しく、ナトリウム-カリウム-クロライド共輸送体1(NKCC1)によって細胞内クロライドが調節されている¹⁷⁾。そのため、多く

のDRGニューロンにおいて細胞内クロライド濃度は比較的高く保持されており、クロライドチャンネルの活性化はクロライドの流出によって脱分極を引き起こす。そこで、DRGニューロンにおいて観察されるカプサイシン誘発活動電位と脱分極に対するANO1阻害剤の影響を観察した。実験では、最初にカプサイシン単独投与による応答を確認し、10分間の洗浄後に再びカプサイシンにより引き起こされる活動電位を測定した。この状況において、2回目の活動電位が減弱するニューロンも存在する一方で、引き続き神経興奮を示すニューロンがあることがわかった。既報によれば、脱感作後1時間程度はTRPV1のカプサイシン感受性は回復しないが、AKAPとの相互作用を介したPKC依存的なリン酸化によりTRPV1は断続的に活性化する²²⁾。さらに、TRPV1の一部はそもそもリン酸化しており活性化しやすいということも報告されている¹⁶⁾。つまりは、一部のニューロンではたまたまリン酸化されたTRPV1が多かったため継続して活動電位が惹起されたというのが既報からの解釈であるが、選択的ANO1阻害剤であるT16Ainh-A01がこの2回目の活動電位をほぼ完全に抑制した。このことから、TRPV1活性単独ではなくANO1活性を介したクロライド輸送によって神経興奮が促進したと考えられた。すなわち、細胞内クロライド濃度が高い場合、TRPV1-ANO1相互作用は疼痛を増悪させるように働くことがわかった。

しかしながら、実際には細胞内クロライド濃度が低いDRGニューロンも存在しており、痛覚に対する作用としてTRPV1-ANO1相互作用が促進的なのか抑制的なのかはわからなかった。そこで、マウスを用いて行動薬理的検討を行ったところ、カプサイシンによる足舐め行動はANO1阻害剤により抑制された。これによ

て、DRG ニューロンにおける TRPV1-ANO1 相互作用が痛みの増悪に関わるということが示された (Fig.2-B)。このことは、ANO1 を標的とした鎮痛薬開発の重要性を示唆するものであるが、全身投与では様々な副作用が予想されるため湿布を用いた皮膚への局所投与などが現実的な利用方法であると考えられる。

TRPV1-ANO1 相互作用の 神経伝達における意義

TRPV1 は末梢神経において自由神経終末のみに局在するわけではなく、中枢端にも分布している。そのため、TRPV1 の活性化は神経伝達物質の放出を促し、この機構はミトコンドリアに依存した細胞内カルシウム濃度上昇と共役している¹⁸⁾。神経傷害などによりリン酸化された TRPV1 は体温下で活性化するため、中枢端における機能解析も重要であると考えられた。脊髄後角の第二層に分布する substantia gelatinosa (SG) ニューロンは DRG ニューロンから侵害性刺激による入力を多く受けている⁹⁾。また、同一の侵害性刺激に対する DRG ニューロンと SG ニューロンの応答性は常に一致するものではなく、脊髄レベルで神経信号が統合される場合もある³³⁾。そこで、脊髄スライス標本において SG ニューロンで観察される興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current, EPSC) の解析から TRPV1-ANO1 相互作用を検討した。その結果、ANO1 阻害剤はカプサイシンにより亢進した EPSC の発生頻度を抑制するが、後根付きスライス標本において A δ 線維や C 線維誘起の EPSC に対しては阻害効果が無いことが判明した。すなわち、TRPV1-ANO1 相互作用を介した脱分極により電位依存性カルシウムチャネル活性化に伴う自発性の神経伝達が起こると

ということが示唆された (Fig.2-B)。このことは、治療選択の一つとして脊髄への ANO1 阻害剤投与の重要性を示唆するものである。また、ANO1 活性化がエクソサイトシスを引き起こすに足る脱分極を惹起することの証明でもあり、事実、膵臓 β 細胞におけるインスリン分泌とグルコースによる活動電位は ANO1 依存的であることが近年報告された^{6,34)}。

情報統合システムとしての相互作用と その薬理学的制御による疼痛緩和

前述のように、TRPV1 活性化を引き金とする痛みは ANO1 によって増悪する。すなわち、TRPV1 は侵害性物質に対する検出器であり、ANO1 がその信号の増幅器として機能していることになる。各々はそれ自体が侵害受容性チャネルとして独立した機能を持つが、複合体となることで情報系統が統合され、一つの集積素子のように機能する。そこで、単一のイオンチャネルではなく複合体全体を調節する方法について検討した。近年、筆者らはメントールやカルバクロール、2-APB といった TRP チャネルアゴニストが ANO1 を阻害することを発見した³⁰⁾。特に、メントールは TRPV1 と ANO1 の両方を阻害することから、それがメントールの鎮痛作用のメカニズムと考えられる²⁷⁾。さらに、メントールの類似体である 4-イソプロピルシクロヘキサノール (4-iPr-CyH-OH) が ANO1 に対して効果的であった。また、TRP チャネルに対しても広く抑制効果が見られた (Fig.3)。この化合物は、商業的には食品・香料添加物として用いられる脂肪族高級アルコール類であるが、意外にも 4-iPr-CyH-OH の腎毒性のみが報告されていた¹¹⁾。筆者らは、鎮痛効果を検討するためマウスの後肢に 4-iPr-CyH-

Fig.3 Structures of menthol and its analogues. Values in parentheses indicate logarithmic ratio (log P) of octanol–water partitioning coefficient at pH 7.40 (<http://www.chemspider.com>). Table shows agonistic or antagonistic effects of 4-iPr-CyH-OH on each ion channel, including TRPV1, TRPA1, TRPM8, TRPV4 and ANO1 in both mice and humans. iPr-CyH, isopropylcyclohexane. 4-iPr-CyH-OH, 4-isopropylcyclohexanol. 1-iPr-4-m-CyH, 1-isopropyl-4-methylcyclohexane. CyH-OH, cyclohexanol. 3-m-CyH-OH, 3-methylcyclohexanol. 2-PrOH, 2-propanol.

OH を皮下投与したところ、カプサイシンによる疼痛関連行動が抑制された。また、TRPV1 や ANO1 に対するアゴニスト作用は確認されなかった。興味深いことに、4-iPr-CyH-OH は TRPA1 に対するアゴニスト効果も非常に弱かった。そのため、4-iPr-CyH-OH を既存の薬剤に配合する（香料添加物指定であるため比較的自由に配合できる）などして新薬開発に繋

がると考えている。このように、天然化合物由来の物質にも TRP-ANO1 相互作用を制御できるものが存在する。

おわりに

本稿で紹介した以外にも TRP チャネルと ANO1 の相互作用は様々な生理現象に関わっていることが近年明らかとなってきている。生体内の多くの組織に存在する TRP チャネル同様に、ANO ファミリーも全身に存在している。また、ANO が持つ機能はチャネル機能、スクランブラーゼ活性およびインターナリゼーション活性であるので意義を含めると非常に多くの可能性が存在している。今後、様々な場面で TRP チャネルと ANO と組み合わせることによって理解できる現象が多々あるのではないかと大いに期待される。

文 献

- 1) Benfenati, V., Caprini, M., Dovizio, M., Mylonakou, M.N., Ferroni, S., Ottersen, O.P., Amiry-Moghaddam, M., An aquaporin-4 / transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/ TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108 (2011) 2563–2568.
- 2) Brunner, J.D., Lim, N.K., Schenck, S., Duerst, A., Dutzler, R., X-ray structure of a calcium-activated TMEM16 lipid scramblase, *Nature*, 516 (2014) 207–212.
- 3) Caputo, A., Caci, E., Ferrera, L., Pedemonte, N., Barsanti, C., Sondo, E., Pfeffer, U., Ravazzolo, R., Zegarra-Moran, O., Galletta, L. J., TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity, *Science*, 322 (2008) 590–594.
- 4) Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D., The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature*, 389 (1997) 816–824.

- 5) Cho, H., Yang, Y.D., Lee, J., Lee, B., Kim, T., Jang, Y., Back, S.K., Na, H.S., Harfe, B.D., Wang, F., Raouf, R., Wood, J.N., Oh, U., The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons, *Nat. Neurosci.*, 15 (2012) 1015–1021.
- 6) Crutzen, R., Virreira, M., Markadieu, N., Shlyonsky, V., Sener, A., Malaisse, W.J., Beauwens, R., Boom, A., Golstein, P.E., Anoctamin 1 (Ano1) is required for glucose-induced membrane potential oscillations and insulin secretion by murine beta-cells, *Pflugers Arch.*, 468 (2016) 573–591.
- 7) Dang, S., Feng, S., Tien, J., Peters, C.J., Bulkley, D., Lolicato, M., Zhao, J., Zuberbühler, K., Ye, W., Qi, L., Chen, T., Craik, C.S., Nung Jan, Y., Minor, D.L. Jr., Cheng, Y., Yeh Jan, L., Cryo-EM structures of the TMEM16A calcium-activated chloride channel, *Nature*, 552 (2017) 426–429.
- 8) Duran, C., Qu, Z., Osunkoya, A.O., Cui, Y., Hartzell, H.C., ANOs 3–7 in the anoctamin/Tmem16 Cl[−] channel family are intracellular proteins, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 302 (2012) C482–493.
- 9) Furue, H., Katafuchi, T., Yoshimura, M., Sensory processing and functional reorganization of sensory transmission under pathological conditions in the spinal dorsal horn, *Neurosci. Res.*, 48 (2004) 361–368.
- 10) Gees, M., Colasoul, B., Nilius, B., The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2 (2010) a003962.
- 11) Henningsen, G.M., Salomon, R.A., Yu, K.O., Lopez, I., Roberts, J., Serve, M.P., Metabolism of nephrotoxic isopropylcyclohexane in male Fischer 344 rats, *J. Toxicol. Environ. Health*, 24 (1988) 19–25.
- 12) Iwamoto, N., Higashi, T., Furuse, M., Localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells in vivo, *Cell Struct. Funct.*, 39 (2014) 1–8.
- 13) Jiang, T., Yu, K., Hartzell, H.C., Tajkhorshid, E., Lipids and ions traverse the membrane by the same physical pathway in the nhTMEM16 scramblase, *Elife*, 6 (2017).
- 14) Jin, X., Shah, S., Du, X., Zhang, H., Gamper, N., Activation of Ca(2+) -activated Cl(−) channel ANO1 by localized Ca(2+) signals, *J. Physiol.*, 594 (2016) 19–30.
- 15) Lim, N.K., Lam, A.K., Dutzler, R., Independent activation of ion conduction pores in the double-barreled calcium-activated chloride channel TMEM16A, *J. Gen. Physiol.*, 148 (2016) 375–392.
- 16) Mandadi, S., Tominaga, T., Numazaki, M., Murayama, N., Saito, N., Armati, P.J., Roufogalis, B.D., Tominaga, M., Increased sensitivity of desensitized TRPV1 by PMA occurs through PKCepsilon-mediated phosphorylation at S800, *Pain*, 123 (2006) 106–116.
- 17) Mao, S., Garzon-Muvdi, T., Di Fulvio, M., Chen, Y., Delpire, E., Alvarez, F.J., Alvarez-Leefmans, F.J., Molecular and functional expression of cation-chloride cotransporters in dorsal root ganglion neurons during postnatal maturation, *J. Neurophysiol.*, 108 (2012) 834–852.
- 18) Medvedeva, Y.V., Kim, M.S., Usachev, Y.M., Mechanisms of prolonged presynaptic Ca²⁺ signaling and glutamate release induced by TRPV1 activation in rat sensory neurons, *J. Neurosci.*, 28 (2008) 5295–5311.
- 19) Mulier, M., Vriens, J., Voets, T., TRP channel pores and local calcium signals, *Cell Calcium*, 66 (2017) 19–24.
- 20) Paulino, C., Neldner, Y., Lam, A.K., Kalienkova, V., Brunner, J.D., Schenck, S., Dutzler, R., Structural basis for anion conduction in the calcium-activated chloride channel TMEM16A, *Elife*, 6 (2017).
- 21) Paulino, C., Kalienkova, V., Lam, A.K.M., Neldner, Y., Dutzler, R., Activation mechanism of the calcium-activated chloride channel TMEM16A revealed by cryo-EM, *Nature*, 552 (2017) 421–425.
- 22) Schnitzler, K., Shutov, L.P., Van Kanegan, M.J., Merrill, M.A., Nichols, B., McKnight, G.S., Strack, S., Hell, J.W., Usachev, Y.M., Protein kinase A anchoring via AKAP150 is essential for TRPV1 modulation by forskolin and prostaglandin E2 in mouse sensory neurons, *J. Neurosci.*, 28 (2008) 4904–4917.
- 23) Schroeder, B.C., Cheng, T., Jan, Y.N., Jan, L.Y., Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit, *Cell*, 134 (2008) 1019–1029.
- 24) Shibasaki, K., Suzuki, M., Mizuno, A., Tominaga, M., Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4, *J. Neurosci.*, 27 (2007) 1566–1575.
- 25) Speake, T., Freeman, L.J., Brown, P.D., Expression of aquaporin 1 and aquaporin 4 water channels in rat choroid plexus, *Biochim. Biophys. Acta*, 1609 (2003) 80–86.
- 26) Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba,

- H., Nagata, S., Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members, *J. Biol. Chem.*, 288 (2013) 13305–13316.
- 27) Takaishi, M., Fujita, F., Uchida, K., Yamamoto, S., Sawada Shimizu, M., Hatai Uotsu, C., Shimizu, M., Tominaga, M., 1,8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1, *Mol. Pain*, 8 (2012) 86.
 - 28) Takayama, Y., Shibasaki, K., Suzuki, Y., Yamanaka, A., Tominaga, M., Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1, *FASEB J.*, 28 (2014) 2238–2248.
 - 29) Takayama, Y., Uta, D., Furue, H., Tominaga, M., Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112 (2015) 5213–5218.
 - 30) Takayama, Y., Furue, H., Tominaga, M., 4-isopropylcyclohexanol has potential analgesic effects through the inhibition of anoctamin 1, TRPV1 and TRPA1 channel activities, *Sci. Rep.*, 7 (2017) 43132.
 - 31) Tian, Y., Schreiber, R., Kunzelmann, K., Anoctamins are a family of Ca²⁺-activated Cl[−] channels, *J. Cell Sci.*, 125 (2012) 4991–4998.
 - 32) Tien, J., Lee, H.Y., Minor, D.L., Jr., Jan, Y.N., Jan, L.Y., Identification of a dimerization domain in the TMEM16A calcium-activated chloride channel (CaCC), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110 (2013) 6352–6357.
 - 33) Uta, D., Furue, H., Pickering, A.E., Rashid, M.H., Mizuguchi-Takase, H., Katafuchi, T., Imoto, K., Yoshimura, M., TRPA1-expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord, *Eur. J. Neurosci.*, 31 (2010) 1960–1973.
 - 34) Xu, Z., Lefevre, G.M., Gavrilova, O., Foster St Claire, M.B., Riddick, G., Felsenfeld, G., Mapping of long-range INS promoter interactions reveals a role for calcium-activated chloride channel ANO1 in insulin secretion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111 (2014) 16760–16765.
 - 35) Yang, Y.D., Cho, H., Koo, J.Y., Tak, M.H., Cho, Y., Shim, W.S., Park, S.P., Lee, J., Lee, B., Kim, B.M., Raouf, R., Shin, Y.K., Oh, U., TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance, *Nature*, 455 (2008) 1210–1215.

Address for correspondence: Yasunori Takayama
Division of Cell Signaling,
Okazaki Institute for Integrative Bioscience
(National Institute for Physiological Sciences)
5-1 Higashiyama Myodaiji, Okazaki,
Aichi 444-8787, Japan