

学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏名	堀 翔悟
学位の種類	博士（バイオサイエンス）
授与年月日	2022年（令和4年）9月22日
学位授与の要件	本学学位規程第18条第1項該当者（学位規則第4条第1項）
学位論文の題名	有尾両生類の侵害センサーTRPV1に共通に見出された低い高温開口温度とその制御の分子機構
審査委員 主査	齊藤 修 教授
副査	向井 秀仁 教授
副査	中村 肇伸 教授

論文内容要旨

地球上には様々な生物が多様な環境に適応して生息している。それを支えるメカニズムの一つとして、環境温度の感知が挙げられ、生物たちは外界の温度を感知し、時には好み、時には忌避することで生存に役立てている。温度感覚の分子センサーとしては、TRP（Transient Receptor Potential）チャンネルと呼ばれる陽イオンチャンネルの一群が機能している。TRPチャンネルは、温度やpH、機械刺激や化学物質等により開口することで動物が持つセンサーとして機能する。その中で、感覚神経に存在し高温を感じ取る最も主要な温度TRPとして、TRPV(Vanilloid)1が挙げられる。哺乳類が持つTRPV1は、一般的に約40℃以上の侵害高温を検出するセンサーとして機能し、この機能は動物が個体レベルにおいて自身の組織に損傷を与える侵害高温への忌避応答を引き起こす。TRPV1は温度センサーとして初めて同定された分子であるが、TRPV1が高温により開口する分子メカニズムの詳細は未だ明らかになっていない。特に、温度TRPが特定の温度をどのような機構で認識し開口するのか、その分子メカニズムは不明である。また、現在までの温度TRPの研究は主に恒温動物を中心に行われてきた。一方で、変温動物は体温が環境温度に強く依存する点から、異なる温度環境への適応には温度感覚の大きな変化が伴っている事が期待される。特に有尾両生類はその多くが30℃以上の高温への適応力を持たない生物群であり、我々恒温動物とは大きく異なる高温感受性をも

つ事が期待される生物群である。しかし、有尾両生類がもつ温度 TRP の機能については殆ど研究されていなかった。

本研究では、有尾両生類の低温環境への適応を支える高温センサーTRPV1 の機能変化の獲得を明らかにし、更にその TRPV1 がどのような分子メカニズムで開口温度を変化させているのかについて解明する事を目的とした。まず、4 種の有尾両生類から TRPV1 の cDNA を配列決定し、機能解析によりそれらの温度感受性を解析した。その結果、有尾両生類が持つ TRPV1 は他の四肢動物の TRPV1 より 10°C程低い温度から開口する、非常に特徴的な温度応答性を持つ事が明らかになった。更に、ラットの TRPV1 とのキメラ及び点変異解析により、有尾両生類の低い開口温度が、チャンネル N 末に位置するアンキリンリピート 1 (ANK1) 領域の 2 か所のアミノ酸の置換により獲得されている事を明らかにした。更に、逆に有尾両生類 TRPV1 の同じ位置の 2 アミノ酸をラット型に置換すると、温度応答性もこの 2 変異だけでラット型に変化する事を発見した。そして、電気生理学的実験と構造生物学的実験の組み合わせにより、ANK 領域の熱安定性が、チャンネル開口温度と密接に関わっている事を明らかにした。さらに、ツメガエル、ニワトリといった他の動物種の TRPV1 とのキメラ実験は、ANK1 領域による開口温度の決定が、四肢動物において広く保存された普遍的なメカニズムである事を明らかにした。これらの結果は、TRPV1 の ANK1 領域が、TRPV1 の開口温度を決定する「温度センサードメイン」として機能している事を世界に先駆けて示している。そして、これらの発見は、未だ明らかでない、温度 TRP が特定の温度により開口するメカニズムの解明に大きく貢献すると期待される。

論文審査結果要旨

堀君は、本研究で低温を好む有尾両生類が持つ TRPV1 がどのような機能変化を獲得した高温センサーであるかを明らかにして、高温センサーが特定の温度で開口する機構の解明を目指した。

まず 4 種の有尾両生類の TRPV1 をクローニングし機能解析した結果、他の四肢動物よりも 10°C低い温度から開口する非常に特徴的な温度応答性を持つことが判明した。そして、ラットの TRPV1 とのキメラと点変異体解析から、この低い開口温度は、N 末端に位置するアンキリンリピート 1 (ANK1) の 2 か所のアミノ酸の置換により生じていることを突き止めた。更に、ホモロジーモデリングによる構造予測と多数の点変異体の機能解析実験から、ANK を含む N 端の熱安定性が TRPV1 チャンネルの開口温度決定に重要で、発見した ANK1 の 2 か所のアミノ酸残基が熱安定性に大きく寄与することを示した。このことは、N 末端の組換えタンパクを実際に調製して生化学的にも証明した。そして、

このメカニズムが低い開口温度の有尾両生類 TRPV1 に共通であることに留まらず、多くの四肢動物で普遍的なメカニズムであることを明らかにした。以上の研究成果は、TRP チャンネルがどのような機構で温度を感知して開口するのか、その機構解明に大きく寄与するものである。

また、本研究は、膨大な生理実験データに裏付けられたものであり、更に構造生物学的アプローチや生化学的アプローチを駆使して課題解明に取り組んだものである。公開審査において堀君は、本研究の内容を分かりやすく解説するとともに、質問に対し真摯に、また論理的に説明しており、十分に水準を満たしていると判断した。よって、本博士論文は、博士の学位を授与するにふさわしいと判定する。