

博士論文

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

2022年 9月

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科
バイオサイエンス専攻
バイオ科学技術研究領域

堀 翔悟

目次

略語一覧	4 ページ
序論	5 ページ
第1章. 「有尾両生類の侵害高温センサーTRPV1 のクローニングと機能解析」	
I. 緒言	8 ページ
II. 材料と方法	10 ページ
1. 材料	
2. 実験動物	
3. 行動解析	
4. Total RNA の抽出	
5. TRP チャネル部分配列決定	
6. 完全長配列決定	
7. 分子系統解析	
8. 発現プラスミドの構築	
9. 2 本電極膜電位固定法	
10. 統計解析	
III. 結果	18 ページ
1. 有尾両生類の行動解析	
2. 有尾両生類 TRPV1 の完全長 cDNA 配列決定	
3. 有尾両生類 TRPV1 の機能解析	
IV. 考察	22 ページ
1 V. 図	25 ページ
第2章. 「有尾両生類 TRPV1 で見られる低い高温活性化温度閾値の 獲得メカニズムの検討」	
I. 緒言	36 ページ

II. 材料と方法	37 ページ
1. 材料	
2. キメラチャネル作成	
3. 点変異体作成	
4. 分子モデリング	
5. TRPV1 タンパク質発現及び精製	
6. サーマルシフトアッセイ	
7. 2本電極膜電位固定法	
8. ホールセルパッチクランプ測定	
9. 統計処理	
III. 結果	41 ページ
1. axTRPV1 と rTRPV1 の比較による開口温度決定の責任部位の探索	
2. 点変異解析による責任アミノ酸の探索	
3. ホモロジーモデリングにより予想された酸性アミノ酸との相互作用	
4. 構造の安定性と開口温度の関係の検討	
IV. 考察	46 ページ
V. 図	49 ページ

第3章. 「各四肢動物の TRPV1 の温度感受性はアンキリンリピート1の配列で
決定される」

I. 緒言	61 ページ
II. 材料と方法	62 ページ
1. 材料	
2. 各動物種 TRPV1-ARD1 領域の増幅	
3. 発現コンストラクト	
4. 点変異解析	
5. 2本電極膜電位固定法	
6. 統計解析	

III. 結果	64 ページ
1. 有尾両生類の TRPV1 における Q128 及び L154 座標の役割	
2. 他の四肢動物の TRPV1 における ARD1 領域による高温活性化閾値の調節	
IV. 考察	67 ページ
V. 図	69 ページ
総合考察	76 ページ
参考文献	78 ページ
謝辞	83 ページ

略語一覧

TRP : Transient Receptor Potential

TRPV : TRP Vanilloid

TRPM : TRP Melastatin

TRPA : TRP Ankyrin

ARD : Ankyrin Repeat Domain

TMD : Trans Membrane Domain

MPD : Membrane Proximal Domain

ORF : Open Reading Frame

PCR : Polymerase Chain Reaction

ML 法 : Maximum likelihood method

JTT : Jones-Taylor-Thornton

DMSO : Dimethyl sulfoxide

RR : Ruthenium Red

HBSS : Hank's Balanced Salts solution

DRG : Dorsal Root Ganglion 後根神経

IR Newt : イベリアトゲイモリ

Y Sal : ヤマトサンショウウオ

JC Sal : ハコネサンショウウオ

axTRPV1 : アホロートル TRPV1

inTRPV1 : イベリアトゲイモリ TRPV1

inTRPA1 : イベリアトゲイモリ TRPA1

ysTRPV1 : ヤマトサンショウウオ TRPV1

jcTRPV1 : ハコネサンショウウオ TRPV1

xlTRPV1 : アフリカツメガエル TRPV1

xtTRPV1 : ネットアイツメガエル TRPV1

chTRPV1 : ニワトリ TRPV1

plTRPV1 : カモノハシ TRPV1

序論

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っている。外界の温度を感知するモデルとしては、先ず皮膚へ投射した神経終末に発現する温度センサー（陽イオンチャンネル）が温度変化により活性化し、神経細胞内への陽イオン流入を引き起こす。それにより細胞が脱分極することで活動電位が発生し、その興奮が中枢神経へと伝わることで温度変化を認識するというモデルが知られている [1-2]。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し、その中で温度を感知する TRP チャンネル（温度 TRP）は現在 11 種類知られている [3]。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 (Transient Receptor Potential Vanilloid)1 が挙げられる。TRPV1 はチャンネル前半に 6 回繰り返しのアンキリンリピート構造と 6 回膜貫通領域をもつ陽イオンチャンネルであり、ホモ 4 量体を形成する事で機能する [Fig. 1 A-C]。TRPV1 は 1997 年にカプサイシンによって活性化する侵害受容器として発見され、その後高温や酸性化といった複数の刺激によって活性化される多刺激痛み受容体であることが明らかとなった [4-5]。哺乳類が持つ TRPV1 は、一般的に約 40°C 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 が高温に応答する分子メカニズムの詳細は未だ明らかになっておらず、世界的に温度センサーとして機能するドメインの探索が進められている [6-15]。点変異やチャンネル一部領域の切除、他のチャンネルとのキメラによる実験は、TRPV1 のイオン通過部を含む膜貫通ドメイン及びその近傍に位置するドメインが、温度による開口に重要であることを明らかにしている [6-10]。一方で、これまでの研究により、様々な動物種において TRPV1 の分子機能が調査されてきた。それにより、TRPV1 の機能は生物種によりある程度異なっていることが明らかとされている。例を挙げると、ウサギやニワトリ、ツメガエルといった動物はげっ歯類やヒトに比べカプサ

イシン感受性が低くなっている。一方で最高気温が 50°Cを超える砂漠気候に生息するラクダの TRPV1 は高温応答性を失っていることが報告されている [11-14]。また、コウモリの一部では TRPV1 の C 末端を欠失させることで TRPV1 の開口温度を低下させ、獲物となる恒温動物の探知に役立っていることが報告されている [15]。これらの報告は、生物がその環境や自らの食性等に合わせた生態的ニッチを獲得する中で、TRPV1 の機能変化もしくは消失を獲得していることを示唆する。しかし、どう分子変化が起こり、どのような温度感受性の変化を獲得することで多様な温度環境に適応しているのかについては未だ謎が多い。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ことが期待される。特に有尾両生類はその多くが 30°C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こと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ことを目的とした。第一章では、生息環境が異なる 4 種の有尾両生類から TRPV1 の cDNA を配列決定し、機能解析により明らかにしたそれらの温度感受性について記述する。第 2 章では、有尾両生類アホロートルの TRPV1 とラット TRPV1 との比較から、TRPV1 の開口温度を制御する「温度センサードメイン」を明らかにするとともに、特定した責任部位が TRPV1 の開口温度を制御する分子メカニズムについて議論する。第 3 章では、第 2 章で明らかにした分子メカニズムが、アホロートルとラット間のみならず、他の生物にも当てはまる一般的な制御メカニズムなのか議論するべく、他の有尾両生類 TRPV1、更にツメガエル、ニワトリ、カモノハシといった開口温度が異なる他の生物群の TRPV1 を対象に解析した結果を記述する。

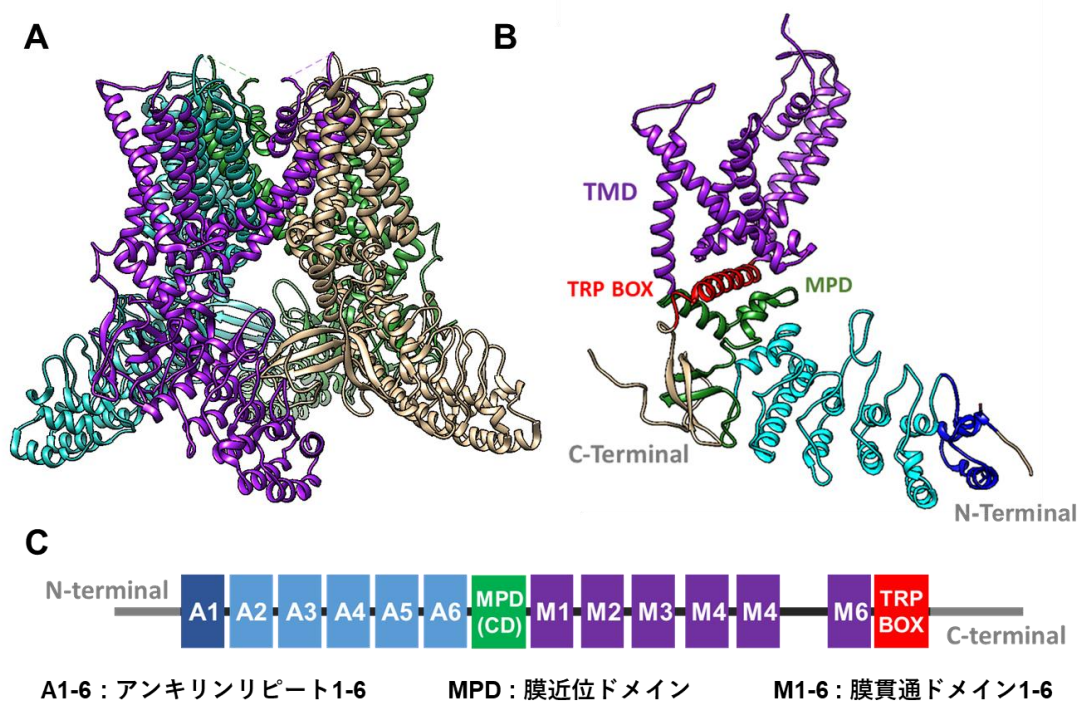


Fig. 1 TRPV1 の構造

(A) TRPV1 ホモ 4 量体の立体構造。4つのユニットをそれぞれ紫、シアン、緑、白で示した。構造データは PDBID : 7lp9 を使用した。

(B) TRPV1 の 1 ユニットの構造。TRPV1 の主要なドメインを色分けして示した。紫には細胞膜上に位置する膜貫通領域を示し、緑には膜近位ドメイン、赤には TRPBOX、そしてシアン及び青でアンキリンリピートドメインを示した。

(C) TRPV1 の構造模式図。TRPV1 タンパク質の N 末から C 末までの各ドメインの並びを示した。

第1章

有尾両生類の侵害高温センサーTRPV1のクローニングと機能解析

I. 緒言

両生類は四肢動物で初めて陸用へ進出したグループであり、世界中の淡水域に生息している。両生類は3つの目から成り、カエル類から成る無尾類、アシナシイモリから成る無足類、そしてサンショウウオやイモリから成る有尾類によって構成される。その中で、有尾両生類は温帯から寒帯という限られた温度帯にのみ生息する生物群であり、熱帯に生息する無足類や、熱帯から寒帯まで幅広く生息する無尾類とは大きく異なる。この分布の特徴は、有尾両生類が高温への適応能力を欠いていることを表しており、彼らの生命に危険が及ぶ高温（侵害高温）は他の四肢動物よりも低い温度であると考えられる。しかし、有尾両生類がどのような高温センサーを使い外界温度を感知しているのか、その詳細は全く分かっていなかった。四肢動物の侵害高温感知について、過去に行われた齧歯類を用いたノックアウト実験から3つのTRPチャンネル（TRPA（Transient Receptor Potential Ankyrin）1, TRPM（Transient Receptor Potential Melastatin）3, TRPV1）の関与が報告されている [16]。TRPA1は節足動物から脊椎動物まで幅広い生物種が持つTRPチャンネルであり、ワサビやからしに含まれるAITC（Allyl isothiocyanate,）といった辛み物質によって活性化される他、多くの動物で温度の上昇によって開口する高温センサーであることが報告されている [3, 17-18]。TRPM3は、低張による細胞の膨張を検知する物理受容体として発見され、後に感覚神経で侵害高温を検知することが報告された [19]。脂質膜にTRPM3のみを発現させた場合には、他の温度感受性TRPチャンネルで見られるような温度依存的な開口が見られなかったことから、TRPM3が侵害温度の感知に関与するメカニズムは不明であり、また哺乳類以外の動物種においてTRPM3が侵害温度の感知に関与しているのかは明らかではない [20]。TRPV1は侵害刺激であるカプサイシンの刺激を感じ取る受容体として、初めて発見された侵害受容器である [4]。神経細胞を中心に全身の幅広い組織、細胞で発現しており、TRPV1の活性化は細胞膜電位や細胞内Ca²⁺濃度の上昇を引き起こすことで、様々な細胞シグナルの引き金となる [3]。TRPV1を含め、温度TRPによる温度感受のシステムはげっ歯類やヒトをモデルとして詳細が調査されてきた。しかし、他の動物種、

特に適応する温度帯が大きく異なる生物種がどのような仕組みで温度を感じ取っているのかについては、非モデル動物を対象にした研究により、彼らが持つ温度 TRP のユニークな応答性が明らかとなってきている。例えば、非常に高温な環境である砂漠に生息するラクダは、その高温に耐えるべく高温応答性を減弱させた TRPV1 を獲得している他、哺乳類より体温が高いニワトリは開口温度が上昇した TRPV1 を獲得しており、逆に体温が低いカモノハシは開口温度が下がった TRPV1 を獲得している [12-13, 21]。両生類の温度 TRP についての研究は、無尾両生類でツメガエル TRPV1 と TRPA1、有尾両生類ではアホロートル TRPA1 について報告されている [22, 23]。冷水帯に生息するツメガエルは、熱帯に生息するツメガエルに対し TRPA1 の開口温度が 2°C 下がっているとともに、連続で高温刺激を行った際の TRPV1 の応答が変化しており、熱帯のツメガエルが持つ TRPV1 は連続刺激により応答が減弱していくのに対し、冷水帯のツメガエルが持つ TRPV1 は連続刺激により応答が増強する [23]。アホロートル TRPA1 については、本研究室の先行研究により 40°C 以上の高温によって開口する高温センサーであるとされた [22]。しかし、40°C という開口温度は低温を好む有尾両生類の生態的ニッチを説明するにはあまりにも高い温度であり、低い温度から開口する別の侵害温度センサーの存在が示唆されていた。

そこで本研究では、有尾類の低温環境への適応における温度感覚の変化の責任分子として TRPV1 に着目した。有尾両生類の TRPV1 は全く研究が行われていなかったため、本章では先ず生態的ニッチの異なる 4 種の有尾両生類アホロートル、イベリアトゲイモリ、ヤマトサンショウウオ、ハコネサンショウウオの高温忌避温度を解析、比較した。アホロートルは 16-20°C の冷涼な温度を至適とする種であり、イベリアトゲイモリは 15-28°C という比較的広い温度が適温であることが知られている [24, 25]。また、ヤマトサンショウウオは日本の近畿地方の平野部に生息する種であり、四季の影響を強く受ける環境に生息する [26]。そして、ハコネサンショウウオは日本の山地の溪流に生息する種であり、4 種のうち最も低温な環境に生息する種である [27]。行動解析後は、Race 法により 4 種の有尾両生類の TRPV1 の完全長 cDNA の配列決定を行い、その後、カエル卵母細胞発現系を用いた電気生理解析により温度応答性について評価した。

II. 材料と方法

1. 材料

Tricaine [Sigma-Aldrich]

TRIzol Regent [Ambion]

BioMasher II [Funakoshi]

M-MLV Reverse Transcriptase [Invitrogen]

KOD Fx Neo [TOYOBO]

KOD One [TOYOBO]

Gene Racer Kit [Invitrogen]

Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit [Invitrogen]

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit [Applied Biosystems]

Pure Link™ HiPure plasmid Midiprep kit [Invitrogen]

Go Taq Green Master Mix [Promega]

DNA Ligation Kit [TaKaRa]

mMESSAGE mMACHINE Kit [Invitrogen]

Collagenase Type I [Wako]

Ruthenium Red (RR) [Sigma-Aldrich]

Dimethyl sulfoxide (DMSO) [Sigma-Aldrich]

Capsaicin [Wako]

RNA Easy Measurement N [DynaMarker]

Gene Ladder Fast II [ニッポン・ジーン]

注射用蒸留水 [大塚製薬株式会社]

2. 実験動物

全ての動物実験は、長浜バイオ大学実験附属施設運営委員会のガイドラインに従って行った。アホロートルはウーパールーパーNET から購入した。イベリアトゲイモリは広島大学両生類研究センターより提供を受けた。ヤマトサンショウウオ及びハコネサンショウウオは野外にて捕獲した（日本 滋賀県 長浜市及び高島市）。ハコネサンショウウオを除く3種は室温(22-25°C)で飼育し、ハコネサンショウウオは7°Cで飼育した。

電気生理解析に使用したアフリカツメガエルは、浜松生物教材株式会社から成体の雌個体を購入し、20°Cで飼育した。個体の大きさについては、アホロートル及びイベリアトゲイモリは、RNA抽出に12-20 cm、行動実験には7-12 cmの亜成体を使用した。ヤマトサンショウウオは5-8 cmの亜成体を、ハコネサンショウウオは5-7 cmの幼生をRNA抽出及び行動解析に使用した。すべての生物種について、飼育水には塩素を中和した水道水を使用した。

3. 行動解析

アホロートル及びイベリアトゲイモリは500 mLの飼育水(25, 33, 36, 39°C)が入った金属トレイ(15×21 cm)に入れ測定した。ヤマトサンショウウオは100 mlの飼育水(25, 33, 36°C)の入った1 Lビーカー[IWAKI]に入れ測定した。測定はビデオカメラで行い、2分間の個体の移動する様子を撮影した。投入の10秒後からの1分間(アホロートル、ヤマトサンショウウオ)もしくは30秒(イベリアトゲイモリ)までの動きを2秒(アホロートル、ヤマトサンショウウオ)もしくは1秒(イベリアトゲイモリ)ごとにプロットし、総移動距離を算出した。

4. Total RNA の抽出

各種有尾両生類を30分間以上氷冷麻酔し、断頭により屠殺した。ハコネサンショウウオについては、氷冷による十分な麻酔効果が見られなかったため、0.05% Tricaine [Sigma-Aldrich]を添加した上で氷冷麻酔を行った。摘出した各組織は液体窒素により速やかに凍結し、使用まで-80°Cで保存した。各組織の重量に応じ、Trizol Reagent [Invitrogen]を組織100 mg 対 Trizol 1 ml となるように添加し、Bio Masher II [Funakoshi]によりホモジナイズを行った。その後の操作は、Trizol Reagentのプロトコ

ルに従い Total RNA を精製した。

5. TRP チャネル部分配列決定

Total RNA 1.5 µg を用いて、Random Primer 及び M-MLV [Invitrogen] による逆転写反応を行い、cDNA を作成した。アホロートル TRPV1 (axTRPV1) については、研究開始時には配列情報が存在しなかったため、過去に設計された四肢動物 TRPV1 縮合プライマー [22] を使用した。イベリアトゲイモリ TRPV1 (inTRPV1) 及びイベリアトゲイモリ TRPA1 (inTRPA1) については広島大学イベリアトゲイモリ研究コンソーシアムが提供する EST データに対し、四肢動物 TRPV1 の保存配列を検索し、得られた 2 つの配列 (M4959883, M2066090 : inTRPV1) (M0529016, M0529016 : inTRPA1) を元に Primer を設計した。ヤマトサンショウウオ TRPV1 (ysTRPV1) 及びハコネサンショウウオ TRPV1 (jcTRPV1) については、axTRPV1 と inTRPV1 間での保存配列に対し Primer を設計した。KOD ONE [東洋紡] もしくは KOD Fx Neo [東洋紡] を用いた PCR により TRPV1 部分配列を増幅後、TOPO ベクターへクローニングした後サンガーシーケンスにより塩基配列を決定した。以下に使用したプライマーセットを示す。

- Axolotl TRPV1 (axTRPV1)
Degenerate Primer TRPV1 F : CARGACAARTGGGACMGATT
Degenerate Primer TRPV1 R : TAWATGCCCATGWGAGCTGRA
- IR Newt TRPV1 (inTRPV1)
F Primer : GGGCAGATGGAGAGTTCTTC
R Primer : TCCCTCCAATCACGGTTATG
- Y Sal TRPV1 (ysTRPV1)
1st F Primer : GCTGGAAGATATTGCCAACAAGAAAG
1st R Primer : ATTCGGGGTCTCGCTGCTGTAG
2nd F Primer : CTTGCTGCAAAGACAGGCAAGAT
2nd R Primer : TGATCTCCAGCACCGAATTGTTC

- JC Sal TRPV1 (jcTRPV1)
 - F Primer : TCTGTCCCGCAAGTTCACAG
 - R Primer : TCAGCGAGTTCAGGAAGCTC
- IR Newt TRPA1 (inTRPA1)
 - inTRPA1 1F : CTATCCAGAGGAGCCAATCC
 - inTRPA1 1R : GATCGAGACTCCTTGTCGAG
 - inTRPA1 2F : GCTGAAGTGCAACGCAATGC
 - inTRPA1 2R : TTGCTTTCTTTGCGGTTTCAG

6. 完全長配列決定

TRPV1 が高発現すると期待される脳（ハコネサンショウウオについては頭部）の Total RNA に対し Gene Racer kit [Invitrogen]を用いた RACE 法により部分配列の上流及び下流の cDNA を増幅した。PCR には KOD ONE [東洋紡]もしくは KOD Fx Neo [東洋紡]を使用し、増幅産物を TOPO ベクターにクローニング後、サンガーシーケンスにより塩基配列を決定した。PCR 及びシーケンスのエラーを考慮し、複数（2-4）のクローンについて配列を決定した。以下に使用したプライマーセットを示す。

- Axolotl TRPV1
 - 1st F Primer : ATCCCTCTATGACCTGACGT
 - 1st R Primer : TCGATGTCCAGGATGGTGAT
 - 2nd F Primer : GCTCATCAGGGCGATCAGCA
 - 2nd R Primer : GTCGCCTATAACCGGCCGCT
- IR Newt TRPV1
 - 1st F Primer : GCTGGAAGATATTGCCAACAAGAAAG
 - 1st R Primer : CTTGCTGCAAAGACAGGCAAGAT
 - 2nd F Primer : ATTCGGGGTCTCGCTGCTGTAG
 - 2nd R Primer : TGATCTCCAGCACCGAATTGTTC

- Y Sal TRPV1

1st F Primer : ATCTCTCCCGCAAGTTCACCGAG

1st R Primer : CCTCGGATGAAGAAATAGATTCCTC

2nd F Primer : CCACTCATCCCTGTACGACTTGTC

2nd R Primer : CGTAGCGCAGGTAATCTTCCTTC

- JC Sal TRPV1

1st F Primer : GTTCACAGAGTGGGCCTACGGAC

1st R Primer : GATTCGGCGTCTCACTGCTGTAG

2nd F Primer : CGTGCACTCGTCCCTGTATGAC

2nd R Primer : GCAATGATCTCCAGCACAGAGTTG

7. 分子系統解析

MEGAX を用いて、ML 法 (Maximum Likelihood Method) で TRPV ファミリーの分子系統樹を作成した (JTT model, Bootstrap Replications = 1000)。各生物種の TRPV1-6 のアミノ酸配列は NCBI より取得した。使用した配列のアクセッション番号は以下のとおりである。

ヒト TRPA1 : NP_015628.2、ヒト TRPV1 : NP_542435.2、

マウス TRPV1 : NP_001001445.1、ラット TRPV1 : NP_114188.1

ニワトリ TRPV1 : NP_989903.1、ガラガラヘビ TRPV1 : ADD82931.1

ニシツメガエル TRPV1 : NP_001243521.1、メダカ TRPV1 : XP_011482044.1

ゼブラフィッシュ TRPV1 : NP_001119871.1、ヒト TRPV2 : NP_057197.2

マウス TRPV2 : EDL10354.1、ラット TRPV2 : NP_058903.2

ニワトリ TRPV2 : XP004946742.1、ニシツメガエル TRPV2 : XP_002938302.2

ヒト TRPV3 : NP_001245134.1、ラット TRPV3 : NP_001020928.2

ヒト TRPV4 : NP_001170904.1、ラット TRPV4 : NP_076460.1

ヒト TRPV5 : NP_062815.3、ラット TRPV5 : NP_446239.3

ヒト TRPV6 : NP_061116.5、ラット TRPV6 : NP_446138.1

8. 発現プラスミドの構築

rTRPV1 (in pcDNA3)は Dr. David Julius (UCSF)から譲渡されたものを用いた。

各種有尾両生類 TRPV1 については、ORF の両端にそれぞれ制限酵素サイトを付加した cDNA を PCR により作成し、TOPO ベクターにサブクローニングした(axTRPV1: 5'-Sma I 3'-Xba I , inTRPV1, A1 及び ysTRPV1: 5'-Xba I 3'-HindIII, jcTRPV1: 5'3'ともに Xba I)。その後、PCR エラーの無いクローンについて制限酵素処理により TOPO ベクターから切断し、DNA Ligation Kit [TaKaRa]を用いてカエル卵母細胞発現ベクター-pGEMHE へクローニングした。以下に使用したプライマーセットを示す。

- Axolotl TRPV1

F Primer : CAGCTAGCCCCGGGACCATGAGGAAGTTGGGCAGTTCCACAA

R Primer : CATCTAGATTACACAGTCTTGACAAGAGGGGCC

- IR Newt TRPV1

F Primer : CTTCTAGAACCATGAGGAGGACTGGCAGTTCCACAG

R Primer : CTAAGCTTTTACACCGTCTTAGCGAGGTGGGCC

- Y Sal TRPV1

F Primer : CCTCTAGAACCATGAAGAAGGGCGGTAGTTCCACA

R Primer : GGAAGCTTTCACATCGTCTTAGCGAGAGGGGCC

- JC Sal TRPV1

F Primer : CCTCTAGAACCATGAGGAAGCTCGGCAGTTCCACAG

R Primer : GGTCTAGATTACATAATCTTGCAAGAGGGGCCCT

9.2 本電極膜電位固定法

各プラスミドを制限酵素 Nhe I 処理により直鎖化し、フェノールクロロホルム処理とエタノール沈殿により精製した。精製した DNA を鋳型として使用し、T7 mMESSAGE mMACHINE Kit [Invitrogen]を用いて、キャップ構造付き cRNA を合成した。合成した cRNA は塩化リチウム沈殿により精製後、注射用蒸留水で 100-200 ng/μl になるように溶解した。30 分以上氷冷麻酔したアフリカツメガエル雌個体の腹部を 1-2 cm 切り、卵母細胞を摘出した。摘出した卵母細胞は Collagenase (2 mg/ml)を含む 10 ml の MBSH

(88 mM NaCl, 1.1 mM KCl, 2.4 mM NaHCO₃, 15 mM HEPES pH 7.6 (NaOH), 0.4 mM Ca(NO₃)₂, 0.4 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.8 mM MgSO₄ · 7H₂O, 10 µg/ml penicillin, 10 µg/ml streptomycin)中で、回転させながら 4 -5 時間室温でインキュベートした。卵母細胞は 5 回以上 MBSH で洗浄し、24 時間以内にインジェクションを行った。インジェクションには Nanoject II [Drummond Scientific Company] を使用し、1 細胞あたり 50 nl をインジェクションした。その後、卵母細胞は 17°C の MBSH 中で 2-3 日間培養した。測定時のバス液には ND96 (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 5 mM HEPES pH 7.4 (NaOH)) を使用した。3 M KCl で満たした 2 本のガラス電極を実体顕微鏡下で卵母細胞に挿入し、OC-725C [Warner Instruments] により膜電位固定及びチャネル開口による電流を測定した。電圧条件は、-20 mV の固定電圧の元、1 秒ごとに -80 mV (100 ms) と +40 mV (100 ms) のステップパルス、もしくは 2 秒ごとに -100 mV から +100 mV まで (200 ms) のランプパルスにより行った。取得したデータは Digidata 1550 [Axon Instruments] で取得し、pCLAMP [Axon Instruments] ソフトウェアを用いて解析を行った。温度の制御及び測定は、Bipolar Temperature Controller CL-100 と In-line Heater/Cooler SC-20 [Warner Instruments] により温めたバス液を灌流することで行った。シグモイド曲線のフィッティング及び各種パラメータの算出は GraphPad Prism9 ソフトウェア (ver2.0) により行った。また、少なくとも 2 回以上の独立した実験を行った。

開口温度閾値の算出には、アレニウスプロットを用いた。アレニウスプロットには絶対温度の逆数に対し、対数スケールで -80 mV 電流の値をプロットした。開口温度閾値は、ベースライン (非活性時) へフィットした直線と、活性化状態へフィットした直線の交点で求めた。温度係数 Q₁₀ (温度が 10°C 上昇した際の反応の変化率。4 以下は温度依存性無し) の算出は、下の計算式で行った。R は電流、T は温度を示す。

$$Q_{10} = \left[\frac{R_2}{R_1} \right]^{10/(T_2 - T_1)}$$

R₁ 及び T₁ は各種 TRPV1 インジェクション処理卵母細胞の活性化閾値から取得し、R₂ 及び T₂ は活性化閾値から 5°C 上昇した点から取得した。

10. 統計解析

データの統計処理及びグラフ作成は GraphPad Prism9 [MDF] を使用し、グラフは平均及び標準誤差 (SEM) で示した。カプサイシン標準化した高温応答電流の比較には、One-way ANOVA の後 Dunnett's Test により rTRPV と各種有尾両生類 TRPV1 の平均の差を検定した。他のデータについては、One-way ANOVA の後 Tukey's Test により各群の平均の差を検定した。

III. 結果

1. 有尾両生類の行動解析

有尾両生類は低温を好むとされているが、その具体的な忌避温度は解析されていない。そこで、本項では4種の有尾両生類について高温に対する忌避温度を明らかにすべく、飼育温度の水槽内と温度を上げた水槽内での移動量を比較した。測定の結果、今回対象とした4種の有尾両生類全てにおいて40°C以下の温度から移動量の有意な増加が認められた (Fig. 2A, B)。アホロートルは室温において殆ど移動しなかったが、33°Cの水槽内では逃げ回る様な顕著な遊泳行動を示した。イベリアトゲイモリは25°Cから36°Cまでの水槽内では遊泳行動をとらなかったが、39°Cの水槽では顕著な遊泳行動を示した。ヤマトサンショウウオは25°Cや33°Cの水槽内でも遊泳行動が見られたが、36°Cの水槽内では遊泳行動の有意な増加が見受けられた。一方、ハコネサンショウウオでは、20°Cの水槽での顕著な移動量の増加が見い出された (長浜バイオ大 新谷卒論 2021)

2. 有尾両生類 TRPV1 の完全長 cDNA 配列決定

各種プライマーを用いて脳を対象に RT (逆転写) -PCR を行い、部分配列を増幅した。増幅した配列を配列決定し、得られた部分配列情報を元に RACE 法による完全長配列決定を行った。その結果、有尾両生類4種全てについて、約850アミノ酸から成る TRPV1 をコードする cDNA の取得に成功した。決定した有尾両生類 TRPV1 と他種 TRPV1 を含めたアライメントを行った (Fig. 3)。その結果、TRPV1 を構成する6つのアンキリンリピートドメイン及び6つの膜貫通ドメインは有尾両生類 TRPV1 においても高く保存されていた。また、配列決定した有尾両生類 TRPV1 配列と他種 TRPV1 チャンネルとの系統関係を調査するために、ML 法により TRPV1 ファミリーの分子系統樹を作成した (Fig. 4)。その結果、有尾両生類 TRPV1 は四肢動物 TRPV1 のクレードに含まれ、同じ両生類であるツメガエル TRPV1 と近縁であることが示された。

TRPV1 の刺激応答性についての責任部位は、カプサイシンと酸について詳細が明らかにされている。そこで、これらの責任部位について調査したところ、酸応答に重要なアミノ酸 (rTRPV1 : E601, T633, E648) については全て保存されていた。一方で、カプサイシン結合サイトについては、膜貫通領域に存在する3か所のアミノ酸 (rTRPV1 :

S512, T550, E570) のうち 1 つの座標 (T550) については 4 種ともにバリンへと置換され、他の 2 アミノ酸については保存されていた。また、ツメガエル TRPV1 を対象にした研究により、TRPV1 の感作-脱感作を決定する 3 か所のアミノ酸 (K156, P188, E232) が報告されている [21]。有尾両生類各種について見てみると、P188 座標は 4 種ともに保存されていたのに対し、K156 座標は 4 種ともにヒスチジンに置換しており、E232 座標は inTRPV1 及び ysTRPV1 については保存されていたが、axTRPV1 及び jcTRPV1 ではグルタミンに置換していた。

また、RACE 法による各種有尾両生類 TRPV1 の PCR 増幅の際に、イベリアトゲイモリにのみ膜貫通領域の 2 から 6 が欠損したスプライス変異体の顕著な増幅が確認された (Fig. 5)。

3. 有尾両生類 TRPV1 の機能解析

3-1 有尾両生類 TRPV1 は TRPV1 代表リガンドに応答する

配列決定した有尾両生類 TRPV1 が、四肢動物 TRPV1 と同様に侵害受容器としての機能を有しているのか検討するため、四肢動物 TRPV1 において代表リガンドとされるカプサイシン及び酸に対する応答性を調査した。2 本電極膜電位固定法による電気生理解析の結果、有尾両生類 TRPV1 発現卵母細胞は酸及びカプサイシンの適用により活性電流の発生が検出された (Fig. 6A-D)。次に、代表四肢動物 TRPV1 として rTRPV1 発現卵母細胞を用意し、各種有尾両生類 TRPV1 発現卵母細胞との間でカプサイシン応答における濃度依存性を比較した。その結果、有尾両生類 TRPV1 のカプサイシン感受性は rTRPV1 より低いことが示された。rTRPV1 の 50% 活性濃度 (EC_{50}) は約 $0.6 \mu M$ であったのに対し、有尾両生類 TRPV1 の EC_{50} は $50 \mu M$ 前後であり、約 100 倍感度が低かった (Fig. 6B)。また、酸応答について、rTRPV1 と有尾両生類 TRPV1 を比較した所、有尾両生類 TRPV1 は rTRPV1 よりも酸感受性がやや高いことが示された。rTRPV1 の EC_{50} が pH5.5 であったのに対し、有尾両生類 TRPV1 の EC_{50} は pH6 前後であった (Fig. 6D)。各種 TRPV1 のカプサイシン応答及び酸応答の EC_{50} を Table. 1 に示した。

3-2 有尾両生類 TRPV1 は約 30°Cで開口する

有尾両生類 TRPV1 の高温応答性について、2 本電極膜電位固定法により調査した。インラインヒーターによりバス液の温度を 40°Cまで徐々に加熱していったところ、非インジェクション及び rTRPV1 を発現させた卵母細胞は 40°C以下の温度に対し応答を示さなかったが、有尾両生類 TRPV1 を発現させた卵母細胞については温度の上昇に伴う明瞭な活性電流の発生が見られた (Fig. 7A, B)。次に、有尾両生類 TRPV1 の詳細な開口温度を明らかにすべく、アレニウスプロットを作成し、開口温度閾値を決定した。その結果、ハコネサンショウウオは $27.87 \pm 0.31^\circ\text{C}$ 、アホロートルでは $30.91 \pm 0.34^\circ\text{C}$ 。イベリアトゲイモリで $31.57 \pm 0.36^\circ\text{C}$ 、ヤマトサンショウウオで $34.11 \pm 0.35^\circ\text{C}$ の閾値が示された (Fig. 7 C)。また、50%開口温度はハコネサンショウウオ及びアホロートルでは約 35°C、イベリアトゲイモリとヤマトサンショウウオについても 40°Cを下回っていた (Fig. 7D)。活性化の温度係数 Q_{10} は 4 種ともに 10 を超える高い値を示した (Fig. 5E)。各有尾両生類 TRPV1 の開口温度閾値、50%開口温度及び Q_{10} を Table. 2 に示した。

3-3 有尾両生類 TRPV1 の高温脱感作は種により異なる

同じ両生類に属するツメガエル類の TRPV1 は、連続した高温刺激に対する応答性が異なっており、冷環境に生息するツメガエルは連続刺激により活性が増強し、熱帯に生息するツメガエルでは逆に減弱する [23]。連続的な温度刺激に対する有尾両生類 TRPV1 の応答性を明らかにすべく、5 回の連続高温刺激を行った。40°Cまでの連続した高温刺激により、アホロートル及びイベリアトゲイモリ TRPV1 の温度応答性は変化しなかったが、他の 2 種については連続して刺激するにつれて応答が有意に減弱した (Fig. 8)。ハコネサンショウウオ TRPV1 については、5 回の連続刺激によりその活性化電流を 6 割に減弱させた。顕著に電流の減弱が見られたヤマトサンショウウオについては 2 回目の刺激から急激に応答が減弱し、最終的に 2 割の電流へと減弱した。

3-4 イベリアトゲイモリ TRPA1 は約 40°Cの高温から開口する

イベリアトゲイモリは行動解析において 39°Cから高温忌避応答を示したのに対し、イベリアトゲイモリから単離した TRPV1 の開口温度閾値は 31°Cであった。そこで、個

体の高温忌避への他の高温センサーの関与を考慮し、イベリアトゲイモリ TRPA1 をクローニングした後 2 本電極膜電位固定法による高温応答解析を行った。解析の結果、inTRPA1 発現卵母細胞は 40°C から活性化が見られた (Fig. 9)。この結果は、axTRPA1 発現細胞と同様であった。

IV. 考察

本研究では、低温環境に適応する有尾両生類について、その高温忌避特性および侵害高温センサーTRPV1の機能について調査した。過去の報告において、哺乳類を中心にいくつかの四肢動物が持つTRPV1の高温応答性が示されていた。それらの報告では、四肢動物がもつTRPV1は約40°Cの温度から開口する高温センサーであることが示されている。40°Cという温度は、哺乳類の体温から逸脱し、細胞や組織に害を及ぼす高温を検知していると考えられる。実際に、哺乳類より体温が高い鳥類であるニワトリのTRPV1は哺乳類TRPV1よりも高い活性化温度閾値を持ち、逆に一般的な哺乳類より体温が低いカモノハシは開口温度が低くなっていた[13, 21]。一方で、変温動物は、体温が外界の温度に大きく影響を受ける動物群であり、異なる温度環境への適応はTRPV1の活性化温度閾値の大きな変化を伴うことが予想されるが、変温動物のTRPV1について調査された報告はツメガエル類及びヘビ類の数種に留まる。これらの報告の中で、低温環境を好む変温動物としてアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) が調査された。xlTRPV1は約40°Cから活性化する高温センサーであることが示され、熱帯に生息するネッタイツメガエルと同じ開口温度をもつことが報告されている。一方で、もう一つの侵害高温センサーであるTRPA1において、ツメガエル類の生息環境温度と活性化閾値に相関関係が報告されており、より低温に生息するツメガエルはより低い開口温度を持つことが示された[23]。これらの報告は、ツメガエル類の温度適応がTRPV1よりもむしろTRPA1と密接に関わることを示唆する。しかし、近年の研究により、有尾両生類アホロートルがもつTRPA1が40°Cの開口温度を持つことが明らかになった[22]。行動解析の結果、有尾両生類4種中3種は40°Cより大きく低い温度から忌避行動を示した。アホロートルの高温忌避は33°Cという低い温度から誘導されており、この結果はaxTRPA1の高温活性化閾値とは大きく離れている。この結果は、有尾両生類の高温忌避におけるTRPA1以外の高温センサーの関与を強く示唆し、有尾両生類がツメガエル類とは異なる温度感知メカニズムを持つことが示唆された。電気生理解析は、有尾両生類TRPV1がカプサイシン、酸といった代表的な侵害刺激によって開口し、また約30°Cという低い温度から開口することを明らかにした。化学応答の結果は、有尾両生類TRPV1が四肢動物TRPV1と同等の侵害刺激センサーとして機能することを意味し、

これらの機能が多様な生物の中で広く保存される主要な機能であることを示唆する。また、更に詳しく化学応答の特性を比較すると、カプサイシンや酸応答の責任アミノ酸の一致度から予想された様に、rTRPV1 と比較して有尾両生類の TRPV1 のカプサイシン応答性は低く、酸へは同等の応答性を示した。一方で、有尾両生類 TRPV1 の開口温度は過去に報告された全ての四肢動物より大きく低い値を示した。約 30°C という開口温度は、低温環境を好む有尾両生類の特徴とよく一致する。一方で、イベリアトゲイモリは 33°C 及び 36°C の温度で忌避行動を示さなかったのに対し、TRPV1 の開口温度は約 31°C であった。アホロートルにおいて TRPA1 が 40°C から開口する高温センサーであることから、イベリアトゲイモリが TRPV1 よりむしろ TRPA1 を主要な侵害高温センサーとして活用している可能性が考えられる。実際に、電気生理解析の結果はイベリアトゲイモリの TRPA1 が 40°C から開口する高温センサーであることを示しており、この温度はイベリアトゲイモリの行動解析の結果とほぼ一致する。また、inTRPV1 をクローニングする際、膜貫通領域の一部を欠いた転写産物の顕著な増幅が見られた。このスプライス変異体は、TRP チャンネルにおけるイオンの通り道であるポアドメインを欠いており、チャンネルとしての機能を失ったタンパク質を発現すると考えられる。これらの結果は、イベリアトゲイモリが転写後の選択的スプライシングにより、機能的な TRPV1 の発現を抑制することで感知温度を高温側 (TRPA1 依存) に変化させている可能性を示唆する。また、有尾両生類 TRPV1 は、種によって脱感作能が異なった。過去の報告は、ツメガエル類が種によって異なる脱感作能を持つことを明らかにしており、3 か所のアミノ酸の置換によりチャンネル脱感作能を変化させているとされた [23]。この 3 か所のアミノ酸を比較すると axTRPV1 及び jcTRPV1 は脱感作能を持たず、inTRPV1 及び ysTRPV は脱感作能を獲得していることが示唆された。しかし、機能解析の結果はヤマトサンショウウオ及びハコネサンショウウオの 2 種の TRPV1 が脱感作能を獲得していることを示した。この結果はツメガエルで報告された結果と矛盾する。ツメガエル TRPV1 で報告された脱感作の分子基盤が、有尾両生類や他の生物種が持つ TRPV1 にも適応される一般的なメカニズムであるかについては今後の解明が必要とされる。脱感作の獲得は TRPV1 の開口状態の継続による細胞死を防ぐことが報告されている [21]。今回研究対象とした有尾両生類のなかで、TRPV1 が最も顕著な脱感作を示したヤマトサンショウウオは、日本の近畿地方の平野部に生息する種であり、今回対象

とした 4 種の中で、30°Cを超える高温に最も晒されやすい種であると考えられる。ysTRPV1 の持つ強力な脱感作能は、夏期の避けられない高温環境下での細胞死を防ぐ役割を持つ可能性がある。また、同じサンショウウオ科に属する 2 種のサンショウウオ（ヤマトサンショウウオ及びハコネサンショウウオ）の間で、高温活性化閾値が 5°C 以上異なっていた。これらの 2 種は生息する温度環境が大きく異なる。特に TRPV1 が 4 種で最も低い開口温度を示したハコネサンショウウオは、標高 350 m 以上の山地に生息する種であり、20°C から高温を忌避する極めて低温へ適応した種である [27]。サンショウウオ類で見られた TRPV1 の開口温度閾値の差異は、彼らが種ごとの環境ニッチに合わせ、開口温度が厳格に変化した TRPV1 を獲得している可能性を示唆する。今後は、他のサンショウウオ類についても調査対象とし、生息温度と TRPV1 開口温度の相関関係を調査することが重要である。

本研究で明らかにした有尾両生類 TRPV1 がもつ 30°C という開口温度は、過去に報告されたあらゆる四肢動物種が持つ TRPV1 と大きく離れた非常に特異的な性質である。この開口温度シフトの分子メカニズムを明らかにすることは、未だ明らかではない「TRP チャンネルが特定の温度を認識し開口するメカニズム」の解明に新しい洞察を齎すと期待される。

V. 図

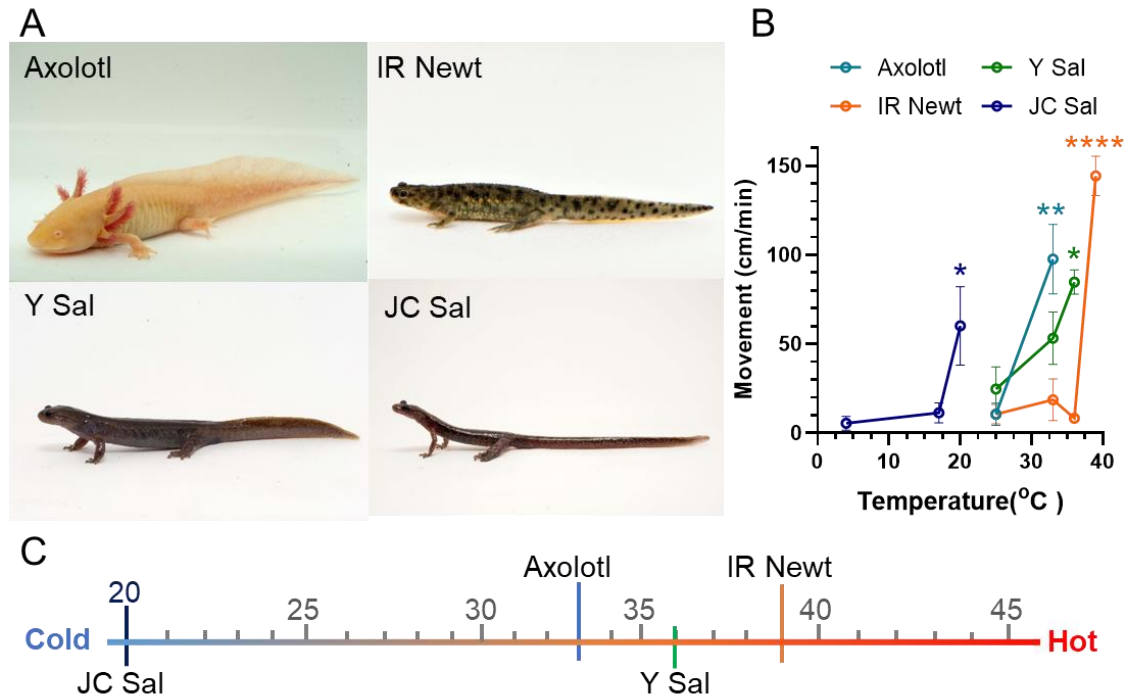


Fig. 2 各種有尾両生類の高温忌避

- (A) 各種有尾両生類の画像（自然写真家 関 慎太郎 氏より提供）
- (B) 行動解析による各種有尾両生類の高温忌避温度解析の結果。縦軸は 1 分間の移動量 (cm) を示し、横軸は温度条件 (°C) を示す。また、各種有尾両生類の移動量の平均及び標準誤差を青：Axolotl (n = 4), 橙：IR Newt (n = 3), 緑：Y Sal (n = 3), 紺：JC Sal (n = 5) で示した。統計処理は、Dunnett's Test により飼育温度 (JC Sal : 4°C, 他 25°C) 下の移動量に対する高温条件 (33°C, 36°C, 39°C) での移動量を比較した。有意差は* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, **** = $p < 0.0001$ で示した。また、ハコネサンショウウオの行動解析は長浜バイオ大学 新谷の卒論 (2021)より引用した。
- (C) 各種有尾両生類の高温忌避温度。各種有尾両生類が忌避行動を引き起こした温度を示した。

Fig. 3 有尾両生類及び代表四肢動物 TRPV1 のアライメント

有尾両生類及び代表的な脊椎動物種がもつ TRPV1 のアミノ酸配列を用いてアライメントを行った (CLUSTALW, GenomeNet)。アンキリンリピートドメインを黒太字で示し、膜貫領域を網掛けで示した。

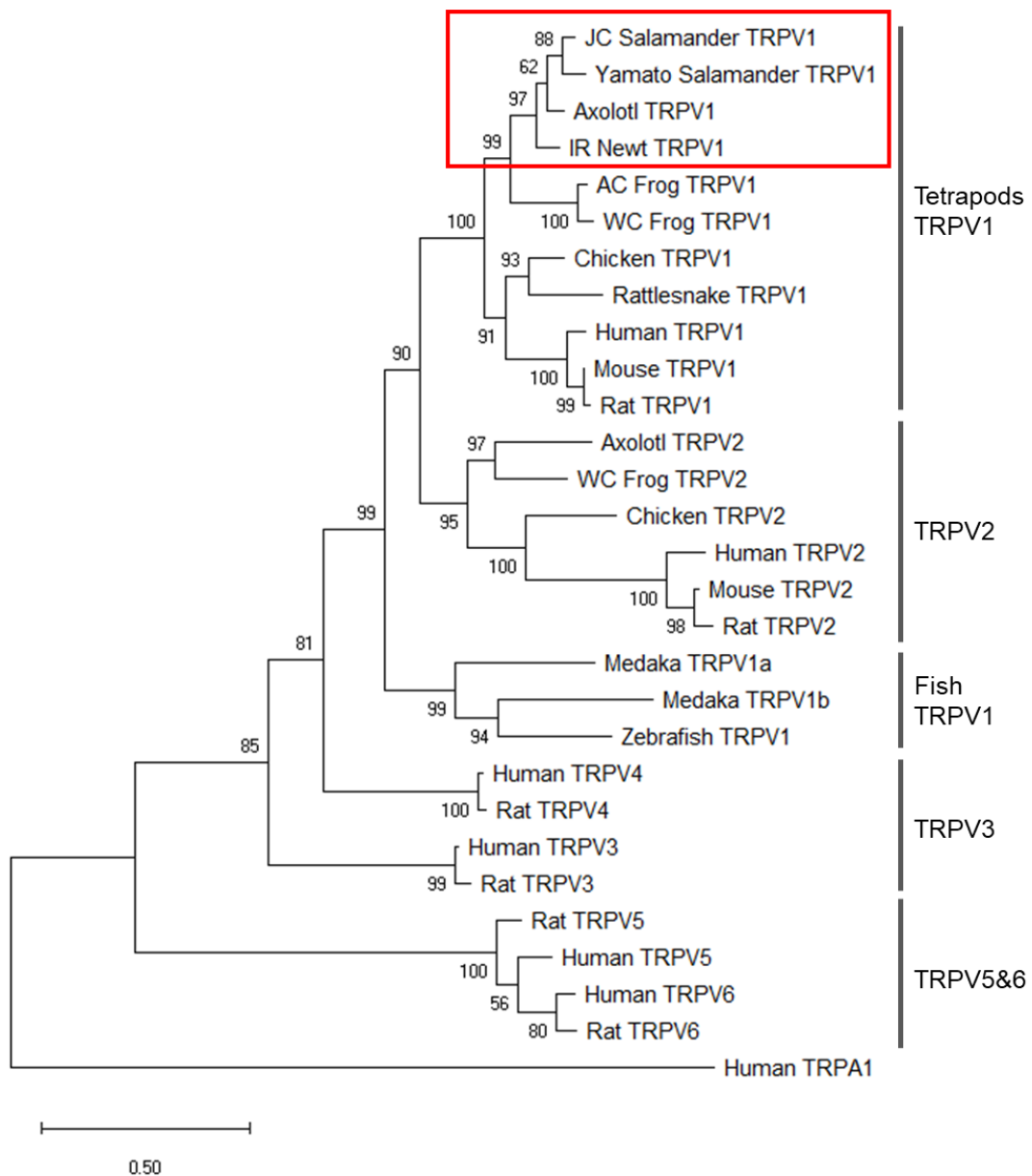


Fig. 4 TRPV ファミリーの分子系統樹

有尾両生類及び代表的な脊椎動物種の TRPV1-6 のアミノ酸配列を用いて系統樹を作成した (Maximum Likelihood Method, JTT Model, Bootstrap Replications = 1000)。各枝の値は、信頼度 (ブートストラップ値) を示す。また、スケールバーは長さ当たり 0.5% のアミノ酸置換を示す。

```

IR NewTRPV1  MRRTGSS TELEESDI TDES GFTQETDKQSDEFNLELPEEFQSSKPRSGMFLNF IASPKQK 60
SV           MRRTGSS TELEESDI TDES GFTQETDKQSDEFNLELPEEFQSSKPRSGMFLNF IASPKQK 60
*****

IR NewTRPV1  RLRFGKGDYDKEMAPMDSMYMMESKVLSP TIKYNTCDKGRYNQLFKKSTSV DSTTSCKE I 120
SV           RLRFGKGDYDKEMAPMDSMYMMESKVLSP TIKYNTCDKGRYNQLFKKSTSV DSTTSCKE I 120
*****

IR NewTRPV1  ALKVYDQRK IFEAVSEGDKNELDDLLVYLRRTVKHL TDDEFKEPDTGKTCLLKAMLNLSH 180
SV           ALKVYDQRK IFEAVSEGDKNELDDLLVYLRRTVKHL TDDEFKEPDTGKTCLLKAMLNLSH 180
*****

IR NewTRPV1  GKNDT IPLLLEIAEKTD SLKEF INAAYTDEYYRGQTALH IAIERRNMYLVELL IQHGADV 240
SV           GKNDT IPLLLEIAEKTD SLKEF INAAYTDEYYRGQTALH IAIERRNMYLVELL IQHGADV 240
*****

IR NewTRPV1  HARADGEFFRQLKGGKPGFYFGELPLSLAACTNQLD I VKYLLQNQYQPANI AAKDSKGN TV 300
SV           HARADGEFFRQLKGGKPGFYFGELPLSLAACTNQLD I VKYLLQNQYQPANI AAKDSKGN TV 300
*****

IR NewTRPV1  LHALVEIADNTKENTKFVTKMYSILILGAKIHPTKKLEDIANKKGLT PLKLAAKTGKIG 360
SV           LHALVEIADNTKENTKFVTKMYSILILGAKIHPTKKLEDIANKKGLT PLKLAAKTGKIG 360
*****

IR NewTRPV1  VFAY I LRREI KEPECRHLSRKFTWAYGVPVHSSLYDLSCVDTYENNSVLE I IAYSSETPN 420
SV           VFAY I LRREI KEPECRHLSRKFTWAYGVPVHSSLYDLSCVDTYENNSVLE I IAYSSETPN 420
*****

IR NewTRPV1  RHDMLLVEPLNRRLLQDKWDRFVKKR IFYFNFLMYTAYLVVFTIAAY YRPVKGKPPFPLEHS 480
SV           RHDMLLVEPLNRRLLQDKWDRFVKKR IFYFNFLMYTAYLVVFTIAAY YRPVKGKPPFPLEHS 480
*****

IR NewTRPV1  KGAY LRIAGE IITVIGGIYFFIRGIQYFLQRRPSLKSFLIDS YSEVLFFIQSLFLLNAV V 540
SV           KGAY LRIAGE IITVIGGIYFFIR----- 503
*****

IR NewTRPV1  LYFLGMQEYVASLVICLSLSWVNMLY YTRGFQQMGIYSVMI EKMI LRDLLRFMFVYMVFL 600
SV           ----- 503

IR NewTRPV1  FGFAAALVTLIEDGDES KNSSSNEGNVSPWASGQVRRGICKGSQESYNNLYYTCLELFKF 660
SV           ----- 503

IR NewTRPV1  AIGMGDLEF TDNYRFKPIFILLLVVYVIMTY ILLLNLIALMGETVSKIAQESKSIWKLQ 720
SV           ----- G 504

IR NewTRPV1  RAITILDI EKSF LNSLRNVFRSGKPVLVG ITPDGKEDYRWC FRVDEVNWT TWNTNLGIIN 780
SV           RAITILDI EKSF LNSLRNVFRSGKPVLVG ITPDGKEDYRWC FRVDEVNWT TWNTNLGIIN 564
*****

IR NewTRPV1  EDPGECDG I KRTL SAVRPSRGKSWRNLPYVRDLNHRAKAETLQEEVDLNPELSTSEPD 840
SV           EDPGECDG I KRTL SAVRPSRVVLM----- 589
*****

IR NewTRPV1  DNTAQMAHLAKTV 853
SV           ----- 589

```

Fig. 5 inTRPV1 全長配列及びスプライス変異体配列のアライメント

inTRPV1 及びそのスプライス変異体のアミノ酸配列を用いてアライメントを行った (CLUSTALW, GenomeNet)。アンキリンリピートドメインを黒太字で示し、膜貫領域を網掛けで示した。

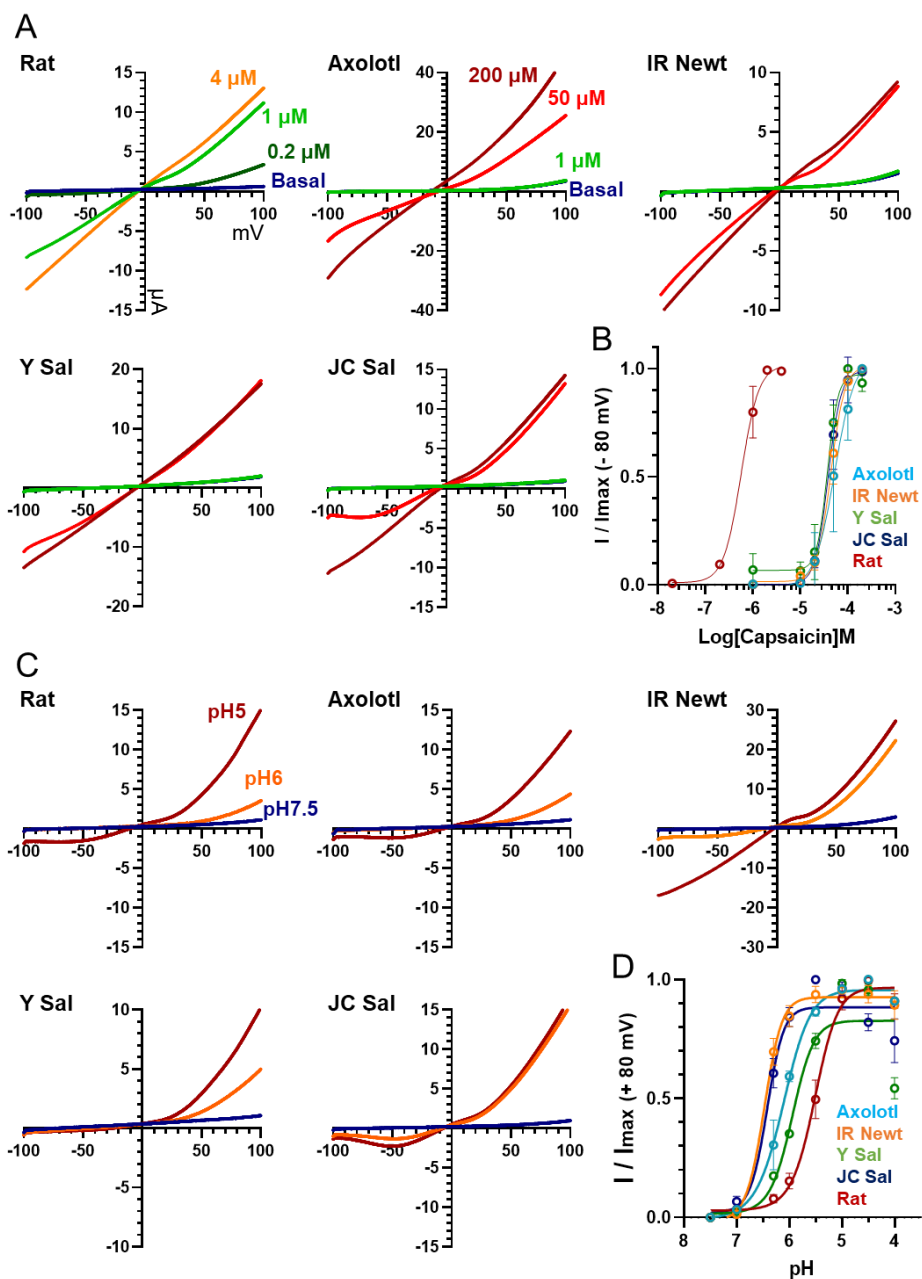


Fig. 6 有尾両生類 TRPV1 のカプサイシン及び酸応答

カエル卵母細胞に有尾両生類各種及びラットの TRPV1 を導入し、2 本電極膜電位固定法によりチャネル応答性を解析した。A 及び C にはそれぞれカプサイシン及び酸刺激を行った際の応答の IV カーブを示した。IV カーブは、同一細胞に対し各強度の刺激を与えた際の電流-電圧関係をプロットした。B 及び D には各遺伝子につき 4 個の卵母細胞の応答の平均と標準誤差及びシグモイド曲線を示した。電流値の取得は、カプサイシン：-80 mV, 酸：+80 mV 電圧条件で行った。

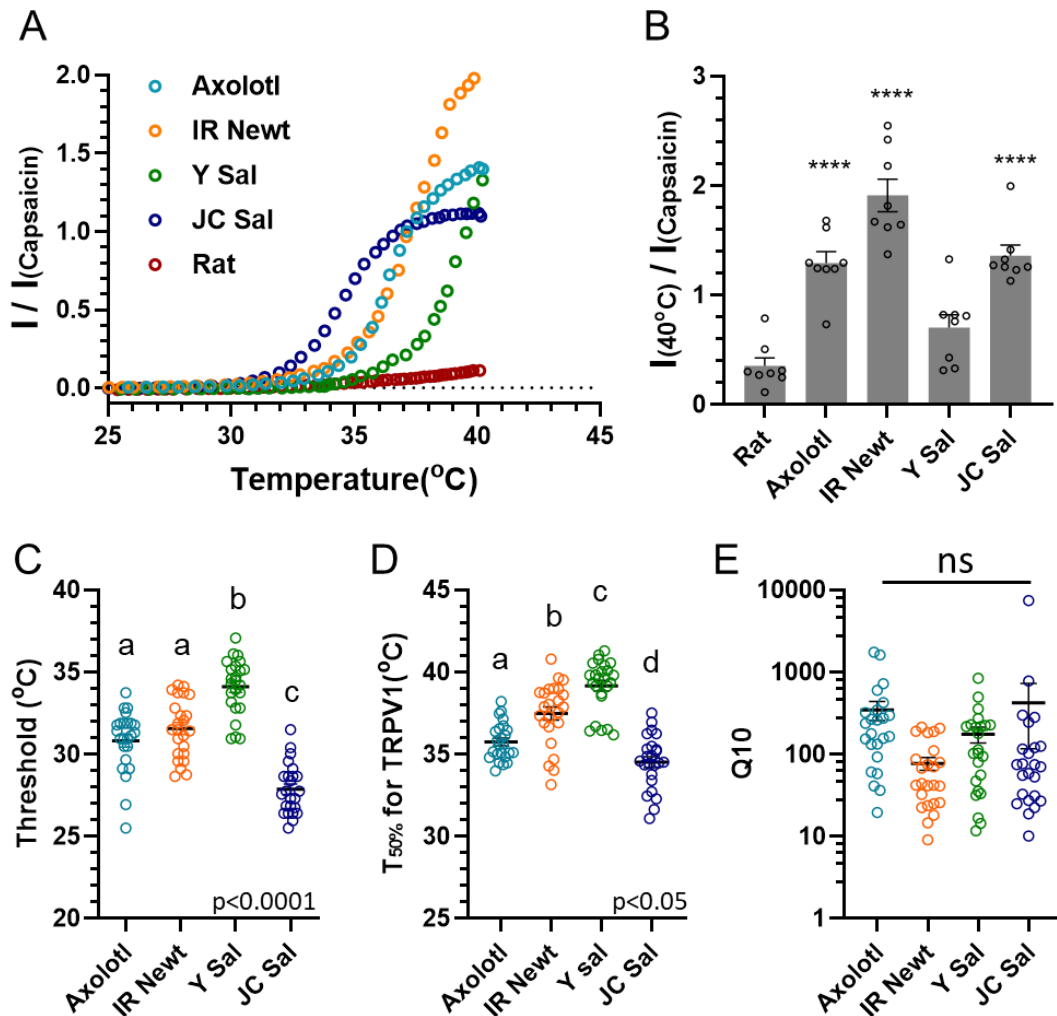


Fig. 7 有尾両生類 TRPV1 の高温応答性

カエル卵母細胞に有尾両生類各種もしくはラットの TRPV1 を導入し、2 本電極膜電位固定法により温度応答性を解析した (-80 mV)。A は各種 TRPV1 発現卵母細胞の、温度応答電流/カプサイシン電流をプロットし、B には 40°C 点での応答の平均及び標準誤差を棒グラフに示した ($n = 8$)。また、各細胞データを丸でプロットした。統計処理は、Dunnnett's Test によりラット TRPV1 に対する有尾両生類各種 TRPV1 の平均を比較した。有意差は $**** = p < 0.0001$ で示した。C-E には各有尾両生類 TRPV1 の開口温度閾値, 50% 開口温度及び Q10 を示した。横棒は各群の平均及び標準誤差を示し、各丸は細胞データを示す ($n = 24$)。統計処理は、Tukey's Test により各種 TRPV1 の平均の差を比較した。p 値が 0.05 を下回る群間で異なるアルファベットをグラフ上に記入した。

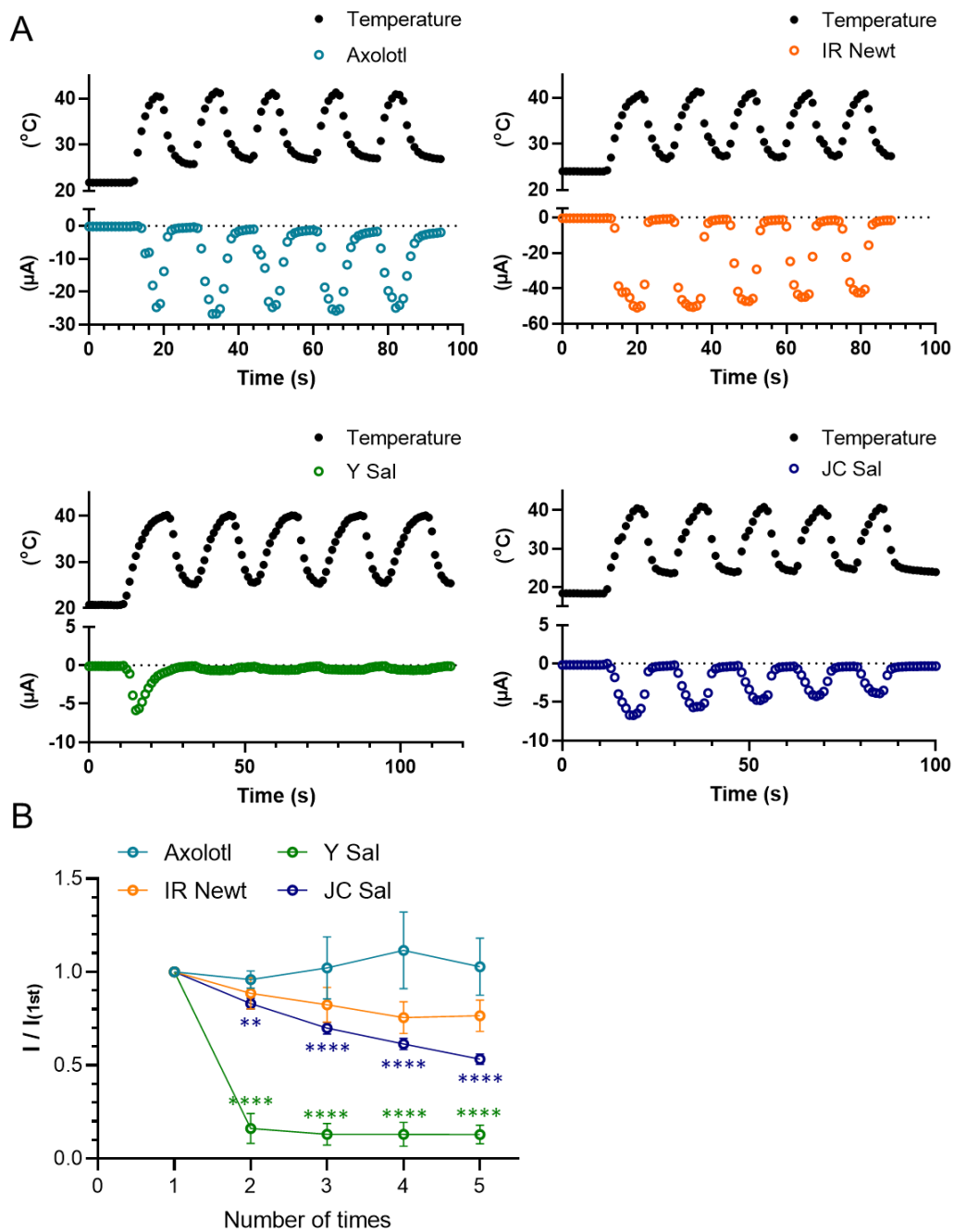


Fig. 8 有尾両生類 TRPV1 の高温脱感作

カエル卵母細胞に有尾両生類各種の TRPV1 を導入し、2 本電極膜電位固定法により、5 回の繰り返し高温刺激に対する応答を解析した (-80 mV)。A は各種 TRPV1 の代表トレースを示し、B は各種 TRPV1 の 1 回目の応答を 1 として標準化した平均応答を示す。統計処理は、Dunnett's Test により 1 回目の高温刺激に対する 2 回目以降の刺激の平均を比較した。有意差は** = $p < 0.01$, **** = $p < 0.0001$ で示した。

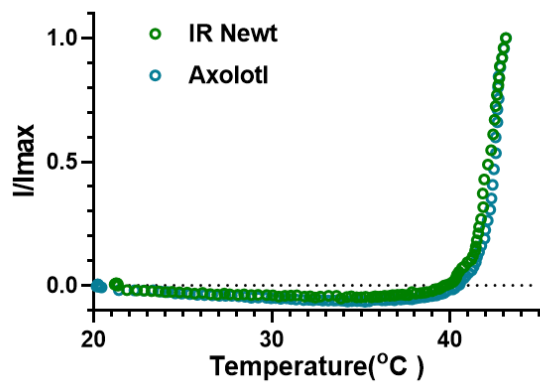


Fig. 9 イベリアトゲイモリ及びアホロートル TRPA1 の高温応答性

カエル卵母細胞にイベリアトゲイモリもしくはアホロートル TRPA1 を導入し、2 本電極膜電位固定法により温度応答性を解析した(+40 mV)。応答は最大電流で標準化し、緑は inTRPA1, 青は axTRPA1 の温度応答を示す。

	rTRPV1	axTRPV1	inTRPV1	ysTRPV1	jcTRPV1
Capsaicin(μ M)	0.86 ± 0.12	53.17 ± 7.85	43.53 ± 2.09	38.33 ± 2.32	35.73 ± 2.41
pH	5.52 ± 0.04	6.12 ± 0.04	6.48 ± 0.07	5.94 ± 0.08	6.43 ± 0.09

Table. 1 各種 TRPV1 の化学応答における 50%開口濃度

	axTRPV1	inTRPV1	ysTRPV1	jcTRPV1
Threshold($^{\circ}$ C)	30.91 ± 0.34	31.57 ± 0.36	34.11 ± 0.35	27.87 ± 0.31
T _{50%}	35.75 ± 0.23	37.48 ± 0.39	39.17 ± 0.32	34.52 ± 0.34
Q10	347.38 ± 91.00	77.26 ± 13.79	175.50 ± 38.08	423.50 ± 306.74

Table. 2 各種 TRPV1 の温度応答における各種値

第2章

有尾両生類 TRPV1 で見られる低い高温活性化閾値の獲得メカニズムの検討

I. 緒言

四肢動物が持つ TRPV1 は、約 40°C という閾値を持つ高温センサーとして機能する。この開口閾値の存在により、我々は 37°C 前後といった体温程度の非侵害刺激では痛みを感じることなく、40°C を超える侵害高温に晒された際にのみ痛みを誘導し、組織の損傷から身を守ることが可能となる。TRPV1 が持つ温度応答性の分子基盤は世界中で盛んに研究されており、過去の報告ではアラニンスキャンやチャネル一部領域の切除、他のチャネルとのキメラ実験により、膜近位アンキリンリピートドメイン (ARD) 及びポアドメイン、そして C 末端が TRPV1 の活性化温度閾値の制御領域として報告されている [6-10, 29-32]。一方で、アラニンへの置換やチャネル一部領域の切除は開口温度を変化させると同時に、カプサイシン応答性といった他の刺激に対する感受性を同時に変化させる場合が多く、特定した部位が純粋な温度センサードメインなのか、単にチャネルのゲーティングに重要なドメインなのか議論するのが困難であった。また、温度感受性が異なる他のチャネルとのキメラ実験は、相同性の低さから機能不全チャネルを生み出すことが多く、責任部位をアミノ酸レベルまで絞り込むことが困難である。一方で、特定の刺激への感受性が異なる TRPV1 間での比較は、切除による影響や相同性の低さによる絞り込みの困難さといった問題を解決できる可能性がある。実際に、カプサイシンの結合サイトは、ニワトリやツメガエルといったカプサイシン応答性が低い TRPV1 と、カプサイシン応答性が高いげっ歯類やヒトの TRPV1 との比較により明らかにされている [11-13]。そのため、温度応答性が大きく異なる TRPV1 を研究することは、温度応答性の分子基盤の解明に非常に有用であると考えられる。しかし、過去に報告された四肢動物の TRPV1 は、いずれも約 40°C の開口閾値を持つため、比較による開口閾値責任部位の探索が困難であった。本研究の 1 章で明らかにした有尾両生類の TRPV1 の開口温度閾値は約 30°C と、過去に報告された四肢動物の TRPV1 と大きく離れており、動物種間での TRPV1 との比較により温度センサードメインの発見に繋がることが期待される。そこで本章では、31°C から開口する axTRPV1 と 43°C から開口する rTRPV1 の 2 つを比較することで、TRPV1 の開口温度閾値の決定メカニズムを検討した。

II 材料と方法

1. 材料

KOD One [TOYOBO]

KOD Plus Mutagenesis Kit [TOYOBO]

Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit [Invitrogen]

BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit [Applied Biosystems]

Pure Link™ HiPure plasmid Midiprep kit [Invitrogen]

Go Taq Green Master Mix [Promega]

mMESSAGE mMACHINE Kit [Invitrogen]

Collagenase Type I [Wako]

Dimethyl sulfoxide (DMSO) [Sigma-Aldrich]

Capsaicin [Wako]

RNA Easy Measurement N [DynaMarker]

Gene Ladder Fast II [ニッポン・ジーン]

DNA gel Extraction キット [Millipore]

DNA Ligation Kit[TaKaRa]

pQE30 vector [Qiagen]

Ni-NTA Agarose [QIAGEN]

NAP-25 カラム[Amersham Biosciences]

SYPRO Orange [ThermoFisher]

2. キメラチャネル作成

キメラチャネルの作成のため、各種 TRPV1 断片を PCR により増幅した。増幅産物を DNA gel Extraction キット [Millipore]により精製し、オーバーラップ PCR により各断片を結合した。その際、両端に XbaI サイトを付加したプライマーを用いることで、翻訳領域の両端に XbaI サイトを付加した。PCR 産物は TOPO Vector [Invitrogen]へサブクローニングし、シーケンスにより PCR エラーをチェックした。変異が無いことが確認されたクローンについて、XbaI 処理によりキメラ配列を切断し、ゲル切り出しにより精製した。その後、DNA Ligation Kit [TaKaRa]を用いたライゲーションにより pGEMHE へクローニングした。

3. 点変異体作成

点変異を導入したプライマーを用いたインバース PCR により、発現ベクターごと目的配列を増幅し、DpnI 処理により鋳型プラスミドを消化した。その後、T4 Polynucleotide Kinase により末端のリン酸化を行うとともに増幅産物のセルフライゲーションを行った。ライゲーション産物を DH5 α へ形質転換し、いくつかのクローンについてシーケンスによる配列確認を行った。目的の点変異の導入が確認されたクローンについて、電気生理解析を行った。

4. 分子モデリング

N 末構造を伸長した axTRPV1 構造モデルについては、TRPV3 の全長クライオ電子顕微鏡像 (pdbid:7MIK) を用いてモデリングを行い、自由エネルギー変化の算出に用いた rTRPV1 及び axTRPV1 の構造モデルは、rTRPV1 の全長クライオ電子顕微鏡像 (pdbID:7LP9)を用いてモデリングした [33, 34]。構造モデルは MODELLER により作成した [35]。作成したモデルは PHENIX プログラムにより精密化され、モデルの品質は MOLPROBITY により評価した [36, 37]。点変異体の自由エネルギー変化 ($\Delta \Delta G$) は FOLDX プログラムにより評価した [38]。

以上の解析は、長浜バイオ大学、白井剛先生との共同研究である。

5. TRPV1 タンパク質発現及び精製

TRPV1-ARD 領域のタンパク質を得るため、過去の報告を参考に rTRPV1 の 100~362 残基のアミノ酸をコードする cDNA (野生型, R114Q, K140L) を pQE30 vector へクローニングした [39]。これにより、N 末に 6 個のヒスチジンが付加された組み換えタンパク質が発現された。タンパク質発現の際には、作成したプラスミドを JM109 株に形質転換し、0.1 mg/ml のアンピシリン [Wako] を含む LB 培地 [Nakalai] 中で 37°C 一晩振盪培養した。培養液 6 ml から遠心により菌体を回収し、新たにアンピシリン含有 LB 培地 250 ml 中で 2 時間培養した (WT: 25°C, R114Q: 17°C、K140L: 15°C)。その後、終濃度 1 mM (WT) もしくは 0.1 mM (R114Q, K140L) となるように Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside [nakalai] を添加し、24(WT)~48(R114Q, K140L) 時間振盪培養した。菌体を遠心により回収し、1 mM Dithiothreitol, 300 mM NaCl, 50 mM TrisHCl (pH8) を含む抽出バッファに懸濁した。1 分間の超音波処理により細胞を破碎し、水溶性画分を His タグ精製に使用した。破碎液の上清について、培養液 250 ml に対し 2 ml の Ni-NTA Agarose [QIAGEN] (抽出バッファにより平衡化) を添加し、4°C で 1 時間 His タグタンパク質を吸着した。その後、0~500 mM Imidazole [Wako] を含む 2.6 mL の抽出バッファにより溶出した。溶出タンパク質は、SDS ゲル電気泳動で純度を検定した (Fig. 17)。目的タンパクは 50~200 mM imidazole 濃度で多く溶出した。100 mM 及び 200 mM imidazole 溶出区分について、50 mM TrisHCl (pH8) で平衡化した NAP-25 カラム [Amersham Biosciences] を用いて脱塩し、使用まで -80°C で保存した。

6. サーマルシフトアッセイ

温度の上昇によるタンパク質高次構造の変性温度を測定するため、SYPRO Orange [ThermoFisher] を用いたサーマルシフトアッセイを行った。各サンプルは 5×SYPRO ORANGE を含む 50 mM TrisHCl (pH8) で調製した。リアルタイム PCR 用 96 well プレートを使用し、各 well あたり 20 μ l の液量で測定を行った。測定には Mini Opticon リアルタイム PCR システム [BioRad] の SBG1 条件を使用し、0.5°C/10 sec の温度上昇率で 10°C から 95°C までのデータを取得した。その後、20°C から 40°C の温度範囲について最大蛍光変化量を 1 として標準化した蛍光変化量を求め、Prism9 を用いてシグモイド曲線へのフィッティング及び T_M 値 (50% 蛍光変化温度) の算出を行った。

7. 2本電極膜電位固定法

2本電極膜電位固定法については、1章と同様の方法で行った。

8. ホールセルパッチクランプ測定

各種 TRPV1 チャンネル及びキメラは、蛍光タンパク質 (Venus) のコンストラクトとともに lipofectamine2000 [ThermoFisher]により HEK293T 細胞へトランスフェクションされた。24~72 時間の培養の後、蛍光を示す細胞に対しホールセルパッチクランプ実験を行った。細胞は、140 mM NaCl, 4 mM KCl, 0.3 mM MgCl₂, 10 mM HEPES (pH7.4) から成るバス液中で測定した。ガラス電極は 130 mM KCl, 5 mM Na₂-ATP, 3 mM EGTA, 4 mM MgCl₂, 0.3 mM GTP, 10 mM HEPES (pH7.4) から成る塩溶液で満たした。電圧条件は -20 mV の固定電圧化で -80 mV:100 ms, +40 mV:100 ms のステップパルスで行った。閾値の算出のために、-80 mV 電圧下での電流データを用いて Origin 2016 ソフトウェア [Light Store]を用いてアレニウスプロットを作成した。以上の解析は、生理学研究所の久保義弘先生及び立山充博先生との共同研究である。

9. 統計処理

データの統計処理及びグラフ作成は GraphPad Prism9 [MDF]を使用し、グラフは平均及び標準誤差 (SEM) で示した。カプサイシン標準化した高温応答電流の比較には、One-way ANOVA の後 Dunnett's Test によりコントロール群と他の群の平均の差を検定した。他のデータについては、One-way ANOVA の後 Tukey's Test により各群の平均の差を検定した。電気生理解析により測定した各点変異体の開口温度閾値の平均と FoldX により算出した $\Delta \Delta G$ の相関については、Prism9 を用いて Pearson 相関分析により評価した。

III. 結果

1. axTRPV1 と rTRPV1 の比較による開口温度決定の責任部位の探索

有尾両生類の TRPV1 が持つ低い高温活性化閾値の分子メカニズムにアプローチするべく、まずは責任部位の同定を試みた。31°Cから開口する axTRPV1 と 43°Cから開口する rTRPV1 の間で前半後半キメラチャンネルを作成し、開口温度を切り替える責任部位がチャンネルの前半部、後半部どちらに存在するのか検討した (Fig. 10A)。その結果、rTRPV1 の前半部を axTRPV1 に置換した AR キメラは、axTRPV1 と同様の高温応答性を示した (Fig. 10B)。この結果は、axTRPV1 の低い開口温度閾値が、チャンネル前半領域に由来することを示す。更なる絞り込みを行うため、rTRPV1 をベースにチャンネル前半領域を 5 分割し、一部を axTRPV1 に挿げ替えたキメラチャンネル (ARAC1-5) を作成し機能解析を行った。その結果、チャンネル N 末端から ARD1 迄を置換されたキメラ (ARAC1) について 40°C以下の温度で高温応答が見られた (Fig. 10C-D)。その他の領域を置換されたキメラ (ARAC1-4) は 40°C以下の温度に対し応答しなかった (Fig. 10C-D)。カエル卵母細胞発現系は 45°C辺りから内在性の高温応答が生じるため、40°C以上の開口温度閾値を持つ rTRPV1 型の高温応答を捉えることが困難である。そこで、哺乳類細胞発現系を用いたパッチクランプ法により N 末交換キメラの高温応答性を解析した。パッチクランプ実験においても、axTRPV1 は約 30°Cから開口し、その閾値は $31.47 \pm 1.28^\circ\text{C}$ であった (Fig. 10E-F)。また、rTRPV1 の開口温度は $40.81 \pm 1.68^\circ\text{C}$ であった (Fig. 10E-F)。更に、N 末端から ARD1 迄の領域の交換により、rTRPV1 の開口温度は $28.00 \pm 0.93^\circ\text{C}$ (ARAC1) まで低下し、逆に axTRPV1 の開口温度は $41.56 \pm 0.90^\circ\text{C}$ (RAAC1) まで上昇した (Fig. 10E-F)。これらの結果は、axTRPV1 と rTRPV1 の開口温度の違いが、N 末端から ARD1 領域までの領域により生じていることを示す。

2. 点変異解析による責任アミノ酸の探索

開口温度決定部位のアミノ酸レベルへの絞り込みを試みた (Fig. 11A)。rTRPV1 の N 末端から ARD1 迄の配列を更に分割し、axTRPV1 と交換したキメラ (ARNT1-5) について解析した所、ARD1 に相当する 40 アミノ酸領域を置換されたキメラ (ARNT5) のみ、40°C以下の温度で高温応答が見られた (Fig. 11C, F)。この結果は、ARD1 領域が

axTRPV1 型温度応答の責任部位であることを示す。また、この 40 アミノ酸領域を更に 2 分割したキメラ (ARNT6-7) は、不十分ながら両方ともに開口温度の低下を示した (Fig. 11D-E)。更に責任部位をアミノ酸レベルに絞り込むために、キメラ解析により明らかにした 40 アミノ酸のうち、有尾両生類の TRPV1 で性質が保存され、rTRPV1 では保存されていないアミノ酸を対象に (Fig. 11B)、点変異解析を行った。即ち、ARD1 の 40 アミノ酸の前半領域キメラ (ARNT6) 或いは後半領域キメラ (ARNT7) に、更にラット型へ戻す各種点変異を導入し、前半領域、後半領域の中でそれぞれどのアミノ酸座標が開口温度を低下させているのか解析した。ARNT6 への点変異導入については、128 座標を axTRPV1 型 (グルタミン) から rTRPV1 型 (アルギニン) に戻すことで温度応答性が rTRPV1 型へ変更された (Fig. 10D, G)。また、ARNT7 への点変異導入については、154 座標を axTRPV1 型 (ロイシン) から rTRPV1 型 (リシン) へ戻すことで rTRPV1 型の高温応答へ切り替わった (Fig. 11E, H)。ARNT6, 7 どちらにおいても、他の座標における rTRPV1 型への点変異は、キメラの高温応答性を変更しなかった (Fig. 11G-H)。以上の解析から、axTRPV1 の ARD1 の 40 アミノ酸の中で、前半では Q128、後半では L154 がアホロートル型の低い高温活性化閾値に重要であることが示唆された。そこで、この 2 アミノ酸だけで実際に TRPV1 の高温活性化閾値が決定されるのか検討を行った。即ち、野生型 axTRPV1 及び rTRPV1 について、128 座標 (rTRPV1 : 114 座標) 及び 154 座標 (rTRPV1 : 140 座標) の置換による、開口温度閾値への効果を検証した。カエル卵母細胞発現系を用いた 2 本電極膜電位固定法の結果は、Q128R や L154K の点変異は開口温度を上昇させたものの単独では不十分であり、2 重変異の導入が axTRPV1 の 40°C 以下の高温応答性を消失させ、逆に rTRPV1 には 40°C 以下の温度での高温応答性を付与することを明らかにした (Fig. 12A-D)。また、哺乳類培養細胞 HEK293T を用いたパッチクランプ実験により高温開口閾値を調査した所、2 重変異の導入により axTRPV1 の開口温度閾値は $31.90 \pm 0.52^\circ\text{C}$ から $38.73 \pm 1.17^\circ\text{C}$ まで上昇してラット型となり、逆に rTRPV1 では $43.18^\circ\text{C} \pm 1.80^\circ\text{C}$ から $33.57 \pm 0.57^\circ\text{C}$ まで低下しアホロートル型に変化した (Fig. 12E-G)。以上の様に、2 つの異なる発現系でほぼ同一の結論が再現された。これらの結果は、axTRPV1 と rTRPV1 間の開口温度の大きな差が、たった 2 つのアミノ酸により生じていることを示す。

また、これらの点変異が、TRPV1 の他のチャンネル機能に影響を与えることなく、温

度応答に特異的に作用しているのか検討するため、それぞれの 2 重変異体 (axTRPV1_Q128R/L154K, rTRPV1_R114Q/K140L) のカプサイシン応答性を解析し、野生型チャンネルと比較した。2 本電極膜電位固定法による解析の結果、両遺伝子ともに、2 重変異体のカプサイシン応答性は野生型と比べて変化していなかった (Fig. 13A-B)。この結果から、128Q 及び 154L 座標の変異が TRPV1 の温度応答性に特異的に作用していることが明らかになった。

3. ホモロジーモデリングにより予想された酸性アミノ酸との相互作用

前述の解析により TRPV1 の ARD1 領域内の特定の 2 アミノ酸により axTRPV1 の高温感受性が決定されることが明らかになった。これら 2 か所のアミノ酸変異がどのような仕組みで高温感受性を大きく変化させるのかを解明することは、TRPV1 の温度依存的開口メカニズムの解明に大きく寄与すると考えられる。以前の研究により、TRPV1 のホモログである TRPV3 において、開口時にチャンネルの N 端が折れ曲がるという大きな構造変化が起こることが報告されている [33]。一方で、タンパク質分子において、塩橋の増加は構造の熱安定性を向上させることが報告されている [40]。そして、本研究で点変異解析により明らかにした 2 か所の責任アミノ酸は、ともに塩基性アミノ酸へ置換することで開口温度を axTRPV1 型から rTRPV1 型へ上昇させている。これらのことから、rTRPV1 においては 2 か所のアミノ酸が塩基性アミノ酸へ置換することにより、近傍の酸性アミノ酸との塩橋を生じることでチャンネル N 末の伸びた構造を安定化させ、開口温度を上昇させている可能性が考えられた。そこで、TRPV3 の閉口状態での立体構造データ (pdbID : 7MIK) をもとに axTRPV1 のホモロジーモデルを作成し (Fig. 14A)、立体構造上で 2 か所の責任アミノ酸 (Q128, L154) の近傍に位置した酸性アミノ酸 4 か所についてそれぞれアラニンへの点変異導入 (アラニンスキャン) を行った。axTRPV1-Q128R/L154K に対するアラニンスキャンの結果、E164A 変異体において 2 重変異により上昇した開口温度の低下が確認された (Fig. 14B,C)。この座標は、Q128R との相互作用が期待される座標である。この変異が Q128 座標と特異的に相互作用し、開口温度を制御しているのか調査すべく、axTRPV1-Q128R 及び axTRPV1-L154K の単独変異体に対し E164A 変異を挿入し、開口温度の変化を解析した。E164 が Q128R 座標に特異的に相互作用しているのであれば、Q128R/E164A 変異のみ開口温

度が低下し、L154K/E164A 変異の場合には変化しないはずである。解析の結果、E164A 変異は Q128R 特異的ではなく、両方の変異体について開口温度を低下させた (Fig. 14D-H)。よって、「axTRPV1 の E164 は変異により R128 あるいは K154 と特異的に相互作用を獲得し、安定性を向上させることで高温感受性を変化させている」とは説明できなかった。

4. 構造の安定性と開口温度の関係の検討

最近、TRPV1 を加熱状態から瞬間凍結した状態でクライオ電子顕微鏡により撮影することで、高温開口状態と思われる TRPV1 の立体構造像が観測された [34]。この報告では、TRPV1 の熱開口には閉口状態→中間状態→開口状態へと構造が変化する開口までのモデルが提示されている。中間状態への推移では、N 末の ARD1-4 の構造が解けるとともに N 末全体が膜貫通領域側へ縮小しており、この状態からさらにイオンの通り道となるチャネルポアドメインが構造変化することでチャネルが開口する (Fig. 15)。この報告から、本研究で特定した 2 か所の変異は ARD1 の構造の安定性を変化させることで、閉口状態から中間状態へと推移する温度を変化させていることが予測された。構造の安定性とチャネル開口温度の関係性について明らかにするため、まずは報告された閉口時の立体構造 (pdbID : 7LP9) を元に axTRPV1 のホモロジーモデルを作成し、FoldX プログラムを用いて Q128 及び L154 座標が他のアミノ酸へ置換した際の自由エネルギー変化量 ($\Delta \Delta G$) を算出した (Fig. 16A)。すると図 11 で実験結果を示した axTRPV1 の Q128R、L154K 変異の際の $\Delta \Delta G$ はどちらも明らかな負の値を示し、変異により構造が安定化している可能性が示唆された。閉口構造の安定化は中間状態への構造変化を起し難くし、閾値の上昇に繋がるとされる。つまりこの結果は電気生理解析の結果と極めて良く整合することが分かった。そこで、幅広い $\Delta \Delta G$ の値をカバーするようにアミノ酸を選択し、各座標の点変異体を作成後、カエル卵母細胞発現系による電気生理解析によりそれぞれの開口温度閾値を測定した (Fig. 16B-C)。その後、算出された $\Delta \Delta G$ と実測した開口温度閾値について、相関関係の有無を評価した。その結果、Q128、L154 座標ともに $\Delta \Delta G$ と開口温度閾値に有意な負の相関関係が見られた (Fig. 16D-E)。それぞれの相関係数 (r) は Q128 で -0.57、L154 では -0.89 を示し、相関関係は L154 座標でより顕著であった。即ち、TRPV1 の ARD1 領域の 2 番目と 28 番目に

どのアミノ酸が入るかにより、恐らく N 端の温度依存的な構造変化（フレキシブル化）の容易さが変化する。それにより中間状態への遷移のハードルが変わることで開口温度閾値の変化、つまり温度感受性の変化に繋がっているというメカニズムが想定されることとなった。

次に、TRPV1 の ARD1 を含む N 末端部位タンパク質において、前述の 2 座標の点変異のみで、実際にタンパク質構造の熱安定性が変化するのか検討することにした。rTRPV1 の N 末端部タンパク質の生化学的特徴については、組み替えタンパク質（100-362 残基）を調製して解析した場合、TRPV1 の開口温度に比べて低い温度で構造変化が起こることが、CD スペクトル法とプロテインサーマルシフトアッセイにより示されていた [39]。そこで、蛍光色素によりタンパク質の熱安定性を測定するプロテインサーマルシフト法を用いて、点変異による構造の安定性変化が実際にタンパク質レベルで生じているのか解析した。SYPRO Orange は、タンパク質中の露出した疎水性残基に結合し蛍光を発する色素であり、温度の上昇による高次構造の解消を検出する（Fig. 18A）。精製した組み替えタンパク質である His タグ付加 rTRPV1-ARD（100-362 aa）及びその点変異体（R114Q, K140L）について温度の上昇による蛍光変化を計測したところ、全てのサンプルにおいて温度の上昇による蛍光ピークの発生が見られた（Fig. 17B）。野生型タンパク質における蛍光変化の T_M 値は $32.03 \pm 0.01^\circ\text{C}$ であり、この値は過去の報告と一致した [39]。一方で、点変異（R114Q, K140L）を導入したタンパク質において、野生型に比べ蛍光ピークが有意に低温側へシフトしていた（Fig. 18B）。それぞれの T_M 値は R114Q 変異体で 30.16 ± 0.02 、K140L 変異体で 28.04 ± 0.06 であった（Fig. 18C）。

この結果から、2 か所どちらの座標の点変異においても、実際にタンパク質レベルで温度依存的な N 端の安定性が明らかに減少することが判明した。そのため、この N 端の構造上の変化が、温度依存的な TRPV1 開口の次のステップへの遷移温度を変化させることで、温度感受性を変化させるものと考えられた（Fig. 19）。

IV. 考察

本項では、rTRPV1 との比較により、axTRPV1 の低い高温活性化閾値がどのような分子メカニズムにより獲得されているのか検討した。四肢動物が持つ TRPV1 の高温応答性については、過去にヒト、マウス、ラット、コウモリ、ウシ、モグラ、ニワトリ、カモノハシ、ツメガエルを対象に研究が行われた。その結果、これらの動物種の TRPV1 が 35-45°C の間で開口することが明らかにされている [5, 12, 13, 15, 21, 23]。また現在までに、TRPV1 の温度応答性を制御する領域として膜貫通領域およびその近傍の ARD3-6、そして C 末が知られている [6-10, 29-32]。一方で、TRPV1 の開口温度の種差が、どのような分子基盤によって獲得されているのかについてその詳細を検証した報告は少ない [31]。過去の研究では、40°C から開口するコウモリ TRPV1 と 43°C から開口するヒト TRPV1 との比較により、ポアドメインの細胞外領域に存在する 3 つアミノ酸置換により、開口温度閾値が 3°C 変化していることが明らかになっている。しかし、ポアドメインによる開口温度制御が四肢動物で広く採用される普遍的な制御メカニズムかについては明らかでなかった。本項で行ったキメラ及び点変異解析は、axTRPV1 の特徴的な高温応答性がチャンネル N 末の ARD1 領域に存在する 2 か所のアミノ酸 (Q128, L154) により獲得されていることを明らかにした。一方で、最近のクライオ電子顕微鏡像により TRPV1 の温度開口のスナップ写真が撮影されている [34]。この報告では、温度上昇により TRPV1 が開口に至るまでには中間状態が存在することが示唆されている。具体的には、温度の上昇により先ず初めに ARD1-4 領域の構造が解けるとともに ARD5-6 領域が膜貫通ドメイン側へ縮小し、その後近づいたドメイン間の相互作用によって膜貫通領域の構造変化が誘導されることでチャンネルが開口する (Fig. 14)。更に、タンパク質製剤 (抗体ミメティック) としてのアンキリンリピートタンパク質 (DARPs) における最新の研究では、DARPs の熱安定性が、単一のアミノ酸置換により 10°C 前後変化することが明らかにされた [41]。また、報告された「ARD の熱安定性を大きく変化させるアミノ酸座標」が、本研究で発見した「TRPV1 の開口温度を大きく変化させる 2 アミノ酸座標」と同様に、ARD1 上に存在する点は非常に興味深い。本項で実施した、電気生理学と構造生物学を組み合わせた実験は、ARD1 領域の構造安定性が、チャンネルの開口温度閾値に密接に関わっており、ARD1 構造の安定化が開口温

度の上昇を引き起こし、不安定化は開口温度の低下を引き起こすことを示唆した。この結果はクライオ電子顕微鏡による研究結果を支持するとともに、四肢動物が種特有に獲得している開口温度閾値が、開口モデルにおける中間状態へシフトする温度を変化させることで獲得されている可能性を示唆する。また、砂漠に生息し、高温耐性を示すジリスやラクダが持つ TRPV1 は高温活性化が抑制されており、その責任部位は ARD1 領域内のセリンからアスパラギン、更に ARD2 直後のグルタミンからグルタミン酸への変異であると報告されていた [14]。そこで、axTRPV1 で行ったのと同様に rTRPV1 モデルを用いてこれらの点変異に伴う $\Delta \Delta G$ の変化を算出した所、やはり負の値を示した (Fig. 20)。よって、構造が安定化してチャンネルは開口しにくくなることになり、報告された結果と良く一致した。一方で、128 Q や 154 L 座標の変異は同等の開口温度の変化を誘導するのに対し、 $\Delta \Delta G$ と開口温度の相関やサーマルシフトの変化は 154 L に対し 128 Q が小さかった。この結果は、立体構造データや、今回精製したタンパク質上に N 末 (~約 100 aa) が存在しないことに由来する可能性が考えられるが、Q128 座標における開口温度制御に、自由エネルギー変化とは異なるメカニズムが存在する可能性もある。現状で具体的なモデルは提示できないが、今後の検討が重要である。また、本項で axTRPV1 と rTRPV1 の比較により明らかにした開口温度閾値制御メカニズムが、axTRPV1-rTRPV1 間でのみ成立するのか、他の四肢動物を含めた普遍多岐なメカニズムであるのかについては、他の生物種の TRPV1 を含めた更なる検討が必要であり、それらについては第 3 章で記述する。

また、TRPV1 の応答性は、選択的スプライシングやリン酸化、他の分子との結合により調整されていることが知られており、これらは主に細胞内ドメインである N 末や C 末を標的としている [15, 42, 43, 44, 45]。例えば、選択的スプライシングによる N 末や C 末の欠如、PKC による C 末の一部のアミノ酸のリン酸化はチャンネルの感度を上昇させ、酸、温度、カプサイシンといった刺激に対し、より小さな刺激から応答するように調節する [15, 42, 43, 44]。逆に C 末への電位依存性カリウムチャンネル β サブユニット (KvB1) の結合は、他の刺激の感度を変えることなく開口温度閾値を高温側へシフトさせる [45]。一方で、これらの調節がどのような分子メカニズムにより引き起こされるのか、その詳細は明らかになっていない。しかし、少なくとも N 末や C 末の欠失は、細胞内領域の構造の安定性を著しく低下させると考えられ、逆にサブユニットとの結合

は安定性を向上させる可能性が考えられる。そのため、本項で明らかにした、N 末構造の安定性の調節によるチャンネル感度の調節は、これらの知見ともある程度整合すると思われる。

V. 图

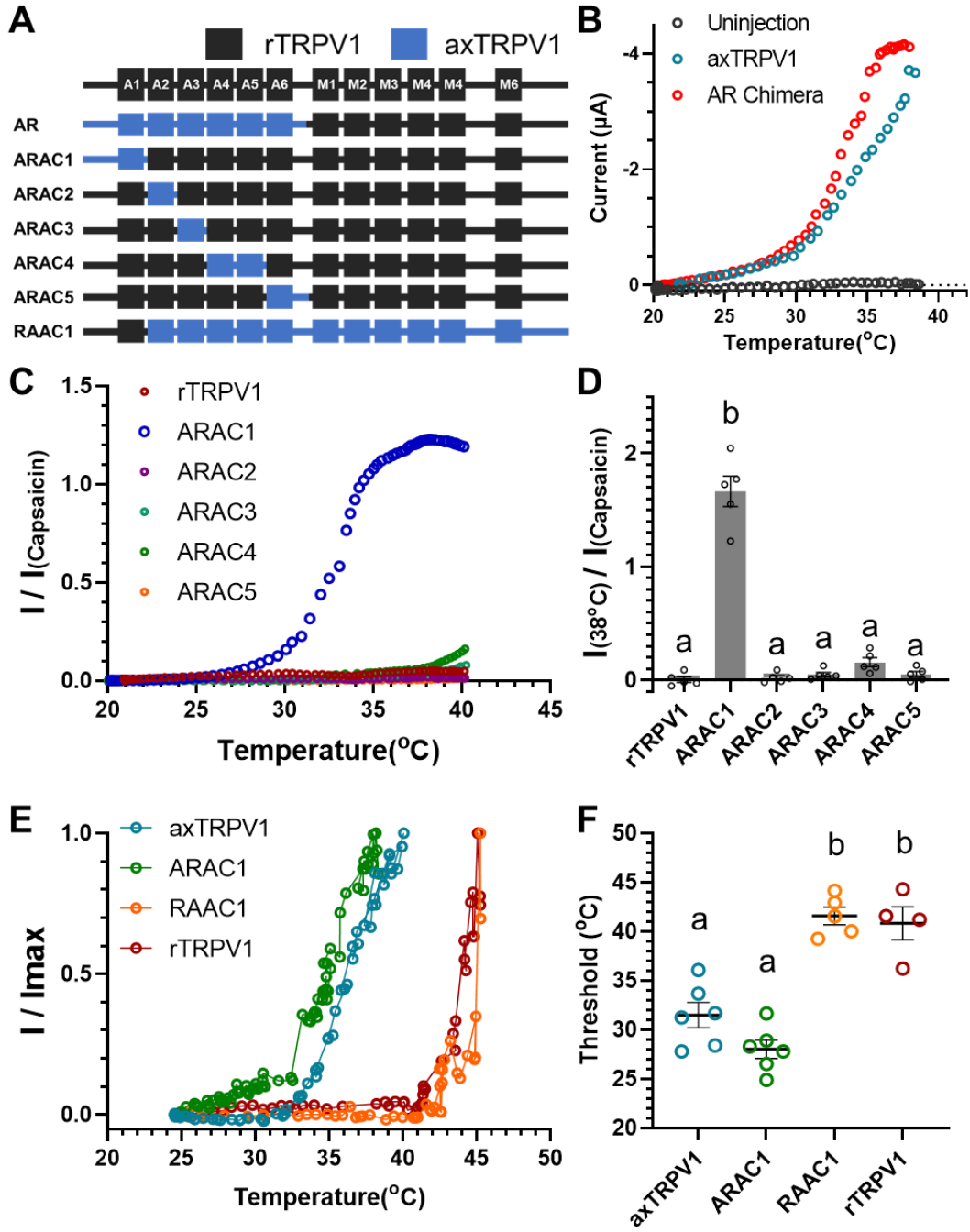


Fig. 10 キメラ解析による開口温度制御責任部位の探索

axTRPV1 と rTRPV1 間でキメラチャネルを作成し、電気生理解析により温度応答性を解析した。A は各種キメラの模式図を示す。B, C には、カエル卵母細胞発現系での 2 本電極膜電位固定法により解析した各種キメラにおける温度応答の代表トレース (-80 mV : 温度電流/カプサイシン電流) を示し、D には 38°C 応答電流/カプサイシン電流の平均及び標準誤差を示した (n = 5)。E-F は HEK293T 細胞に発現させた各種 N 末キメラをホールセルパッチクランプ法で解析した際の、標準化した電流のトレース (E) 及び開口温度閾値 (F) を示す (n: axTRPV1 = 6, ARAC1 = 6, RAAC1 = 5, rTRPV1 = 4)。統計処理は、Tukey's Test により各種キメラの平均の差を比較し、p 値が 0.05 を下回る群間で異なるアルファベットをグラフ上に記入した。

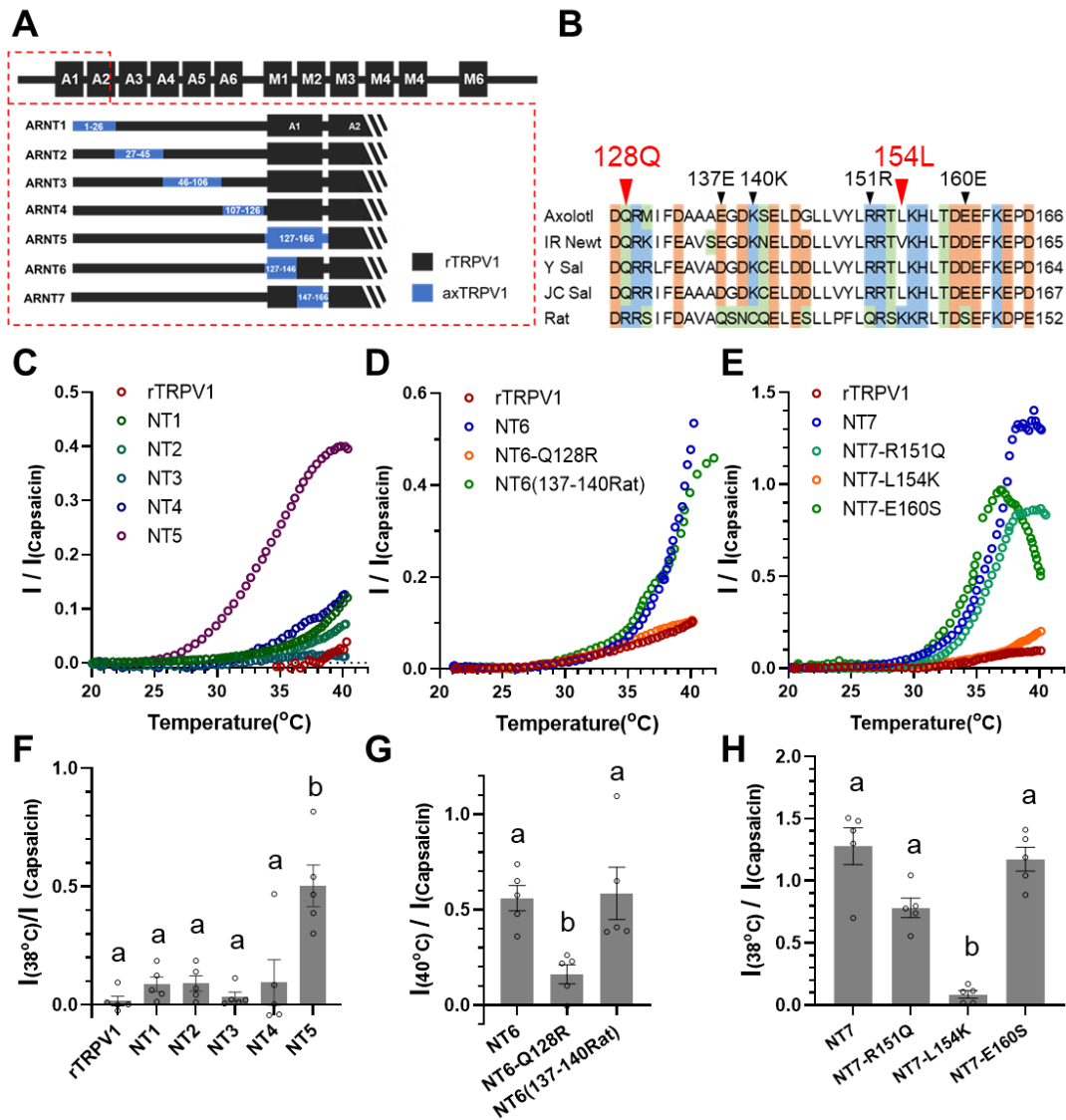


Fig.11 N末キメラ及び点変異解析による責任アミノ酸の探索

axTRPV1-rTRPV1間についてN末領域をさらに細分化したキメラ解析を行い、更に点変異解析により責任部位の絞り込みを行った。Aには各種キメラの模式図を示し、Bには各有尾両生類及びrTRPV1におけるARD1領域のアミノ酸配列を示す。C-Eはカエル卵母細胞発現系で解析した各種キメラ及びその点変異体の代表トレース（温度電流/カプサイシン電流）を示し、F-Gにはカプサイシン電流で標準化した38°Cもしくは40°C地点における電流の平均及び標準誤差を示した（ $n = 5$ ）。統計処理は、Tukey's Testにより各種キメラ及び点変異体の平均の差を比較した。p値が0.05を下回る群間で異なるアルファベットをグラフ上に記入した

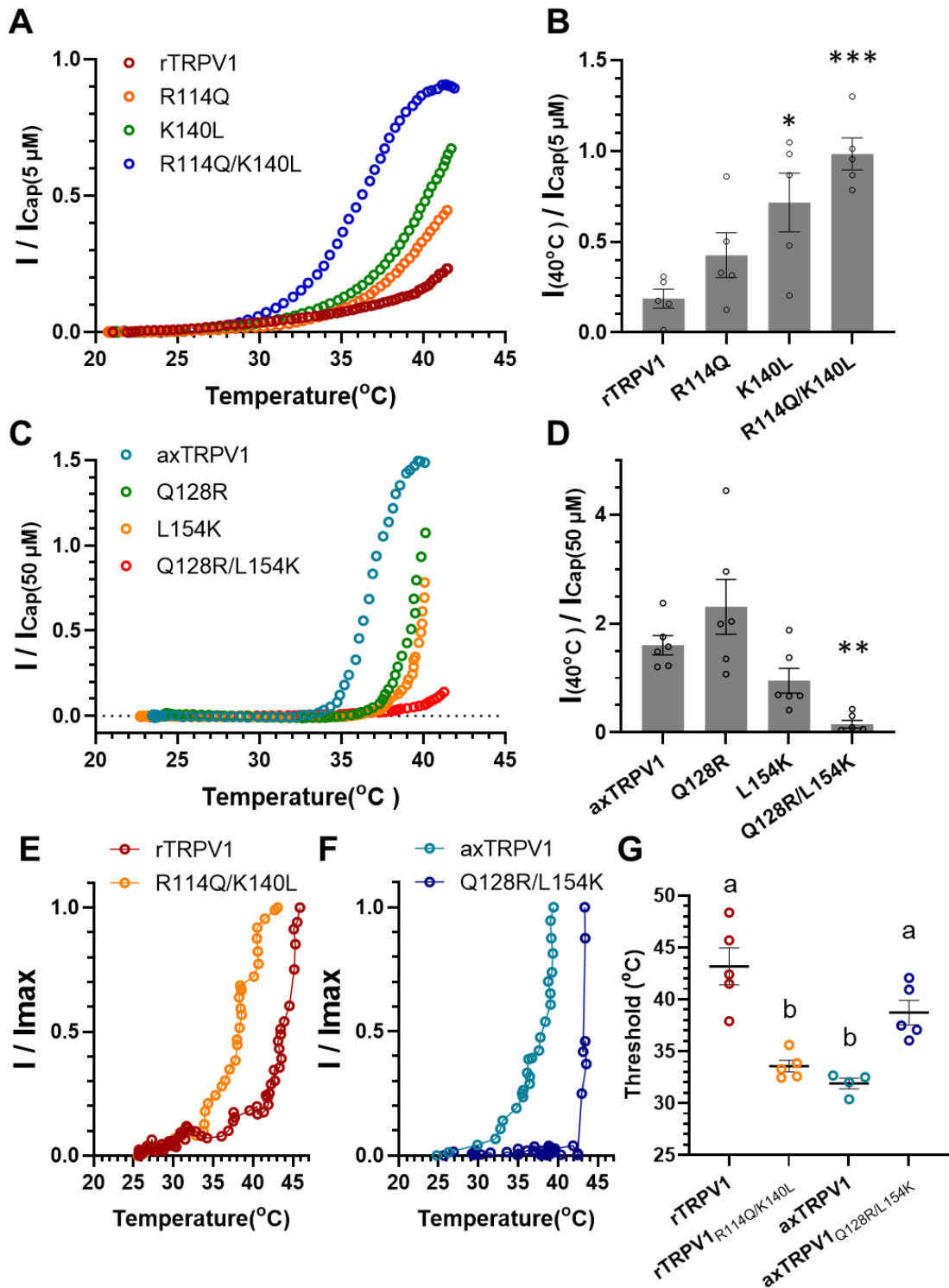


Fig. 12 特定した責任アミノ酸の野生型チャンネルに対する効果の検証

キメラ解析により明らかにした 2 か所の責任アミノ酸について、axTRPV1 及び rTRPV1 野生型チャンネルに同様の点変異を導入し、その温度応答性の変化を検討した。A-B には axTRPV1、C-D には rTRPV1 の点変異体の温度応答について卵母細胞発現系を用いた 2 本電極膜電位固定法により測定した際の代表トレース (A, C) と 40°C 地点での温度電流/カプサイシン電流の平均及び標準誤差 (B, D) を示す (n = 5)。E-G には HEK293T 細胞を用いたパッチクランプ法により測定した各種野生型及び点変異チャンネルの代表トレース (E-F) と開口温度の平均及び標準誤差 (G) を示す (n: rTRPV1 = 4, rTRPV1-mutation = 5, axTRPV1 = 4, axTRPV1-mutation = 5)。統計処理は、Dunnett's test (B, D) もしくは Tukey's Test (G) により各種点変異体の平均の差を比較した。有意差は Dunnett's test の際には * = p<0.05, ** = p<0.01, *** = p<0.001 で示し、Tukey's test の際には p 値が 0.05 を下回る群間で異なるアルファベットをグラフ上に記入した

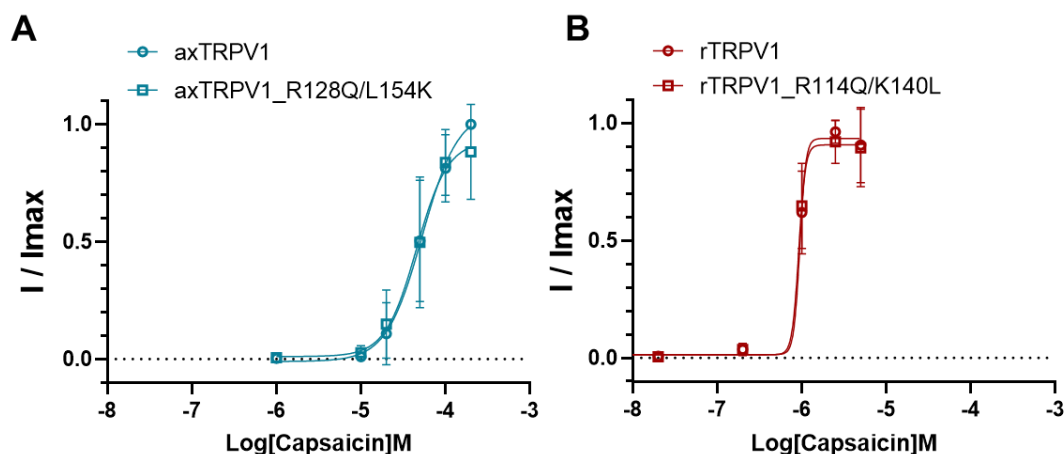


Fig. 13 axTRPV1, rTRPV1_2 重変異体のカプサイシン応答性

カエル卵母細胞に axTRPV1, rTRPV1 の 2 重変異体を導入し、2 本電極膜電位固定法によりカプサイシン応答性を解析した (n = 4)。A には axTRPV1 における野生型と 2 重変異体 (Q128R/L154K) を、B には rTRPV1 における野生型と 2 重変異体 (R114Q/K140L) のカプサイシン応答の濃度依存を示した。

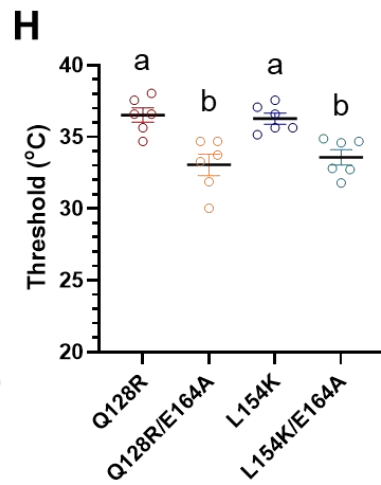
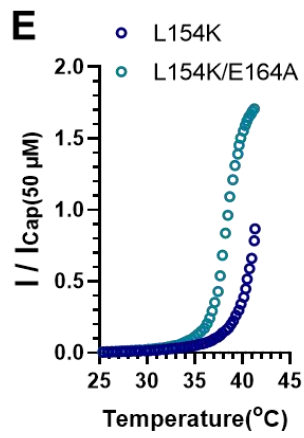
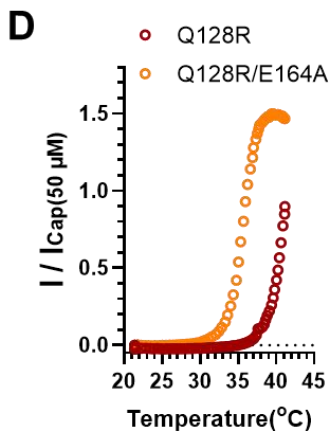
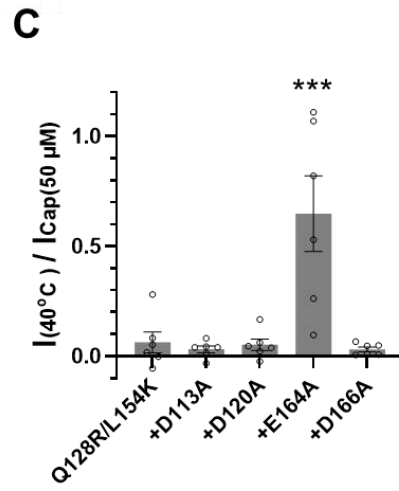
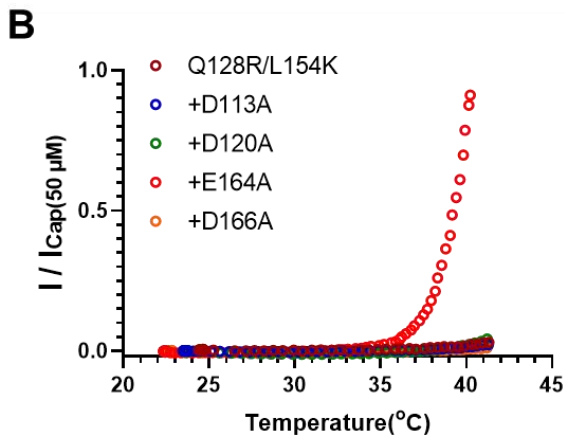
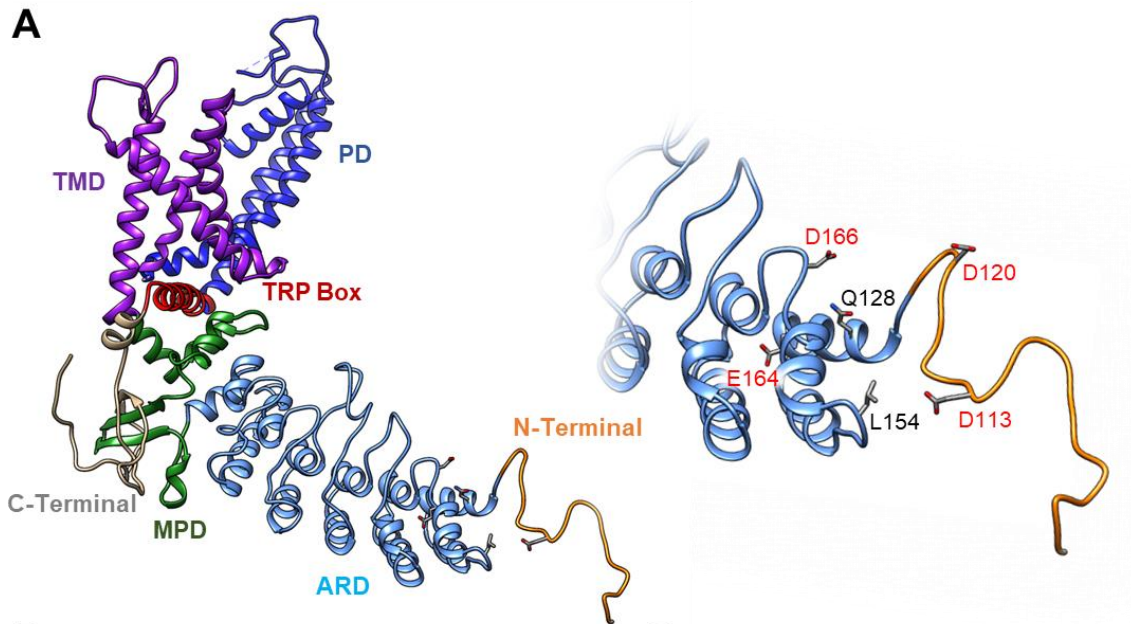


Fig. 14 Q128, L154 の相互座用アミノ酸の探索

文献 33 を参考に、TRPV1 の閉口状態で Q128, L154 座標と相互作用すると思われる、それぞれの座標の近傍に位置する酸性アミノ酸の探索を行った。A には rTRPV3 の構造情報を元にホモロジーモデリングにより作成した axTRPV1 構造モデル及び Q128, L154 座標の近傍に位置する 4 つの酸性アミノ酸を示す。B-C には卵母細胞実験系による解析結果を示しており、axTRPV1 の 2 重変異体 (Q128R/L154K) に対し、追加で酸性アミノ酸をアラニンへ置換した際の代表トレース (B) と平均及び標準誤差 (C) を示す (n = 5)。D-H には、axTRPV1 単体変異体 (Q128R, L154K) に対し E164A 変異を導入した際の温度応答の代表トレース (D-E) と開口温度の平均及び標準誤差 (F) を示す (n = 5)。有意差は Dunnett's test の際には *** = p<0.001 で示し、Tukey's test の際には p 値が 0.05 を下回る群間で異なるアルファベットをグラフ上に記入した

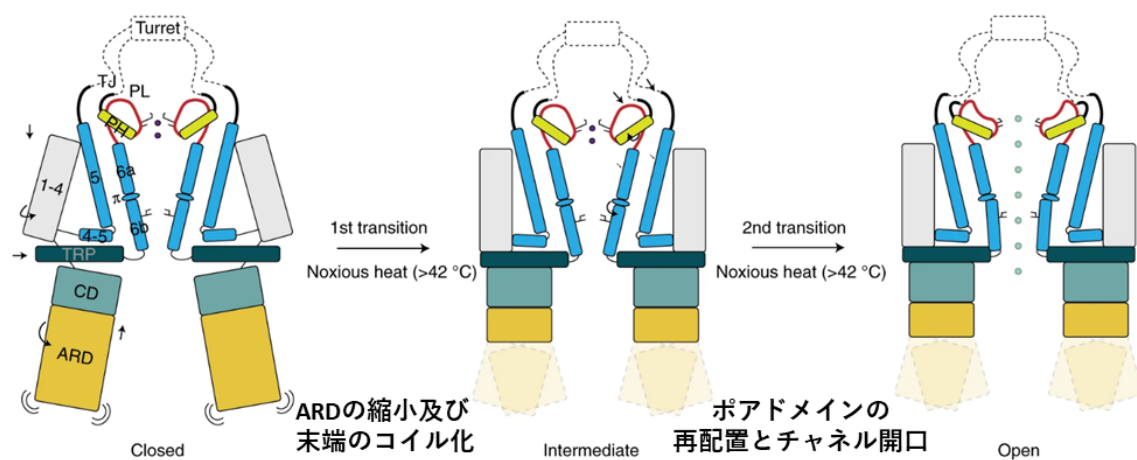


Fig. 15 クライオ電子顕微鏡像より提供された TRPV1 温度開口までの構造変化

クライオ電子顕微鏡による調査から推測された、TRPV1 が温度上昇により開口するまでの構造変化モデルを示す。図は文献 34 より引用した。

A

Q128 $\Delta\Delta G$		L154 $\Delta\Delta G$	
P	-1.01	K	-1.53
M	-0.81	H	-1.14
R	-0.70	R	-1.04
L	-0.56	G	-0.64
I	-0.33	N	-0.61
K	-0.27	Q	-0.59
F	-0.19	F	-0.31
A	-0.13	C	-0.28
Q	0.00	Y	-0.27
Y	0.01	S	-0.25
N	0.04	L	0.00
G	0.08	A	0.01
H	0.10	D	0.04
S	0.34	M	0.08
C	0.36	E	0.09
V	0.39	T	0.28
T	0.50	V	0.78
W	0.57	W	1.84
E	0.66	I	2.01
D	1.14	P	5.72

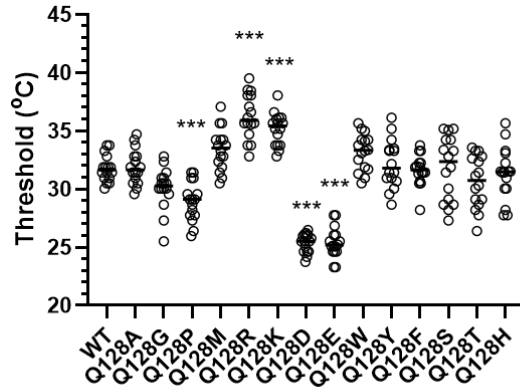
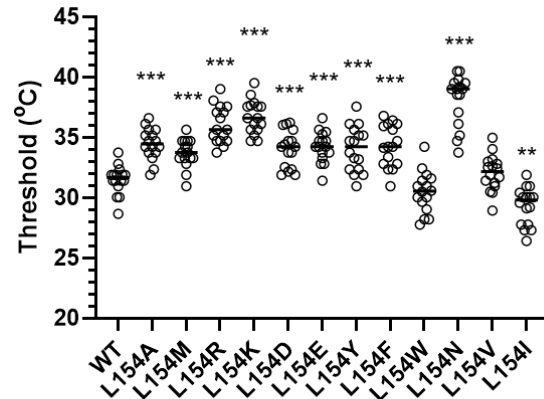
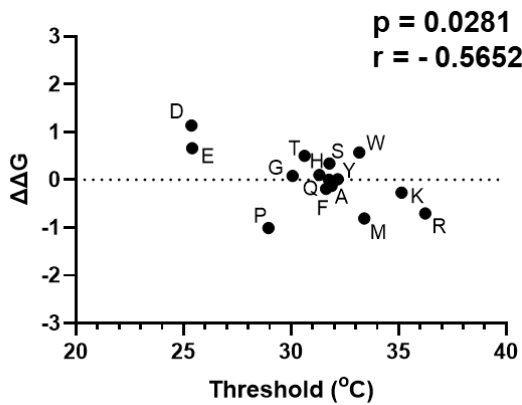
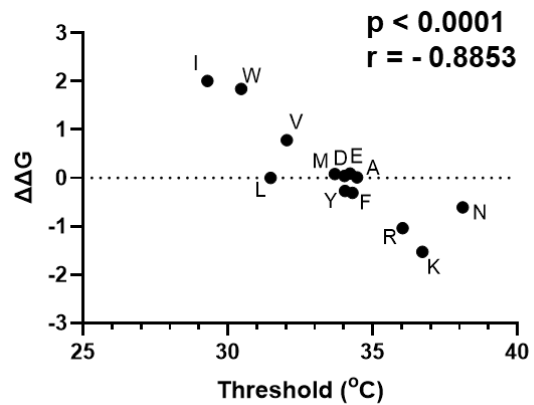
B**Q128 Mutation****C****L154 Mutation****D****Q128 Mutation****E****L154 Mutation**

Fig. 16 axTRPV1 開口温度と構造安定性の関係

axTRPV1 の開口温度を制御する分子基盤を明らかにするべく、構造の安定性と開口温度の関係性を調査した。A には FoldX プログラムにより算出した axTRPV1 各種点変異体の自由エネルギー変化 ($\Delta \Delta G$) を示し、オレンジはラット型アミノ酸を示す。B-C には 2 本電極膜電位固定法により測定した各種点変異体の開口温度の平均及び標準誤差を示した ($n = 16$)。D-E には、点変異体の算出した $\Delta \Delta G$ と実際に計測した開口温度閾値の相関関係を示す。統計処理は、Dunnett's test (B)より野生型 axTRPV1 に対する各種点変異体の平均の差を比較した。有意差は $* = p < 0.05$, $** = p < 0.01$, $*** = p < 0.001$ で示した。各種点変異体の開口温度閾値の平均と $\Delta \Delta G$ の相関は、Prism9 を用いて Pearson 相関分析により評価した。

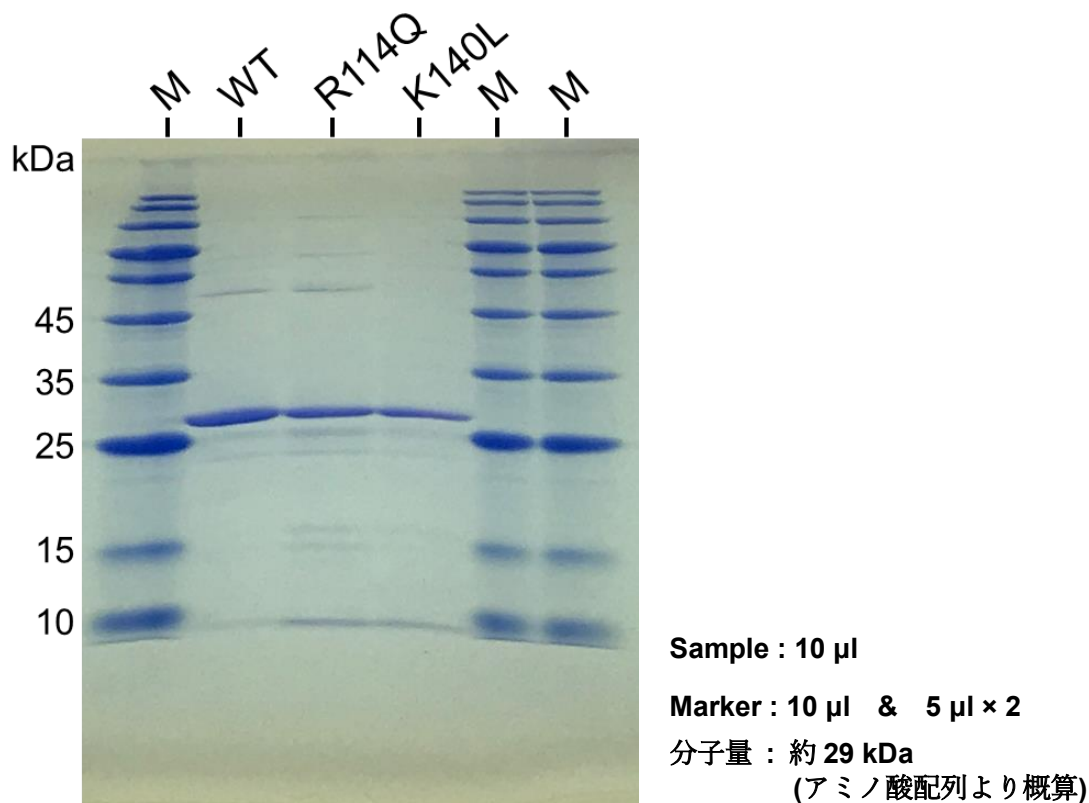


Fig.17 精製した rTRPV1-ARD 組み換えタンパク質の電気泳動写真

精製及び脱塩したタンパク質に対し SDS ゲル電気泳動を行い、クマシーブルー染色 (ラピッドステイン CBB キット [Nakalai tesque])によりタンパク質を検出した。アプライしたサンプルは、左からマーカー (ExcelBand All Blue Regular Range Protein Marker [SMOBIO])、野生型、R114Q、K140L、そしてマーカー \times 2 である。

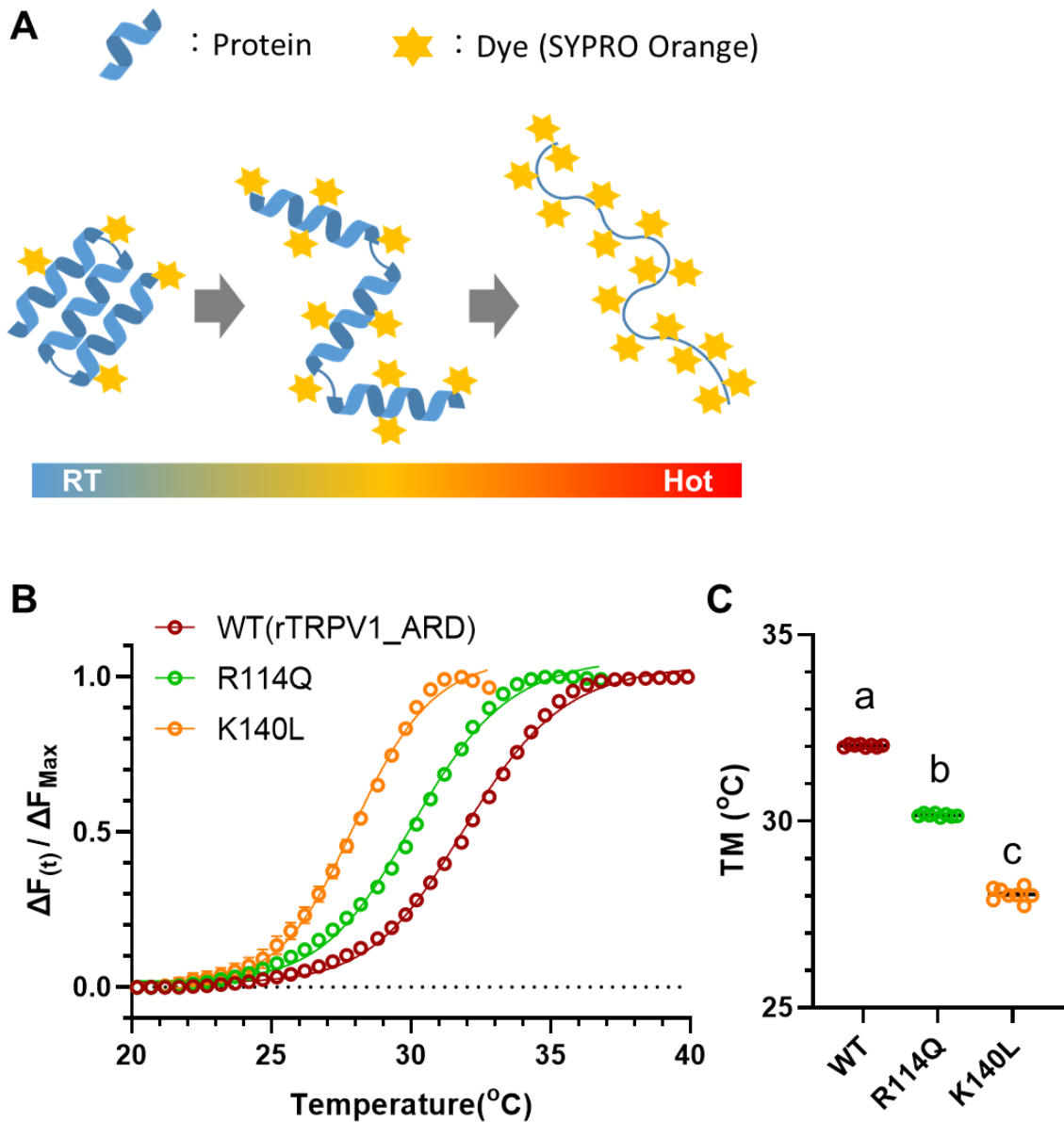


Fig. 18 rTRPV1-ARD タンパク質のサーマルシフトアッセイ

SYPRO Orange を使用したサーマルシフトアッセイにより、rTRPV1ARD 組み換えタンパク質の点変異体の熱安定性を評価した。A にはサーマルシフトアッセイの原理を示した。B は rTRPV1 野生型 ARD 及び各点変異体 ARD タンパク質の各温度における蛍光変化の平均及び標準誤差を示しており、C は各種 ARD タンパク質の 50% 蛍光変化温度 (TM) を示す (n = 8)。統計処理は、Tukey's Test により各種点変異体の平均の差を比較した。有意差については、p 値が 0.05 を下回る群間で異なるアルファベットをグラフ上に記入した。

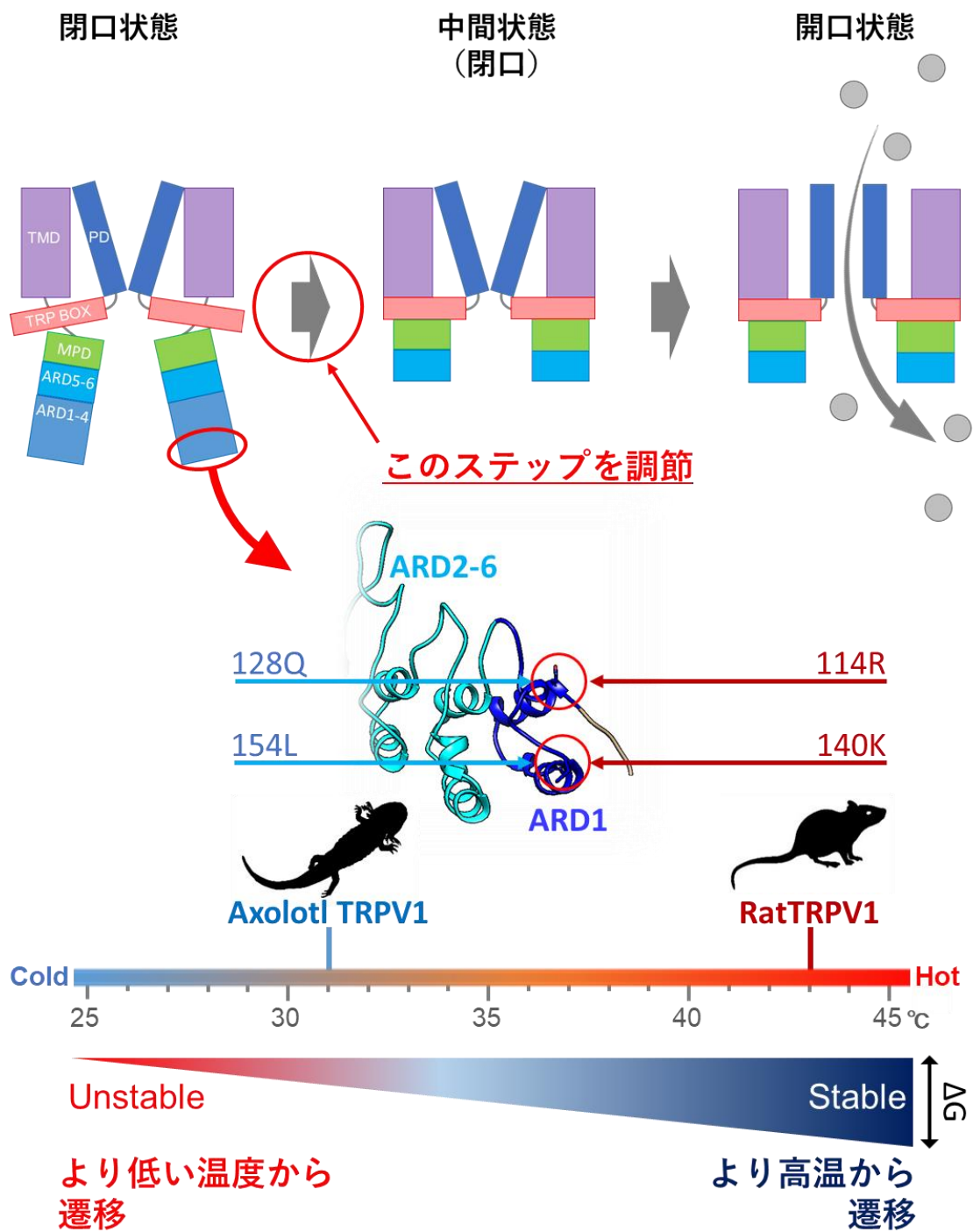


Fig. 19 axTRPV1 と rTRPV1 間の開口温度の差を生じる分子機構

本項で明らかにした、TRPV1 の開口温度を変化させる分子メカニズムについてまとめた。axTRPV1 は、ARD1 領域の変異を獲得することで ARD 構造の熱安定性を低下させ、中間状態への遷移のハードルを下げることで温度感受性を高めている。

S124		Q188	
K	-0.97	E	-1.55
G	-0.95	P	-0.97
R	-0.39	M	-0.52
N	-0.39	K	-0.41
H	-0.31	F	-0.38
F	-0.22	Y	-0.34
Q	-0.22	L	-0.34
C	-0.09	V	-0.25
S	0.00	W	-0.23
L	0.04	I	-0.19
Y	0.06	C	-0.17
M	0.14	T	-0.15
A	0.15	D	-0.13
W	0.24	R	-0.08
D	0.34	A	-0.02
E	0.36	Q	0.00
T	0.75	S	0.08
V	1.36	H	0.13
I	2.62	G	0.13
P	5.59	N	0.20

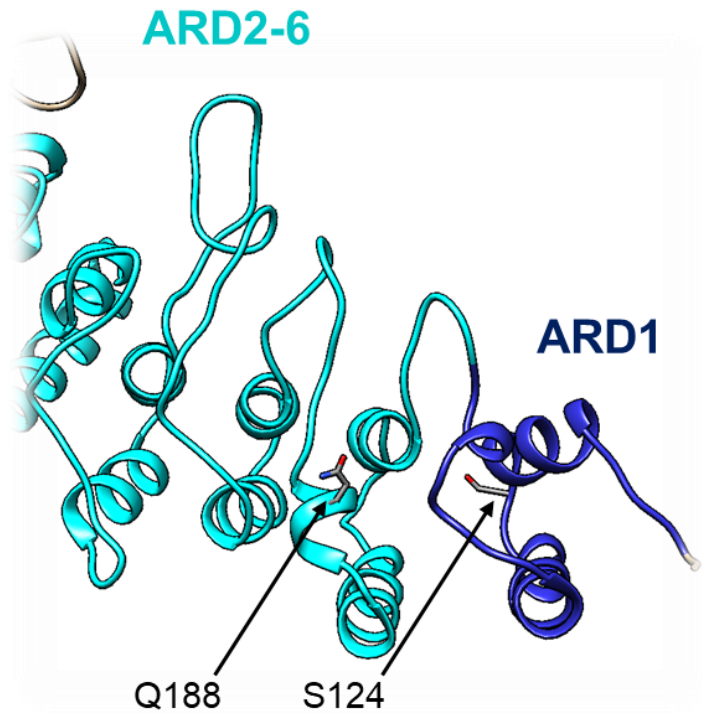


Fig. 20 rTRPV1_S124 及び Q188 座標の置換による ΔG の変化

rTRPV1 の閉口時のクライオ電子顕微鏡像 (pdbID : 7LP9) を鋳型とし、FoldX によりラクダ型高温応答の責任部位 (S124, Q188) が他のアミノ酸に置換した場合の ΔG の変化を算出した。オレンジで示した S124N 及び Q188E は、それぞれラット型からラクダ型へ変異する場合の置換である。

第3章

各四肢動物の TRPV1 の温度感受性はアンキリンリピート 1 の配列で決定される

I. 緒言

最近のいくつかの研究は、ユニークな温度環境に生息する生物種が、特別な温度感受性を獲得した TRP チャンネルを持つことを明らかにしてきた。例えば、砂漠の高温環境に生息するラクダは高温センサーTRPV1 の ARD に存在する 2 か所のアミノ酸変異の獲得により高温応答性を減弱させ、北極に生息するペンギンは低温センサーTRPM8 の膜貫通領域の 1 アミノ酸変異により低温感受性を低下させている [14, 46]。しかし、過去の報告の多くは特定の 2 種類の生物種を対象に比較が行われており、2 種間で見られた温度応答性の差を生み出すメカニズムが四肢動物で広く保存されているのか、その 2 種間だけで成り立っているのかについては議論の必要がある。実際に、40°Cの開口温度閾値を持つウシやコウモリの TRPV1 はラクダ型応答の責任アミノ酸がラクダ型に変異しており、高温応答が減弱しているはずであるにも関わらず、明瞭な高温応答を持つ。またニワトリ TRPM8 はペンギン型応答の責任アミノ酸がペンギン型であるにも関わらず、ペンギンとは異なり低温に顕著に応答する [14, 15, 47]。これらの結果は、2 種の動物の比較による研究では、動物たちが持つ TRP チャンネルの温度応答の分子メカニズムを理解する上で不十分であることを意味している。本研究の主題である、「温度適応に関連した TRPV1 の開口温度閾値の獲得」について、より深い議論を行う上では複数の動物群を対象に TRPV1 を比較することが必要とされる。

本章では、axTRPV1 と rTRPV1 の比較により明らかにした、「TRPV1-ARD1 領域のアミノ酸変異による開口温度閾値の決定機構」の普遍性について 2 つの検討を行った。1 つ目としては、axTRPV1 以外の有尾両生類 TRPV1 が、axTRPV1 と同様に 2 か所のアミノ酸置換により温度開口閾値を低下させているのか検討した。2 つ目に、過去に報告された各四肢動物が持つ温度感受性が異なる TRPV1 について、axTRPV1-rTRPV1 間の結果と同様に ARD1 により開口温度閾値が制御されているのか検討した。これらの検討により、チャンネル N 末による開口温度の制御が、広く四肢動物で保存される一般的なメカニズムであるのか検討した。

II 材料と方法

1. 材料

In-Fusion HD Cloning kit [Clontech]

その他の材料は 1 章及び 2 章と同様で行った。

2. 各動物種 TRPV1-ARD1 領域の増幅

キメラチャネルの作成に用いたネッタイツメガエル脳 Total RNA は、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して広島大学両生類研究センターより提供を受けた（系統：Nigerian H 臓器：脳）。Total RNA に対し、1 章で記載した方法により cDNA を合成した。合成した cDNA に対し PCR を行い、ARD-1 に相当する 120 塩基対を増幅した。

ラット及びニワトリ TRPV1-ARD1 は Dr. D. Julius より提供を受けたプラスミドを鋳型とし、PCR により ARD1 領域を増幅した。

以下に使用したプライマーを示す。

XeARD1_F Primer : TGCTACAAGCTCTATGACCAGAGAAGGATTTTTGA

XeARD1_R Primer : GCAGGTTTTCCCAGTCTCTTTCTCTTTAAACTCTT

RatARD1_R Primer : TGCTACAAGCTCTATGATCGCAGGAGCATCTTCGA

RatARD1_R Primer : GCAGGTTTTCCCAGTCTCTGGGTCTTTGAACTCGC

ChARD1_F Primer : TGCTACAAGCTCTATGACCGCAGAAGGATCTTTGA

ChARD1_R Primer : GCAGGTTTTCCCAGTTTCTGGTTCTTTGAATTCAT

カモノハシ TRPV1-ARD1 はデータベース上の配列（アクセッション No : XM_029082374）から ARD1 領域の配列情報を取得し、ユーロフィンジェノミクスの人工遺伝子合成サービスにより ARD1 領域の cDNA を合成した。

3. 発現コンストラクト

Axolotl TRPV1 の ARD1 を各動物種に置換したキメラチャンネルを作成するために、pGEMHE に入った axTRPV1 を鋳型とし、axTRPV1 の N 末及び ARD2 から C 末までを含む pGEMHE の配列をインバース PCR により増幅した。DpnI 処理により鋳型プラスミドを消化し、In Fusion Kit により、2 の項で取得した ARD1 領域と結合した。クローニング後、シーケンスにより配列を確認し、エラーの無いクローンを電気生理解析に使用した。インバース PCR に使用したプライマーを以下に示す。

iPCR_F primer : ACTGGGAAAACCTGCTTGCTGAAAG

iPCR_R Primer : ATAGAGCTTGTAGCAGTGGTCTTTGCAG

4. 点変異体作成

点変異体作成については、2 章と同様に行った。

5. 2 本電極膜電位固定法

2 本電極膜電位固定法については、1 章と同様に行った。

6. 統計処理

データの統計処理及びグラフ作成は GraphPad Prism9 [MDF] を使用し、グラフは平均及び標準誤差 (SEM) で示した。2 群間の比較は、Student's t-test を用いて行い、3 群以上の比較には Onw-Way-ANOVA の後 Tukey's test により各群の平均の差を調査した。

III. 結果

1. 有尾両生類の TRPV1 における Q128 及び L154 座標の役割

2 章で明らかにした、axTRPV1 の低い高温活性化閾値の責任アミノ酸である Q128 と L154 座標が、他の有尾両生類の TRPV1 においても開口温度を低下させる責任アミノ酸として機能しているのか検討した。アミノ酸配列上では、Q128 座標は 4 種の有尾両生類 TRPV1 の全てで保存されていた。また、L154 座標は axTRPV1, ysTRPV1, jcTRPV1 については保存されていたが、inTRPV1 では同じ疎水性アミノ酸であるバリンへと置換していた (Fig. 21A)。2 章で行った実験と同様に、inTRPV1 及び ysTRPV1、jcTRPV1 における該当座標を rTRPV1 へ置換した点変異体 (inTRPV1_Q127R/V153K, ysTRPV1_Q126R/L152K, jcTRPV1_Q129R/L155K) を作成し、その温度応答性を解析した。2 本電極膜電位固定法による電気生理解析の結果、野生型の各種有尾両生類 TRPV1 は 40°C 以下の高温に対し明瞭な高温応答を示したのに対し、その 2 重変異体は、ともに 40°C 以下での高温に対し応答性を示さなくなった (Fig. 21B-G)。よって各有尾両生類の TRPV1 は、共通に ARD1 の 2 番目と 28 番目のアミノ酸 (128Q, 154L) が主な責任部位となり、低い高温活性化閾値を獲得し、温度感受性が上昇していることが明らかになった。

2. 他の四肢動物の TRPV1 における ARD1 領域による高温活性化閾値の調節

過去の報告では、43°C から開口する齧歯類やヒトの TRPV1 の他に、やや高い温度である 45°C から開口する鳥類ニワトリの TRPV1 [13] や、逆にやや低い温度である 40°C から開口する無尾両生類ツメガエルの TRPV1 [23]、35°C から開口する単孔類カモノハシの TRPV1 [21] が報告されている。しかし、これらの TRPV1 がどのような分子基盤でその高温活性化閾値を獲得しているのかについては解明されていない。本項目では、2 章で明らかにした ARD1 による開口温度の制御が、これらの TRPV1 の開口温度決定にどのように関わっているのか検討した。31°C から開口する axTRPV1 の ARD1 領域を、ラットやニワトリ、ツメガエル、カモノハシの TRPV1 の ARD1 領域に挿げ替えたキメラチャンネルを作成し、その高温応答性を解析した。その結果、全てのキメラが、40°C 以下の温度での高温応答性を失っていた。そこで、更に高温に対する応答について、カ

エル卵母細胞発現系の限界高温である 46°Cまで温度を上昇させ、高温応答性を評価した所、カモノハシ及びツメガエルキメラにおいて約 40°Cから活性化が見受けられた。また、ラットキメラについては 43°C辺りから活性化が見られ、ニワトリキメラでは明瞭な高温活性化は確認されなかった (Fig. 22C-D)。つまり、各動物の TRPV1 の ARD1 は、その部位だけで axTRPV1 の開口温度を ARD1 の由来する各四肢動物の TRPV1 がもつ高温活性化閾値へと変化させることが明らかになった。そこで、更に 2 章で明らかにした 2 アミノ酸座標 (Q128R, L154K) が、これらのキメラにおける開口温度の上昇に関与しているのか検討するため、ARD1 領域のアミノ酸の比較を行った。すると、ニワトリにおいて Q128 座標はラット型、L154 座標はアホロートル型となっていた。また、カモノハシにおいては Q128 座標はラット型、L154 座標はトレオニンへと置換しており、ラット型でもアホロートル型でもなかった。また、ツメガエルにおいて Q128 座標はアホロートル型、L154 座標はヒスチジンへ置換しておりラット型でもアホロートル型でもなかった (Fig. 23A)。次に、ニワトリ、カモノハシ、ツメガエルキメラについて、Q128 及び L154 座標をアホロートル型に置換する点変異体 (ChA_R128Q, PIA_R128Q, R128Q/T154L, XeA_H154L) を作成し、これらの座標が実際に開口温度を上昇させているのか検証した。その結果、全てのキメラについて、点変異により開口温度の低下が確認された (Fig. 23B-G)。特に、カモノハシキメラにおける 2 座標点変異 (R128Q/T154L) は開口温度をアホロートルと同等の開口温度である 30 度にまで低下させていた (Fig. 23C, F)。一方で、ニワトリ及びツメガエルキメラの単一点変異体 (ChA_R128Q, XeA_H154L) は、開口温度を約 35°C程度までしか下げられていなかった (Fig. 23B, D-E, G)。この結果は、これら単一の変異だけでは、開口温度の変化に不十分であることを示す。そこで、これら 2 種のキメラの開口温度を決定する他の責任アミノ酸を明らかにするために、更なる点変異解析を行った。その結果、ニワトリキメラ 3 重変異体 (R128Q/R137E/K141S) 及びツメガエルキメラ 2 重変異体 (H154L/K165P) は、開口温度が約 30°Cにまで低下した (Fig. 23B, D-E, G)。この結果は、追加で導入した変異の座標 (ChA_R137 & K141, XeA_K165) が、これらのキメラの開口温度を決定する責任部位であることを示す。また、本研究では -80 mV の電圧条件で解析を行っているのに対し、以前の報告では、カモノハシの TRPV1 は +80 mV の電圧条件で解析が行われていた [21]。TRPV1 は電圧依存性を持つことから、高い電圧条件ではよりチャネ

ルが開きやすくなっていると考えられる。そこで、カモノハシキメラについて+80 mV 電圧条件での高温応答性を解析した所、カモノハシキメラは約 35°Cから開口した (Fig. 24)。このカモノハシキメラの温度応答性は、過去の報告にある結果と一致した [21]。これらの解析から、各四肢動物の TRPV1 がもつ温度感受性は、主に ARD1 領域の 2 番目と 28 番目のアミノ酸が重要な役割を果たしており、更にそれ以外の座標のアミノ酸変異を獲得することで微細に調節されていると考えられた。

IV. 考察

本項の結果は、ARD1 領域が四肢動物 TRPV1 の開口温度閾値を制御する責任部位であることを示す。過去の報告は、TRP チャンネルの温度応答性が、進化の過程で起こる数アミノ酸の変異で容易に変化することを示してきた [14, 23, 31, 42]。しかし、これらは特徴的な温度応答性を持つ 2 種の動物間の種差に焦点を当てた研究である。一方で、似通った温度応答性を持つ温度 TRP が、どのような分子メカニズムで相同な温度応答性の獲得に至っているのか、その詳細を研究した報告は無い。四肢動物が持つ TRPV1 は、スプライス変異体を除いて約 40°C 以上の高温で開口するとされ、この特徴はカエルから哺乳類まで共通の分子機能である [5, 13, 15, 21, 23, 42]。一方で、約 40°C という普遍的な開口温度が、共通の保存されたアミノ酸によって獲得されているのか、或いは異なる座標における変異の獲得により結果的に似た温度感受性を獲得しているのかについては、今まで議論されたことは無かった。また、TRPV1 の温度応答性の分子基盤に関する研究は、イオンの通り道として機能するポアドメイン及びその近傍の膜貫通ドメインが中心に行われており、ポアドメインから遠く離れた遠位 ARD 領域 (ARD1-2) の機能については報告が少ない [4, 8, 24-26, 48-50]。一方で、CD スペクトルやサーマルシフトアッセイ、クライオ電子顕微鏡像の報告は遠位 ARD 領域が非常に温度依存性の高い領域であることを示唆している [34, 38, 40, 45]。本項では、先ず有尾両生類各種の TRPV1 について、axTRPV1 と同様に ARD1 上の 128 及び 154 のアミノ酸座標 (ARD 1 の中では 2 番目と 28 番目に位置する) による開口温度制御が獲得されているのか検討した。点変異解析の結果は、3 種の有尾両生類 (イベリアトゲイモリ、ヤマトサンショウウオ、ハコネサンショウウオ) の TRPV1 においても、128 及び 154 座標が開口温度を低下させる責任アミノ酸であることを明らかにした。これらの結果は、この 2 座標による開口温度の低下が、有尾両生類で広く保存された分子戦略であることを示す。一方で、ヤマトサンショウウオは他の 3 種よりも高い高温活性化閾値を持つにも関わらず、これら 2 か所のアミノ酸は axTRPV1 や jsTRPV1 と一致していた。このことは、ysTRPV1 において、開口温度を制御する追加のアミノ酸置換が存在することを示唆する。

本項のキメラ解析の結果は、遠位 ARD に含まれ、最もポアドメインから遠い位置に

存在する ARD1 が、各生物種の TRPV1 が持つ固有の開口温度閾値を発現するために十分な領域であることを示した。更に、点変異解析は各動物種の TRPV1 が持つ開口温度閾値の責任アミノ酸とされる残基を明らかにした。カモノハシ TRPV1 は、Q128 座標をラット型のアルギニンにしつつ、L154 座標をリシンではなくトレオニンへ置換することで開口温度閾値をラットより下げている。またニワトリについては、Q128 座標はラット型であるが、L154 座標についてはアホロートル型であるにも関わらず、R137E/K141S という独自の変異を獲得することで開口温度を上昇させている。そしてツメガエルについては、Q128 座標がアホロートル型であるにも関わらず、L154H/P165K という独自の変異を獲得することで開口温度を上昇させていた。これらの結果は、四肢動物 TRPV1 における種ごとの開口温度閾値が、Q128 及び L154 座標を中心としつつ、他のアミノ酸座標に各動物種独自の変異を生じることで獲得されていることを示す。そして、それらの付加変異も ARD1 領域の 40 アミノ酸の中に存在した。このことから、四肢動物の進化や温度環境適応の中で、ARD1 の構造が安定化するアミノ酸置換が生じたことで TRPV1 の開口温度の上昇を獲得したことが示唆される。

本項における結果は、詳細な機能が不明であった遠位 ARD (ARD1) が、開口温度閾値の制御という極めて重要な役割を持つ機能単位であることを明らかにし、更にこの機能が、両生類から哺乳類にかけて、四肢動物の TRPV1 において広く保存される普遍的なメカニズムであることを強く示唆する (Fig. 25)。

V. 图

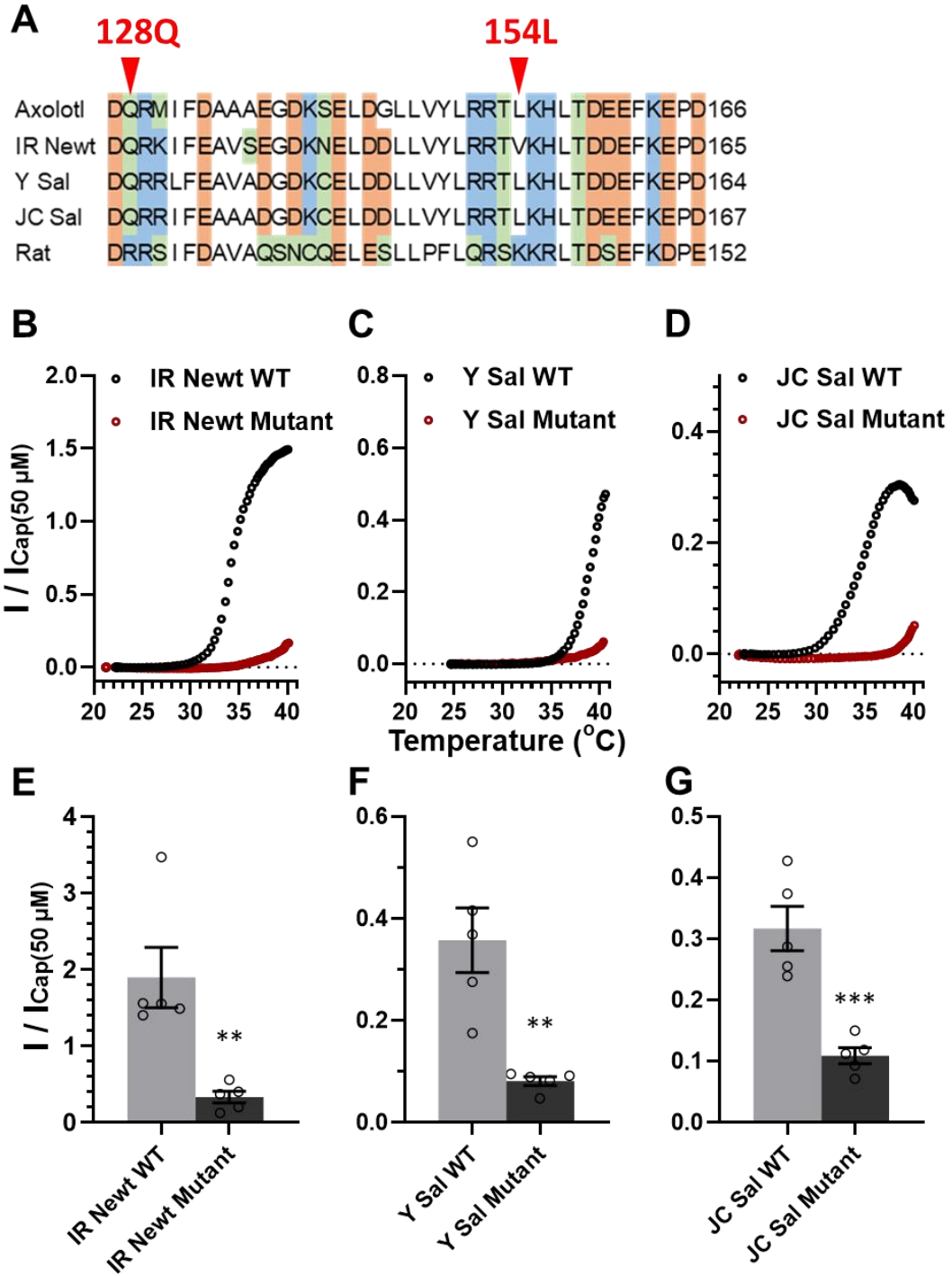


Fig. 21 inTRPV1, ysTRPV1, jcTRPV1 における Q128R/L154K2 重変異の効果

inTRPV1, ysTRPV1, jcTRPV1 について axTRPV1 と同様に、Q128R/L154K 点変異により開口温度が上昇するのか検討した。A には各種有尾両生類及びラットの TRPV1 の ARD1 領域のアミノ酸配列を示す。B-D はカエル卵母細胞発現系での電気生理解析により解析した、各種有尾両生類の TRPV1 における野生型及び 2 重変異体の代表トレースを示しており、E-G にはカプサイシン電流で標準化した 40°C 地点での電流の平均及び標準誤差を示す (n = 5)。統計処理は Student's t-test を用いて野生型と 2 重変異体の平均の差を比較し、各グラフの有意差は * = p < 0.05, ** = p < 0.01, *** = p < 0.001 で示した。

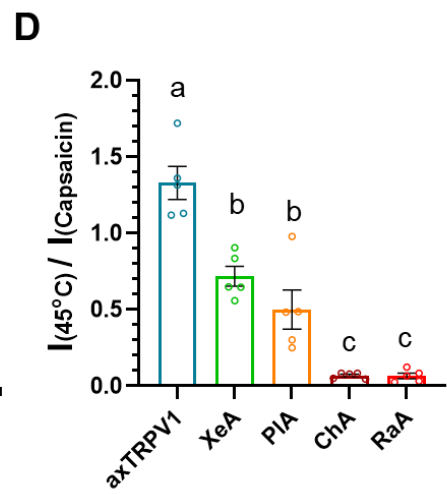
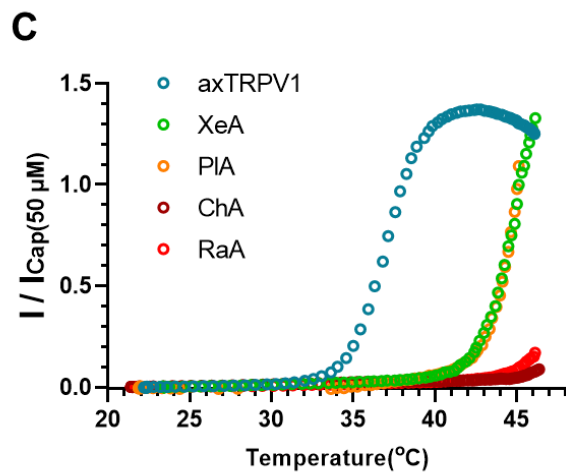
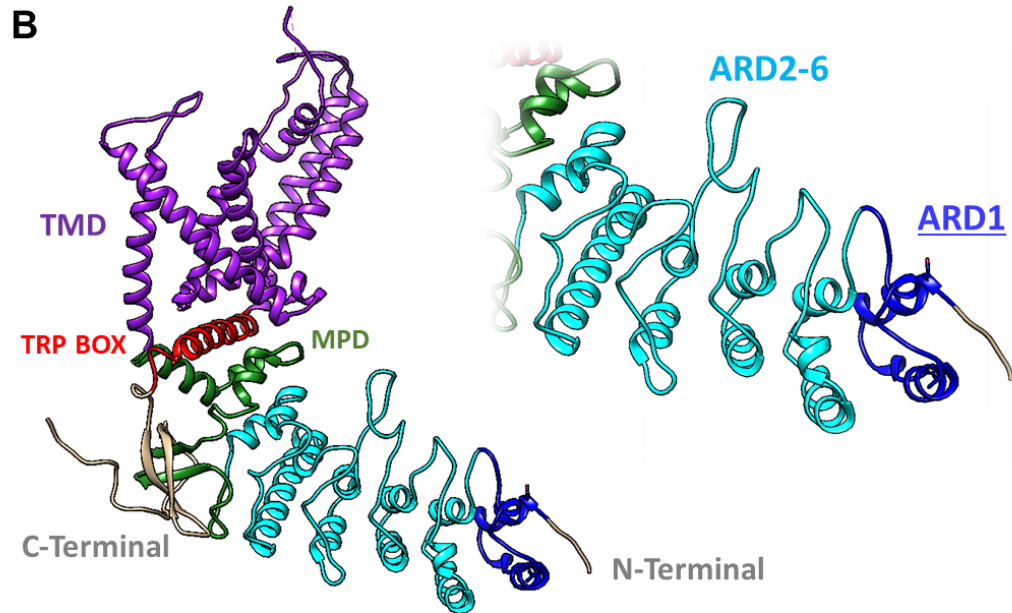
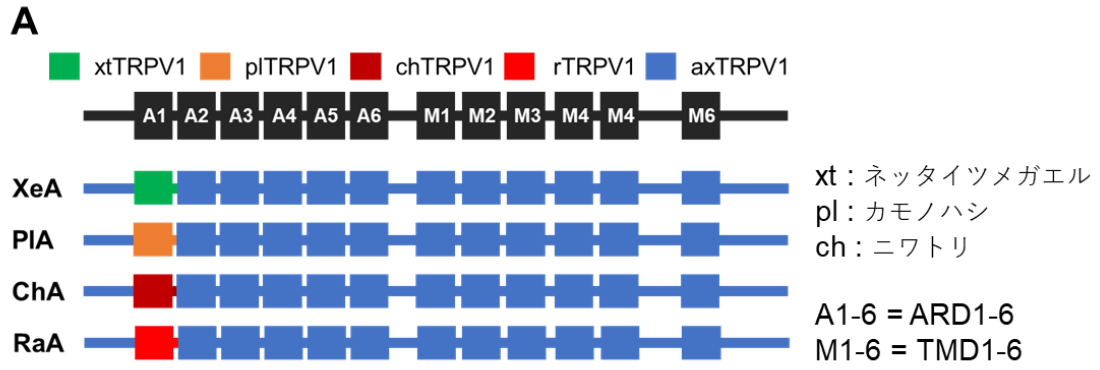


Fig. 22 四肢動物の TRPV1-ARD 領域の開口温度制御効果の検討

axTRPV1ARD1 領域を、開口温度閾値が異なる他の四肢動物 TRPV1ARD1 領域に挿げ替えたキメラチャネルを作成し、温度応答性の変化を調査した。A には各種キメラの模式図を示し、B には立体構造における ARD1 領域の位置を示す。C-D にはカエル卵母細胞実験系で解析した結果を示しており、C は各キメラの代表トレース、D には 45°C 地点での電流をカプサイシン電流で標準化した平均及び標準誤差を示した (n = 5)。電流は全て -80 mV 電圧条件での電流を取得した。統計処理は Tukey's test により各群の平均の差を比較し、 $p < 0.05$ となったペアについて異なるアルファベットなるように記入した。

xt: ネットアイツメガエル

pl: カモノハシ

ch: ニワトリ

Fig. 23 各四肢動物の TRPV1-ARD1 領域における開口温度決定の責任アミノ酸の探索

各種 ARD1 キメラについて、開口温度を上昇させているアミノ酸の探索を行った。A は各種四肢動物の TRPV1 における ARD1 領域のアミノ酸配列を示す。B-G には、カエル卵母細胞実験系で解析した結果を示す (-80 mV)。B-D には、それぞれツメガエル、カモノハシ、ニワトリキメラに対し各種点変異を導入したチャンネルを発現した卵母細胞の代表トレースを示し、E-G には各種チャンネルの開口温度閾値の平均及び標準誤差を示した (n = 5-10)。統計処理は、Tukey's test により各群の平均の差を比較し、 $p < 0.05$ となったペアに異なるアルファベットを記入した。

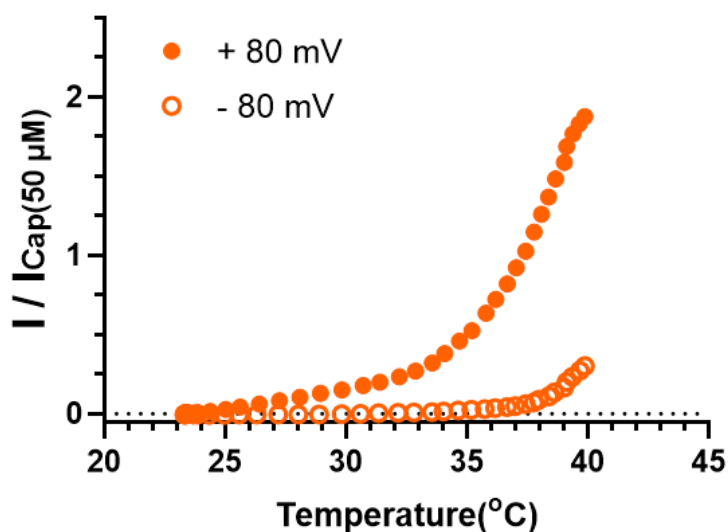


Fig. 24 +80 mV 電圧条件での PIA キメラの温度応答性

カエル卵母細胞発現系を用いた 2 本電極膜電位固定法により、カモノハシキメラの高温応答性を解析した。応答は、50 μM カプサイシンに対する応答の電流で標準化し、●には+80 mV、○には同じ卵母細胞での-80 mV 電圧条件での高温応答を示した。

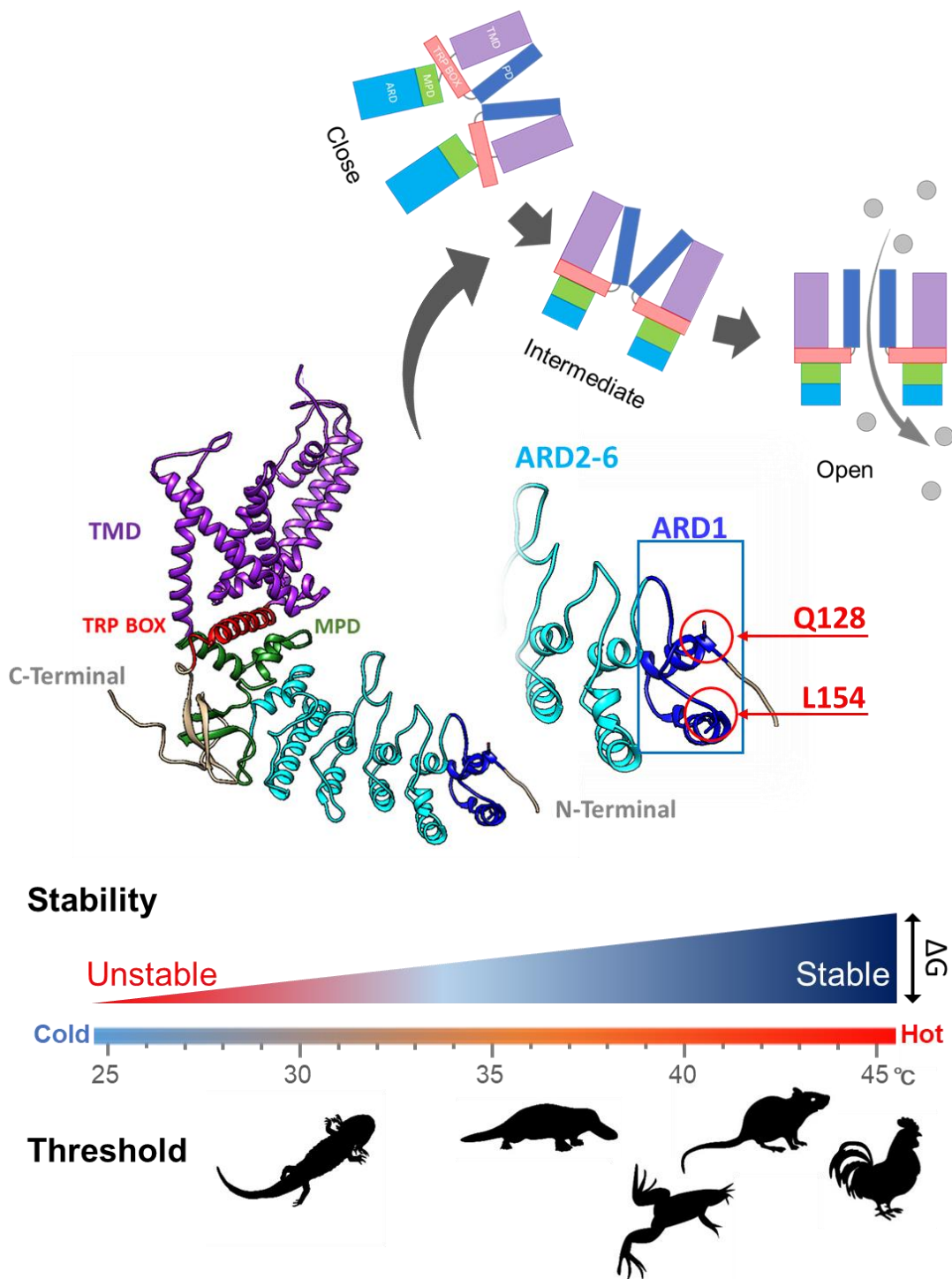


Fig. 25 TRPV1-ARD1 領域による TRPV1 開口温度の決定

本研究で明らかにした、TRPV1 の開口温度閾値の決定機構についてまとめた。四肢動物 TRPV1 は、ARD1 領域の 2 か所のアミノ酸を中心に、ARD1 領域の熱安定性を変化させることで中間状態への遷移温度を変化させ、種特有の開口温度を獲得している

総合考察

生物における温度感知は、侵害刺激の忌避から生理機能調節まで幅広い役割を持つ極めて重要な機能である。そのことから、TRPV1 の研究は世界的に盛んに行われており、2022 年 7 月現在までに 8 千近い論文が報告されている。それにも関わらず、「TRPV1 がどのような分子メカニズムで特定の温度を認識しているのか」については未だ明瞭な答えには至っていない。本研究では、四肢動物の温度適応の観点から研究を行い、低温環境に生息する有尾両生類が TRPV1 の温度応答性を劇的に変化させていることを明らかにした。更に比較研究から、TRPV1 が種によって異なる固有の侵害温度を感じ取るための分子基盤について、電気生理学と構造生物学、そして生化学の実験を組み合わせることで、その詳細を明らかにした。有尾両生類の TRPV1 とラットの TRPV1 の比較実験は、彼らの開口温度の差が ARD1 領域に存在する 2 か所のアミノ酸の置換により生じていることを明らかにした。この結果は、TRPV1 の開口温度閾値の変化を通じた忌避温度の変化の獲得が、単一アミノ酸レベルで獲得可能であることを示し、この能力は生物が異なる温度的環境ニッチを獲得する上で非常に有利に働いていると考えられる。また、構造生物学及び生化学の実験から axTRPV1 は ARD1 領域のアミノ酸置換の獲得により ARD1 領域の安定性を低下させることで中間状態への推移を容易にし、それにより開口温度を低下させていることが示された。更に、各種動物とのキメラ解析により、ARD1 領域による開口温度の制御は四肢動物 TRPV1 で普遍的なメカニズムであることが示された。これらの結果は、詳細な分子機構が明らかではなかった「TRPV1 が特定の温度を認識する分子メカニズム」に極めて大きな洞察をもたらすとともに、TRPV1 の遠位 ARD が持つ、極めて重要な分子機能を世界で初めて明らかにしたものである。この発見は温度 TRP を介した温度適応の分子基盤の理解に大きく貢献すると考えられる。一方で、水の中に生息する魚類は祖先的な TRPV1 を持っており、四肢動物がもつ TRPV1 と分子的、機能的に異なることが明らかになっている [長浜バイオ大学 浅野修論 (2019)]。温度応答性の大きく異なる点として、魚類 TRPV1 の高温応答は明瞭な開口温度閾値を持たない。即ち、TRPV1 の明瞭な高温活性化閾値の獲得は、基本的に陸上に進出した四肢動物で初めて起こったと考えられている。そして、陸上の様々な温度環境への適応に、TRPV1 の ARD1 に起こった変異による構造の安定化が重要な意味を

持った可能性が考えられる。今後、魚類や肉鱗類といった動物群がもつ TRPV1 についても調査を行い、動物の陸上進出と ARD1 の安定性の獲得についての詳細を検討することが求められる。また、TRPV1 の活性は Ca^{2+} イオンの流入や膜電位の上昇を引き起こすことで様々な細胞シグナルの引き金となっており、機能する組織の多様さや関係する疾患の広さから重要な創薬標的とされている [51-54]。一方で、全身で広く機能している故に、TRPV1 の阻害による鎮痛剤は高体温を中心とした全身性の重篤な副作用を引き起こすという問題を抱えており、何らかの改善が待たれている [51]。本研究による ARD1 領域でのチャネル活性の調節機構の発見は、TRPV1 標的創薬の設計に新しい機会を提供すると期待される。

参考文献

1. J. Vriens, B. Nilius and T. Voets, Peripheral thermosensation in mammals, *Nat. Rev. Neurosci.* 15:573-1589 (2014)
2. S. N. Bagriantsev and E. O. Gracheva, Molecular mechanisms of temperature adaptation, *J. Physiol.* 593:3483-3491 (2015)
3. S. Saito and M. Tominaga, Functional diversity and evolutionary dynamics of thermoTRP channels, *Cell Calcium* 57:214-221 (2015)
4. M. J. Caterina, M. A. Schumacher, *et al.*, The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway, *Nature* 389:816-824 (1997)
5. M. Tominaga, M. J. Caterina, *et al.*, The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli, *Neuron* 21:531-543 (1998)
6. J. Yao, B. Liu, and F. Qin, Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 11109-11114 (2011)
7. B. R. Myers, C. J. Bohlen and D. Julius, A yeast genetic screen reveals a critical role for the pore helix domain in TRP channel gating, *Neuron* 58:362-373 (2008).
8. J. Grandl, S. E. Kim, *et al.*, Temperature-induced opening of TRPV1 ion channel is stabilized by the pore domain, *Nat. Neurosci.* 13:708-714 (2010).
9. Y. Cui, F. Yanget, *et al.*, Selective disruption of high sensitivity heat activation but not capsaicin activation of TRPV1 channels by pore turret mutations, *J. Gen. Physiol.* 139:273-283 (2012).
10. F. Zhang, A. Jara-Oseguera, *et al.*, Heat activation is intrinsic to the pore domain of TRPV1, *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.* 115:317-324 (2017)
11. N. R. Gavva, L. Klionsky, *et al.*, Molecular Determinants of Vanilloid Sensitivity in TRPV1, *J. Biol. Chem.* 279:20283-20295 (2004)
12. M. Ohkita, S. Saito, *et al.*, Molecular Cloning and Functional Characterization of *Xenopus tropicalis* Frog Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Reveal Its Functional Evolution for Heat, Acid, and Capsaicin Sensitivities in Terrestrial Vertebrates, *J. Biol. Chem.*

- 108:421-430 (2002)
13. S.-Eric Jordt and D. Julius, Molecular Basis for Species-Specific Sensitivity to “Hot” Chili Peppers, *Cell* 108:421-430 (2002)
 14. W. J. Laursen, E. R. Schneider, *et al.*, Low-cost functional plasticity of TRPV1 supports heat tolerance in squirrels and camels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113:11342-11347 (2016)
 15. E. O. Gracheva, J. F. Cordero-Morales, *et al.*, Ganglion-specific splicing of TRPV1 underlies infrared sensation in vampire bats, *Nature* 476:88-91 (2011)
 16. I. Vandewauw, K. D. Clercq, *et al.*, A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing, *Nature*, 555, 662–666, (2018)
 17. V. Viswanath, G. M. Story, Opposite thermosensor in fruitfly and mouse, *Nature* 423:833-823 (2003)
 18. E. O. Gracheva, N. T. Ingolia, *et al.*, Molecular basis of infrared detection by snakes, *Nature* 464:1006-1011 (2010)
 19. K. Held, T. Voets, and J. Vriens, TRPM3 in temperature sensing and beyond, *Temperature (Austin)* 2(2): 201–213. (2015)
 20. K. Uchida, L. Demirkhanyan, *et al.*, Stimulation-dependent gating of TRPM3 channel in planar lipid bilayers. *The FASEB J.* 30:1306-13160 (2016)
 21. L. Luo, Y. Wang, *et al.*, Molecular basis for heat desensitization of TRPV1 ion channels, *Nat. Commun.* 2134 (2019)
 22. M. Oda, H. Ogino, *et al.*, Functional properties of axolotl transient receptor potential ankyrin 1 revealed by the heterologous expression system, *Neuroreport* 30:323-330 (2019)
 23. S. Saito, C. T. Saito, *et al.*, Elucidating the functional evolution of heat sensors among *Xenopus* species adapted to different thermal niches by ancestral sequence reconstruction, *Mol. Ecol.* 28:3561-3571 (2019)
 24. J. E. Farkas and J. R. Monaghan, Housing and maintenance of *Ambystoma mexicanum*, the Mexican axolotl, *Methods Mol. Biol.* 1290:27-46 (2015)
 25. A. Joven, M. Kirkham and A. Simon, Husbandry of Spanish ribbed newts (*Pleurodeles*

- waltl), *Methods Mol. Biol.* 1290:47-70 (2015)
26. N. Mito, K. Ohshima and O. Saitoh, Genetic Diversity among Clouded Salamanders (*Hynobius nebulosus*) in Shiga Prefecture, *Zool. Sci.* 35:427-435 (2018)
 27. N. Yoshikawa, M. Matsui, *et al.*, Phylogenetic relationships and biogeography of the Japanese clawed salamander, *Onychodactylus japonicus* (Amphibia: Caudata: Hynobiidae), and its congener inferred from the mitochondrial cytochrome b gene, *Mol. Phylogenet. Evol.* 49:249-259 (2008)
 28. F. Seebacher and S. A. Murray, Transient Receptor Potential Ion Channels Control Thermoregulatory Behaviour in Reptiles, *PLoS One* 14 (2007)
 29. E. D. Prescott and D. Julius, A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity, *Science* 300:1284-1288 (2003)
 30. J. Yao and B. Liu, Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:11109-11114 (2011)
 31. G. Du, Y. Tian, A specialized pore turret in the mammalian cation channel TRPV1 is responsible for distinct and species-specific heat activation thresholds, *J. Biol. Chem.* 295:9641-9649 (2020)
 32. Y. Chu, B. E. Cohen and H. H. Chuang, A single TRPV1 amino acid controls species sensitivity to capsaicin, *Sci. Rep.* 10:8038 (2020)
 33. K. D. Nadezhdin, A. Neuberger, *et al.*, Structural mechanism of heat-induced opening of a temperature-sensitive TRP channel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 28:564-572 (2021)
 34. D. H. Kwon, F. Zhang, *et al.*, Heat-dependent opening of TRPV1 in the presence of capsaicin, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 28: 554-563 (2021).
 35. B. Webb and A. Sali, Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER, *Curr. Protoc. Bioinformatics* 54:5.6.1-5.6.37 (2016).
 36. P. D. Adams, P. V. Afonine, *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallogr. D* 66:213-221 (2010).
 37. C. J. Williams, J. J. Headd, *et al.* MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation, *Protein Sci.* 27:293-315 (2018).
 38. J. Schymkowitz, J. Borg, *et al.* The FoldX web server: an online force field, *Nucleic Acids*

- Res.* 33:382-388 (2005).
39. E. L. Guevara, L. Dominguez, The Contribution of the Ankyrin Repeat Domain of TRPV1 as a Thermal Module, *Biophys. J.* 118:836-845 (2020)
 40. C.H. Chan, T.H. Yu, K. B. Wong, Stabilizing salt-bridge enhances protein thermostability by reducing the heat capacity change of unfolding, *PLoS One* 6:21624 (2011)
 41. J. Schilling, C. Jost, Thermostable designed ankyrin repeat proteins (DARPin)s as building blocks for innovative drugs, *J. Biol. Chem.* 298:101403 (2022)
 42. C. Zaelzer, P. Hua, *et al.* Δ N-TRPV1: A Molecular Co-detector of Body Temperature and Osmotic Stress, *Cell Rep.* 13:23-30 (2015)
 43. V. Vellani, S. Mapplebeck, *et al.*, Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide, *J. Physiol.* 534: 813-825 (2001)
 44. S. Wang, J. Joseph, *et al.*, Modality-specific mechanisms of protein kinase C-induced hypersensitivity of TRPV1: S800 is a polymodal sensitization site, *Pain* 156: 931-941 (2015)
 45. Y. Wang, X. Mo, *et al.*, Site-specific contacts enable distinct modes of TRPV1 regulation by the potassium channel Kv β 1 subunit, *J. Biol. Chem.* 295:17337-17348 (2020)
 46. S. Yang, X. Lu, *et al.*, A paradigm of thermal adaptation in penguins and elephants by tuning cold activation in TRPM8, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117:8633-8638 (2020)
 47. M. Pertusa, B. Rivera, *et al.*, Critical role of the pore domain in the cold response of TRPM8 channels identified by ortholog functional comparison, *J. Biol. Chem.* 293:12454-12471(2018)
 48. S. Yang, F. Yang, *et al.*, A pain-inducing centipede toxin targets the heat activation machinery of nociceptor TRPV1, *Nat. Commun.* 6:8297 (2015)
 49. W. Zheng and H. Wen, Heat activation mechanism of TRPV1: New insights from molecular dynamics simulation, *Temperature (Austin)* 6:120-131 (2019)
 50. Y. Cui, F. Yang, *et al.*, Selective disruption of high sensitivity heat activation but not capsaicin activation of TRPV1 channels by pore turret mutations, *J. Gen. Physiol.* 139:273-83 (2012)

51. A. Szallasi, F. Cruz and P. Geppetti, TRPV1: a therapeutic target for novel analgesic drugs?, *Trends Mol. Med.* 12:545-54 (2006)
52. M. A. Tabrizi, P. G. Baraldi, *et al.*, Medicinal Chemistry, Pharmacology, and Clinical Implications of TRPV1 Receptor Antagonists, *Med. Res. Rev.* 37:936-983 (2017)
53. J. K. Bujak, D. Kosmala, *et al.*, Inflammation, Cancer and Immunity-Implication of TRPV1 Channel, *Front. Oncol.* 9:1087 (2019)
54. J. Bousquet, W. Czarlewski, *et al.*, Potential Interplay between Nrf2, TRPA1, and TRPV1 in Nutrients for the Control of COVID-19, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 182:324-338 (2021)

謝辞

研究生活を送る上で、多大なるご指導、ご助言を頂きました長浜バイオ大学 動物分子生物学研究室 齊藤 修 教授に心から深く感謝致します。

また、私の至らぬ分野について共同研究をして頂いた長浜バイオ大学 構造生物学研究室の白井 剛 教授、生理学研究所 神経機能素子研究部門の久保 義弘 教授及び立山 充博 准教授に厚く御礼申し上げます。そしてご多忙の中、副査をして頂いた中村 肇伸 教授、向井 秀仁 教授に深く感謝いたします。

そして、各種有尾両生類の写真を提供してくださった関 慎太郎 氏、組織サンプルの採取にご協力頂いた水戸 直 助手、水戸 麻湖 博士、織田 麻衣 博士、動物分子生物学研究室の方々に、この場をお借りして心より感謝申し上げます。

最後に、実験のために貴重な命を提供して頂いた生物達に、感謝と追悼の意を表します。

本研究の一部は、公益財団法人 日本科学協会 笹川科学研究助成による助成を受けたものです(研究番号：2021-4032)。