

博士論文

動物の陸生化と TRPA1 の機能変化に関する研究

2017 年 3 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

織田 麻衣

目次

略語表	… 1
序論	… 2
第 1 章 魚類 TRPA1 の機能解析	
緒言	… 10
材料と方法	… 12
結果	… 18
考察	… 27
第 2 章 axTRPA1 のクローニングと機能解析	
緒言	… 61
材料と方法	… 63
結果	… 68
考察	… 72
第 3 章 魚類と陸上動物の TRPA1 の高温活性化特性を支える分子基盤の検討	
緒言	… 94
材料と方法	… 96
結果	… 98
考察	… 102
総合考察	… 122
参考文献	… 125
謝辞	… 134

略語表

TRP : Transient Receptor Potential

TRPV : TRP Vanilloid

TRPM : TRP Melastatin

TRPA : TRP Ankyrin

AITC : Allyl isothiocyanate

EGCG : Epigallocatechin gallate

oxi EGCG : 自動酸化した EGCG

ROS : Reactive Oxygen Species 活性酸素

MA : Methyl Anthranilate

DMSO : Dimethyl sulfoxide

RR : Ruthenium Red

HBSS : Hank's Balanced Salts solution

DRG : Dorsal root ganglion 後根神経

AR : Ankyrin repeat アンキリンリピート

ML 法 : Maximum likelihood method

hTRPA1 : ヒト TRPA1

mTRPA1 : マウス TRPA1

cTRPA1 : ニワトリ TRPA1

rsTRPA1 : ガラガラヘビ TRPA1

xtTRPA1 : ニシツメガエル TRPA1

xlTRPA1a : アフリカツメガエル TRPA1a

xlTRPA1b : アフリカツメガエル TRPA1b

axTRPA1 : アホロートル TRPA1

zTRPA1a : ゼブラフィッシュ TRPA1a

zTRPA1b : ゼブラフィッシュ TRPA1b

olTRPA1 : メダカ TRPA1

pfTRPA1 : フグ TRPA1

序論

動物は、様々な外界刺激を「特殊感覚」と「体性感覚」で感知している。身体の特定の部位にある受容器を使って感知する「特殊感覚」には、味覚、聴覚、視覚、嗅覚、触覚があり、例えば、光の刺激は目で視覚として感知される。一方、皮膚や筋肉で感知する「体性感覚」は、触圧覚、運動覚、温度覚、振動覚、痛覚があり、例えば、温度変化は皮膚で温度覚として感知される。自然界には、生存環境や食性が異なる多種多様な動物が存在しており、環境適応や生存戦略のために、感知する外界刺激の種類、性質、閾値、感度などを変化させていると考えられる。また、触圧覚、温度覚、痛覚は、組織を損傷する恐れのある刺激である「侵害刺激」となる。

一方、動物界には多くの動物が存在している。そのうち、動物界の半分以上を占める脊椎動物は、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類の5系統が存在する(Fig.1)。魚類は、北極、南極からアフリカを含む地理的、気候的に様々な温度域に分布し、表層から深海まで生息している。さらに、海水性と淡水性など生息環境の幅は広い。両生類は、約4億年前に魚類から進化し、様々な環境に分布する。冬眠する能力があるため、極度の低温でも生存でき、低温によるダメージから組織を保護するために、脱水を行う能力、糖質保護物質や浸透圧調節物質の産生といった代謝や生化学的に順応できるように発達している。爬虫類は、南極大陸を除く、全ての大陸に生息している。鳥類は、哺乳類と比較して高い基礎代謝と深部体温(40-44°C)を持ち、高い体温を維持できる。また、長距離を飛行する能力は、様々な環境に移住することを可能にしている。哺乳類は、地上や水中などを含む地球上のほとんどの環境に生息しており、地上で最も繁栄している系統である。多くの哺乳類の体温は、36-38°Cの範囲であり、他の系統と比較して体温の温度範囲は狭い。よって、これら脊椎動物が生息する環境を温度の観点から見ると、水中は温度変化が少ないのに対し、陸上は日照などの影響で温度変化が大きくなり、より苛酷になっている。しかし、陸上は効率的な呼吸を行うために、酸素分圧が高くなっている。

以上のことから、「温度の感知」は生存において重要な機能であり、脊椎動物から無脊椎動物、そして単細胞生物まで必須の感覚である。そして、温度環境が極めて安定な水中に生息する魚類と温度変化の大きい陸上に生息する動物の間でその差は著しい。動物は、それぞれの至適生存温度を逸脱する温度を「侵害刺激」として受け取

り、哺乳類の場合、15℃以下、43℃以上の温度は痛覚を引き起こし、侵害温度として定義されている。しかし、異なる環境の温度に適応した動物の間では、同じ温度でも侵害刺激に種差が生じることになる。では、どのような仕組みで感覚の種差が生じるのか、その機構の詳細はほとんど明らかにされていない。

また、動物はそれぞれの生存環境に適応していくために、温度感知センサーや機構を変化させていると考えられる。皮膚での温度感知は、皮膚の神経線維に発現する温度受容体が温度刺激によって活性化し、細胞内に陽イオンが流入することで、脱分極し、活動電位が発生する。そして、脊髄を通して脳へ情報が伝達されることで、温度の認知と温度制御プロセスが開始される(Vriens et al., 2014; Bagriantsev et al., 2015)。

この温度受容体として、TRP チャンネルが挙げられる。この TRP チャンネルは、1989 年にショウジョウバエの *trp* 遺伝子が同定されて以来、世界で精力的に研究されている陽イオンチャンネルである。哺乳類では、6 つのサブファミリー(TRPV, TRPM, TRPML, TRPC, TRPA, TRPP)から構成され、27 種類の遺伝子が同定されている(沼田 他, 2009)。TRP チャンネルは、6 回膜貫通領域を含むイオンチャンネル領域が 4 量体を形成し、チャンネルとして機能する。また、TRP チャンネルの活性化機構は多岐にわたっており、温度、機械刺激、浸透圧、pH、酸化ストレスや侵害性化学物質など種々の刺激によって活性化され、細胞内外の環境変化を感知し、細胞内シグナルに変換する“センサー”タンパク質として働いている。

また、TRP チャンネルのうち、哺乳類のマウスは 9 種類の温度感受性 TRP チャンネル(TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPM8, TRPA1)を使って、温度を識別、感知していることが報告されている(Fig.2) (Saito et al., 2015)。一方、水中に生息するゼブラフィッシュの温度感受性 TRP チャンネルは、ゲノム解析から 9 種類の温度感受性 TRP チャンネルうち 3 種類の遺伝子が欠如している。哺乳類で 15-25℃の低温を感知する TRPM8 と 52℃以上の高温を感知する TRPV2 はゲノム上に存在せず、TRPV1 は TRPV2 との祖先遺伝子と考えられる TRPV1/2 を持っている(Saito et al., 2006, 2015)。また、全ゲノム重複によって、TRPA1 は 2 個、TRPM4 は 3 個に増加し、マウスとは異なる構成の 9 個の温度感受性 TRP チャンネル(TRPV1, TRPV4, TRPM2, 3 つの TRPM4, TRPM5, 2 つの TRPA1)を使って、哺乳類と異なるレパートリーで温度を感知していると考えられている(Fig.2)。

これら温度感受性 TRP チャンネルの中の 1 つ、TRPA ファミリーは、多くの動物で

TRPA1 の 1 種類のみが存在し、極めて多種多様な刺激への応答性を持ち、さらに各動物で刺激応答性の多様性が見出されている。おそらく、動物の進化や環境適応に際して、顕著に機能変化を獲得していったと推測される。TRPA1 の構造は、N 末端に 16 個の AR を持ち(Fig.3)、主に DRG や三叉神経といった感覚神経や脳、心臓、肺に発現している。TRPA1 の立体構造解析は、高分解能低温電子顕微鏡解析によって、5 番目と 6 番目の膜貫通領域の間に位置する細胞外表面の 2 つのポアヘリックスが Ca^{2+} などの陽イオンの流入を調節している(Fig.3) (Paulsen et al., 2015; Brewster et al., 2015)。また、TRPA1 の一番の特徴である AR は、33 個のアミノ酸からなる 2 つの α ヘリックスと 1 つの β ターンから構成されるモチーフである(Gaudet, 2000)。この AR の機能的な役割について詳しく分かっていないが、チャネルの機能制御機構に関わっていると予想されている。

TRPA1 の機能解析は、主に哺乳類のヒトとマウスを用いて解析が行われてきた。齧歯類の TRPA1 は、pH、低温(17°C以下)、細胞内 Ca^{2+} 上昇、機械刺激、さらに有害な化学物質によって活性化する侵害刺激センサーとして働いている(Story et al., 2003; Corey et al., 2004; Zurborg et al., 2007; Fujita et al., 2008; Karashima et al., 2009; Camino et al., 2010; Chen et al., 2013; de la Roche et al., 2013)。

TRPA1 を活性化する化学物質であるワサビ由来の辛味物質 AITC やジャスミンの香気成分 carvacrol は、多くの脊椎動物の TRPA1 を活性化することが知られており、TRPA1 の代表的な活性化剤である(Jordt et al., 2004; Bandell et al., 2004; Lee et al., 2008)。植物由来の苦味物質 caffeine は、hTRPA1 を抑制し、mTRPA1 を活性化することが報告されている(Nagatomo et al., 2008, 2010)。緑茶カテキンの渋味成分 EGCG は、当研究室の黒木により、TRPA1 と TRPV1 を発現させた HEK 細胞が応答することが明らかになった。さらに、調製直後の EGCG ではなく、oxi EGCG が応答することが明らかになった(Kurogi et al., 2012, 2015)。また、シグナル分子として働く H_2O_2 は、細胞内に発生すると周囲の生体分子を非特異的に酸化する高反応性の酸化促進性物質である。hTRPA1 を用いた解析から、N 末端の AR 内の Cys が酸化されることによって、TRPA1 が活性化することが報告されている(Andersson et al., 2008; Bessac et al., 2008; Takahashi et al., 2008)。さらに、コンコードブドウに含まれる香気成分の MA は、鳥類忌避剤として使用されている。斎藤らのグループによって、各動物の TRPA1 の MA 応答の解析が行われ、ヒト、マウス、ニワトリの TRPA1 は活性化するが、グリーンアノールトカゲやニシツメガエ

ルの TRPA1 は応答しないことが報告されている(Saito et al., 2014)。

また、阻害剤に関しては、TRP チャネル全般の阻害剤の RR は、ポアドメインの酸性アミノ酸の親和性を低下させ、 Ca^{2+} と Mg^{2+} の透過性を低下させることで抑制することが報告されている(García-Martínez et al., 2000)。一方、TRPA1 阻害剤である HC-030031 はヒト、マウス、ニワトリ、グリーンアノールトカゲの TRPA1 の応答を抑制し、ニシツメガエルの TRPA1 の応答は抑制しないと報告されていた(McNamara et al., 2007; Saito et al., 2012, 2014)。最近、HC-030031 の阻害効果に重要なアミノ酸が 4 番目と 5 番目の膜貫通領域の間に位置する Asn (hTRPA1 の 855 番目)であることが報告された(Gupta et al., 2016) また、AP-18 はヒト、マウスの TRPA1 の応答を抑制するが、グリーンアノールトカゲ、ニシツメガエルの TRPA1 の応答を抑制できない(Petrus et al., 2007; Xiao et al. 2008; Saito et al., 2012, 2014)。また、AP-18 の作用部位は、メンソール結合部位である 5 番目の膜貫通領域に位置する Ser と Thr (mTRPA1 の 876 番目と 877 番目)が重要であると報告されている(Xiao et al., 2008)。阻害剤の効果の種間多様性の研究は、阻害剤が作用する分子メカニズムの解明や TRPA1 分子の構造の理解に役立ち、さらに TRPA1 の阻害剤研究は侵害刺激を抑える、いわゆる鎮痛薬の開発に貢献することが期待されている。

一方、各動物の TRPA1 の解析から、哺乳類のヒトは低温と高温両方に応答性がなく、マウスは低温のみに応答することが報告されていた。しかし、最近、hTRPA1 は温度刺激単独では応答しないが、 H_2O_2 など TRPA1 を活性化する化学物質と温度刺激を同時に行うと、低温と高温両方に応答するようになると報告された(Moparthi et al., 2014, 2016; Miyake et al., 2016)。他の動物については、鳥類のニワトリは 39°C 以上、爬虫類のガラガラヘビは 27°C 以上、爬虫類のグリーンアノールトカゲは 34°C 以上、両生類のニシツメガエルは 39°C 以上、昆虫類のショウジョウバエは 28°C 以上の高温で活性化されることが報告されている(Hamada et al., 2008; Gracheva et al., 2010; Kang et al., 2011; Saito et al., 2012, 2014)。

TRPA1 の温度応答と動物の生理機能との関連については、いくつか報告がある。ガラガラヘビでは、ピット器官と呼ばれる赤外線感知器官の三叉神経に TRPA1 が発現し、獲物の体表温度を検知する機能を担っていると予想されている(Gracheva et al., 2010)。また、 21°C で活性化するカイコの TRPA1 は卵の休眠を決定する分子として関与していることが報告されている(Sato et al., 2014)。

このように、TRPA1 の化学物質と温度に対する感受性が動物種で異なり、多様化し

ていることから、動物種間で見られる外界刺激を受容する感覚の種差は、TRPA1 の機能的な違いが大きく貢献していると考えられる。すなわち、「動物の環境適応や生存戦略に合わせて、TRPA1 の応答性は変化している」と仮説が立てられる。しかし、動物の進化と環境適応に伴い、TRPA1 はどのような応答性の変化を獲得してきたのか、統一的解明には至っていない。また、化学物質に関しては感受性部位の解析が盛んに行われているが、温度感受性部位と温度によるチャネルの活性化機構はいくつか報告があるが(Cordero- Morales et al., 2011; Chen et al., 2013; Jabba et al., 2014)、明確な結論には至っていない。また、侵害受容センサーである TRPA1 が動物の生理機能や環境適応に重要な役割を果たす可能性が高いため、動物の環境適応や種の多様性を理解するためには、TRPA1 の機能的な進化を明らかにする必要がある。しかし、動物の種差に注目した TRPA1 の比較とその分子基盤に焦点をあてた研究は殆ど行われていない。

そこで本研究では、解析がほとんど行われていない脊椎動物の3種の魚類(ゼブラフィッシュ、メダカ、フグ)の TRPA1 の化学物質と温度に対する応答性を mTRPA1 と比較することで、水中に生息する魚類の TRPA1 特有の特徴を明らかにする(第1章)。そして、次に水生動物と陸生動物の両方の特徴を持つ有尾両生類アホロートルの TRPA1 の化学物質や温度に対する応答性を解析し、動物が陸生化に伴って TRPA1 はどのような機能変化を獲得したのか考察する(第2章)。さらに、脊椎動物 TRPA1 の高温感受性の特性の違いを決定している分子基盤を明らかにすることを目的として、水生動物メダカの TRPA1 と陸生動物ガラガラヘビの TRPA1 の間のキメラチャネルの解析によって、高温応答の特性の責任部位の探索を行う(第3章)。そして、これらの研究によって得られた結果を統合して、動物の環境適応(陸生化)と TRPA1 の機能変化について議論する。

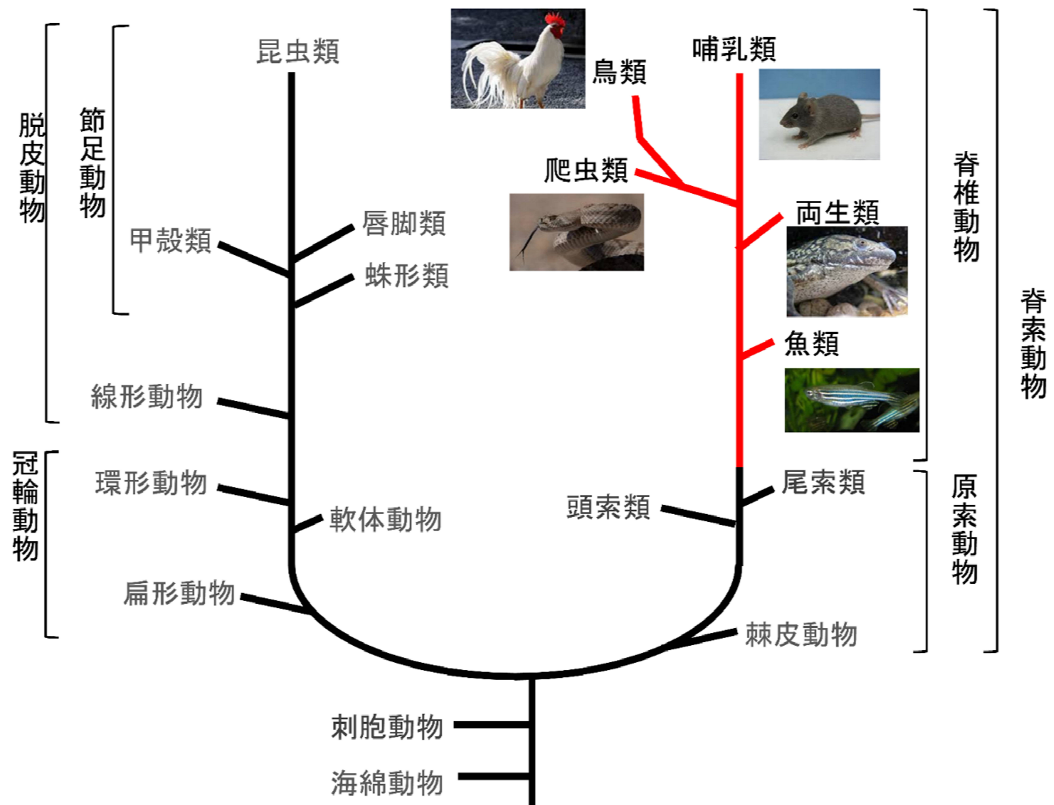


Fig.1 動物の系統

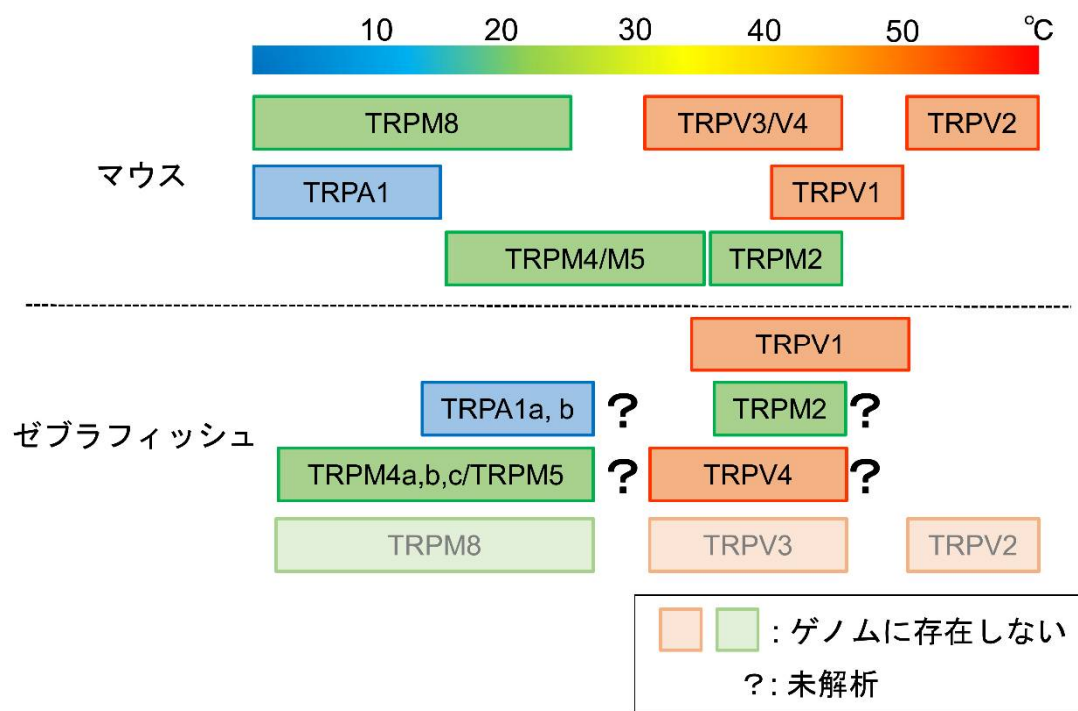


Fig.2 マウスとゼブラフィッシュの温度感受性 TRP チャンネル

マウスとゼブラフィッシュの温度感受性 TRP チャンネルをプロットした(Saito et al., 2015)。解析が行われている TRP チャンネルは、以下の論文(Caterina et al., 1997, 1999; Guler et al., 2002; Peier et al., 2002; Smith et al., 2002; Xu et al., 2002; Story et al., 2003; Talavera et al., 2004; Togashi et al., 2006; Myers et al., 2009; Gracheva et al., 2011; Saito et al., 2011; Ohkita et al., 2012; Saito et al., 2012; Gau et al., 2013) を参考にプロットした。

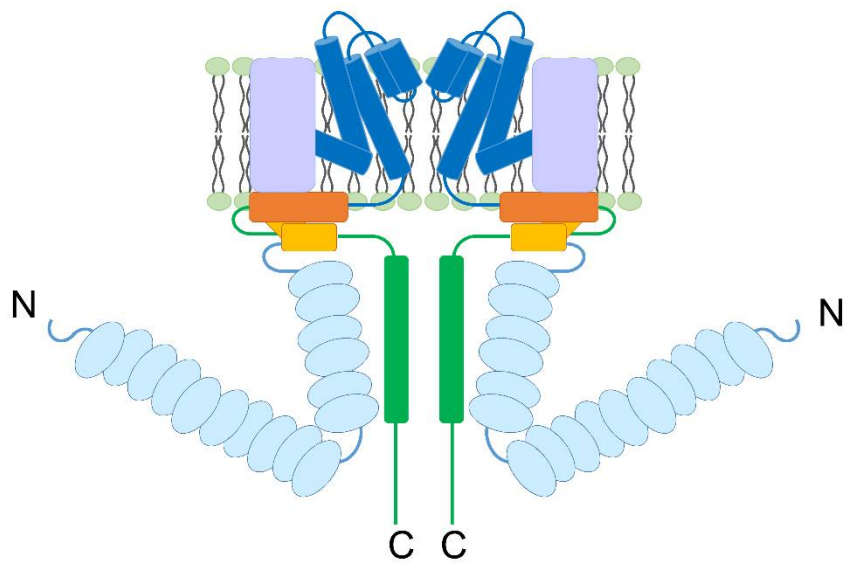


Fig.3 TRPA1 の構造

TRPA1 の立体構造ドメイン(水色 : AR, 黄色 : リンカードメイン, 紫色 : 1-4 番目の膜貫通領域, 青色 : 5 番目と 6 番目の膜貫通領域, オレンジ : TRP ドメイン, 黄緑 : コイルドコイル)は、Brewster et al., 2015 を参考に作成した。

第1章 魚類 TRPA1 の機能解析

緒言

魚類は、基本的に一生の間水中に生息し、鰓呼吸を行い、鰭を用いて移動する。魚類の半分以上を占める真骨魚類は、固く発達した骨格、なめらかな鱗、均整の取れた尾鰭などが特徴で、南極の氷の下から数千メートルの深海、熱帯のジャングルを流れる川に至るまで、あらゆる水域に生息している。よって、多くの魚類は広範囲の温度で生息することができ、例えば、ゼブラフィッシュは 14-35°C に耐性を持っている(Wang et al., 2014)。

では、水中に生息する魚類の持つ侵害刺激センサーの TRPA1 はどのような応答性を持っているのだろうか。詳しい化学物質や温度に対する機能解析は、殆ど行われていない。ゲノム解析から、真骨魚類の TRPA1 は、ゼブラフィッシュに 2 種類(zTRPA1a, zTRPA1b)、フグに 1 種類(pfTRPA1)、メダカに 1 種類(olTRPA1)存在する(Saito et al., 2006, 2015)。

ゼブラフィッシュの TRPA1 は、AITC、cinnamaldehyde といった哺乳類の TRPA1 を活性化するアゴニストに応答することが報告されていた(Prober et al., 2008)。また、*in situ* hybridization による解析によって、幼生で zTRPA1a は迷走神経、zTRPA1b は三叉神経に発現していることから、成体では zTRPA1a は内臓、zTRPA1b は皮膚に発現していると予想されている。また、温度感受性については、個体の行動解析において zTRPA1a と zTRPA1b どちらの KO 個体も温度刺激に対して、野生型と比較して変化が見られないことが報告されていた(Prober et al., 2008)。さらに、zTRPA1a と zTRPA1b 発現 HEK293 細胞を Ca^{2+} イメージング法で解析すると、高温応答性がないと報告されていた(Gracheva et al., 2010)。一方、pfTRPA1 については、一部の化学物質に対する応答性が解析されていたのみであった(Xiao et al., 2008)。olTRPA1 は、全く研究が行われていなかったが、当研究室の八田によって完全長 cDNA が決定され、齊藤によって機能解析が行われた(八田, 卒業論文, 2014; 齊藤, 修士論文, 2017)。

真骨魚類のゲノム上には、哺乳類で低温応答(15-25°C)を担う TRPM8 のオルソログが存在しない(Saito et al., 2006, 2015)。よって、魚類では他の温度感受性 TRP チャネルが低温センサーの機能を果たしていると考えられるが、全く解析が行われていない。

脊椎動物は、約 5 億年前に 2 回にわたってゲノムサイズが倍になる「全ゲノム重複」

が起きている。さらに、真骨魚類は四肢動物に至る系統と分岐した後、約 3 億年前にさらにもう 1 回全ゲノム重複が起きている。その結果、生じた重複遺伝子は、片方が新機能を獲得したり、機能を失ったり、あるいは 2 つの遺伝子の間で機能分担が起きることが知られている(大野, 遺伝子重複による進化, 1977; Force et al., 1999; 佐藤 他, 2009; Inoue et al., 2015)。全ゲノム重複後に出現した真骨魚類のゼブラフィッシュ、メダカ、フグはこの順に分岐し、ゼブラフィッシュは遺伝子重複する遺伝子が多く存在するため、ゲノムサイズが 17 億塩基対と大きいのに対して、その後進化したメダカやフグは、重複した遺伝子の一部が欠失し、ゲノムサイズ(メダカ:8 億塩基対、フグ:4 億塩基対)が小さくなっている(Fig.4) (Aparicio et al., 2002; Kasahara et al., 2007; Howe et al., 2013)。そして、硬骨魚類のモデル生物であるゼブラフィッシュ、メダカ、フグのうち、ゼブラフィッシュのみが 2 種類の TRPA1 を持っており、これらの魚類の間で TRPA1 の化学物質応答性と温度応答性にどのような変化が起きているのか全く明らかにされていない。

そこで、本章では、魚類 TRPA1 の詳しい性質を明らかにし、その性質を決定している分子基盤にアプローチすることを目的とした。魚類 3 種(ゼブラフィッシュ、フグ、メダカ)の TRPA1 が、侵害性の化学物質(AITC, caffeine, oxi EGCG, H_2O_2)に対してどのような濃度で活性化されるのか、TRP チャネル阻害剤によって化学物質に対する応答が抑制されるのか、HEK293T 細胞発現系を用いた Ca^{2+} イメージング法で解析を行った。さらに、それぞれどのような温度で活性化されるのか、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた二本刺し膜電位固定法で解析を行った。これらの解析から、魚類 TRPA1 の応答性と既知の各動物の TRPA1 の応答性と比較することで、魚類特有の特性がみられるのか考察した。また、zTRPA1a と zTRPA1b の間の感受性を決定する部位を探索するために、キメラチャネルを作製し、解析を行った。

材料と方法

1. 材料

AITC [ナカライテスク] Caffeine [Sigma-Aldrich]
(-)-Epigallocatechin-3-gallate [Wako] Hydrogen peroxide (30% H₂O₂) [Wako]
Carvacrol [Wako] MA [Wako]
DMSO [Sigma-Aldrich] TRP チャネル阻害剤: RR [Sigma-Aldrich]
TRPA1 阻害剤:HC-030031, AP-18 [Enzo life sciences]
HBSS [Sigma-Aldrich] Fetal Calf Serum (FCS) [Gibco]
Growth Factor Reduced MATRIGEL ® Matrix (Matrigel) [BD bioscience]
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose [Wako, ナカライテスク]
Collagenase type I [Wako]

2. 実験動物

全ての動物実験は、長浜バイオ大学の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。アフリカツメガエルは、浜松生物教材株式会社から成体のメス個体を購入し、約 20℃の水温で飼育した。

3. 発現プラスミド

mTRPA1 (in Kei ベクター or pBluescript II SK(-))を久保 義弘博士(生理学研究所)、zTRPA1a と zTRPA1b (in pcDNA3)を Dr. David Prober (Harvard University)、pfTRPA1 (in pcDNA3.1(+))を Dr. Ardem Patapoutian (The Scripps Research Institute)から頂いた。

二本刺し膜電位固定法で解析を行うために、zTRPA1a と zTRPA1b (in pcDNA3)を BamHI と EcoRI で切断し、卵母細胞発現用ベクターpGEMHE (アフリカツメガエルの β -globin の 5' と 3' の noncoding sequence を含む)にクローニングした(zTRPA1bは、pGEMHE の NheI の後に XhoI サイトを付加し、エンジニアした pGEMHE-XhoI にクローニングした) (Tytgat et al. 1994)。また、pfTRPA1 (in pcDNA3.1(+))は、EcoRI と XbaI で切断し、pGEMHEにクローニングした。また、Ca²⁺イメージング解析の olTRPA1 は、八田が pcDNA 3.1/Hygro(-)にクローニングしたプラスミドを使用した(八田, 卒業論文, 2014)。また、二本刺し膜電位固定法の olTRPA1 は、齊藤が pGEMHE にクローニングしたプラスミドを

使用した(齊藤, 修士論文, 2017)。

キメラチャネルの発現プラスミドを作製するために、hTRPA1 の 16 個の AR の情報を基に(Gaudet, 2000)、ヒト、マウス、ゼブラフィッシュ a、ゼブラフィッシュ b の TRPA1 のアミノ酸配列を Clustal W を用いてアライメントを行い、AR ごとに区切った(Fig.5, Fig.6)。初めに、N 末端と C 末端の断片をそれぞれ増幅するために、zTRPA1a と zTRPA1b の cDNA を鋳型に、1 段階目の PCR {PCR 条件:94°C 2 分, (98°C 10 秒, 57°C 30 秒, 68°C 3 分)×30, 68°C 5 分, 4°C ∞}を KOD Fx Neo [TOYOBO]を使用して行った。増幅した PCR 産物は、DNA gel Extraction キット [Millipore]を使って、切り出しを行った。その後、この切り出し産物を鋳型に使用して、2 段階目のオーバーラップ PCR を行った。その PCR 産物は、制限酵素で切断後、切り出しを行い、Ca²⁺イメージング解析用のプラスミドは、pcDNA3.1/Hygro(-)または pcDNA3、二本刺し膜電位固定法用のプラスミドは、pGEMHE-XhoI にクローニングした。Ca²⁺イメージング解析に使用した BA と AB は、N 末端の境目①、二本刺し膜電位固定法に使用した BA は、N 末端の境目②で PCR を行った(Fig.5)。

AB、BA、A(10)B、A(5)B は、BamHI を付加した Forward と Reverse プライマーを使用した。B(10)A と B(5)A は、Forward に BamHI、Reverse に EcoRI を付加したプライマーを使用した(制限酵素は下線で示した)。キメラの境目に使用したプライマーは、鋳型と相同な配列を 20 塩基と境目以降の配列を 16 塩基付加したプライマーを設計した。以下に示したプライマーを使用した。

zTRPA1a-Forward:5'-GCGGATCCATGACAAAAAATGACACA-3'

zTRPA1a-Reverse 1: 5'-CGGGATCCCTTAAGTTTTTCCGAAACTGC-3'

zTRPA1a-Reverse 2: 5'-GCGAATTCTTAAGTTTTTCCGAAACTGC-3'

zTRPA1b-Forward: 5'-GCGGATCCATGCAGTTTGGAAAGGAGTT-3'

zTRPA1b-Reverse 1: 5'-TAGGATCCCTCACTTCTTGGCCTTGATTG-3'

zTRPA1b-Reverse 2: 5'-GCGAATTCTCACTTCTTGGCCTTGATTG-3'

AB-Forward:5'-GAAATATTTGGAGATGAAGTGGACGGCATATGGAAG -3'

AB-Reverse:5'-CATATGCCGTCCACTTCATCTCCAAATATTTCTTGC-3'

A(10)B-Forward:5'- GGGCTGTACGCCTCTCCACTACGCCTGCAAGCTTGG-3'

A(10)B-Reverse:5'- GCTTGCAGGCGTAGTGGAGAGGCGTACAGCCCTCAA-3'

A(5)B-Forward:5'- CAGCAGCCCCACTTCACCTGGCTGTACGCGGAGGCAA-3'

A(5)B-Reverse:5'- CTCCGCGTACAGCCAGGTGAAGTGGGCTGCTGCAAG-3'

BA-Forward 1:5'-TGGAAGCAAAGTTCATCTGCTCAATATGACTGTTTATG-3'

BA-Reverse 1:5'-CAGTCATATTGAGCAGATGAACCTTTGCTTCCATATGCC-3'

BA-Forward 2:5'-AAAATACCTGGAGATGAAGTGGAGTGCCTATGGGAT-3'

BA-Reverse 2:5'-CATAGGCACTCCACTTCATCTCCAGGTATTTTCGGC-3'

B(10)A-Forward:5'-AGGCTGCACTCCTCTGCATTACGCCTGCAGACTGGG-3'

B(10)A-Reverse:5'-GTCTGCAGGCGTAATGCAGAGGAGTGCAGCCTTCAA-3'

B(5)A-Forward:5'-AAGCACACCTCTTCATCTGGCTGTGCGTGGAGGAAA-3'

B(5)A-Reverse:5'-CTCCACGCACAGCCAGATGAAGAGGTGTGCTTTTGG-3'

発現プラスミドは、Pure Link™ HiPure plasmid Midi prep kit [Invitrogen]を用いて単離し、機能解析に使用した。

4. Ca²⁺イメージング解析

TRPA1 が発現していない HEK293T 細胞を TRPA1 発現用細胞として使用した。10 cm ディッシュに HEK293T 細胞を起こし、培養(37°C, 5% CO₂)した。培地は、DMEM High Glucose +10% FCS (0.1 µg/ml kanamycin 含む)を使用した。細胞を起こした 1-2 日後に、6 well plate [TPP]に細胞を継代し、翌日、各 TRPA1 の発現プラスミド(0.8 µg)を Effectene transfection reagent [QIAGEN]を使用して、HEK293T 細胞に導入した。トランスフェクションから 4 時間後に、Matrigel コーティングし、DMEM 培地を入れたµ-Slide 8 well [ibidi]にトランスフェクションした細胞をまき、培養した。

µ-Slide 8 well で 16-24 時間培養した細胞を HBSS で洗浄し、HBSS で希釈した 5 µM Fluo8-AM [AAT bioquest]を 150 µl ずつ加え、室温で 30 分間静置した。これを除去後、HBSS で一度洗った後、新たに HBSS 150 µl を加え、室温で 30 分間静置した。アッセイは、計測開始 6 秒後に蛍光顕微鏡(Axiovert200 [Zeiss])上でµ-Slide 8 well の各 well に 2 倍濃度に調製したリガンド溶液を 150 µl 加え、その後の細胞の蛍光(Ex 470/40 nm, Em 525/50 nm)変化を記録した。また、TRPA1 の発現を確認するために、計測開始 120 秒後に、2 倍濃度に調製した AITC (終濃度 200 µM)を 300 µl 加えた。蛍光の撮影は、3 秒おきに 120 秒間、または 180 秒間行った。解析ソフト Image Pro Plus [Media Cybernetics]を用いて、一視野の細胞の中から 10 個の細胞を無作為に選択し、それらの

蛍光量の変化率($\Delta F/F=(F-F_0)/F_0$)を算出し、その平均を求め、時間(秒)を横軸にグラフを作成した。

oxi EGCG を使用する際は、HBSS で作成した 4 mM EGCG を室温で 3-4 時間インキュベーションし、自動酸化したものを使用した。また、 H_2O_2 、carvacrol、MA、HC-030031、AP-18 は DMSO で溶解した 100 mM を使用して、解析に使用したリガンドを調製した。その他のリガンドは、HBSS で調製した。

5. 二本刺し膜電位固定法

解析には、pBluescript II SK(-)に入っている mTRPA1、pGEMHE に入っている zTRPA1a、zTRPA1b、olTRPA1、pfTRPA1、BA のプラスミドを使用した。各プラスミドを制限酵素処理(マウス、ゼブラフィッシュ b、BA は XhoI、ゼブラフィッシュ a、メダカ、フグは Nhe I)で直鎖にし、フェノールクロロホルム処理とエタノール沈殿で精製した。精製した DNA を鋳型として使用し、mTRPA1 は T3 プロモーター、それ以外は T7 プロモーターの mMESSAGE mMACHINE Kit [Ambion]を用いて、cRNA を合成し、塩化リチウム沈殿後、注射用蒸留水 [大塚製薬株式会社]で溶解した。RNA 合成後、DynaBead RNA Easy Measurement N キット [BioDynamics Laboratory]で電気泳動を行い、cRNA の濃度を算出し、100 ng/ μ l になるように希釈した。

30 分間氷冷麻酔したアフリカツメガエルの腹部の皮膚層と筋層をメスで 1-2 cm 切り、卵母細胞を取り出した。その後、カエルは糸付き縫合針で皮膚層と筋層を縫い合わせ、常温の水に戻し、回復させた。取り出した卵母細胞は、Collagenase (2 mg/ml)を溶かした 10 ml の MBSH (88 mM NaCl, 1.1 mM KCl, 2.4 mM $NaHCO_3$, 15 mM HEPES pH 7.6 (NaOH), 0.4 mM $Ca(NO_3)_2$, 0.4 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.8 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 μ g/ml penicillin, 10 μ g/ml streptomycin)を入れたバイアルに入れ、rotary shaker でゆっくり回転させながら、4-5 時間室温でインキュベートした。その後、MBSH で数回洗い、MBSH 入りの 6 cm ディッシュに入れ、17°C で培養した。そして、24 時間以内に cRNA (100 ng/ μ l)を卵母細胞に Nanoject II [Drummond Scientific Company]を用いて、50 nl ずつインジェクションした。インジェクションした卵母細胞は、MBSH を入れた 6 cm ディッシュに入れ、3-5 日間 17°C で培養した。

3-5 日間 17°C で培養した卵母細胞を MBSH からバス溶液(96 mM NaCl, 2 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$, 5 mM HEPES pH 7.4 (NaOH))に移し替え、実体顕微鏡下で 2 本の電極を卵母

細胞に挿入し、Oocyte Clamp OC-725B あるいは OC-725C [Warner Instruments]を使用して、膜電位固定によりチャネルの通過電流とバス内の温度を測定しながら解析を行った。電極は、3 M KCl で満たしたガラス管 [World Precision Instruments]を 0.8~0.2 M Ω の抵抗値で使用した。記録は、-20 mV で膜電位を固定し、1 秒ごとに-80 mV (100 ms) と+40 mV (100 ms)のステップパルスの電圧条件で、活性電流を測定した。データは、Digidata1200 あるいは Digidata 1550 [Axon Instruments]で取得し、pCLAMP software [Axon Instruments]を用いて解析を行った。

温度刺激の解析では、まず氷上で冷やしたバス液を Pipetman Concept C5000 [Gilson] を使って 5 ml バス内に添加し、低温の応答を調べた。その後、室温に戻ってから高温への応答を見るため、チューブ内のバス液を温めながら灌流した(Bipolar Temperature Controller CL-100 と In-line Heater/Cooler SC-20 [Warner Instruments]または ThermoClampTM-1 [AutoMate Scientific])。この条件ではバス内の温度条件は、5℃から 42℃まで変化した。

6. 分子系統樹の作成

MEGA7 を用いて、ML 法で分子系統樹を作成した。Bootstrap Replications は、1000 で行った。NCBI より、アミノ酸配列を取得した。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。

TRPA1

(Human:NP_015628, Mouse:NP_808449, Chicken:BAQ25782, Rattlesnake:ADD82930, *X.tropicalis*:BAM42680, Coelacanth: XP_014342061, Spotted gar: XP_015208897, Zebrafish-a:ACI26674, Zebrafish-b:ACI26673, Pufferfish: XP_003968031, Drosophila:AEU17952) Medaka は、当研究室の八田が決定した配列を使用した(八田, 卒業論文, 2014)。

温度感受性 TRP チャネル

Mouse (TRPV1:NP_001001445.1, TRPV2:NP_035836.2, TRPV3:AAI08985.1, TRPV4:NP_071300.2, TRPM2:NP_612174.2, TRPM4:NP_780339.2, TRPM5:NP_064673.2, TRPM8:NP_599013.1)
Chicken (TRPV1:NP_989903.1, TRPV2:XP_004946742.1, TRPV3:XP_001235155.1, TRPV4:NP_990023.1, TRPM2:XP_015132560.1, TRPM5:XP_003641369.2,

TRPM8:NP_001007083.1)

X. tropicalis (TRPV1:NP_001177322.1, TRPV2:XP_002938302.2, TRPV3:NP_001243218.1, TRPV4a:XP_002932129.1, TRPM2:XP_017952764.1, TRPM4:XP_002934673.1, TRPM8a:NP_001155105.1, TRPM8b: NP_001155106.1)

Zebrafish (TRPV1:XP_005165384.1, TRPV4:NP_001036195.1, TRPM2:NP_001275746.1, TRPM4a:KF305309, TRPM4b1:KF305310, TRPM4b2:KF305311, TRPM4b3: KF305312, TRPM5:NP_001121711.1)

Pufferfish (TRPV1a:XP_011606498.1, TRPV4:XP_003975033.1, TRPM2:XP_011609233.1, TRPM4:XP_011601522.1, TRPM5: XP_011608202.1)

Medaka (TRPM2:XP_011487990.1, TRPM4a:XP_011486369.1, TRPM4b:XP_011476960.1, TRPM5:XP_011485893.1)

Medaka の TRPV1a と TRPV1b は当研究室の安田、TRPV4 は坂元が決定した配列を使用した(安田, 修士論文, 2016; 坂元, 卒業論文, 2017)。

外群として、マウスの Kv1.4 (NP_067250.2)、ショウジョウバエの Kv1.4(CAA29917.1)を使用した。

結果

1. ゼブラフィッシュ TRPA1 の刺激応答性

1-1. zTRPA1a は化学物質感受性が高い

mTRPA1 は、マスタードオイルの辛味成分 AITC、コーヒーの苦味成分 *caffeine*、ハッカの *menthol*、緑茶カテキンの渋味成分 *oxi EGCG*、活性酸素種の H_2O_2 、ジャスミンの香気成分 *carvacrol*、コンコードブドウの香気成分 MA など様々な化学物質によって活性化される(Jordt et al., 2004; Bandell et al., 2004; Bessac et al., 2008; Lee et al., 2008; Nagatomo et al., 2008; Saito et al., 2014; Kurogi et al., 2015)。これに対して、ゼブラフィッシュには、独立した遺伝子座にコードされる 2 種類の TRPA1(zTRPA1a, zTRPA1b)が存在し、AITC や *cinnamaldehyde* に応答することが報告されていた(Prober et al., 2008)。しかし、どの濃度の AITC で活性化するのか、他の化学物質に応答するのかについては、詳しい解析が行われていなかった。そこで、zTRPA1a と zTRPA1b の 4 種類の化学物質(AITC, *caffeine*, *oxi EGCG*, H_2O_2)に対する応答性について、HEK 293T 細胞発現系を用いた Ca^{2+} イメージング法で解析を行った。mTRPA1、zTRPA1a、zTRPA1b の発現プラスミドを、Effectene を用いて HEK293T 細胞に導入し、Fluo8-AM を用いて Ca^{2+} イメージングで解析を行った。

まず、何も発現させていない HEK293T 細胞の 4 種の化学物質に対する応答を確認した。使用した化学物質は、各化学物質の最大濃度(200 μM AITC, 10 mM *caffeine*, 200 μM *oxi EGCG*, 400 μM H_2O_2)を使用した。また、外液に使用している HBSS と H_2O_2 の溶媒に使用した 0.8% DMSO 含有 HBSS についても HEK 細胞の応答性を確認した。結果、HEK293T 細胞は、4 種類の化学物質、HBSS と 0.8 % DMSO 含有 HBSS に有意な応答を示さなかった(Fig.7)。

まず、AITC (0.5 μM , 5 μM , 50 μM , 100 μM)に対する応答性を解析した。結果、mTRPA1 は 0.5 μM から濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} が上昇した。これに対し、zTRPA1a は 0.5 μM には全く応答せず 5 μM から応答したが、zTRPA1b は 100 μM のみに応答した(Fig.8A)。30 秒時点の各濃度の AITC への応答を比較すると、zTRPA1b に比べ、zTRPA1a の感度が高く、応答も大きいことが分かった(Fig.8B)。また、zTRPA1a と zTRPA1b の AITC 応答の違いは、50 μM 付近が最も顕著であることが判明した。

次に、caffeine (1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM)に対する応答性を解析した。結果、mTRPA1 は 1 mM から濃度依存的に応答するのに対して、ゼブラフィッシュの TRPA1 は 1 mM、2.5 mM には全く応答せず、5 mM から応答した(Fig.9A)。90 秒時点の caffeine への応答を比較すると、ゼブラフィッシュの TRPA1 は同程度の応答性を示した(Fig.9B)。

次に、3 時間自動酸化させた EGCG (2 μ M, 20 μ M, 100 μ M, 200 μ M)に対する応答性を解析した。その結果、mTRPA1 は 2 μ M、20 μ M に全く応答せず、100 μ M、200 μ M の順に応答することが確認された(Fig.10A)。これに対し、zTRPA1a は 100 μ M と 200 μ M に応答したが、zTRPA1b はどの濃度にも応答しなかった。117 秒時点の oxi EGCG への応答を比較すると、mTRPA1 と zTRPA1a は oxi EGCG に同程度応答したが、zTRPA1b は oxi EGCG に全く応答性を示さないことが明らかになった(Fig.10B)。

次に、ROS の 1 種である H₂O₂ (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 400 μ M)の応答性を解析した。その結果、mTRPA1 と zTRPA1a は濃度依存的に応答するのに対して、zTRPA1b は高濃度の 400 μ M のみに応答した(Fig.11A)。また、mTRPA1 は 60 秒以内に立ち上がり定常状態に達するのに対し、zTRPA1a は 60 秒前後から応答が始まり、mTRPA1 と zTRPA1a の応答のパターンは大きく異なることが明らかになった。90 秒時点の H₂O₂ への応答を比較すると、zTRPA1a は低濃度の H₂O₂ から応答するのに対し、zTRPA1b は高濃度(400 μ M)の H₂O₂ のみに応答することが示された(Fig.11B)。

以上の結果から、zTRPA1a は zTRPA1b と比較して、4 種の化学物質に感度よく応答し、化学物質応答性が高い傾向が見られた。このことから、zTRPA1a は自然環境下で侵害物質の感知を担っている可能性が高いと考えられた。

1-2. ゼブラフィッシュ TRPA1 の阻害剤の効果は大きく異なる

次に、哺乳類 TRPA1 の阻害剤(TRP チャネルの阻害剤 RR, TRPA1 阻害剤 HC-030031 と AP-18)の抑制効果について検討を行った。各阻害剤存在下で mTRPA1、zTRPA1a、zTRPA1b を発現させた HEK293T 細胞の AITC(mTRPA1 は 50 μ M、ゼブラフィッシュ TRPA1 は 100 μ M)に対する応答がどう変化するのか、Ca²⁺イメージング法で解析を行った。

その結果、TRP チャネル阻害剤の RR を添加すると、いずれの TRPA1 発現 HEK 細胞の AITC 応答も抑制された。また、mTRPA1 は TRPA1 阻害剤の HC-030031 と AP-18

によって AITC 応答が完全になくることが確認された。これに対して、zTRPA1a は HC-030031 と AP-18 によって AITC 応答が完全に抑制された。しかし、zTRPA1b はどちらの阻害剤でも抑制されず、AP-18 によって活性化の傾向が見られた(Fig.12)。AITC 単独の添加では、どの TRPA1 も視野の中で 20~30 個の細胞が応答していた。以上の結果から、TRPA1 阻害剤の効果が zTRPA1a と zTRPA1b の間で大きく異なることが明らかになった。

1-3. zTRPA1a の化学物質感受性は N 末端の AR が重要である

1-1.の結果から、ゼブラフィッシュは、zTRPA1a と zTRPA1b の両方が caffeine に応答すること、oxi EGCG には zTRPA1a のみが応答すること、zTRPA1a と zTRPA1b の間で AITC と H₂O₂ で活性化する濃度が異なることが明らかになり、zTRPA1a は化学物質感受性が高い傾向が見られた。そこで、ゼブラフィッシュの 2 種の TRPA1 の化学物質応答性の違いに責任を持つアミノ酸配列を明らかにするために、AR と膜貫通領域を交換したキメラ(AB, BA)、AR1-10 または AR1-5 を交換したキメラ(A(10)B, A(5)B, B(10)A, B(5)A)を作製し(Fig.6)、化学物質に対する応答がどう変化するか、Ca²⁺イメージングで解析を行った。化学物質は、zTRPA1a と zTRPA1b の間で応答性の違いが見られる 50 μ M AITC、5 mM caffeine、200 μ M oxi EGCG、200 μ M H₂O₂ を使用した。

結果、zTRPA1a の N 末端のすべての AR を zTRPA1b と交換したキメラ BA は、caffeine のみに応答した。すなわち、zTRPA1b と同じ応答性を示した。一方、AR1-10 を zTRPA1b と交換した zTRPA1a のキメラ B(10)A は、AITC と caffeine に応答した。さらに、AR1-5 を zTRPA1b と交換した zTRPA1a のキメラ B(5)A は、すべての化学物質に応答した(Fig.13, Table.1)。

すなわち、

(1)BA は AITC、oxi EGCG、H₂O₂ 応答を失った。

→zTRPA1a の N 末端の 16 個の AR に、AITC、oxi EGCG、H₂O₂ 応答に重要な部位が存在する。

(2)B(10)A は caffeine 以外に AITC に応答した。

→zTRPA1a の AR11-16 に AITC 応答に重要な部位が存在する。

(3)B(5)A は AITC、oxi EGCG、H₂O₂ に応答した。

→zTRPA1a の AR6-10 に oxi EGCG と H₂O₂ 応答に重要な残基が存在する。

しかし、zTRPA1a と各長さの AR を交換した zTRPA1b キメラ(AB, A(10)B, A(5)B)は、いずれも *caffeine* のみに応答し、AITC、oxi EGCG、H₂O₂ への応答性を獲得しなかった。

以上のことから、zTRPA1a の N 末端の AR6-10 に oxi EGCG と H₂O₂ 応答、そして AR11-16 に AITC 応答に重要な部位が存在することが示唆された(Fig.14)。しかし、zTRPA1a の N 末端単独では、zTRPA1b に化学物質応答性を付与することができなかったことから、AR 以外に膜貫通領域または C 末端領域の寄与も考えられ、AR とこれら構造ドメイン両方の存在が大きく貢献していると示唆された(Fig.13, Table.1)。

1-4. zTRPA1b は低温と高温両方で活性化される

これまでの研究から、げっ歯類の TRPA1 は低温、鳥類や爬虫類、両生類の TRPA1 は高温で活性化されることが報告されている。一方、2008 年の Prober らの報告では、個体の行動解析と Ca²⁺イメージングの解析から、zTRPA1a と zTRPA1b は温度感知に寄与していないことが報告されていた(Gracheva et al., 2010; Prober et al., 2008)。そこで、ゼブラフィッシュの 2 種類の TRPA1 は、本当に温度に応答しないのか調べるため、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた二本刺し膜電位固定法による電気生理学的解析を行った。まず、mTRPA1、zTRPA1a、zTRPA1b の cRNA を合成し、カエル卵母細胞にインジェクションし、発現させた。そして、卵母細胞を低温(～5℃)と高温(～42℃)両方の温度で刺激し、二本刺し膜電位固定法で通過電流を解析した。

結果、陰性コントロールの non injection は、低温と高温どちらにも応答せず、mTRPA1 は低温に応答し、高温に応答しないという従来知見が再現された。そして、zTRPA1a は低温と高温両方に応答しなかった。興味深いことに、zTRPA1b は低温と高温の両方に応答することが明らかになった(Fig.15A)。いずれのグラフからも明らかのように zTRPA1b は、これまで全く報告されていない低温と高温の両方で活性化される、新しいタイプの TRP チャネルであることが判明した(Fig.15B, C, D)。次に、アレニウスプロットを作成し、温度応答を詳しく解析した。アレニウスプロットは、横軸が絶対温度の逆数、縦軸が活性電流を対数で示したものであり、屈曲点の活性化前と活性化後のプロットに近似直線を引き、その両直線の交点から「活性化温度閾値」を決定することができる。横軸の数値が小さいほど温かい温度、数値が大きいほど低い温度を示している。Fig.15E に示した mTRPA1 は、低温側の交点は 3.49 となり、活性

化温度閾値は 13.53°Cであった。また、Fig.15F に示した zTRPA1b は、低温側の交点は 3.53 なので、活性化温度閾値は 10.29°Cであった。同じバッチ内の活性化温度閾値の平均は、mTRPA1 が $14.4 \pm 0.8^\circ\text{C}$ (n=3)、zTRPA1b は $10.9 \pm 0.7^\circ\text{C}$ (n=7)であった。一方、zTRPA1b の高温側は、屈曲点がなく、一直線になっており、温度閾値を決定できなかった。すなわち、zTRPA1b は低温側では 10°C以下で活性化し、高温側は明確な温度閾値がなく、室温から徐々に高温で活性化する特性であることが明らかになった。

一方、一連の解析において、non injection の低温応答が 16 バッチ中 5 バッチ、高温応答が 17 バッチ中 1 バッチで観察された(Table.2)。non injection と比較して、zTRPA1b の低温応答が有意であると判断された最小の電流が 5.4 μA 、また non injection と比較して、高温応答が有意であると判断された最小の電流が 0.71 μA であった。このことから、低温で 6 μA 以上、高温で 2 μA 以上の活性電流が検出された場合、卵母細胞の内在性の応答と判断し、実験群と比較できないと考えられた。よって、non injection の低温応答が +40 mV で 6 μA 以上、高温応答が +40 mV で 2 μA 以上出たバッチは、解析から除外した。複数回解析を行った結果、zTRPA1b の低温応答はコントロールと比較して 11 バッチ中 5 バッチで有意な応答が観察された(Table.2)。また、高温応答はコントロールと比較して 15 バッチ中 6 バッチで有意な応答が観察された(Table.2)。

以上の結果から、zTRPA1b は低温と高温両方に応答することから、温度応答性が高い傾向が見られた。

1-5. zTRPA1b の温度感受性には N 末端の AR が重要である

1-4.の実験から、zTRPA1a は低温と高温両方に応答せず、zTRPA1b は低温と高温両方に応答することが明らかになった。そこで、TRPA1 の分子構造のどの部分が温度感受性に重要であるか解析することにした。mTRPA1、zTRPA1a、zTRPA1b、zTRPA1a の N 末端(AR1-16)を zTRPA1b と交換したキメラ BA (Fig.6)の cRNA を卵母細胞に注入し、発現させた。そして、卵母細胞を低温と高温で刺激し、二本刺し膜電位固定法で解析した。

その結果、non injection は低温に少し応答した。zTRPA1a は低温と高温両方に応答しなかったが、zTRPA1b は低温と高温両方に大きく応答した。そして、BA キメラも低温と高温両方に応答した(Fig.16A)。また、ピークの活性電流の平均を見ると、zTRPA1a と比較して、BA は低温と高温に対して有意に応答していることが明らかに

なった(Fig.16B, C)。しかし、BA の低温応答の活性電流は zTRPA1b と同程度であったが、BA の高温応答の活性電流は zTRPA1b よりも小さかった。以上の結果から、zTRPA1b の温度感受性は N 末端が重要であること、しかし高温応答には N 末端のみでは不十分であることが示唆された。

2. フグ TRPA1 の刺激応答性

2-1. pfTRPA1 の化学物質感受性は zTRPA1a と zTRPA1b の中間的な応答性を示す

次に、他の魚類 TRPA1 の化学物質感受性はゼブラフィッシュの TRPA1 と同様の応答性を示すのか検討するために、pfTRPA1 の化学物質感受性を検討した。pfTRPA1 の化学物質応答性については、AITC に応答し、Menthol には応答しないことが報告されていた(Xiao et al., 2008)。そこで、pfTRPA1 の AITC、caffeine、oxi EGCG、H₂O₂、carvacrol、MA の 6 種類の化学物質に対する応答性について、HEK 293T 細胞発現系を用いた Ca²⁺イメージング法により解析を行った。

まず、AITC に対して、pfTRPA1 の応答は 50 μ M から検出され、zTRPA1a と同じ濃度から応答することが明らかになった。また、caffeine に対して、pfTRPA1 は 1 mM、2.5 mM には全く応答せず、5 mM から応答し、ゼブラフィッシュの 2 種の TRPA1 とほぼ同様の応答性であった。次に、oxi EGCG に対して、pfTRPA1 はどの濃度の oxi EGCG にも応答しなかった。また、H₂O₂ に対して、pfTRPA1 は 200 μ M から応答し、zTRPA1a と zTRPA1b が活性化する中間の濃度で活性化することが明らかになった。また、carvacrol と MA に対して、pfTRPA1 は高濃度のみに応答した(Fig.17A)。以上の解析から、pfTRPA1 の化学物質応答性は、zTRPA1a と zTRPA1b の中間的な応答性を示した。

次に、哺乳類 TRPA1 の阻害剤(TRP チャネルの阻害剤 RR, TRPA1 阻害剤である HC-030031 と AP-18)の pfTRPA1 の抑制効果について検討を行った。各阻害剤存在下で AITC に対する応答がどう変化するか、Ca²⁺イメージング法で解析を行った。結果、TRP チャネル阻害剤の RR を添加すると、pfTRPA1 発現 HEK 細胞の AITC 応答は完全に抑制した。また、HC-030031 添加により pfTRPA1 の AITC 応答は完全に抑制したが、AP-18 は部分的に抑制した(Fig.17B, C)。

2-2. pfTRPA1 は低温と高温両方の温度感受性を示す

pfTRPA1 の温度応答の解析は全く行われていない。そこで、pfTRPA1 は温度感受性があるのか、どのような温度で活性化するのか、カエル卵母細胞発現系を用いた二本刺し膜電位固定法で解析を行った。

non injection は、低温と高温どちらでも応答が検出されなかった。一方、pfTRPA1 を発現させた卵母細胞は、低温と高温両方に応答した(Fig.18A)。低温のピークと高温(37°C)の活性電流の平均、電流と温度のグラフのいずれから、pfTRPA1 は低温と高温両方で活性化されるチャネルであることが判明した(Fig.18B, C, D)。また、アレニウスプロットを用いて活性化温度閾値を決定すると、低温側は交点が 3.55 なので 8.69°C、高温側は屈曲点がなかったため、温度閾値を決定することができなかった(Fig.18E)。同バッチ内の pfTRPA1 の活性化温度閾値の平均は、 $7.91 \pm 0.51^{\circ}\text{C}$ (n=8)であった。すなわち、pfTRPA1 は低温側では 8°C 以下で活性化され、高温側では明確な温度閾値がなく、室温から徐々に高温で活性化される特性であることが明らかになった。

カエル卵母細胞発現系を用いた pfTRPA1 の温度応答性について、複数回解析を行った結果、non injection で 6 μA 以上の低温応答が 16 バッチ中 4 バッチ、2 μA 以上の高温応答が 16 バッチ中 1 バッチで観察され、それらのバッチは解析から除外した(Table.3)。また、pfTRPA1 の有意な低温応答は、10 バッチ中 6 バッチ、有意な高温応答は 15 バッチ中 7 バッチ観察された(Table.3)。

以上の結果から、pfTRPA1 は低温と高温両方の温度応答性を示すチャネルであり、zTRPA1b と同様の温度応答性であることが明らかになった。

3. メダカ TRPA1 の刺激応答性

3-1. olTRPA1 は H_2O_2 に応答しない

ゼブラフィッシュとフグの TRPA1 の解析結果から、魚類 TRPA1 の化学物質応答性がゼブラフィッシュとフグの間で大きく異なることが明らかになった。そこで、進化的にゼブラフィッシュとフグの間に位置すると考えられるメダカの TRPA1 の化学物質応答性は、どのような応答性を示すのか、そして魚類の間で応答性がどのように異なるのか検討することにした。olTRPA1 は、完全長 cDNA が決定されておらず、クローニングが行われていなかったが、当研究室の八田により完全長 cDNA の決定とクローニングが行われ、齊藤によって二本刺し膜電位固定法を用いて化学物質と温度に

に対する応答性が解析された(八田, 卒業論文, 2014; 齊藤, 修士論文, 2017)。齊藤の解析の結果、olTRPA1 の AITC、carvacrol に対する応答性は mTRPA1 と同程度であったが、caffeine に対する応答性は低く、MA に対する感受性は高い傾向がみられた。本研究では、前述のゼブラフィッシュとメダカの TRPA1 の化学物質応答性を比較するために、HEK 293T 細胞発現系を用いた Ca^{2+} イメージング法により、olTRPA1 の AITC、caffeine、oxi EGCG、 H_2O_2 の 4 種類の化学物質に対する応答性について解析を行った。

まず、AITC に対する応答性を解析した。結果、olTRPA1 の AITC 応答は 50 μM から検出され、zTRPA1a と pfTRPA1 と同様の濃度依存性であった。次に、caffeine に対する応答性を解析した結果、olTRPA1 は他の魚類 TRPA1 と同様の 5 mM から応答することが明らかになった。さらに、oxi EGCG と H_2O_2 に対する応答性を解析した結果、olTRPA1 は oxi EGCG と H_2O_2 のどちらにも応答性を示さなかった(Fig.19)。以上の結果から、olTRPA1 の AITC や caffeine に対する応答性は、他の魚類 TRPA1 と同様であったが、 H_2O_2 に対する応答性は他の魚類 TRPA1 と異なることが明らかになった。また、実験方法は異なるが、齊藤の解析と本解析の結果を比較すると、AITC 応答性は両解析とも 50 μM から応答し、同様の結果であった。しかし、caffeine 応答性は齊藤の解析では 2.5mM から応答するのに対して、本解析では 5 mM から応答し、両解析の結果が少し異なることが分かった。

阻害剤の効果については、齊藤が二本刺し膜電位固定法の解析により、TRPA1 阻害剤の HC-030031 で応答が抑制されないことが明らかになっている(齊藤, 修士論文, 2017)。3 種の魚類 TRPA1 の阻害剤の効果の結果をまとめると、TRP チャネル阻害剤の RR は魚類 TRPA1 すべてを抑制できたが、TRPA1 阻害剤の HC-030031 と AP-18 の効果は、魚類 TRPA1 の間で大きく異なることが明らかになった(Table.4)。

3-2. メダカ TRPA1 は高温のみで活性化される

前述のゼブラフィッシュとフグの TRPA1 に温度に対する応答解析の結果から、zTRPA1b と pfTRPA1 は低温と高温両方に応答し、高温応答は閾値がなく徐々に活性化する性質であることが明らかになった。そこで、魚類の TRPA1 の温度応答性を比較するために、olTRPA1 の温度応答性について、二本刺し膜電位固定法を用いて解析した。

non injection は、低温と高温どちらにも応答しなかった。これに対し、olTRPA1 は低温に応答せず、高温にのみ応答した(Fig.20A)。低温と高温のピークの活性電流の平均を比較すると、olTRPA1 は高温のみで活性化されるチャネルであることが判明し、再現を得ることができた(Fig.20B, C, D)。また、アレニウスプロットを作成して解析すると、高温側はなだらかに上昇し、屈曲点がなかったため、温度閾値を決定することができなかった(Fig.20E)。すなわち、olTRPA1 は低温感受性がなく、高温側は他の魚類TRPA1 と同様に、明確な温度閾値がなく、25°Cから徐々に高温で活性化される特性であることが明らかになった。この結果については、当研究室の齊藤が行った結果と一致した(齊藤, 修士論文, 2017)。

考察

1. 魚類 TRPA1 の化学物質応答性

魚類 TRPA1 の化学物質に対する応答性をまとめると、zTRPA1a は 4 種の化学物質 (AITC, caffeine, oxi EGCG, H₂O₂) すべてに低濃度から応答し、魚類 TRPA1 の中で最も化学物質に対する応答性が高い傾向が見られた (Table.4)。AITC に対して、zTRPA1a は 5 μ M、zTRPA1b は 100 μ M から応答した。一方、その後分岐したメダカとフグの TRPA1 は 50 μ M から応答し、メダカとフグ TRPA1 の AITC 応答性は zTRPA1a と zTRPA1b の中間的な濃度で活性化する傾向がみられた。また、caffeine に対して、mTRPA1 は 1 mM から応答するのに対して、4 種の魚類 TRPA1 は 5 mM から応答し、魚類 TRPA1 の caffeine 応答性は低い傾向がみられた。また、oxi EGCG に対して、zTRPA1a のみが応答した。脊椎動物 TRPA1 の oxi EGCG 応答は zTRPA1a 以外に、解析が行われた動物種の中で、ヒトとマウスが応答することが報告されている (Kurogi et al., 2015)。全ゲノム重複によって生じた重複遺伝子は、機能損失、機能分担、新機能獲得することが考えられる (Force et al., 1999)。よって、魚類の TRPA1 の中で zTRPA1a のみ oxi EGCG に応答するのは、全ゲノム重複によって獲得した新機能ではないかと考えられる。また、H₂O₂ に対して zTRPA1a は 100 μ M、zTRPA1b は 400 μ M、pfTRPA1 は 200 μ M、olTRPA1 はどの濃度にも応答しなかった。以上のことから、魚類 TRPA1 の化学物質応答性の中で、最も応答性が異なったのは H₂O₂ であった。哺乳類で、H₂O₂ に応答する TRP チャネルは、TRPA1 の他に、脳、心臓、肺で TRPA1 と共発現している TRPM2 や TRPM7、TRPC5 が挙げられる (沼田 他, 2009; Kashio et al., 2012)。よって、メダカは TRPA1 ではなく、他の TRP チャネルが H₂O₂ 応答を担っている可能性が考えられる。また、魚類 TRPA1 が応答する化学物質のレパートリーは少なく、動物が陸上生活するようになり、食性や生理機能が変化したことで、新規物質の応答性を獲得していった可能性が示唆された。

これまでの各脊椎動物の TRPA1 の解析から、体にダメージを与える刺激を感知する能力はどの動物でも必須であり、侵害刺激センサーの TRPA1 は脊椎動物の祖先から有害性化学物質の感受性を維持してきたと考えられている。ゼブラフィッシュでは、内臓に発現すると考えられている zTRPA1a (Prober et al., 2008) が化学物質応答に特化し、侵害性の化学物質を感知するセンサーとして働き、体表に発現する zTRPA1b (Prober et al., 2008) が温度応答に特化し、侵害温度センサーとして機能していると考えられた。この

ことは、温度は体表で感じることで、化学成分は体内でできたあるいは体内に侵入したものを感知することが重要であることを意味しているのかもしれない。それでは、他の魚類では1つのTRPA1分子が内臓と体表に発現し、両方の侵害刺激を受容しているのだろうか。メダカとフグにおいては、ゼブラフィッシュほど十分な発現解析ができていないため、その詳細を知ることはできない。魚類の侵害刺激センサーTRPA1の生体における機能を考える上で、重要なポイントであると考えられる。

阻害剤については、HC-030031の効果はzTRPA1aとpfTRPA1のみで見られ、AP-18はzTRPA1aを完全に抑制し、pfTRPA1に部分抑制の効果が見られた。以上の結果から、魚類TRPA1の間の阻害剤の効果が大きく異なることが明らかになった(Table.4)。AP-18の抑制効果に重要な残基は、哺乳類TRPA1の5番目の膜貫通領域にあるSerとThr(mTRPA1の876番目と877番目)であることが報告されている(Xiao et al., 2008)。魚類TRPA1のアミノ酸を見ると、zTRPA1aのその部位のアミノ酸はどちらもIle、zTRPA1bではIleとMet、olTRPA1はIleとVal、pfTRPA1はどちらもValであった(Fig.5)。魚類TRPA1では、AP-18の効果をこの部位のアミノ酸では説明できないことが分かった。また、HC-030031は、hTRPA1の4番目と5番目の膜貫通領域の間にある855番目のAsnとHC-030031が水素結合することでチャネルを抑制することが報告されている(Gupta et al., 2016)。さらに、zTRPA1bのHC-030031による抑制効果はなく、前述の作用部位のアミノ酸を見ると、その部位がArgであった。実際に、hTRPA1の855番目のAsnをArg(zTRPA1b型)に変異させると、HC-030031の抑制効果が有意になくなり、zTRPA1bの860番目のArgをAsn(hTRPA1型)に変異させると、HC-030031の抑制効果が見られると報告されている(Gupta et al., 2016)。この部位のアミノ酸を見ると、zTRPA1aはArg、pfTRPA1はGly、olTRPA1はAsnであった(Fig.5)。本研究の解析で、zTRPA1aとpfTRPA1はHC-030031によって抑制されたが、pfTRPA1はGuptaらによって報告されたアミノ酸ではなかった。また、olTRPA1はAsnであるにもかかわらず、HC-030031で阻害されない。よって、魚類TRPA1のAP-18とHC-030031の作用部位は、哺乳類TRPA1と異なる部位にある他のアミノ酸が標的である可能性が高いと考えられ、リガンド結合様式や活性化様式など構造上の違いを示唆しているのかもしれない。

2. 魚類TRPA1の温度応答性

卵母細胞発現系を用いた温度応答性の解析から、zTRPA1a は温度応答性がなく、zTRPA1b は低温と高温両方の温度で活性化することが分かった(Table.)。そのため、zTRPA1b は化学物質応答性が低く、温度応答に特化していると考えられた。このzTRPA1b は、成体で皮膚に発現していると考えられており(Prober et al., 2008)、20-30°C で生育するゼブラフィッシュにとって侵害となる温度を zTRPA1b が感知していると考えられる。しかし、ゼブラフィッシュ TRPA1 の発現解析は、後期胚を用いた *in situ* hybridization の結果に基づき、それぞれ内臓と皮膚に発現していると推測されているため、成体で 2 種類のゼブラフィッシュ TRPA1 がどこに発現しているのかは調べられていない。考察 1 でも述べたように、今後特異的な抗体を作製し、ゼブラフィッシュの成体の各組織における発現解析を行い、機能と発現に相関関係があるのか検討する必要がある。

最近まで、温度感受性 TRP チャンネルの中で、低温と高温両方に応答する性質を持つものは報告されていなかった。しかし、最近 hTRPA1 が特定の条件下で、低温と高温両方に応答性を示すことが明らかになった(Moparthi et al., 2016)。よって、脊椎動物の祖先が持つ TRPA1 は低温と高温両方の応答性を持っていた可能性を示唆しているかもしれない。一方、ゼブラフィッシュの後に分岐したメダカの TRPA1 は、高温にのみ応答し、さらにその後分岐したフグの TRPA1 は低温と高温両方に応答した(Table.4)。

また、高温応答性は一貫して 3 種の間で保存されており、魚類 TRPA1 の高温応答は、閾値がなく、25°C から徐々に活性化する特性であることが分かった。これまでに、報告されているニワトリ、ガラガラヘビ、ニシツメガエルなどの高温に応答する脊椎動物の TRPA1 は、温度閾値が明確に決められているのに対して(Gracheva et al., 2010; Saito et al., 2012, 2014)、いずれの魚類 TRPA1 も徐々に高温で活性化するという特性を持っていた。この特性は全く新しいものではなく、温度感受性 TRP チャンネルの 1 つである TRPM5 の高温応答性と類似している(Talavera et al., 2005)。哺乳類の TRPM5 は、15°C から 35°C の範囲でゆっくりと活性化し、アレニウスプロットの解析から活性化温度閾値を決定することができない。すなわち、魚類 TRPA1 は、高温感受性を示す他の脊椎動物 TRPA1 とは異なり、哺乳類の TRPM5 に似たユニークな高温応答の特性を持っていると考えられる。

3. ゼブラフィッシュ TRPA1 の化学物質と温度の感受性部位

キメラの解析から、ゼブラフィッシュはそれぞれの N 末端の AR が化学物質と温度の感受性に重要であることが示唆された。よって、魚類 TRPA1 の特徴である閾値のない高温感受性の特性は、N 末端の AR が重要な機能を持っており、この部位の違いが陸上動物と魚類 TRPA1 の高温応答の特性の違いに重要であると考えられる。

化学物質の感受性部位について、哺乳類 TRPA1 の AITC と H_2O_2 の感受性部位は、N 末端の AR にある 5 つの Cys が重要であると報告されている(Hinman et al., 2006; Macpherson et al., 2007; Takahashi et al., 2008, 2011)。この Cys が魚類 TRPA1 で保存されているかどうか配列を見ると、5 つのうち 4 つの Cys が保存されていた(Fig.5)。また、BA、B(10)A、B(5)A のキメラの解析から、zTRPA1a と zTRPA1b の化学物質応答性の違いは、AITC が AR11-16、oxi EGCG と H_2O_2 が AR6-10 の間に重要な感受性部位があると考えられた。求電子性の試薬である AITC は、Cys に共有結合修飾することで TRPA1 を活性化する(Hinman et al., 2006; Macpherson et al., 2007)。一方、 H_2O_2 は Cys を酸化することで、TRPA1 を活性化すると報告されている(Takahashi et al., 2008, 2011)。実際に、各 TRPA1 の Cys の総数の半分以上は N 末端にある。そこで、AR11-16 の範囲で、zTRPA1a が Cys で zTRPA1b は違うアミノ酸の部位を探してみたところ、zTRPA1a の AR16 付近にある 648 番目と 701 番目の Cys が zTRPA1b では Ser であったことから、この部位が zTRPA1a と zTRPA1b の間で応答の違いが出る AITC 感受性部位ではないかと考えられた(Fig.5, 13)。また、 H_2O_2 について AR6~10 の範囲で、zTRPA1a が Cys で zTRPA1b は違うアミノ酸の部位を探してみたところ、zTRPA1a の AR6 にある 268 番目、AR7 にある 297 番目、AR10 にある 374 番目の Cys が見つかった(Fig.5, 13)。これらの部位が zTRPA1a と zTRPA1b の間で応答の違いが出る H_2O_2 感受性部位ではないかと考えられた。このアミノ酸置換を起こした変異体を作製し、その解析から zTRPA1a の AITC と H_2O_2 の感受性部位の決定ができると期待される。

caffeine については、ヒトとマウスの間で、抑制と活性化が切り替わるアミノ酸が報告されているが、明確な活性化にかかわる部位については報告されていない。また、zTRPA1a と TRPA1b の caffeine 応答性は違いが見られないことから、今回の結果からどの部位が活性化部位なのかアプローチすることは難しい。oxi EGCG については、これまでの研究から脊椎動物間でヒト、マウス、ゼブラフィッシュ a の TRPA1 のみが応答し、ニワトリ、ガラガラヘビ、ニシツメガエルの TRPA1 は応答しないことが明らかになっている。また、マウスとニワトリ TRPA1 の N 末端の AR と C 末端の膜貫通領域を

交換したキメラの解析から、この oxi EGCG 応答の違いは膜貫通領域が重要であると示唆されている(Kurogi et al., 2015)。しかし、zTRPA1a と zTRPA1b の oxi EGCG の応答の違いは、AR 領域の交換で変化したことから、zTRPA1a の oxi EGCG 応答には、mTRPA1 とは異なる作用メカニズムの存在が示唆された。

また、zTRPA1b の N 末端を zTRPA1a に交換したキメラである AB、A(5)B、A(10)B の解析結果は、zTRPA1b の AR を交換したキメラの結果と相関が見られなかった。よって、化学物質応答には AR と膜貫通領域または C 末端領域どちらかの構造ドメインの両方の存在が必要であることが示唆された。よって、どのような構造変化が TRPA1 チャネルを活性化する要因となっているかの詳細について、立体構造解析を用いた研究が必要であると思われる。

温度感受性部位については、zTRPA1b の温度感受性には N 末端が重要であること、しかし高温応答には N 末端のみでは不十分であることが示唆された。これまでに、TRPA1 の温度感受性部位について、いくつか報告がある。1 つは、ヒトとマウスの低温応答の違いは、5 番目の膜貫通領域に位置する 1 つのアミノ酸(hTRPA1 の 875 番目の Val が不活性化、mTRPA1 の 878 番目の Gly が活性化)が重要であると報告されている。実際に、mTRPA1 の Gly を Val に変異させると、低温に対する応答性を失ったことから、この部位が低温応答に重要であると考えられている(Chen et al., 2013)。この部位について魚類で見ると、zTRPA1a と zTRPA1b は Val、pfTRPA1 は Leu、olTRPA1 は Met であった(Fig.5)。以上のことから、魚類 TRPA1 の低温感受性部位は、哺乳類 TRPA1 と異なる部位に感受性部位があると考えられる。また、最近 hTRPA1 はあるメカニズムで低温に応答することが報告された(Takahashi et al., 2011; Miyake et al., 2016)。通常、hTRPA1 の 10 番目の AR に位置する 394 番目の Pro は、プロリン水酸化酵素によって抑制されているため、低温刺激を行っても応答しない。しかし、Pro の水酸化がなくなると過酸化水素に敏感に反応するようになり、さらに低温刺激にも応答するようになると報告された(Miyake et al., 2016)。このメカニズムに重要である Pro が zTRPA1b と pfTRPA1 で保存されているか見てみると、両方とも Glu であったため、ヒトと魚類の TRPA1 の低温応答のメカニズムは異なると思われる(Fig.5)。

また、ヒトとガラガラヘビの間のキメラの解析から、ガラガラヘビの高温感受性は N 末端の AR が重要であることが報告されているが、どの AR が高温応答に寄与しているのかははっきり明らかになっていない (Cordero-Moreles et al., 2011)。高温応答の仕方も

異なるので、zTRPA1b のどの AR が温度応答に重要であるのかについては、AR を区切ったキメラ B(10)A や B(5)A を用いた詳細な解析が必要である。

また、zTRPA1b の高温応答は N 末端の交換で不十分だった原因として、N 末端以外に C 末端または膜貫通領域のポアドメインが高温応答に寄与している可能性が考えられる。実際に、哺乳類の温度感受性 TRP チャネルの TRPV1、TRPV3、TRPM8 の温度感受性はポアドメインまたは C 末端領域が重要であることが報告されている(Brauchi et al., 2006; Grandl et al., 2008; Yang et al., 2010)。さらに、TRPA1 の立体構造解析から、TRPA1 の C 末端はコイルドコイルを持ち、4 量体を形成する際に他のサブユニットのコイルドコイルと相互作用していると報告されている(Paulsen et al., 2015)。よって、C 末端のコイルドコイルが高温応答に寄与している可能性が高いため、zTRPA1b の C 末端のみを zTRPA1a と交換したキメラを作製し、zTRPA1b と同程度の高温応答を示すのか解析する必要があるだろう。

4. 魚類の進化と TRPA1 の刺激応答性

本研究の結果から、内臓に発現する zTRPA1a は化学物質、皮膚に発現する zTRPA1b は温度応答に特化し、フグとメダカの TRPA1 は zTRPA1a と zTRPA1b の両方の応答性を示すことが明らかになった。以上のことから、全ゲノム重複によってゼブラフィッシュの TRPA1 は 2 つになり、1 つの TRPA1 で機能していた化学物質感受性と温度感受性を zTRPA1a と zTRPA1b で機能を分担していると考えられる。その後、分岐したフグとメダカの TRPA1 は、重複した遺伝子が整理されたことで、1 つの TRPA1 で化学物質と温度両方の感受性を持つ遺伝子になったと考えられる(Fig.4)。また、魚類の TRPA1 を系統樹で詳しく見ると、最初に分岐した zTRPA1a が魚類 TRPA1 の祖先遺伝子に一番近いと考えられる(Fig.21A)。そして、温度応答を担う zTRPA1b はその後化学物質応答性を獲得し、その後分岐したフグとメダカは zTRPA1b 由来の TRPA1 を持ち、zTRPA1a 由来の遺伝子は損失したと考えられる。一方、化学物質応答性については同じ魚類でも異なる点が多いことから、TRP チャネルは環境や食性に適応するために、機能変化や新機能の獲得が起きていると考えられる。

また、どの動物から TRPA1 の高温応答の特性は変化したのだろうか。陸上進出や肺の獲得と TRPA1 の機能変化を考えると、四肢動物の系統に分岐した後に出現する肺魚やシーラカンスは、どのような TRPA1 を持っているのだろうか(Fig.21A)。これらの

TRPA1 のクローニングと機能解析は、上記の問題を解決するために興味深い研究である。さらに、脊椎動物の祖先に最も近い無顎類(ヤツメウナギ)や3回目の全ゲノム重複が起きる前に分岐したスポッテドガーの TRPA1 はどのような機能を持っているのか(Fig.21A)。魚類全体の TRPA1 の刺激応答性の多様性と進化を考察するためには、生育環境の違う魚類の比較や進化的に異なる段階で出現した魚類の比較解析が必要になってくるだろう。

5. 魚類の温度感受性 TRP チャンネル

温度感受性 TRP チャンネルのレパートリーは、哺乳類(TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM2, TRPM4, TRPM5, TRPM8, TRPA1)とゼブラフィッシュ(TRPV1, TRPV4, TRPM2, 3つの TRPM4, TRPM5, 2つの TRPA1)の間で異なっている。哺乳類の9種類の温度感受性 TRP チャンネルのうち、ゼブラフィッシュは3遺伝子が欠如し、異なる構成の9個のチャンネルで温度を感知していると考えられる(Fig.2, Fig.21B) (Saito et al., 2006, 2015; Kastenhuber et al., 2013)。哺乳類で 15-25°Cの低温を感知する TRPM8 は、真骨魚類のゲノム上に存在しないため、他のチャンネルが低温センサーとして機能していると考えられる(Saito et al., 2015)。

これまでに、ゼブラフィッシュについては、TRPV1 と TRPA1 の温度応答性の解析が行われている。ゼブラフィッシュ TRPV1 は、Gracheva の解析から 32°Cで活性化することが報告されているが、マウスやニワトリの TRPV1 と比べてアレニウスプロットの屈曲点が明確ではない(Gracheva et al., 2011)。また、Gau らの解析では 25°Cの高温から応答し、閾値については決定されていないことから(Gau et al., 2013)、ゼブラフィッシュ TRPV1 は閾値がない高温センサーであると考えられる。以上のことから、ゼブラフィッシュの温度感受性 TRP チャンネルは、TRPV1 が 25°C以上の高温を担当し、TRPA1b は 8 度以下の低温と 25°C以上の高温を担当する温度センサーとして機能していると考えられる。一方、同じ魚類のメダカについては、ゼブラフィッシュと異なる構成(2つの TRPV1, TRPV4, TRPM2, 2つの TRPM4, TRPM5, TRPA1)である(Fig.21B)。ゼブラフィッシュとメダカの間で、TRPA1 は1つ、TRPM4 は2つになったが、一方で TRPV1 は2つになっている。メダカの温度感受性 TRP チャンネルの解析は、当研究室の安田と浅野が TRPV1(a, b)の機能解析を行った結果、TRPV1b は 5°C以下の低温に応答し、さらに高温応答性は閾値がなく、徐々に高温で活性化することを明らかにした(安田, 修士論文,

2016; 浅野, 卒業論文, 2017)。また、今回の解析並びに齊藤の解析の結果から、*olTRPA1* の低温応答性はなく、25℃から徐々に活性化する高温センサーであることが明らかになっている(齊藤, 修士論文, 2017)。以上のことから、メダカでは、*TRPA1* が 25℃以上の高温を担当し、*TRPV1b* が 5 度以下の低温と 25℃以上の高温を担当する温度センサーとして機能していると考えられる。よって、メダカの *TRPA1* は低温応答性を失い、その代わりに *TRPV1b* が低温応答性を獲得し、侵害となる低温応答を感知する低温センサーとして機能していると考えられる。これは、ゼブラフィッシュとメダカの温度感受性 TRP チャンネルの構成が大きく変化していることが影響し、ゼブラフィッシュとメダカの *TRPA1* と *TRPV1* の温度応答性が変化していると考えられる。

これまでに、解析が行われている魚類の *TRPA1* と *TRPV1* の高温応答性は、閾値がなく、徐々に活性化する特性を示すことが明らかになっている(安田, 修士論文, 2016; 浅野, 卒業論文, 2017; 齊藤, 修士論文, 2017; Gau et al., 2013)。これに対して、陸上に進出したニシツメガエルやニワトリの *TRPA1* や *TRPV1* は、閾値がある高温センサーであることが報告されている(Fig.21B) (Saito et al., 2012, 2014)。魚類が生息する水中は一日の温度変化が少なく、急激な温度変化が起きにくいため、体温を調節する必要がない。また、陸上動物と比較して、魚類の耐性温度の範囲は広く(メダカ:4-40℃, フグ:11-27℃, ゼブラフィッシュ:14-33℃)、環境適応能力が高い。よって、魚類は環境下で侵害温度を感知する機会がないため *TRPA1* や *TRPV1* の閾値がないと考えられ、魚類の *TRPA1* と *TRPV1* は幅広い温度で活性化する高温センサーとして機能していると考えられる。一方、陸上に進出した四肢動物は日照などの影響により一日の温度変化は大きくなり、侵害温度に遭遇するようになった。そのため、生息温度や生理機能に関連する温度を逸脱する侵害温度を高感度で感知できるように、陸上動物の *TRPA1* は閾値を持つようになったと考えられる。Fig.21B から、温度感受性 TRP チャンネルは魚類と四肢動物は枝が分かれており、魚類と四肢動物の間に大きな機能の違いがある可能性が高いと思われる。以上のことから、高温感受性を示す魚類の温度感受性 TRP チャンネルは、閾値がない高温応答の特性を持っている可能性が高いと考えられる。しかし、*TRPV1* と *TRPA1* 以外の温度感受性 TRP チャンネルについては、詳しい機能解析が行われていない。よって、魚類の温度感受性 TRP チャンネルをクローニングし、それらがどのような温度で活性化されるのか詳しく解析することで、より正確に各魚類の生育環境と温度感受性 TRP チャンネルの機能の関係が明らかになるだろう。

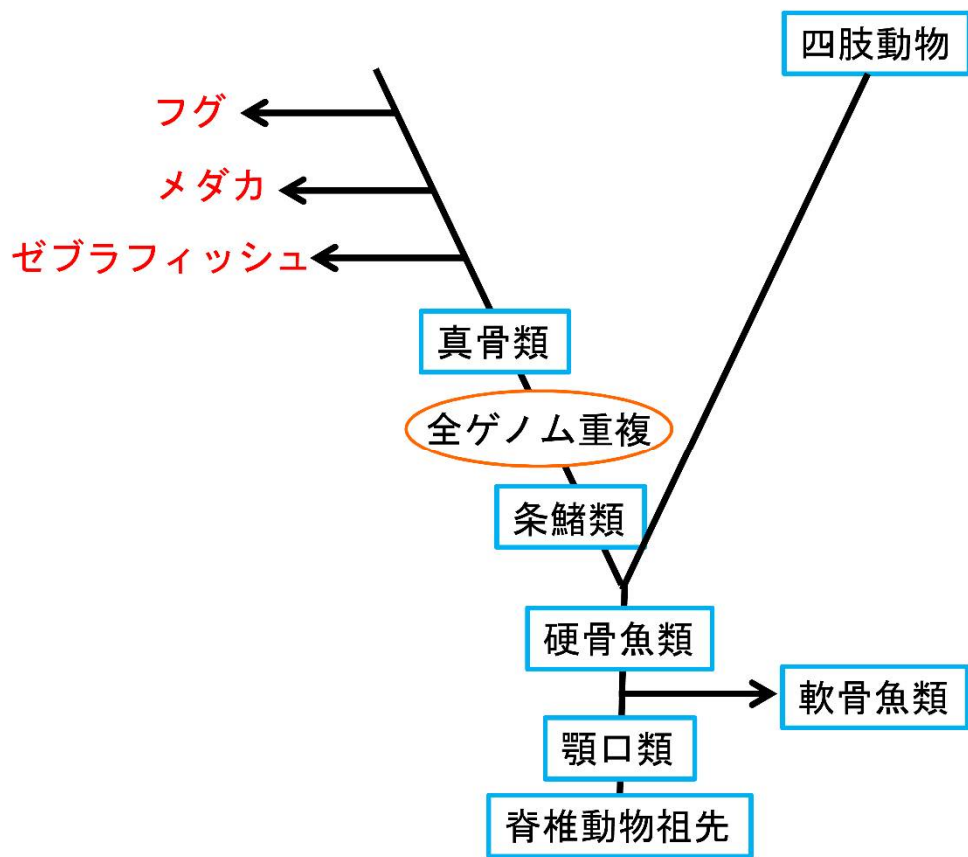


Fig.4 魚類の進化と全ゲノム重複

Fig.5 ゼブラフィッシュ TRPA1 のアミノ酸のアライメント

ヒト、マウス、ゼブラフィッシュの TRPA1 のアミノ酸配列を Clustal W でアライメントした。灰色の部分は AR、四角で囲んだ部分は膜貫通領域、赤色の文字は Cys、青色の文字は哺乳類 TRPA1 で報告されている化学物質感受性部位(AITC, caffeine, H₂O₂)、緑色の文字は mTRPA1 で報告されている低温感受性部位(Chen et al., 2013)を示している。

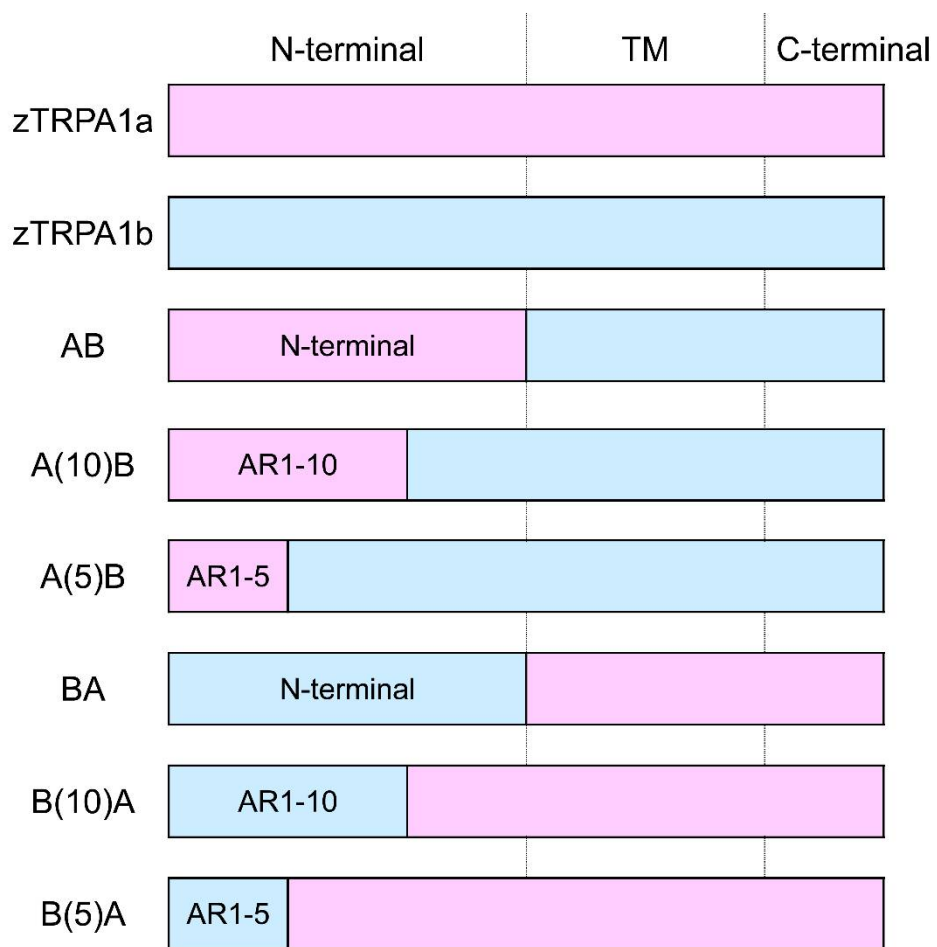


Fig.6 キメラの模式図

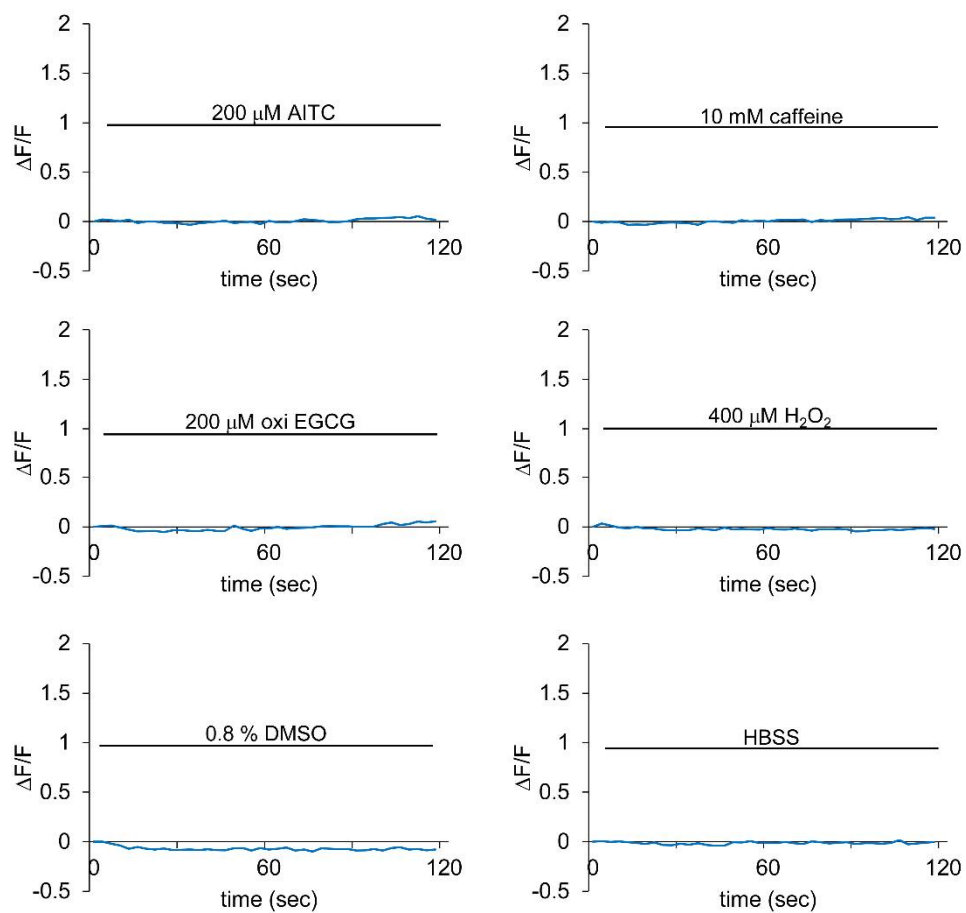


Fig.7 HEK293T 細胞の各化学物質に対する応答

何も導入していない HEK293T 細胞に、測定開始 6 秒後に 200 μ M AITC、10 mM caffeine、200 μ M oxi EGCG、400 μ M H₂O₂、0.8% DMSO 入り HBSS、HBSS を添加した時の蛍光強度の平均を示した。縦軸は蛍光強度の変化率($\Delta F/F$)、横軸は時間(sec)、リガンド添加期間は実線で示した。

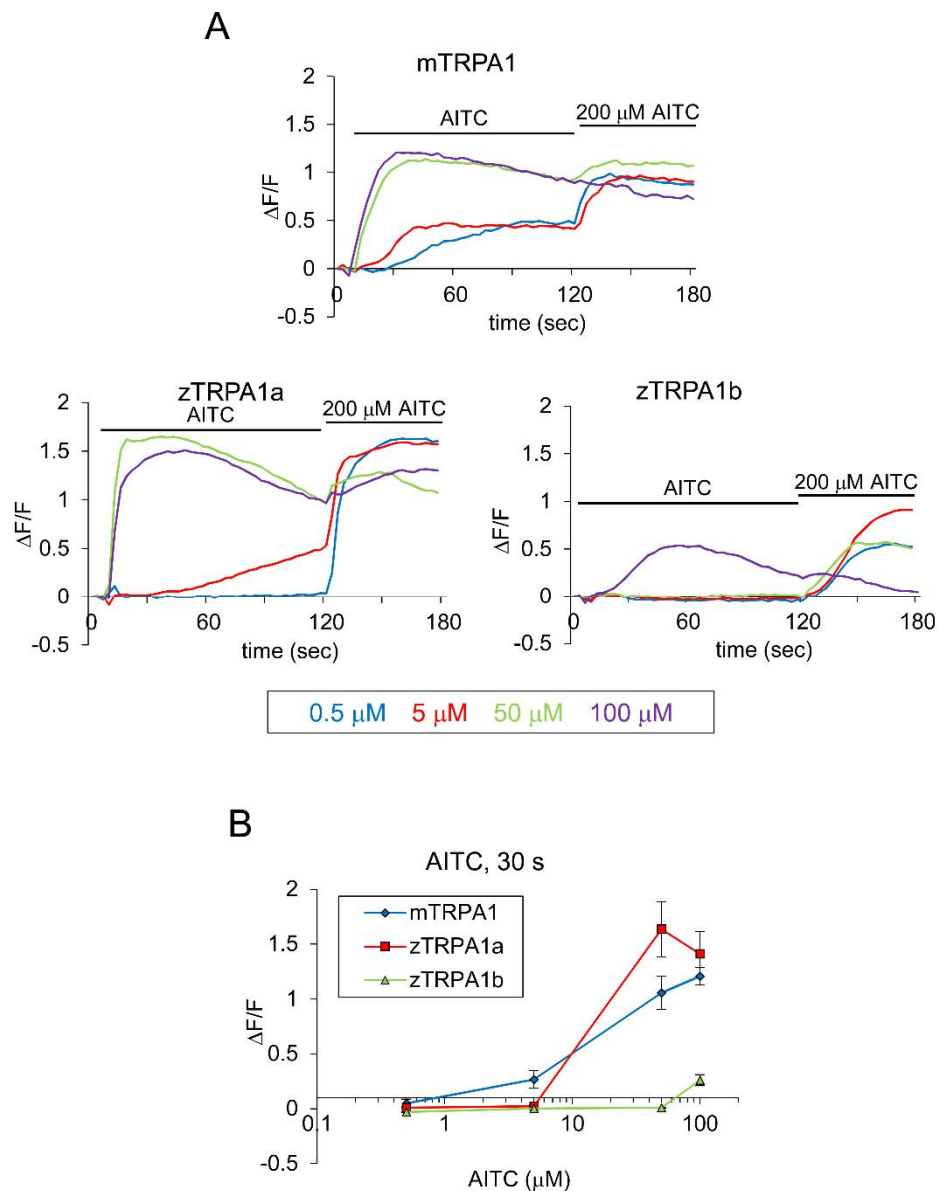


Fig.8 ゼブラフィッシュ TRPA1 の AITC に対する応答

(A) mTRPA1、zTRPA1a、zTRPA1b を発現させた HEK 細胞に、測定開始 6 秒後に各濃度の AITC (終濃度 0.5 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 100 μ M)、120 秒後に 200 μ M AITC を添加した時の蛍光強度の平均を示した。縦軸は蛍光強度の変化率($\Delta F/F$)、横軸は時間(sec)、リガンド添加期間は実線で示した。

(B) A で示した 30 秒時点の各濃度の AITC の蛍光強度($\Delta F/F$)を折れ線グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 \pm SE で示した。(n=10)

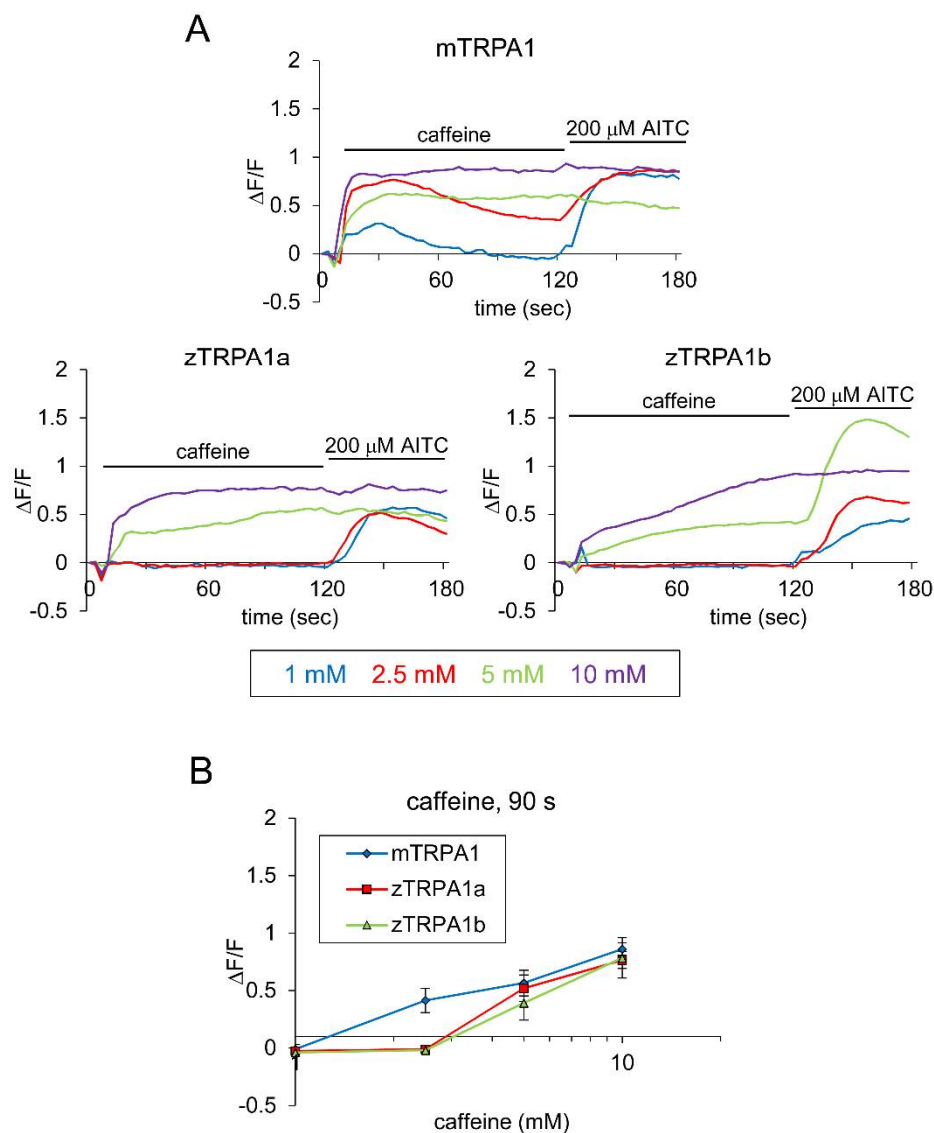


Fig.9 ゼブラフィッシュ TRPA1 の caffeine に対する応答

(A) mTRPA1、zTRPA1a、zTRPA1b を発現させた HEK 細胞に、測定開始 6 秒後に各濃度の caffeine (終濃度 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM)、120 秒後に 200 μ M AITC を添加した時の蛍光強度の平均を示した。縦軸は蛍光強度の変化率($\Delta F/F$)、横軸は時間(sec)、リガンド添加期間は実線で示した。

(B) A で示した 90 秒時点の各濃度の caffeine の蛍光強度($\Delta F/F$)を折れ線グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 \pm SE で示した。(n=10)

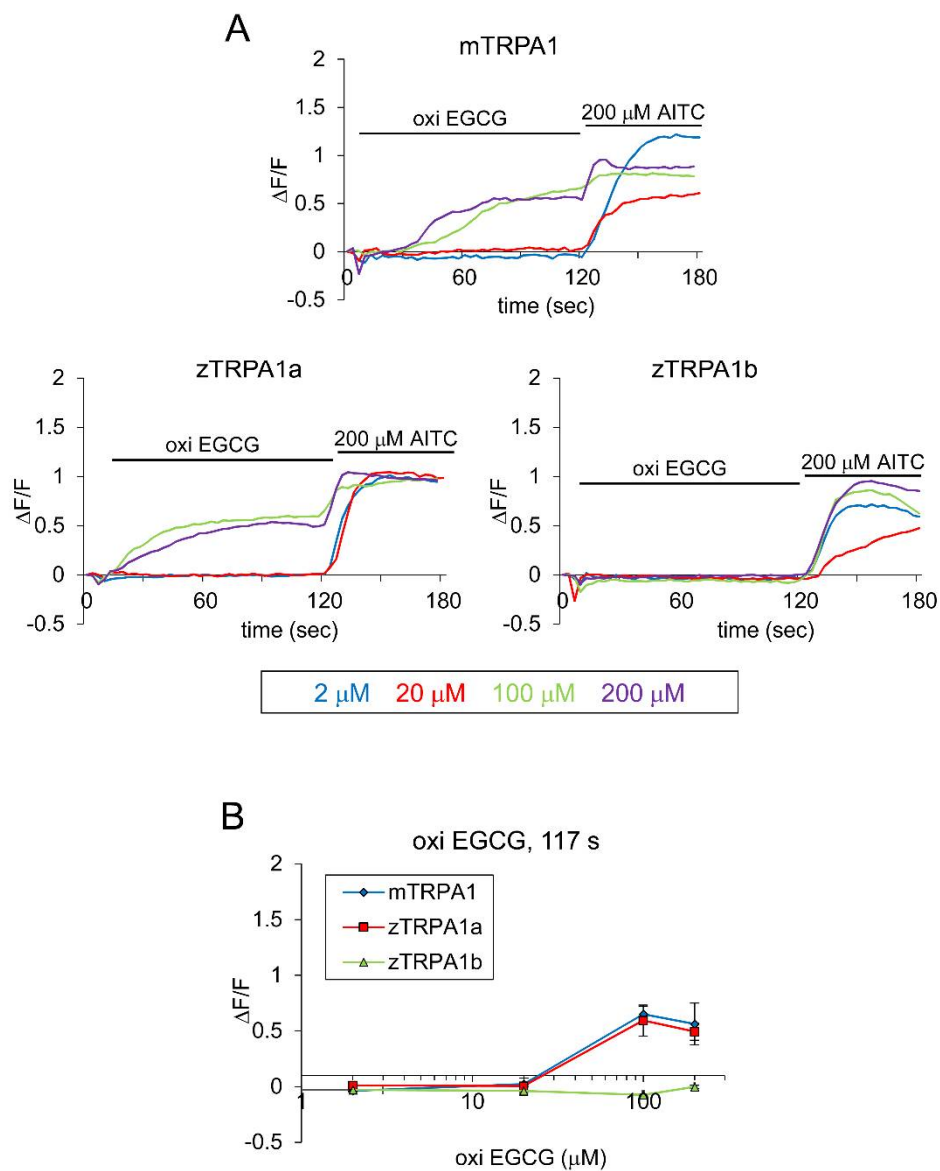


Fig.10 ゼブラフィッシュ TRPA1 の oxi EGCG に対する応答

(A) mTRPA1、zTRPA1a、zTRPA1b を発現させた HEK 細胞に、測定開始 6 秒後に各濃度の oxi EGCG (終濃度 2 μ M, 20 μ M, 100 μ M, 200 μ M)、120 秒後に 200 μ M AITC を添加した時の蛍光強度の平均を示した。縦軸は蛍光強度の変化率($\Delta F/F$)、横軸は時間(sec)、リガンド添加期間は実線で示した。

(B) A で示した 117 秒時点の各濃度の oxi EGCG の蛍光強度($\Delta F/F$)を折れ線グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 \pm SE で示した。(n=10)

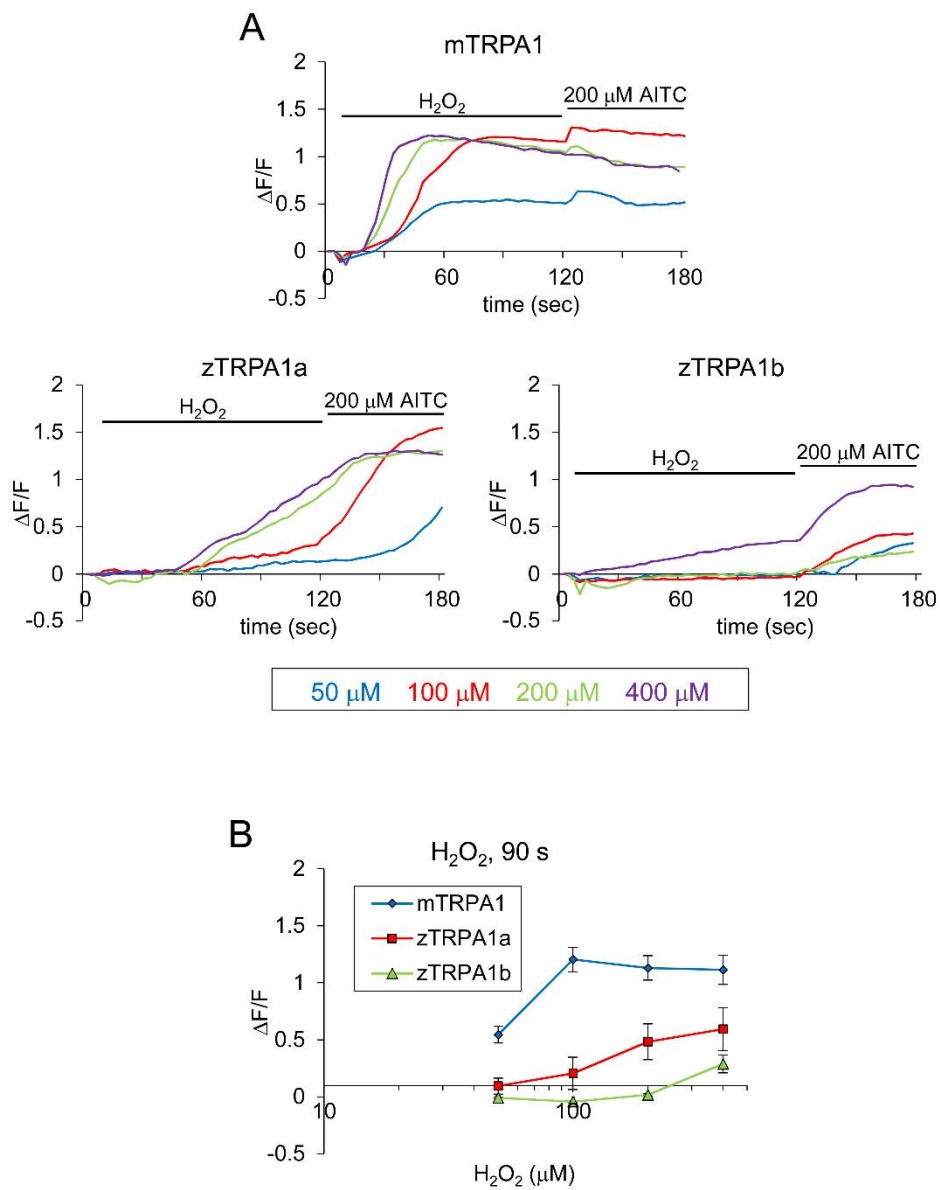


Fig.11 ゼブラフィッシュ TRPA1 の H₂O₂ に対する応答

(A) mTRPA1、zTRPA1a、zTRPA1b を発現させた HEK 細胞に、測定開始 6 秒後に各濃度の H₂O₂ (終濃度 50 μM, 100 μM, 200 μM, 400 μM)、120 秒後に 200 μM AITC を添加した時の蛍光強度の平均を示した。縦軸は蛍光強度の変化率(ΔF/F)、横軸は時間(sec)、リガンド添加期間は実線で示した。

(B) A で示した 90 秒時点の各濃度の H₂O₂ の蛍光強度(ΔF/F)を折れ線グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均±SE で示した。(n=10)

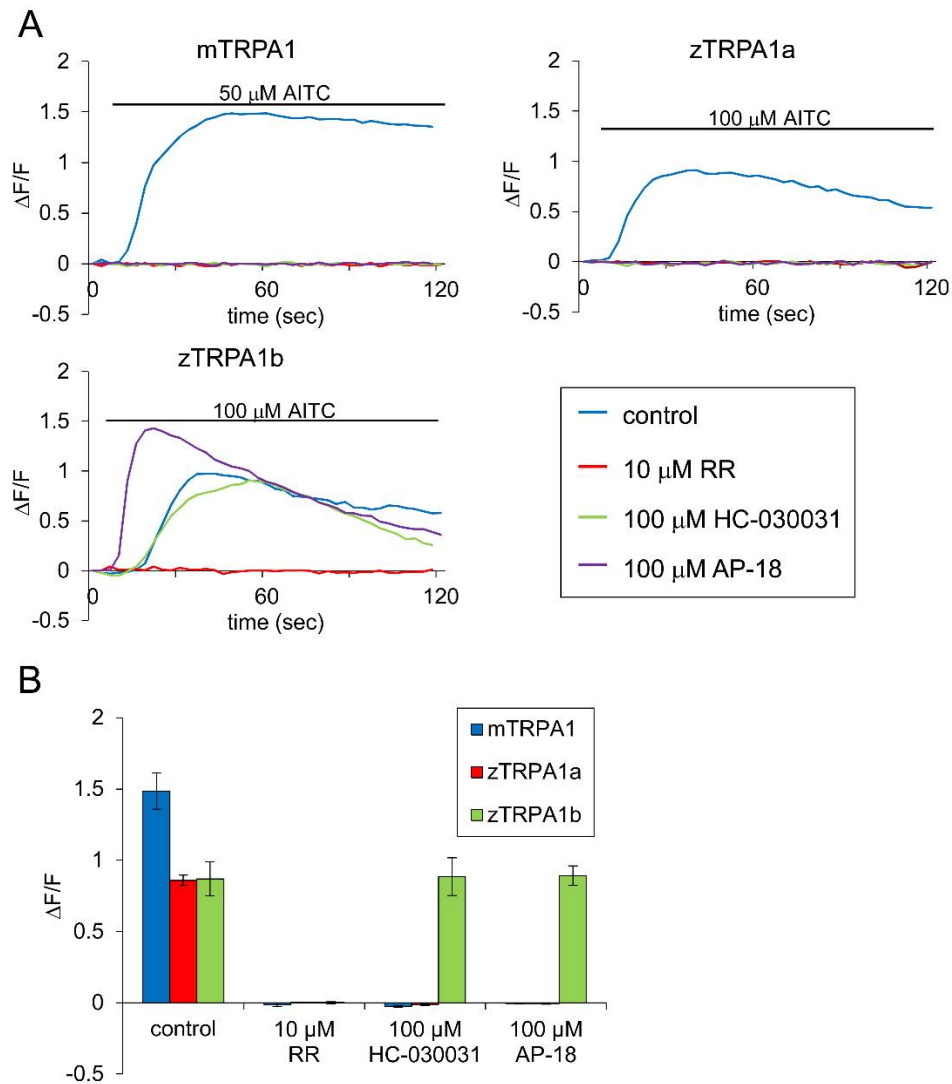


Fig.12 ゼブラフィッシュ TRPA1 の AITC 応答に対する阻害剤の効果

(A) mTRPA1、zTRPA1a、zTRPA1b を発現させた HEK 細胞に、TRP チャンネル阻害剤の 10 μ M RR または TRPA1 阻害剤の 100 μ M HC-030031 と AP-18 の存在下で測定開始 6 秒後に AITC(mTRPA1 は 50 μ M、ゼブラフィッシュ TRPA1 は 100 μ M)を添加した時の蛍光強度の平均を示した。縦軸は、蛍光強度の変化率($\Delta F/F$)、横軸は時間(秒)、リガンド添加期間は実線で示した。

(B) A で示した 60 秒時点の蛍光強度($\Delta F/F$)を棒グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 \pm SE で示した。(n=10)

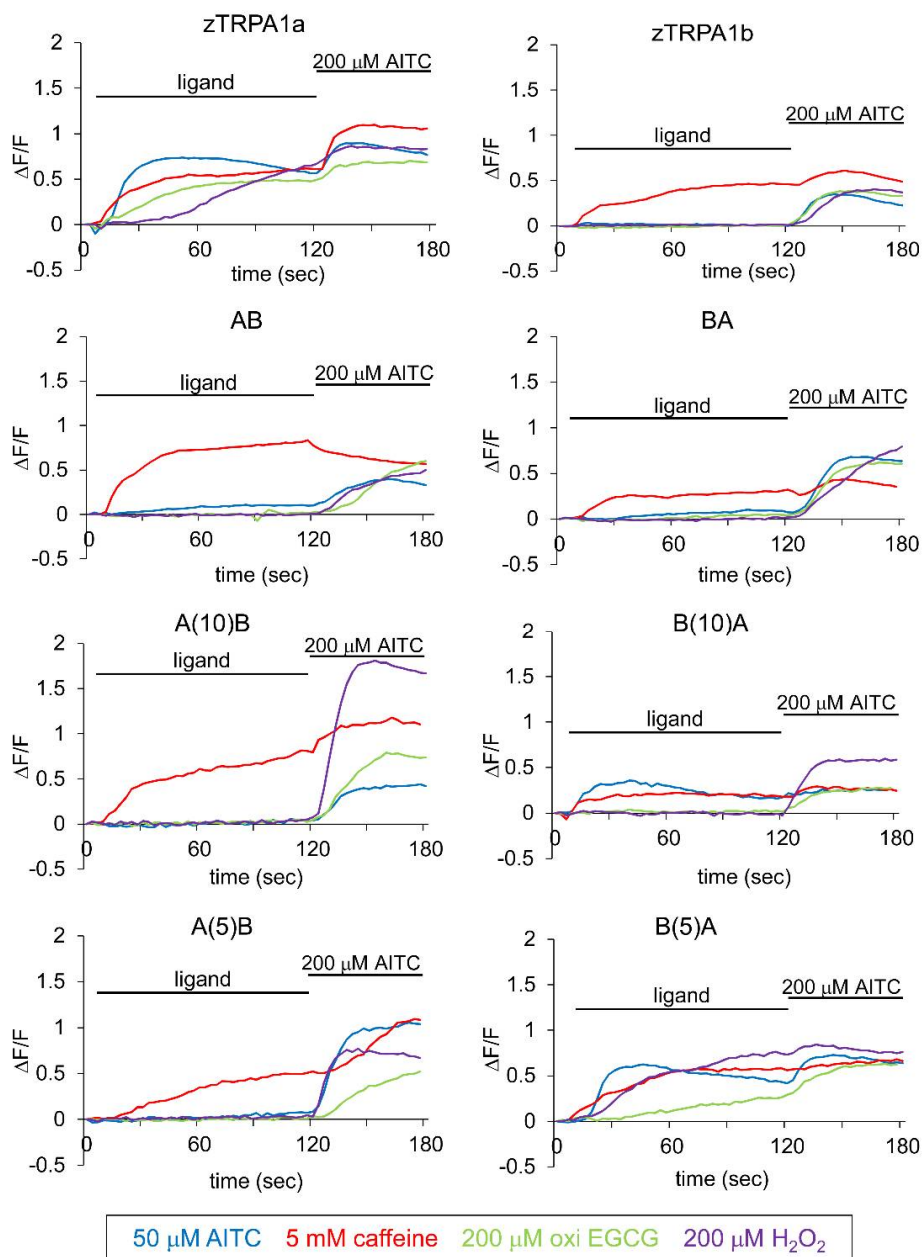


Fig.13 キメラとゼブラフィッシュ TRPA1 の化学物質に対する応答
 zTRPA1a、zTRPA1b と各キメラ(AB, A(10)B, A(5)B, BA, B(10)A, B(5)A)を発現させた HEK 細胞に、測定開始 6 秒後に各化学物質(50 μ M AITC, 5 mM caffeine, 200 μ M oxEGCG, 200 μ M H₂O₂)、120 秒後に 200 μ M の AITC を添加した時の蛍光強度の平均を示した。縦軸は、蛍光強度の変化率($\Delta F/F$)、横軸は時間(秒)、リガンド添加期間は実線で示した。

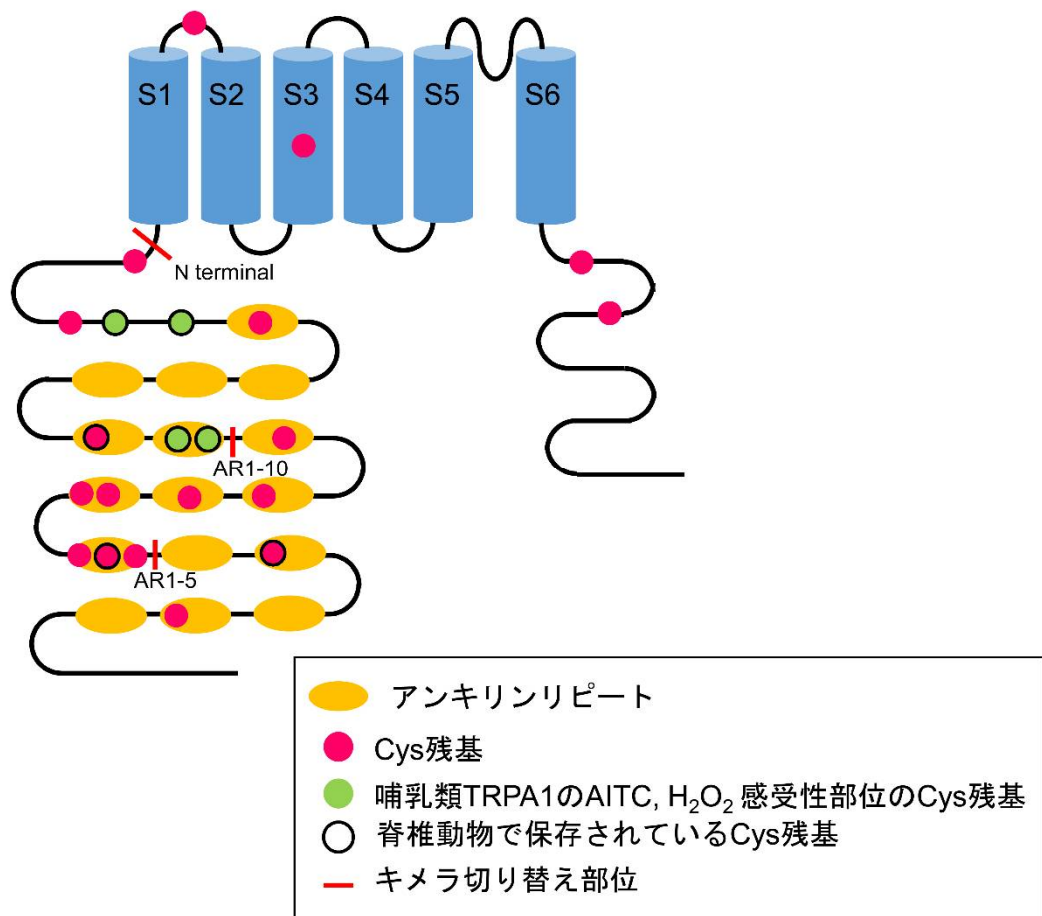
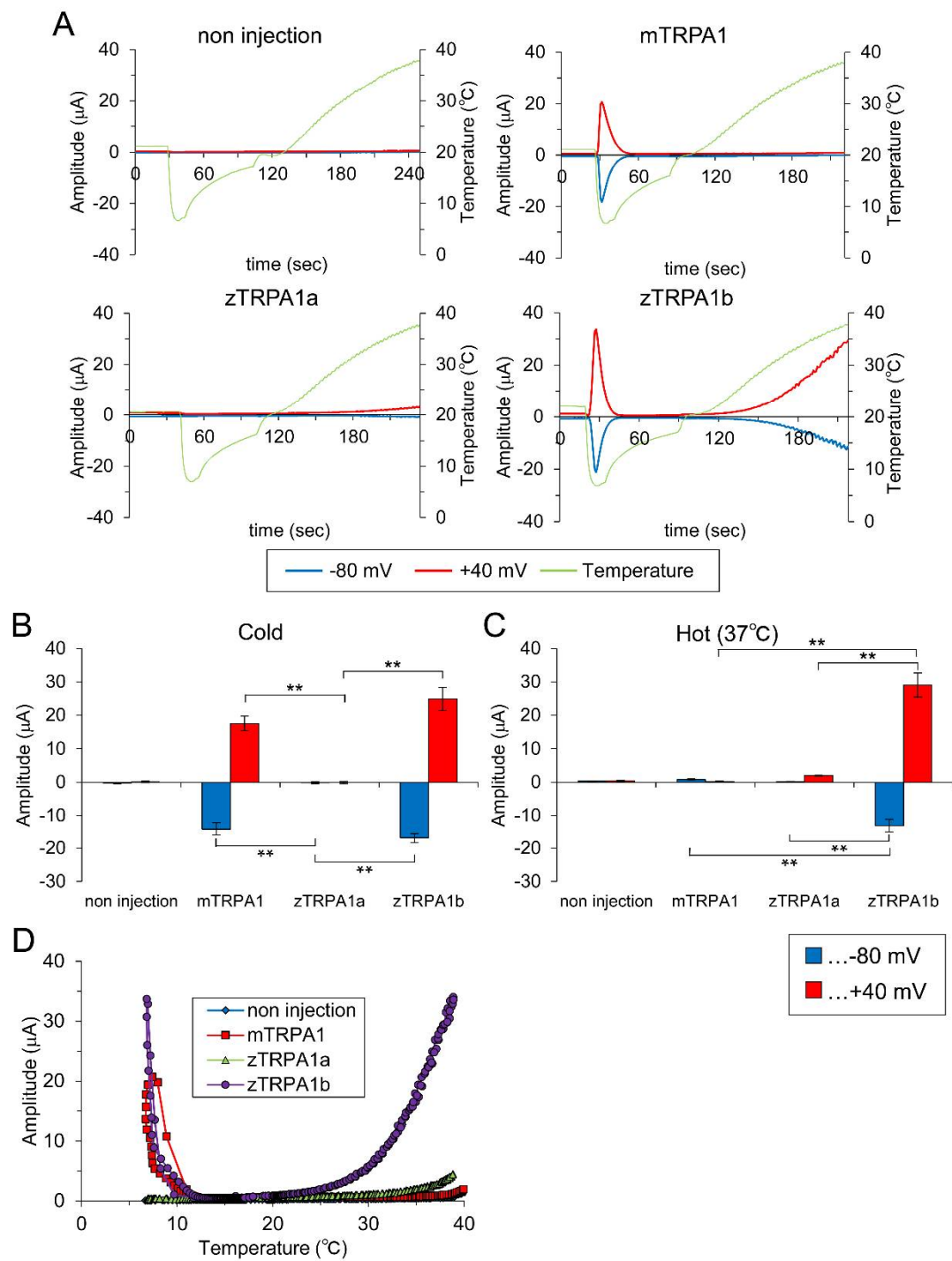


Fig.14 zTRPA1a の構造の模式図

zTRPA1a の N 末端の AR6-10 に oxi EGCG と H₂O₂ 応答、AR11-16 に AITC 応答に重要な部位が存在することが示唆された。AITC と H₂O₂ 感受性に重要な Cys の位置をプロットした。



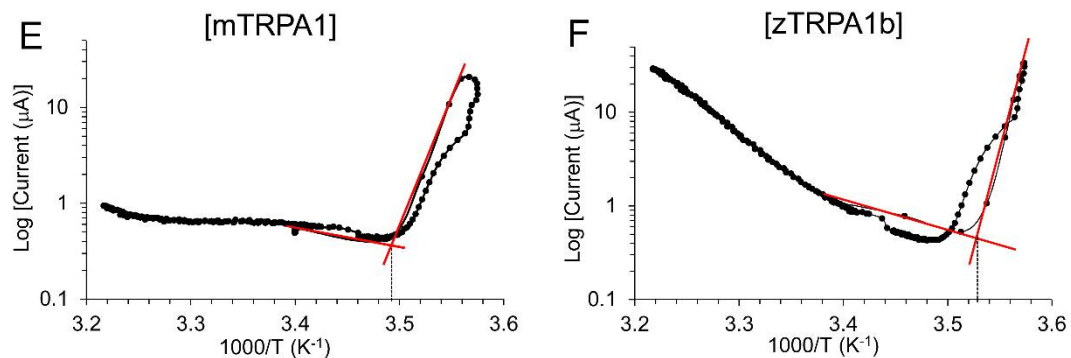


Fig.15 ゼブラフィッシュ TRPA1 の温度応答

(A) 陰性コントロールの cRNA を導入していない卵母細胞と mTRPA1、zTRPA1a、zTRPA1b をそれぞれ発現させた卵母細胞に温度刺激を行い、二本刺し膜電位固定法を用いて電流応答を解析した時のそれぞれの代表トレースを示した。縦軸は活性電流(μA)、横軸は時間(秒)で示した。

(B, C) 低温のピークの活性電流(B)と高温(37°C)の活性電流(C)の平均を棒グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 \pm SE で示した。

(non injection:n=4, mTRPA1:n=3, zTRPA1a:n=3, zTRPA1b:n=7)

(Tukey-Kramer 法で有意差あり $**p<0.01$)

(D) A のトレースを横軸が温度($^\circ\text{C}$)、縦軸が活性電流(μA)でプロットし、電流と温度の関係を示した。

(E, F) A で示した mTRPA1 と zTRPA1b をアレニウスプロットに示した。アレニウスプロットの活性化前と活性化後のプロットの接線の交点から活性化温度閾値を求めることができる。横軸は $1000/\text{絶対温度}$ 、縦軸は対数目盛で活性電流(μA)を示した。

mTRPA1 の低温側の交点は 3.49 なので、閾値は 13.53°C と決定した。zTRPA1b の低温側の交点は 3.53 なので、閾値は 10.29°C と決定した。

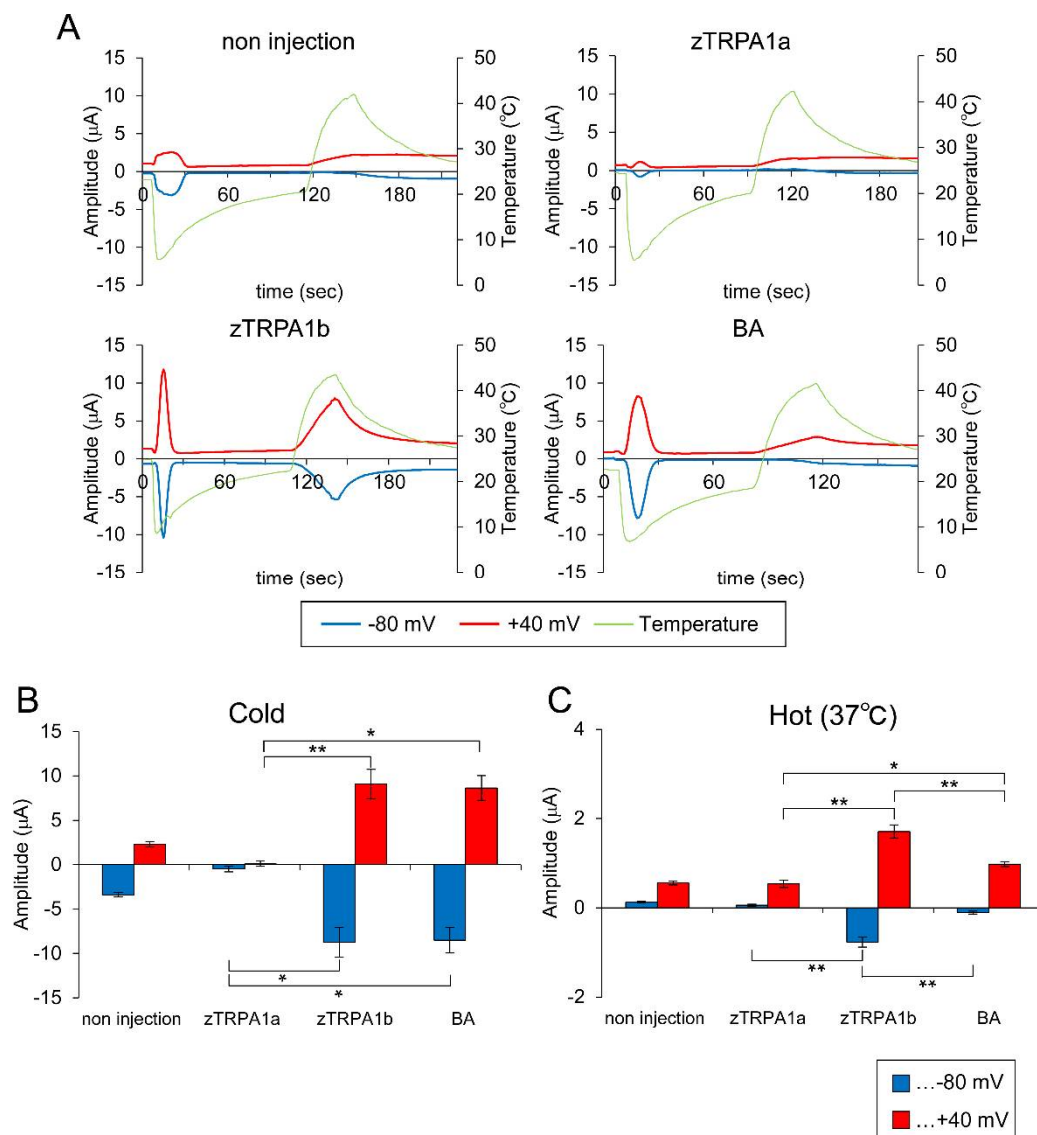
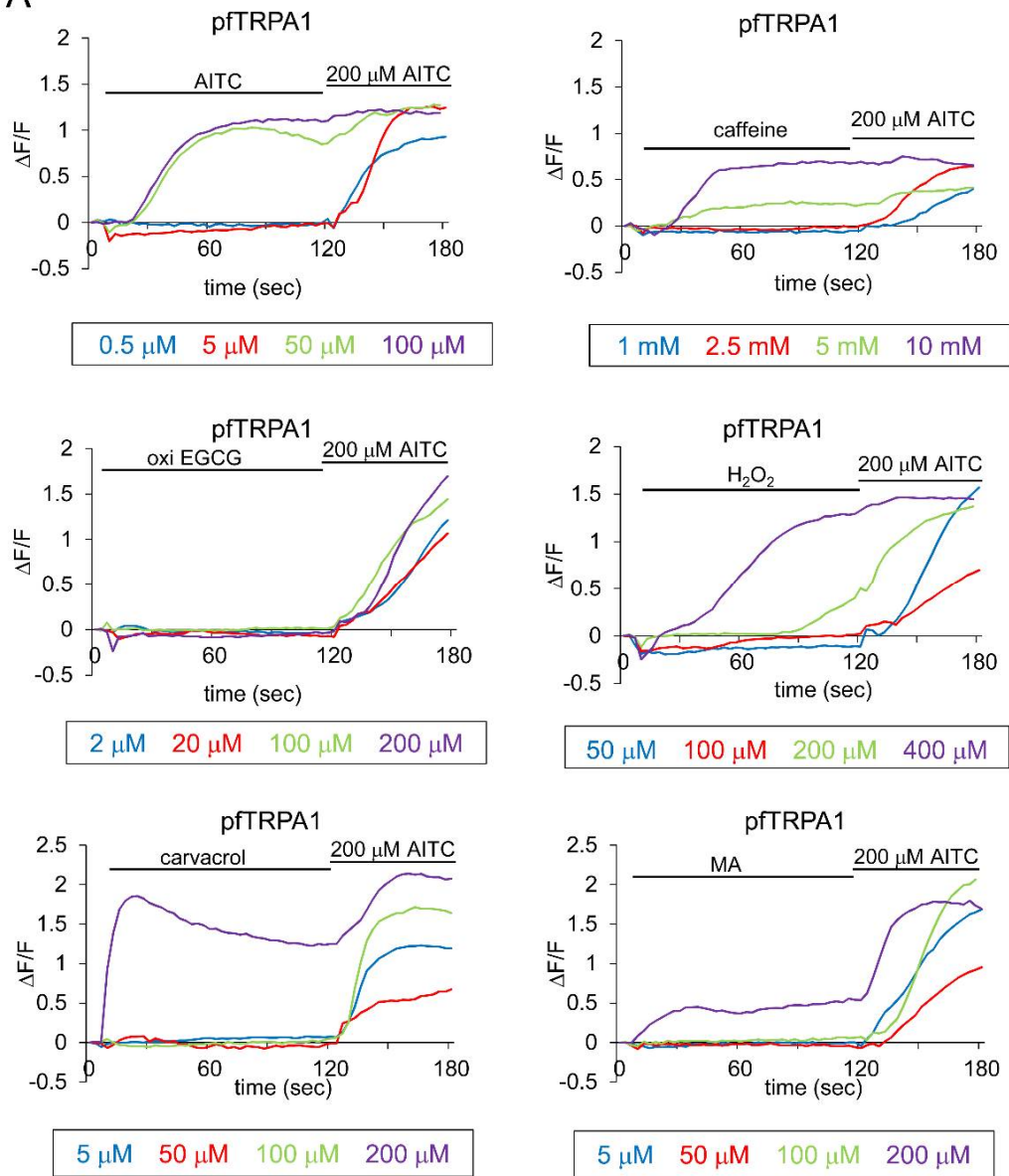


Fig.16 ゼブラフィッシュ TRPA1 と BA の温度応答

(A) cRNA を導入していない卵母細胞と zTRPA1a、zTRPA1b、BA をそれぞれ発現させた卵母細胞に温度刺激を行い、二本刺し膜電位固定法を用いて電流応答を解析した時のそれぞれの代表トレースを示した。縦軸は活性電流(μA)、横軸は時間(秒)で示した。

(B, C) 低温のピークの活性電流(B)と高温(37°C)の活性電流(C)の平均を棒グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 \pm SE で示した。(n=5) (Tukey-Kramer 法で有意差あり ** $p<0.01$, * $p<0.05$)

A



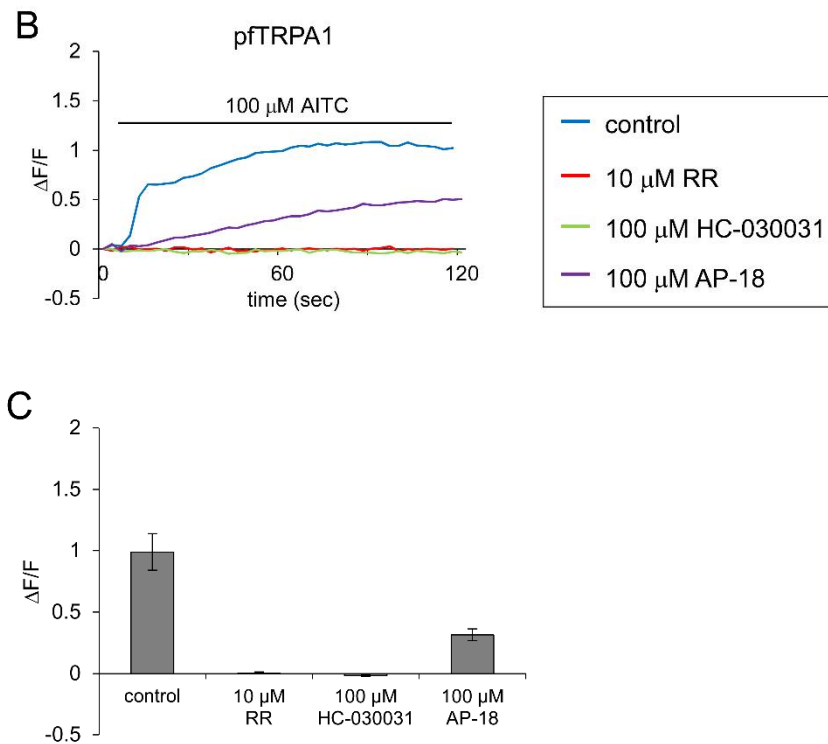


Fig.17 フグ TRPA1 の化学物質に対する応答と阻害剤の効果

(A) pfTRPA1 を発現させた HEK 細胞に、測定開始 6 秒後に 4 種類の濃度の各化学物質 (AITC, caffeine, oxi EGCG, H_2O_2 , carvacrol, MA)、120 秒後に 200 μ M AITC を添加した時の蛍光強度の平均を示した。縦軸は蛍光強度の変化率($\Delta F/F$)、横軸は時間(sec)、リガンド添加期間は実線で示した。

(B) pfTRPA1 を発現させた HEK 細胞に、TRP チャンネル阻害剤の 10 μ M RR または TRPA1 阻害剤の 100 μ M HC-030031 と AP-18 存在下で、測定開始 6 秒後に 100 μ M AITC を添加した時の蛍光強度の平均を示した。縦軸は、蛍光強度の変化率($\Delta F/F$)、横軸は時間(秒)、リガンド添加期間は実線で示した。

(C) B で示した 60 秒時点の蛍光強度($\Delta F/F$)を棒グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 \pm SE で示した。(n=10)

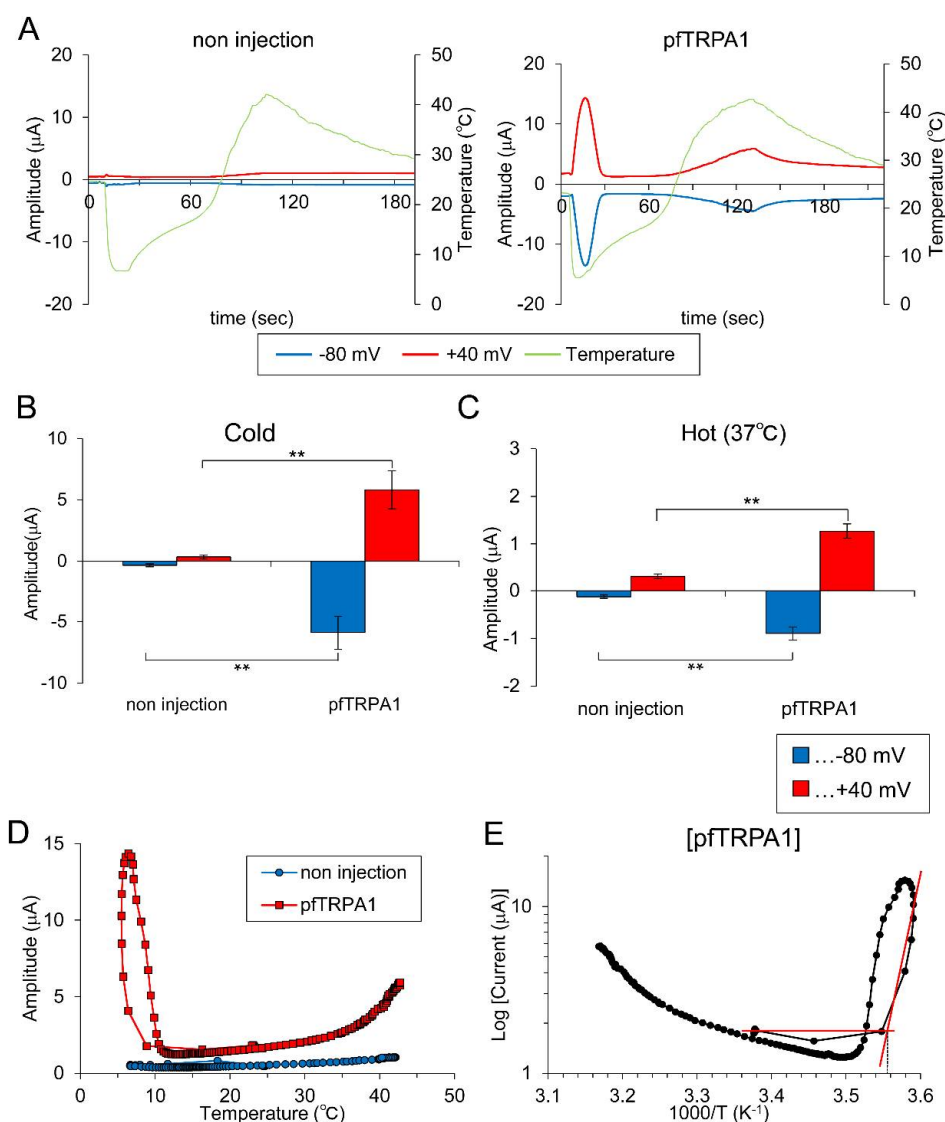


Fig.18 フグ TRPA1 の温度応答

(A) cRNA を導入していない卵母細胞と pfTRPA1 を発現させた卵母細胞に温度刺激を行い、二本刺し膜電位固定法を用いて解析した時のそれぞれの代表トレースを示した。縦軸は活性電流(μA)、横軸は時間(秒)で示した。

(B, C) 低温のピークの活性電流(B)と高温(37°C)の活性電流(C)の平均を棒グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 \pm SE で示した。(n=8)

(T 検定で有意差あり ** $p < 0.01$)

(D) A のトレースを横軸が温度($^{\circ}C$)、縦軸が活性電流(μA)でプロットし、電流と温度の関係を示した。

(E) A で示した pfTRPA1 をアレニウスプロットに示した。

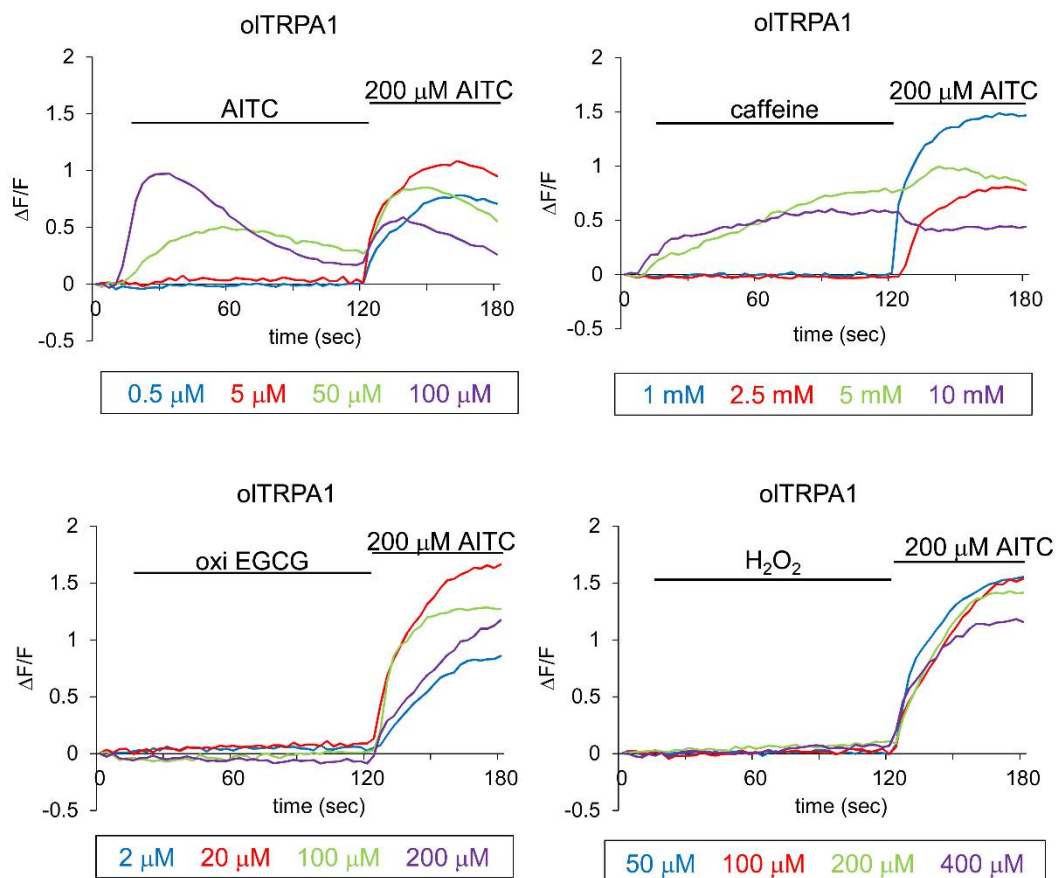


Fig.19 メダカ TRPA1 の化学物質に対する応答

oITRPA1 を発現させた HEK 細胞に、測定開始 6 秒後に 4 種類の濃度の各化学物質 (AITC, caffeine, oxi EGCG, H_2O_2)、120 秒後に 200 μ M AITC を添加した時の蛍光強度の平均を示した。縦軸は蛍光強度の変化率($\Delta F/F$)、横軸は時間(sec)、リガンド添加期間は実線で示した。

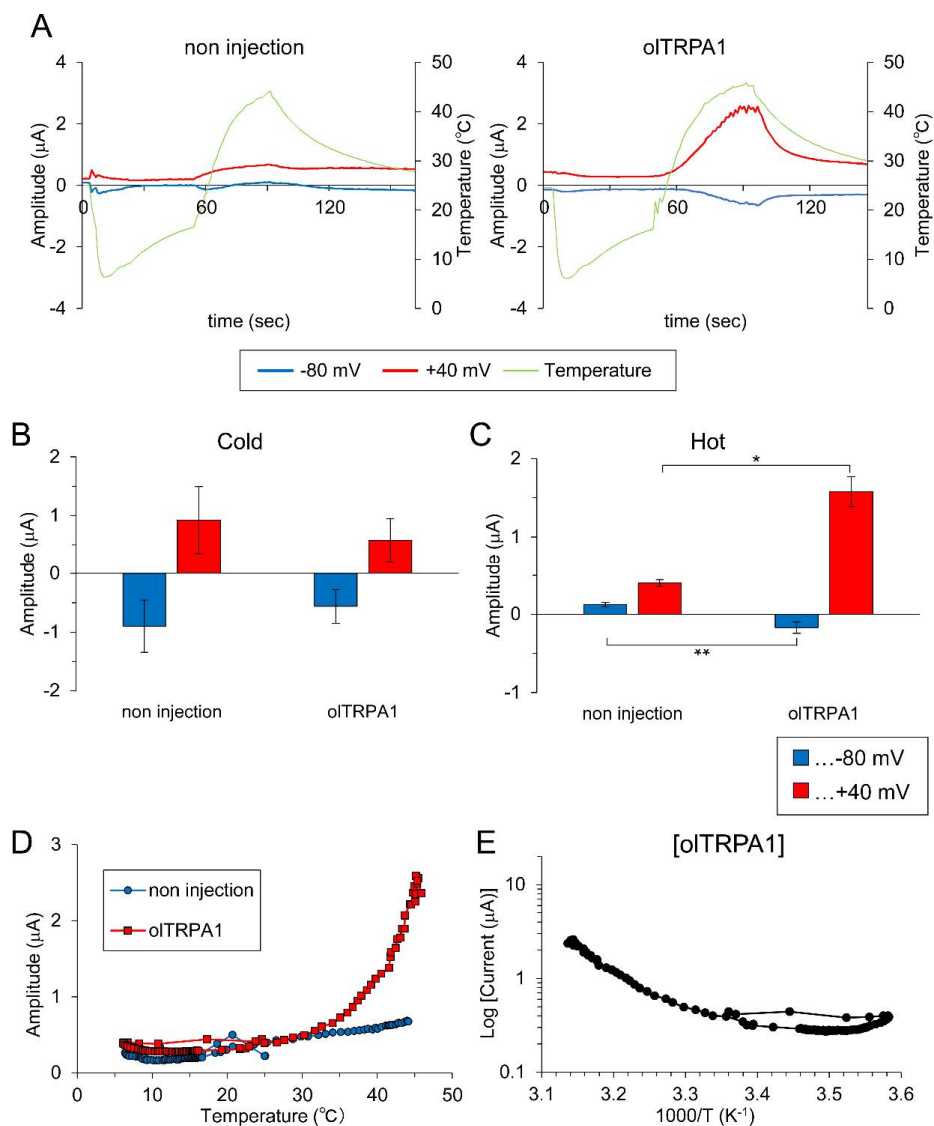


Fig.20 メダカ TRPA1 の温度応答

(A) cRNA を導入していない卵母細胞と olTRPA1 を発現させた卵母細胞に温度刺激を行い、二本刺し膜電位固定法を用いて電流応答を解析した時のそれぞれの代表トレースを示した。縦軸は活性電流(μA)、横軸は時間(秒)で示した。

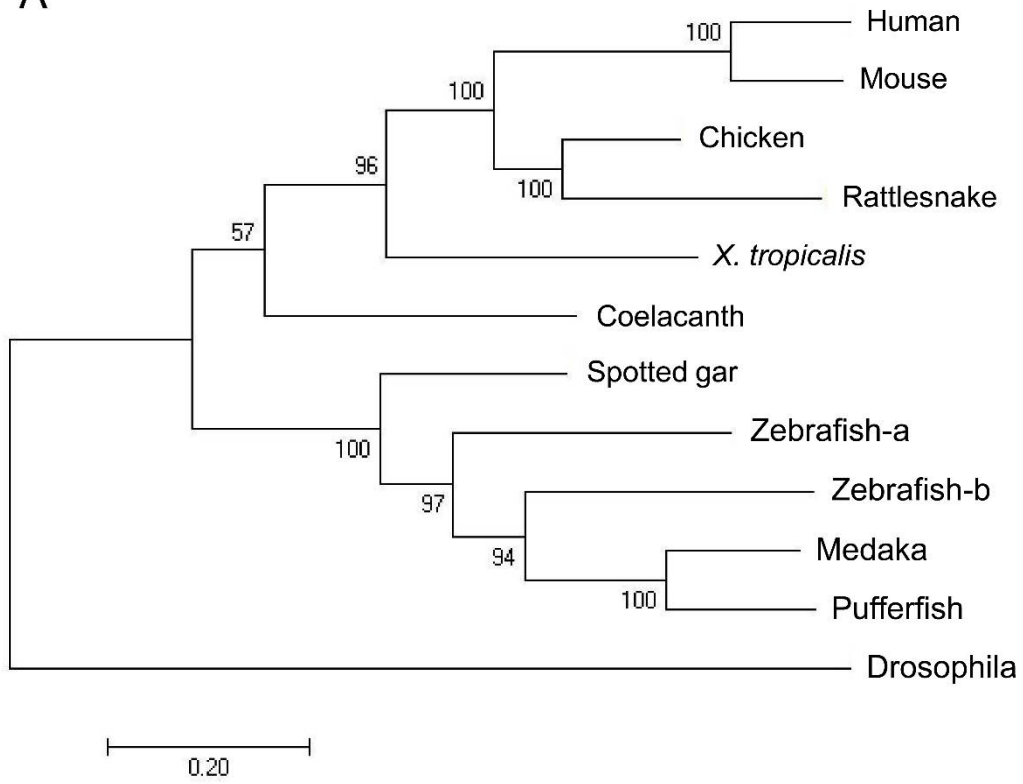
(B, C) 低温(B)と高温(C)のピークの活性電流の平均を棒グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 \pm SE で示した。(n=6)

(T 検定で有意差あり ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

(D) A のトレースを横軸が温度($^{\circ}C$)、縦軸が活性電流(μA)でプロットし、電流と温度の関係を示した。

(E) A で示した olTRPA1 をアレニウスプロットに示した。

A



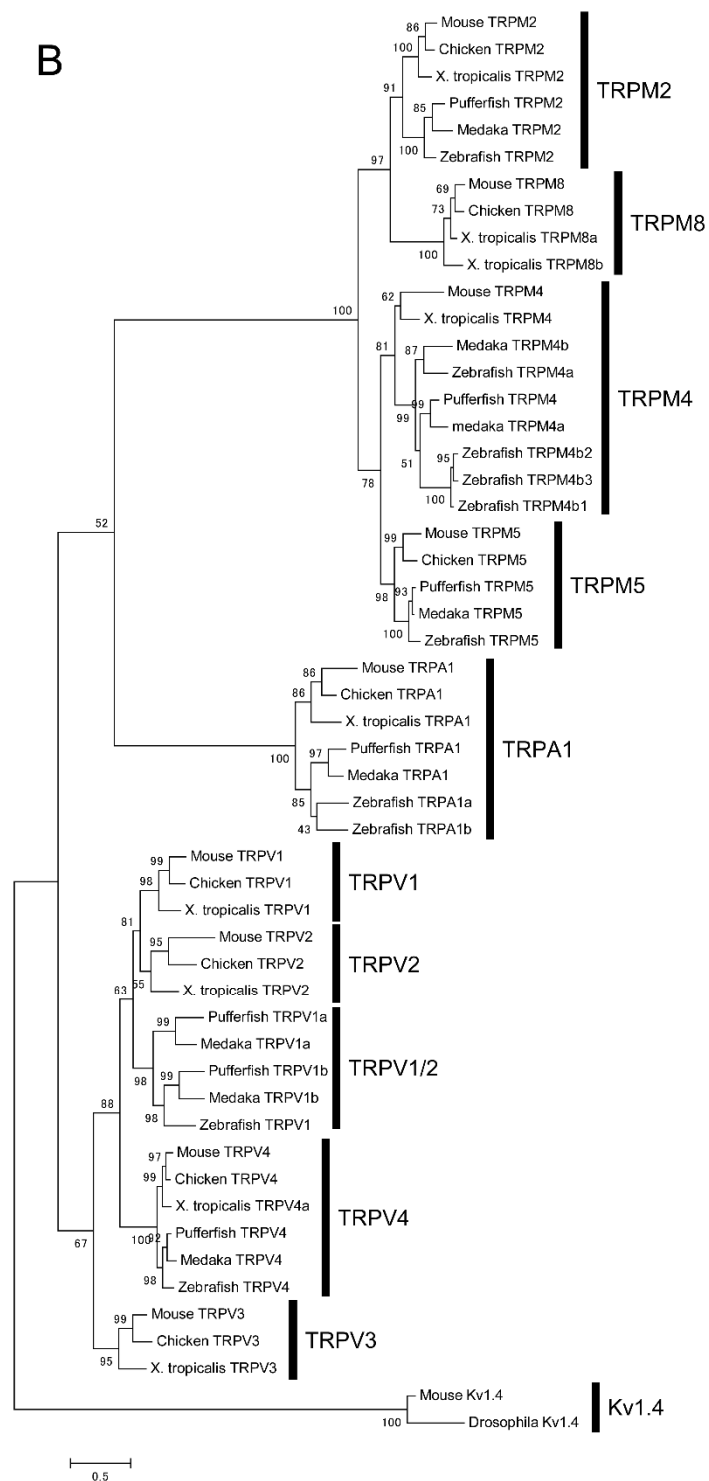


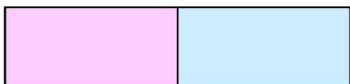


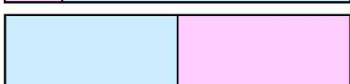

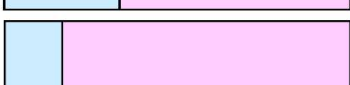


Fig.21 温度感受性 TRP チャンネルの分子系統樹

各動物の TRPA1(A)または各動物の温度感受性 TRP チャンネル(B)のアミノ酸配列で、分子系統樹(ML 法)を作成した。

Table.1 ゼブラフィッシュ TRPA1 とキメラの4種の化学物質に対する応答性

		50 μ M AITC	5 mM caffeine	200 μ M oxi EGCG	200 μ M H ₂ O ₂
zTRPA1a		○	○	○	○
zTRPA1b		×	○	×	×
AB		×	○	×	×
A(10)B		×	○	×	×
A(5)B		×	○	×	×
BA		×	○	×	×
B(10)A		○	○	×	×
B(5)A		○	○	○	○

zTRPA1a と TRPA1b、6 種のキメラの各化学物質(50 μ M AITC, 5 mM caffeine, 200 μ M oxi EGCG, 200 μ M H₂O₂)に対する応答性をまとめた。応答する場合○、応答しない場合を×で示した。

Table.2 ゼブラフィッシュの TRPA1 の温度応答の解析のまとめ

A Response to cold stimulation							
Batch	non injection			zTRPA1b			Statistical significance
	N	Mean (μ A)	S.E.	N	Mean (μ A)	S.E.	
1*	4	0.07	0.22	7	24.92	3.42	**
2	5	0.33	0.17	5	10.27	2.00	*
3	3	12.30	1.00				
4	5	-0.11	0.01	5	7.73	2.38	**
5	5	6.39	1.25				
6	3	1.03	0.21	2	0.65	0.22	N.S.
7	9	-0.07	0.01	9	2.45	1.06	N.S.
8	7	0.53	0.18	9	6.93	3.77	N.S.
9	4	3.41	0.62	5	0.91	0.59	N.S.
10	4	8.31	2.28				
11	5	3.82	1.25	5	11.02	1.57	N.S.
12	4	11.13	1.37				
13	3	8.45	4.71				
14	6	0.03	0.11	3	9.94	0.11	N.S.
15	5	0.15	0.21	5	5.40	1.90	*
16	5	2.29	0.30	5	9.08	1.66	*

Batch	non injection			zTRPA1a			Statistical significance
	N	Mean (μ A)	S.E.	N	Mean (μ A)	S.E.	
1*	4	0.07	0.22	3	-0.09	0.35	N.S.
2	5	0.33	0.17	5	0.39	0.30	N.S.
3	3	12.30	1.00				
4	5	-0.11	0.01	5	-0.21	0.01	N.S.
7	9	-0.07	0.01	5	-0.14	0.16	N.S.
8	7	0.53	0.18	4	0.07	0.06	N.S.
9	4	3.41	0.62	3	7.31	4.00	N.S.
10	4	8.31	2.28				
11	5	3.82	1.25	3	1.82	1.02	N.S.
12	4	11.13	1.37				
13	3	8.45	4.71				
14	6	0.03	0.11	3	3.67	4.21	N.S.
15	5	0.15	0.21	5	-0.01	0.15	N.S.
16	5	2.29	0.30	5	0.11	0.31	N.S.

Batch	non injection			mTRPA1			Statistical significance
	N	Mean (μ A)	S.E.	N	Mean (μ A)	S.E.	
1*	4	0.07	0.22	3	17.56	2.19	*
2	5	0.33	0.17	5	11.15	2.94	*
3	3	12.30	1.00				
7	9	-0.07	0.01	3	0.13	0.23	N.S.
8	7	0.53	0.18	5	1.73	1.41	N.S.
9	4	3.41	0.62	3	3.04	1.72	N.S.
10	4	8.31	2.28				
11	5	3.82	1.25	4	13.40	1.72	*
12	4	11.13	1.37				
13	3	8.45	4.71				
14	6	0.03	0.11	6	12.73	6.19	N.S.

B Response to hot stimulation (37°C)							
Batch	non injection			zTRPA1b			Statistical significance
	N	Mean (μ A)	S.E.	N	Mean (μ A)	S.E.	
1*	4	0.37	0.12	7	29.08	3.60	**
2	5	0.73	0.18	5	8.59	1.36	**
3	3	0.93	0.11	3	1.09	0.16	N.S.
4	5	0.83	0.10	5	4.60	0.78	**
5	5	0.71	0.47	3	0.69	0.24	N.S.
6	3	0.26	0.04	2	0.18	0.05	N.S.
7	9	0.08	0.02	12	0.71	0.10	*
8	7	0.39	0.08	9	0.96	0.36	N.S.
9	4	2.41	0.21				
10	9	0.35	0.08	5	1.51	0.53	N.S.
11	5	0.25	0.06	5	1.34	0.25	**
12	4	0.28	0.09	4	1.94	0.56	N.S.
14	4	0.59	0.35	3	0.91	0.36	N.S.
15	5	0.25	0.07	5	0.59	0.20	N.S.
16	5	0.56	0.03	5	1.71	0.11	**
17	4	0.65	0.11	3	0.96	0.04	N.S.

Batch	non injection			zTRPA1a			Statistical significance
	N	Mean (mA)	S.E.	N	Mean (μ A)	S.E.	
1*	4	0.37	0.12	3	1.96	0.15	N.S.
2	5	0.73	0.18	5	0.73	0.10	N.S.
3	3	0.93	0.11	2	1.51	0.20	N.S.
4	5	0.83	0.10	5	1.87	0.07	N.S.
7	9	0.08	0.02	5	0.32	0.12	N.S.
8	7	0.39	0.08	4	0.50	0.10	N.S.
9	4	2.41	0.21				
10	9	0.35	0.08	5	0.38	0.08	N.S.
11	5	0.25	0.06	3	1.17	0.12	N.S.
12	4	0.28	0.09	3	0.76	0.12	N.S.
14	4	0.59	0.35	3	-0.17	0.54	N.S.
15	5	0.25	0.07	5	0.26	0.04	N.S.
16	5	0.56	0.03	5	0.53	0.08	N.S.
17	4	0.65	0.11	2	0.48	0.17	N.S.

Batch	non injection			mTRPA1			Statistical significance
	N	Mean (μ A)	S.E.	N	Mean (μ A)	S.E.	
1*	4	0.37	0.12	3	0.19	0.14	N.S.
2	5	0.73	0.18	5	0.80	0.13	N.S.
3	3	0.93	0.11	2	0.75	0.08	N.S.
7	9	0.08	0.02	3	0.48	0.23	N.S.
8	7	0.39	0.08	5	0.31	0.05	N.S.
9	4	2.41	0.21				
10	9	0.35	0.08	7	0.55	0.11	N.S.
11	5	0.25	0.06	4	0.83	0.07	N.S.
12	4	0.28	0.09	6	0.46	0.10	N.S.
14	4	0.59	0.35	3	0.30	0.01	N.S.

解析を行った各バッチの mTRPA1、zTRPA1a、zTRPA1b 発現卵母細胞と cRNA を導入していない non injection の間の+40 mV の低温のピークの活性電流(A)と高温(37°C)の活性電流(B)の平均をまとめた。※がついている#1 は、Fig.のバッチを示している。non injection の低温応答が 6 μ A 以上、高温応答が 2 μ A 以上出たバッチは、内因性の電流が観察されたと判断し、解析から除外した。そのため、低温刺激の#3, #5, #10, #12, #13、高温刺激の#9 は空欄にしている。

(Tukey-Kramer 法 **:p<0.01, *:p<0.05, N.S.:有意差が認められない)

Table.3 pfTRPA1 の温度応答の解析のまとめ

A Response to cold stimulation							
Batch	non injection			pfTRPA1			Statistical significance
	N	Mean (μ A)	S.E.	N	Mean (μ A)	S.E.	
1	3	12.30	1.00				
2	5	6.39	1.25				
3	9	-0.07	0.01	6	-0.02	0.19	NS
4	7	0.53	0.18	5	6.13	1.09	**
5	4	3.41	0.62	3	0.78	0.62	NS
6	4	8.31	2.28				
7	4	11.13	1.37				
8	6	0.03	0.11	3	0.49	0.39	NS
11	2	2.70	0.11	2	9.40	2.81	NS
12	2	-0.12	0.05	5	5.34	1.77	*
13	5	-0.06	0.05	5	7.18	2.27	*
14	5	-0.18	0.45	4	2.82	1.16	*
15※	8	0.35	0.16	8	5.83	1.56	**
16	5	0.26	0.08	5	1.43	0.40	*

B Response to hot stimulation (37°C)							
Batch	non injection			pfTRPA1			Statistical significance
	N	Mean (μ A)	S.E.	N	Mean (μ A)	S.E.	
1	3	0.93	0.11	3	9.44	2.64	NS
2	5	0.71	0.47	7	0.92	0.16	NS
3	9	0.08	0.02	6	0.51	0.08	**
4	7	0.39	0.08	5	0.86	0.08	**
5	4	2.41	0.21				
6	9	0.35	0.08	5	1.31	0.08	**
7	4	0.28	0.09	5	3.35	0.38	**
8	4	0.59	0.35	4	0.39	0.09	NS
9	4	0.56	0.21	4	2.47	0.86	NS
10	5	0.53	0.20	5	3.25	0.77	*
11	2	0.76	0.14	2	1.14	0.09	NS
12	2	0.50	0.14	5	0.54	0.10	NS
13	5	0.32	0.09	5	0.52	0.05	NS
14	5	0.06	0.25	4	1.60	0.45	*
15※	8	0.30	0.05	8	1.27	0.15	**
16	5	0.11	0.02	5	2.85	0.79	*

各バッチの pfTRPA1 発現卵母細胞と cRNA を導入していない卵母細胞の間の+40 mV の低温のピークの活性電流(A)と高温(37°C)の活性電流(B)の平均をまとめた。※がついている#15 は、Fig.15 のバッチを示している。低温刺激では#1, #2, #6, #7、高温刺激では#5 で内因性の電流が観察された。non injection の低温応答が 6 μ A 以上、高温応答が 2 μ A 以上出たバッチについては、解析から除外した。

(T 検定 **:p<0.01, *:p<0.05, N.S.:有意差が認められない)

Table.4 マウスと魚類の TRPA1 の化学物質と温度に対する応答性

	Chemical				Inhibitor		Thermo	
	AITC	caffeine	oxi EGCG	H ₂ O ₂	HC- 030031	AP-18	Cold	Hot
Mouse	○	○	○	○	○	○	○ <17°C	×
Zebrafish-a	○	○	○	○	○	○	×	×
Zebrafish-b	△	○	×	△	×	×	○ <10°C	○ No threshold
Medaka	○	○	×	×	×		×	○ No threshold
Pufferfish	○	○	×	○	○	△	○ <8°C	○ No threshold

マウスと魚類(ゼブラフィッシュ、メダカ、フグ)の TRPA1 の各化学物質と温度に対する応答性をまとめた。

表の○は活性化、△は高濃度のみでの活性化、×は不活性化、空欄は未解析を示す。

第2章 axTRPA1 のクローニングと機能解析

緒言

第1章の結果から、水中に生息する魚類の TRPA1 は、閾値がなく、25°Cから徐々に活性化する高温応答の特性を示し、これまで報告されている陸上動物の TRPA1 の高温応答の特性と大きく異なることが明らかになった。魚類が生息する水中は一日の温度変化が少なく、急激な温度変化が起きにくい。一方、陸上は日照などの影響により一日の温度変化は大きくなった。よって、生息温度や生理機能に関連する温度を逸脱する侵害温度を高感度で感知できるように、陸上動物の TRPA1 は閾値を持つようになったと考えられる。よって、動物が水中から陸上へ進出した際に、TRPA1 の温度応答性が大きく変化したと考えられる。では、TRPA1 の高温閾値の有無は、どの動物から変化したのだろうか。

両生類は、動物の陸上進出の過程に深く関わっている。すなわち、両生類は、その発生や成長過程で水中から陸上へと生息域を劇的に変化させる動物である。この両生類は、カエルなどの無尾目、イモリやサンショウウオなどの有尾目、そしてアシナシイモリの無足目からなる。呼吸という観点からみると、両生類は幼生の間は鰓を持ち鰓呼吸だが、成体になると鰓が退化し、陸上に上がり肺呼吸に変化する。さらに、温度耐性については、一般的に両生類は高温と乾燥に弱く、また冬になると寒さを感じ、生き延びるために冬眠をするものが多い。

両生類の TRPA1 については、無尾目のニシツメガエル、アフリカツメガエル(a, b)の TRPA1 のクローニングが行われ、そのチャンネル機能の解析が行われていた(Saito et al., 2012, 2016)。その結果、xtTRPA1 は 39°C以上、xlTRPA1a は 37°C、xlTRPA1b は 36°C以上の高温によって活性化する、閾値を持つ高温センサーであることが報告されている。これら2種のツメガエルの至適生息温度範囲は、アフリカツメガエルは 16-22°C、ニシツメガエルは 22-28°Cである(Kashiwagi et al., 2010)。さらに、アフリカツメガエルは、ニシツメガエルと比較して、涼しい地域に分布しているため、TRPA1 の活性化温度閾値の違いは、生息温度と関連していると考えられている。

また、これら2種のツメガエルの TRPV1 についても、クローニングが行われ、機能解析が行われている。その結果、ツメガエルの TRPV1 は 40°C以上の高温によって活性化する高温センサーとして機能していることが報告されている。また、ニシツメガ

エル TRPV1 とアフリカツメガエル TRPV1a に繰り返し高温刺激を行うと、アフリカツメガエル TRPV1a は脱感作し、ニシツメガエル TRPV1 は感作することが明らかになった。このように 2 種のツメガエルの間で高温応答性の特性が異なることが報告されている(Ohkita et al., 2012; Saito et al., 2016)。

よって、両生類の TRPA1 から閾値を持つ高温センサーの特性に変化したと考えられる。これまでの両生類 TRPA1 の機能解析は、無尾目を使用した研究が多い。では、イモリやサンショウウオを含む有尾目の TRPA1 の機能はどのようなのだろうか。これまで、有尾目の TRPA1 については全く研究が行なわれていなかった。そこで有尾目で、生涯を水中で過ごすアホロートル(*Ambystoma mexicanum*)に注目した。アホロートルは、平均水温 15°C のソチミルコ湖原産で、幼形成熟(ネオテニー)で、外鰓と肺を持ちながら鰓呼吸をする特徴を持ち、水生動物と陸生動物の両方の性質を持っている。さらに、体の失われた部位を再生する能力が著しく高く、再生研究のモデル生物として多くの研究者が使用している。

本章では、有尾両生類 TRPA1 のクローニングとそのチャネルの機能解析を行った。アホロートルのゲノム解析は進行中であり、axTRPA1 の完全長 cDNA は予想されていなかった。そこで、EST データベース上の TRPA1 類似配列を基に部分配列の検出を行った。そして、その配列を基に、RACE 法と oligo capping 法を用いて、完全長 cDNA 配列を決定した。その完全長 cDNA の異種性発現系を用いた化学物質や温度に対する応答性の解析と生体を用いた行動解析を行い、無尾目の xtTRPA1 と比較することで、両生類の TRPA1 の機能の違いを考察した。そして、axTRPA1 は陸上動物型の閾値を持つ高温センサーとして働いているのか解析を行った。

材料と方法

1. 実験動物

アホロートルは、RNA 抽出に 12-15 cm、行動実験には 5-8 cm の亜成体を用いた。アホロートルの胚ステージは、以下の論文を参考に決定した(Bordzilovskaya et al., 1979)。ニシツメガエル(Golden 系統)の幼生(st.50)は、荻野肇博士ならびに National Bio-Resource Project から提供していただいた。それ以外は、「第 1 章 2.実験動物」と同様である。

2. アホロートルの Total RNA の抽出

アホロートル亜成体を 30 分氷冷麻酔し、断頭した。チューブに各組織(脳, 肺, 心臓, 胃, 肝臓, 皮膚, 外鰓, 筋肉, DRG, 脊髄)または各発生段階の胚(st.32, st.40 は 20 匹、孵化幼生は 10 匹) を入れ重さを計測した。各組織を入れた 1.5 ml チューブは、液体窒素で急速凍結させた後、-80℃で保存した。各サンプルの重さに応じて、TRIzol Reagent [Ambion]を必要量(100 mg で 1ml)使用し、ポリトロンで粉砕し、total RNA を抽出した。

3. axTRPA1 の部分配列決定

axTRPA1 の完全長 cDNA 配列の報告はなく、ゲノムは解析中のため、予想配列はデータベース上に存在していなかった。Ambystoma EST Database 上に、axTRPA1 の EST 配列(ID: C2341461, 523 bp)があった(Fig.22A)。そこで、axTRPA1 の EST 配列を増幅するプライマーを設計した。また、ポジティブコントロールとして使用した β -actin プライマーは、Yu et al., 2013 を参考にした。

axTRPA1-Forward:5'-CTGTCTATCCTAAACAGGCC-3'

axTRPA1-Reverse:5'-TTTGCTTTGTGCCATTGGGG-3' 理論値:479 bp

β -actin Forward:5'-GATGATATTGCCGCACTCGTTGTTG-3'

β -actin Reverse:5'-CTGTGTTGGCATAACAAGTCTTTTCG-3' 理論値:750 bp

total RNA 3 µg を用いて、Random primer を使用し逆転写反応(M-MLV [Invitrogen])を行い、cDNA を作製した。この cDNA を鋳型に使用して、上記で示した各プライマーセットを用いて RT-PCR (KOD Fx Neo) {PCR 条件:94°C 2 分, (98°C 10 秒, 55°C 30 秒, 68°C 1 分)×30, 68°C 5 分, 4°C ∞}を行った。増幅された PCR 産物は切り出しを行い、Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit [Invitrogen]にサブクローニングを行った。DH5αに形質転換し、LB^{kana} プレートで培養した。出現したシングルコロニーを爪楊枝でピックアップし、コロニーPCR によるインサート確認と同時に、LB^{kana} 液体培地に入れて 37°C で一晩培養した。コロニーPCR 陽性クローンからプラスミド単離後、Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit [Applied Biosystems]で配列を決定した。

4. axTRPA1 の完全長 cDNA 配列の決定

真核生物の mRNA の 5'末端にはキャップ構造、3'末端には poly A が存在する。また、total RNA は、mRNA の他に何かしらの原因で Cap 構造が付加されず、mRNA の 5'末端にリン酸基もしくは水酸基を持つ不完全な mRNA、さらに tRNA、rRNA が存在する。axTRPA1 の完全長 cDNA を単離するために、成熟した mRNA だけをクローニングする必要があるため、GeneRacer™ Kit [Invitrogen]を用いて以下の手順で、完全な mRNA をクローニングした(Fig.23)。

- ① DRG の total RNA の Cap 構造を解離させる活性を持たない脱リン酸化酵素(CIP)により、完全な mRNA 以外を脱リン酸化する。
- ② タバコ酸性ピロホスファターゼ(TAP)により脱キャップ化することで、完全な mRNA だけが 5'末端にリン酸基が残るようにする。
- ③ T4 RNA ligase で 5' 末端に RNA Oligo をくっつける。
- ④ 3'末端の poly A 特異的な Gene Racer™ Oligo dT プライマーを使用して、逆転写反応を行う。

結果、mRNA から作製した cDNA の 5'末端と 3'末端に既知のプライミングサイトが存在するようにした。得られた cDNA を鋳型に、部分配列決定した axTRPA1 の内部の既知配列に対応したプライマーを用いて 1st-PCR (KOD Fx Neo) {PCR 条件:94°C 2 分, (98°C 10 秒, 72°C 3 分)×5, (98°C 10 秒, 70°C 3 分)×5, (98°C 10 秒, 60°C 30 秒, 68°C 3 分)×25, 68°C 5 分, 4°C ∞または 94°C 2 分, (94°C 30 秒, 72°C 2 分)×5, (94°C 30 秒, 70°C 2 分)×5, (94°C 30 秒, 65°C 30 秒, 68°C 2 分)×25, 68°C 10 分, 4°C ∞}を行

った。その PCR 産物を鋳型に、Nested プライマーを使用して Nested-PCR (KOD Fx Neo) {PCR 条件:94℃ 2 分, (98℃ 10 秒, 65℃ 30 秒, 68℃ 3 分)×30, 68℃ 5 分, 4℃ ∞または 94℃ 2 分, (94℃ 30 秒, 68℃ 2 分 30 秒)×30, 68℃ 10 分, 4℃ ∞}を行った。Nested-PCR の産物は切り出しを行い、「3. axTRPA1 の部分配列決定」と同様の方法で配列を決定した。

1st PCR プライマー

Forward:5'-CGGAGACATTGCAGAAGTACAACG-3'

Reverse プライマーは「3. axTRPA1 の部分配列決定」で使用した axTRPA1-Reverse を使った。

Nested PCR プライマー

Forward:5'-ATGCAGGTCAACCTTCACACCA-3'

Reverse:5'-CAGTGAGTCTCTGGTTCACACA-3'

5. RT-PCR による発現解析

total RNA(組織は 200 ng, 胚は 3 µg)を用いて、Random primer を使用して逆転写反応を行い、cDNA を作製した。バンドの明るさが同程度になるよう RT 産物を調整し、β-actin プライマーで PCR (Go taq [Promega])を行った{PCR 条件:95℃ 2 分, (95℃ 30 秒, 55℃ 30 秒, 72℃ 1 分)×25, 72℃ 5 分, 4℃ ∞}。この条件で、axTRPA1 を増幅する下記のプライマーを使って、PCR を行った{PCR 条件:95℃ 2 分, (95℃ 30 秒, 55℃ 30 秒, 72℃ 1 分)×35, 72℃ 5 分, 4℃ ∞}。

axTRPA1 増幅用プライマー

Forward:5'-ATGCAGGTCAACCTTCACACCA-3'

Reverse:5'-CAGTGAGTCTCTGGTTCACACA-3'

理論値:435 bp

6. 発現プラスミド

完全長 cDNA を増幅するために、4.で増幅した 5'の PCR 断片が入った TOPO ベク

ターのプラスミドまたは 1st-PCR の PCR 産物を鋳型に、4 つの断片に分けて、一段階目の PCR を行い、増幅した PCR 産物は、切り出しを行った。この PCR 産物を鋳型に、二段階目のオーバーラップ PCR を行った。その PCR 産物の切り出しを行い、「3. axTRPA1 の部分配列決定」と同様の方法で、配列を決定した。そして、TOPO ベクターのプラスミドを XhoI と KpnI で切断し、哺乳類発現用ベクター Kei ベクターにクローニングした。一方、カエル卵母細胞発現用ベクター pGEMHE にクローニングする際は、TOPO ベクターのプラスミドを EcoRI で切断し、クローニングした。発現プラスミドは、Pure Link™ HiPure plasmid Midi prep kit を用いて単離し、使用した。

完全長 cDNA 増幅用プライマー

axTRPA1-F:5'-CGTCTAGAGGATCCTGAACCATGAGGAAATCCCTCAAGAG-3'

axTRPA1-seq12R:5'-CGCAGGCATGTATTAATCCG-3'

axTRPA1-seq7F:5'-GCGTACCAGGCTCAGTTAAT-3'

axTRPA1-seq4R:5'-TGGACAATTTGCCACACCTC-3'

axTRPA1-seq8F:5'-CCTGGAGATGATTGAGCATC-3'

axTRPA1-seq2R:5'-AAGTGCAGCATTGCGTTGTA-3'

axTRPA1-seq9F:5'-GGACGATCAATGTTACTGGC-3'

axTRPA1-R:5'-ATCTCGAGCACAGCCTTTGCTTTGACTG-3'

axTRPA1 発現用ベクタープライマー

Forward:5'-GTGGATCCTGAACCATGAGGAAATCCCTCAAGAG-3'

Reverse:5'-GTGGATCCTCACACAGCCTTTGCTTTGA-3'

Ca²⁺イメージングに使用した xtTRPA1 (in pcDNA3.1)は、富永 真琴博士(岡崎総合バイオサイエンスセンター, 生理学研究所)から頂いた。

7. 行動解析

アホロートル垂成体は、1000 ml の飼育水を入れたプラスチック容器(12×30×9.5 cm)に入れ解析を行った。ニシツメガエルの幼生は、200 ml の飼育水を入れたプラスチック容器(8.0×11.5×4.5 cm)に入れ解析を行った。処理は、カルキを抜いた水を用いて

control (0.4% DMSO)、0.5 mM AITC、4 mM MA 入りの飼育水を実験直前に作成し、解析を行った。AITC と MA は、1 M ストックを DMSO で作成し、そのストックを使用した(DMSO の終濃度は 0.4%)。実験は、1 匹ずつ行い、各処理 5 匹分の記録を取った。観察は、3 分間の動きを動画で撮影した。また、実験日から次の実験までは、1 週間以上の期間を空けて行った。

処理開始から 30 秒間の動きをビデオ画像から 3 秒ごとにプロットし、総移動距離を算出し、数値化した。control 処理した時の総移動距離を 1 とした時の AITC と MA で処理した際の距離を算出し、棒グラフで示した。

8. 二本刺し膜電位固定法

卵母細胞発現用ベクター pGEMHE に入っている axTRPA1 の cDNA を Nhe I で直鎖にし、フェノールクロロホルム処理とエタノール沈殿で精製した。精製した DNA をテンプレートとして、T7 プロモーターの mMESSAGE mMACHINE Kit を用いて cRNA を合成した。

MA の応答の解析は、各濃度の MA (終濃度 0.7 mM, 2.7 mM, 4 mM, 8 mM)を使用し、応答を測定した。計測開始から 10 秒後に 0.7 mM、70 秒後に 2.7 mM、130 秒後に 4 mM、190 秒後に 8 mM になるように、5 倍濃度の MA をバス内に 40 μ l アプライし、数回ピペッティング後、バス内の溶液を同量取り除いた。各濃度の MA を添加してから、30 秒後に灌流で 30 秒間洗いを行った。それ以外の方法は、第 1 章と同様の方法で行った。

9. その他の方法

材料、Ca²⁺イメージングについては、第 1 章と同様の方法で行った。

結果

1. axTRPA1 は 1121 アミノ酸からなる

axTRPA1 の完全長 cDNA 配列の報告はなく、ゲノムは解析中のため、予想配列はデータベース上に存在していなかった。Ambystoma EST Database 上に、axTRPA1 の EST 配列(523 bp)が見い出された。そこで、この配列を基にプライマーを設計し、RT-PCR で検出を試みた(Fig.22A)。

TRPA1 が多く発現している脊髄と DRG の RNA を調製し、この RNA と前述のプライマーセットを用いて RT-PCR を行った結果、 β -actin では脊髄と DRG の RT(+)でバンドを増幅することができた。また、axTRPA1 プライマーでは、DRG で理論値のバンドを増幅することができた(Fig.22B)。そして、PCR 産物を配列決定した結果、EST 配列とほぼ同一の配列を取得することができた。

次に、完全長の axTRPA1 の cDNA の配列情報を得るため、RACE 法とオリゴキャッピング法を用いた Gene Racer™ Kit を使用して、cDNA の 5'側と 3'側の配列決定を行った(Fig.23)。そのために、Gene Racer 産物に対して 5'と 3'の PCR 反応を行い、さらにその産物に対して Nested PCR を行った。増幅されたバンドをゲルから精製し、TOPO ベクターに導入して配列決定を行った。その結果、axTRPA1 の cDNA の ORF は 3363 bp で、1121 アミノ酸残基のタンパク質をコードしていることが明らかになった(Fig.24A, B)。得られたアミノ酸配列を基に、構造のモチーフ検索を行った結果、16 個の AR と 6 つの膜貫通領域を持つ、典型的な TRPA1 の構造を持っていることが明らかになった(Fig.24B)。また、他の脊椎動物 TRPA1 のアミノ酸配列との同一性を見ると、両生類のニシツメガエルと最も高い同一性(62.8%)を示した(Fig.24C)。

次に、ML 法で系統樹を作成した。その結果、脊椎動物 TRPA1 は魚類、両生類、爬虫類以上の 3 グループに分かれることが明らかになった(Fig.25)。また、axTRPA1 は、両生類のグループに属していることが分かった。

2. axTRPA1 は脳、心臓、肺、胃での発現が高い

axTRPA1 が組織のどの部位に多く発現しているのか解析するために、アホロートルの各組織(脳, 肺, 心臓, 胃, 肝臓, 皮膚, 外鰓, 筋肉)の RNA を用いて RT-PCR を行った。 β -actin では、すべての臓器でバンドを増幅することができた。これに対して、axTRPA1

の mRNA は、脳、肺、心臓、胃に発現が多く、次に筋肉、そして他の組織では発現レベルが低いことが明らかになった(Fig.26A)。次に、発生段階での axTRPA1 の発現を解析した。解析では、st.32 (尾芽胚後期)、外鰓が出現した後の st.40 (孵化前)、孵化直後の 3 種類の胚を用いて、解析を行った。その結果、axTRPA1 の mRNA は、3 種類の胚すべてでバンドが検出され、発生とともに発現が増加している傾向がみられた(Fig.26B)。

3. axTRPA1 は MA に応答する

次に、哺乳類 TRPA1 が応答する 6 種の化学物質(AITC, caffeine, oxi-EGCG, H₂O₂, carvacrol, MA)に対して、axTRPA1 がどう応答するのか検討するために、HEK293T 細胞発現系を用いた Ca²⁺イメージング法で解析を行った(Fig.27)。同じ両生類の xtTRPA1 と応答を比較した結果、アホロートルとニシツメガエルの TRPA1 は AITC、caffeine、carvacrol に濃度依存的に応答するのに対して、両 TRPA1 は oxi EGCG と H₂O₂ に対して、どの濃度にも応答しなかった。一方、axTRPA1 は MA に応答したが、xtTRPA1 は応答しなかった。以上のことから、axTRPA1 と xtTRPA1 の化学物質応答性の多くは類似していたが、MA に対する応答性が両動物の間で大きく異なることが明らかになった(Fig.27B)。xtTRPA1 は高濃度の MA (8 mM) に対して、微弱な電流を示すことが報告されており、本研究の結果とよく一致する(Saito et al., 2014)。

次に、axTRPA1 は本当に MA に応答するのか検討するために、カエル卵母細胞発現系を用いた二本刺し膜電位固定法で解析を行った。解析では、マウスとアホロートルの TRPA1 の cRNA をカエル卵母細胞に発現させ、MA (0.7 mM, 2.7 mM, 4 mM, 8 mM) に対する活性電流を測定した。

その結果、マウスとアホロートルの TRPA1 は 2.7 mM から応答し、濃度依存的に大きく応答した(Fig.28A)。各濃度の MA に対する平均電流をマウスとアホロートルの TRPA1 で比較すると、電流の大きさはほぼ同様であった(Fig.28B)。以上の結果から、axTRPA1 は mTRPA1 と同様の MA 応答性を示すことが明らかになった。

4. アホロートル亜成体は MA に反応する

前述の実験で、xtTRPA1 の MA 応答性はかなり低いが、axTRPA1 にはある程度高い MA 応答性があることが示された。そこで、TRPA1 の感受性が生体応答に反映しているかどうか、実際にアホロートルの生体が MA に対して反応するのか、個体を用いた行動

解析を行った。control (0.4% DMSO)、0.5 mM AITC、4 mM MA を含む飼育水にアホロートル亜成体またはニシツメガエル幼生を入れ、3 分間の遊泳行動の観察と記録を行った (Fig.29)。

まず、アホロートルとニシツメガエル両方の TRPA1 が応答性を示す AITC に対する両動物の個体の反応を観察した。すると、どちらの動物も 0.5 mM AITC の中で、control に比べ、外鰓を激しく動かし、明らかに活発に動き回るのが確認され、AITC を感知していることが示唆された。次に、MA に対する実験を行った。遊泳行動を観察すると、アホロートルは control 処理では動きが見られなかったが、MA 処理では AITC と同様に外鰓を激しく動かし、活発に動いていることが確認された。これに対して、ニシツメガエルは control 処理と MA 処理両方で動きは見られなかった。しかし、その後 MA 処理の個体は気絶し、動かなくなってしまった (Fig.29A)。

処理開始から 30 秒間の総移動距離をビデオ画像から算出し、比較した。AITC に対して、両動物とも回避行動をとるように動きが活発になることが分かった。しかし、MA に対して、アホロートルは動きが活発になり侵害行動が見られたが、ニシツメガエルは全く動かなかった (Fig.29B)。

これらの結果をまとめると、*in vitro* での機能解析と行動解析の両方で無尾目のニシツメガエルと有尾目のアホロートルの間で、MA 応答が異なることが示され、アホロートルは TRPA1 を使って MA に応答していることが示唆された。

5. axTRPA1 の阻害剤の効果

次に、哺乳類 TRPA1 の阻害剤 (TRP チャネル阻害剤 RR, TRPA1 阻害剤 HC-030031 と AP-18) を使って、axTRPA1 の抑制効果について検討を行った。各阻害剤存在下で AITC に対する応答がどう変化するのか、Ca²⁺イメージング法で解析した。

その結果、TRP チャネル阻害剤の RR を添加すると、mTRPA1 と axTRPA1 発現 HEK 細胞の AITC 応答は抑制された。また、mTRPA1 は TRPA1 阻害剤の HC-030031 と AP-18 によって AITC 応答が完全になくなり、さらに、axTRPA1 も HC-030031 と AP-18 によって AITC 応答が完全に抑制されることが明らかになった (Fig.30)。xtTRPA1 の阻害剤の効果は、HC-030031、AP-18 のどちらにも抑制効果がないことが報告されている (Saito et al., 2012)。以上のことから、axTRPA1 と xtTRPA1 の間で阻害剤の効果が大きく異なることが明らかになった (Table.5)。

6. axTRPA1 は 41°C以上の高温で活性化する陸上動物型の高温センサーである

次に、axTRPA1 の温度応答性を解析するために、二本刺し膜電位固定法を用いた電気生理学解析を行った。低温刺激と高温刺激(〜40°C)を行った結果、non injection は低温と高温両方に応答しなかった。一方、axTRPA1 に同様の低温と高温刺激を行うと、全く応答しなかった。低温のピーク電流と高温(40°C)での活性電流の平均を比較しても、axTRPA1 は有意な応答が見られなかった(Fig.31)。

同じ両生類の xtTRPA1 は、39°C以上の高温で活性化することが報告されているため (Saito et al., 2012)、axTRPA1 はさらに高い温度で活性化する可能性が考えられた。そこで、18〜45°Cまでの高温刺激を行い、axTRPA1 は応答するのか検討した。結果、non injection は全く応答しなかったが、axTRPA1 は 40°Cを超えると応答し始め、明らかな活性電流が確認された(Fig.32A)。44°Cの時の活性電流の平均を比較すると、axTRPA1 は高温に有意に応答していた(Fig.32B)。活性電流と温度のグラフを見ると、axTRPA1 は 40°C付近から活性化していることが分かる(Fig.32C)。このデータを基に、アレニウスプロットを作成すると、魚類 TRPA1 で観察された室温付近から徐々に高温で活性化される特性はなく、明らかに屈曲する点が存在した。このアレニウスプロットを用いて、高温の活性化温度閾値を決定すると、交点が 3.18 なので、閾値は 41.47°Cであった。同じバッチの高温の温度閾値の平均は、 $41.11 \pm 0.18^{\circ}\text{C}$ (n=8)となった(Fig.32D)。よって、axTRPA1 の高温応答の特性は、41°Cに閾値を持つ陸上動物型であることが判明した。

考察

1. axTRPA1 と他の動物 TRPA1 との比較

TRPA1 の分子構造は、16 個の AR と 6 つ膜貫通領域から構成されている(Fig.3) (Paulsen et al., 2015)。本研究で、完全長 cDNA 配列の決定をした axTRPA1 は、16 個の AR と 6 つの膜貫通領域を持つ典型的な TRPA1 であることが明らかになった。また、同じ両生類の xtTRPA1 と axTRPA1 間でアミノ酸配列を比較した結果、同一性が 63%であったことから、ホモロジーがあると考えられる(Fig.24C)。また、axTRPA1 と他の動物の TRPA1 のアミノ酸配列を比較した結果、axTRPA1 は魚類よりも陸上動物の TRPA1 の間と同一性が高い傾向が見られた。陸上動物 TRPA1 と魚類 TRPA1 の最も大きな機能的な違いは、温度応答性であるため、axTRPA1 の温度応答の特性は、陸上動物型の応答性を示す可能性が高いと考えられる。

また、ML 法で分子系統樹を作成した結果、脊椎動物 TRPA1 は、魚類のグループ、両生類のグループ、爬虫類・鳥類・哺乳類のグループの 3 つの系統に分かれることが明らかになった(Fig.25)。axTRPA1 は、アミノ酸の同一性が最も高かったニシツメガエルを含む両生類のグループに入り、そのグループ内で無尾目のツメガエルと有尾目のアホロートルに分岐していることが分かった。この系統樹からも、axTRPA1 は陸上動物に近い刺激応答性を示すと予想された。

2. axTRPA1 の発現部位

アホロートルの成体の各組織での発現解析を行った結果、axTRPA1 は脳、肺、心臓、胃に強く発現し、筋肉に少し発現していることが明らかになった(Fig.26A)。また、部分配列決定と完全長 cDNA 配列決定は、DRG を使って行ったことから、axTRPA1 は DRG にも発現していると考えられる(Fig.22B)。哺乳類 TRPA1 は、DRG、三叉神経、脳、内耳、舌、心臓、肺、腸、脾臓に発現していることが報告されている(Story et al., 2003, Nozawa et al., 2009)。以上のことから、axTRPA1 と哺乳類 TRPA1 の発現部位は重複していることから、これらの組織で axTRPA1 は侵害受容センサーとして機能していると示唆される。

これまでの各動物の TRPA1 の解析から、脊椎動物の祖先の TRPA1 は化学物質感受性と高温感受性を持っており、両生類の TRPA1 から DRG で TRPV1 と共発現していると

推測されている(Saito et al., 2015)。よって、アホロートルの DRG で TRPA1 と TRPV1 が共発現していることが期待される。今後、アホロートル TRPV1 の完全長 cDNA 配列決定を行い、アホロートルの DRG で TRPA1 と TRPV1 が共発現しているのかを含めた研究はとても興味深い。

さらに、アホロートルの胚での発現を解析した結果、axTRPA1 は発生とともに発現量が増加している傾向がみられた(Fig.26B)。今後、受精直後から孵化するまでの各ステージでの発現解析を行うことで、他の動物との違いや TRPA1 の発生中の機能など明らかになるかもしれない。いずれにしても、axTRPA1 の組織や発生段階での発現について、*in situ* hybridization や免疫蛍光染色などで詳細に解析を行い、TRPA1 の機能と発現部位に関連があるのか、検討する必要があるだろう。

3. 両生類 TRPA1 の化学物質感受性

アホロートルとニシツメガエルの TRPA1 の化学物質応答性について、Ca²⁺イメージングで解析した結果、AITC、caffeine、oxi EGCG、H₂O₂、carvacrol の応答性は両動物で類似していた。しかし、xtTRPA1 はどの濃度の MA でも応答しないのに対して、axTRPA1 は MA に応答することが明らかになった(Table.5)。さらに、二本刺し膜電位固定法で解析すると、axTRPA1 は mTRPA1 と同様の MA 応答性を示すことが明らかになった(Fig.28A, B)。

これまでに、各動物の TRPA1 の MA に対する応答性について二本刺し膜電位固定法を用いて解析が行われた結果、ヒト、マウス、ニワトリの TRPA1 は低濃度から大きく応答するのにに対して、グリーンアノールトカゲとニシツメガエルの TRPA1 は高濃度のみで弱い応答を示し、MA 応答性が低いことが報告されていた(Saito et al., 2014)。さらに、AR16 付近に位置する 3 つのアミノ酸(cTRPA1 の 596 番目の Arg, 603 番目の Thr, 627 番目の Pro)が MA 応答に重要であることが報告されている。そこで、axTRPA1 のアミノ酸を見たところ、活性化に重要な 3 つのアミノ酸のうち、Thr と Pro の 2 つのアミノ酸が保存されていることが分かった(Fig.28C)。以上のことから、この 3 つのアミノ酸の違いが両生類 TRPA1 の間の MA 応答の違いに起因していると考えられた。

以上の結果から、無尾目のニシツメガエルと有尾目のアホロートルの TRPA1 の化学物質応答性は、いくつかの点が異なることが明らかになった。ニシツメガエルの食性は雑食(水草、小型の魚、水中の無脊椎動物)で、舌がないために餌は口を開け両手で掻き

込むように押し込んでいる。一方、アホロートルは肉食(魚, 昆虫, 甲殻類)で、舌を持っている(松井, 両生類の進化, 1996)。しかし、餌の物質の感知は、ニシツメガエルは飲み込んで内臓で感知し、アホロートルは舌で感知していると考えられる。よって、両動物の TRPA1 の化学物質応答性の違いは、食性や生存戦略の違いによって変化したと考えられる。

また、xtTRPA1 は DRG に発現していることが報告されており、単離した DRG の化学物質に対する応答性について解析が行われている。axTRPA1 は、DRG を用いて部分配列を決定したことから、axTRPA1 は DRG にも発現している。よって、今後アホロートルの DRG を単離し、今回の解析で応答した化学物質に感覚神経の DRG が応答するのか、さらにニシツメガエルとアホロートルの DRG で MA 応答に違いがあるのか解析していくことが重要である。

さらに、アホロートルは行動レベルで TRPA1 を使って MA に応答している可能性が高く、行動レベルでも無尾両生類ニシツメガエルと有尾両生類アホロートルの間で MA 応答が異なることが示された。これまで、生体を使った侵害行動の解析の多くは、モデル動物のマウスが多く、今回の解析によってアホロートルでも侵害刺激行動が観察できることが示された。

アホロートルはどこで MA を感じているのだろうか。この点に関連して、マウスは鼻腔内の三叉神経に TRPA1 が発現し、刺激物質の AITC やホルマリンの蒸気を曝露すると、忌避行動を示すことが報告されている(Yonemitsu et al., 2013)。また、当研究室の齊藤によって、*in situ* hybridization でメダカの TRPA1 が鼻腔に発現していることが明らかになった(齊藤, 修士論文, 2017)。MA は、コンコードブドウやジャスミンに含まれる香気成分である。この香気成分の挙動が水中と陸上では異なる可能性もあるが、axTRPA1 は鼻腔内の感覚神経に発現し、侵害物質である MA を感知している可能性が高いのではないだろうか。

また、斎藤によって、ニシツメガエルの成体を使ったジャンプ行動で侵害刺激による行動解析が行われており、その結果 TRPA1 のアゴニストによってジャンプ行動が増加していることが報告されている(Saito et al., 2012)。よって、今回の解析結果と一致して、TRPA1 がこれらの侵害物質を感知して、侵害行動が起きている可能性が示唆される。しかし、ニシツメガエルの MA 処理では、移動距離の増加は見られなかったが、しばらくして気絶し、動かなくなってしまった。このことから、他の受容体が MA を感知し、麻

痺反応が起きている、または感知できないため危険に気づかず、気絶したの2つの可能性が考えられる。動物個体に薬物を投与する場合、様々な非特異的応答や別ルートとの関与を否定することは難しい。本当に TRPA1 を使って、アホロートルが AITC と MA に応答しているか、TRPA1 阻害剤の HC-030031 または AP-18 の効果によって侵害行動がどう変化するのか、行動解析をする必要があるだろう。

4. 両生類 TRPA1 の阻害剤の効果

axTRPA1 は、TRPA1 阻害剤の HC-030031 と AP-18 によって抑制された。また、xtTRPA1 は TRPA1 阻害剤両方で抑制されないことが報告されている(Saito et al., 2012)。以上のように、両生類 TRPA1 の間の阻害剤の効果が大きく異なることが明らかになったことから、両チャンネルのリガンド結合様式や活性化様式など構造上の違いが存在すると考えられた。

哺乳類 TRPA1 の AP-18 の阻害効果は、mTRPA1 の 5 番目の膜貫通領域に位置する 876 番目の Ser と 877 番目の Thr が重要であることが報告されている(Xiao et al., 2008)。その部位の axTRPA1 のアミノ酸は Ile と Ala、xtTRPA1 は Ile と Val であった。よって、報告されている作用部位は哺乳類特異的な作用部位であり、axTRPA1 の作用部位では、異なる部位のアミノ酸が重要である可能性が高いと考えられた。

また、hTRPA1 の HC-030031 の阻害効果に重要な残基である 855 番目の Asn について、axTRPA1 のアミノ酸を見てみると、axTRPA1 は Ser であった(Gupta et al., 2016)。HC-030031 によって抑制されない xtTRPA1 のアミノ酸も Ser であったため、両生類 TRPA1 の間で HC-030031 の阻害効果に重要な部位のアミノ酸は同じであったが、阻害剤の効果が異なることが明らかになった。Gupta らの解析によって、xtTRPA1 の 880 番目の Ser を Asn (hTRPA1 型)に変異させると、HC-030031 の抑制効果が見られると報告されている(Gupta et al., 2016)。すなわち、HC-030031 の作用機序が axTRPA1 と xtTRPA1 の間で異なる可能性が高い。

5. 両生類 TRPA1 の温度感受性

二本刺し膜電位固定法で温度に対する応答性を解析した結果、axTRPA1 は低温には応答せず、41℃以上の高温に応答することから、41℃に閾値を持つ陸上動物型の特性であることが明らかになった(Table.5)。一方、同じ両生類の xtTRPA1 は 39℃に閾値を持つ

高温センサーであることが報告されている(Saito et al., 2012)。以上のことから、両生類 TRPA1 の温度特性は、高温閾値を持つという意味で同じであることが明らかになった。しかし、両動物の TRPA1 の活性化温度閾値は数℃異なっている。この温度閾値の違いは、生息環境の温度の違いが反映している、または高温刺激の与え方などの違いが原因で、高温閾値の違いが出ている可能性が考えられる。そのため、同じ条件で両動物の高温応答の閾値を検討する必要があるだろう。

通常、皮膚の神経線維に発現する温度受容器が環境温度を感知していると考えられている。しかし、組織での発現解析で axTRPA1 の発現が皮膚で検出されなかった (Fig.26A)。その理由として、1 つ目に今回の解析では表皮を使用したことから、TRPA1 が発現する神経線維が含まれていなかった可能性が高い。TRPA1 が発現する神経線維は真皮に多く存在しているため、TRPA1 の発現が検出できなかったと考えられる。2 つ目の理由として、温度受容器は中枢神経系(視床下部・中脳・延髄・脊髄)や腹腔、大血管などにも分布しており、体の深部温度を感知している。脳や DRG で axTRPA1 の発現が検出されていることから、axTRPA1 は深部温度の感知に寄与している、または何らかの生理機能に寄与している可能性が考えられる。よって、axTRPA1 の詳細な分布解析を行うことで、温度感知と TRPA1 の温度感受性の関連が明らかになるだろう。

以上の結果と脊椎動物 TRPA1 の温度応答性をまとめると、axTRPA1 は陸上動物型の高温応答を示したことから、動物は水中から陸上へと移行した際、劇的に変化する環境温度の感知に対応するために、有尾両生類から TRPA1 の温度感受性の仕組みを大きく変化させていると考えられた。アホロートルは、基本的に幼形成熟のまま、水中で生活し続けるが、ホルモンの投与または水位の減少などにより変態すると、鰓呼吸から肺呼吸に呼吸様式を変化させ、陸上で生活することが可能になる。よって、何らかの理由でアホロートルは幼形成熟のまま、生涯を水中で過ごす戦略を取ったため、アホロートルの TRPA1 は陸上動物型の高温センサーの機能を持っていると考えられる。

また、安定した低水温環境(ソチミルコ湖の平均水温 15℃)に生息するアホロートルの TRPA1 は、すでに魚類特有の高温感受性を消失していることが判明した。しかし、実際のアホロートルの生息環境を考えると、水温が 40℃以上になる可能性は低く、axTRPA1 は温度感知よりも、侵害となる化学物質を感知するために使っていると考えられる。

両生類の TRPA1 の研究は、無尾目のニシツメガエルやアフリカツメガエルを対象とした研究しか行われていなかった。本研究により、初めて有尾目の TRPA1 のクローニングと機能解析が行われた。結果、有尾目と無尾目の TRPA1 の間で化学物質応答性の違いが見られたが、温度応答性は同じ特性を示すことが明らかになった。また、アホロートルは幼形成熟だが、同じ有尾目に属するサンショウウオ目またはイモリ目は変態し、生息環境が水陸性へと変化する。これらの動物の TRPA1 は、アホロートルの TRPA1 と同じ応答性を示すのだろうか。また、これまでに解析されている両生類は、完全水生の動物である。TRPA1 の温度特性や化学物質応答性は、生存環境の違いによって大きく変化している可能性が高い。よって、生息環境(完全陸生または水陸両生)や生息温度の違いに焦点をあてた両生類 TRPA1 の機能解析を行うことで、両生類 TRPA1 の刺激応答の多様性が見えてくるかもしれない。

A

Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) TRPA1: axTRPA1

```
GTGGATAAGACCTCCATAACTGTCTATCCTAAACAGGCCAAGAATCTGGGGA
GTTGCCATCAATTCACCTTTGCTCCTGTTTCATCTTTGCTTGTGAGGGATCAAC
ACCAGATGTGCCGCCTACCGACACTGCTGTGGAAACGGAACCTTTTAAAGCAA
AAGCACAGGATGAAAGACATGTCTTCTCTGCTTCAAAAACAACATGAACTAAT
TAACTGATACTTCAGAAAATGGAAATTATTTTCAAGAGCTGAAGATGAGGAGG
AGCAGGATCAGCAAAGTTGCAAGGTCAAAAAGTCAAAAAACTGAACCGCAAG
GACAGCAAATGGAATTGTGTGCTAAAAGCAGTCAAAGCAAAGGCTGTGTGA
ACCAGAGACTCACTGTTTTGTTTGATAGTATAATCAGATATTGTCATTTTCAGTT
TCCCCAAAATTAGCCATTTATCTACTGTAGGTTTTTATGTTTTCTCTTTTCGAGCC
TCCCCAATGGCACAAAGCAAATGCCTTTAATAAATGAATGAATTAC
```

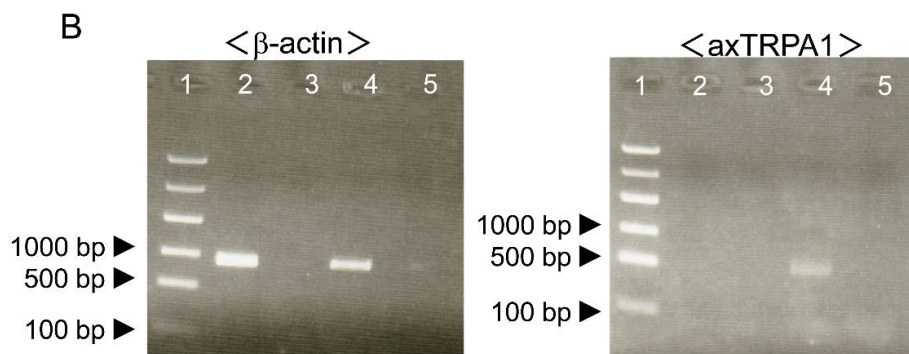


Fig.22 axTRPA1 の EST 配列及び RT-PCR の結果

(A) Ambystoma EST Database 上にあった axTRPA1 の EST 配列 (ID: C2341461, 523 bp)。

赤色の文字は、RT-PCR で使用したプライマーを示す。

(B)アホートルの脊髄と DRG の total RNA を用いて、ポジティブコントロールのβ-actin と axTRPA1 プライマーを使って RT-PCR を行った時の電気泳動の結果を示した (理論値はβ-actin 750 bp, axTRPA1 479 bp)。

レーン 1 : マーカー、レーン 2 : 脊髄 RT (+)、レーン 3 : 脊髄 RT (-)、レーン 4 : DRG RT (+)、レーン 5 : DRG RT (-)

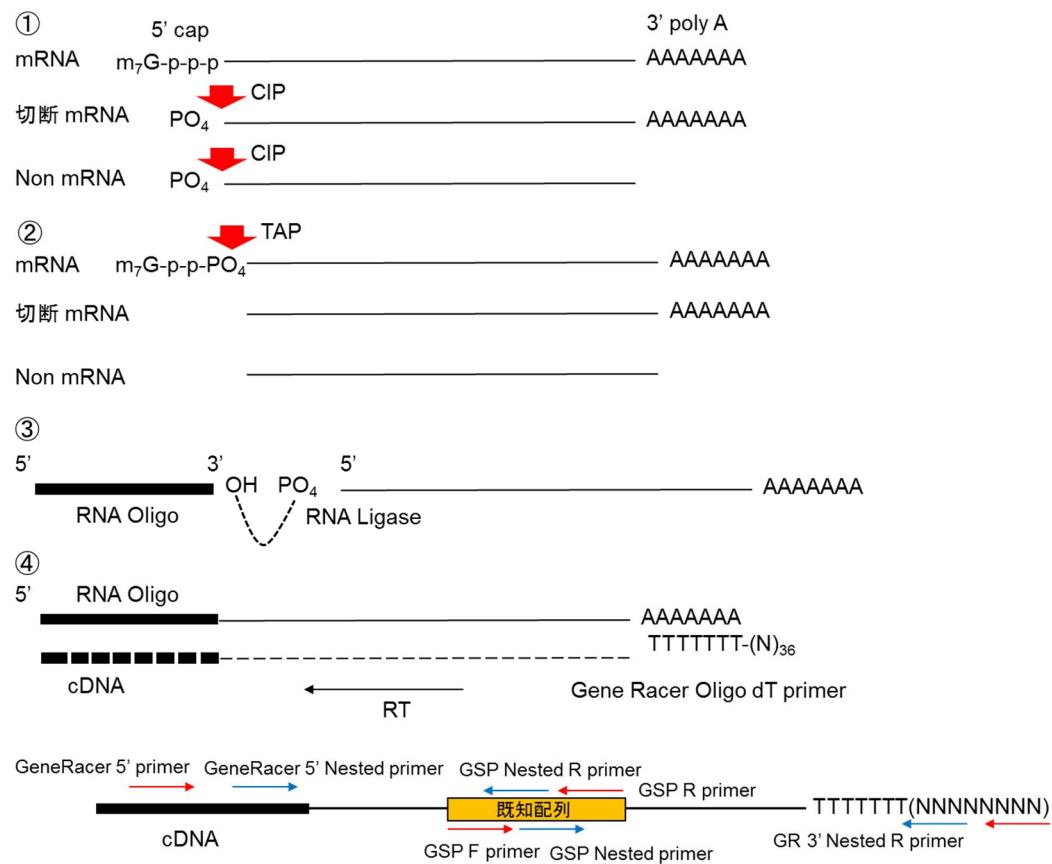


Fig.23 GeneRacer の実験の流れ

A

ATGAGGAAATCCCTCAAGAGAATGTTCAATTTCGGCGGAGGCGATCAAGCGGGACGAGCTGTACCAGGGC
 CTGGACCTGGAGGTCGACGGCAGCGCGCAGCCCTGCACCAAGACCGTCTTTGAGTTGATTTAGATGGC
 GATATTAACCGCGTCCGAAGCTTTATTATGAAAAATCCTACCAGTCTTTACAGTTTGGACGAAGTGAAGGC
 CACCCCATTCGACTATGCTGCAGCACGAGGTGACATGGAGTTGATGCAGATGATTTTTGAAGAGACCGCT
 GATGAAGTCTCAATGTAATTGACTGCAAAGGGAACACTCCTTGCAGTGGGCACTGGAGAACAACAAGAT
 CGAAAGTGTGAGAGCACTCCTGTGCAGAGGCGCAAATCCTAACATTTTGAATTGCTACTTGATGTCCTCCTC
 TTCATAACTCGATCCAGCAATTTACAATAAATTAGTTGAGGTGTTGATCAATCACAGCTCTACCGATATTA
 ACCTAAAAGGAGAAGCTTGACAACACTCCTGTAATACAAGCTTGCTCAAACAATAACCCGGAAGCACTAGAA
 ATGCTGTTTGCAAACAATGCAAAGACTTGCAAAAAGAACAATTGGGATGTTACCCATCCACATGGCAGT
 GTTCGCATGTTCTGAAAAATGCCTTGAATTGGTTTTAAAAACAAGGCGAAAAGAACGGTTATTCTACCTATGA
 TCACATCAACTTTATTGACAATTTGAAGAATAGTCCACTTCATATAGCAGTCCGGACAGGATGCGTGAATAT
 TGTAAAAAATGCATTTCTCTTGAGCTAGGATTGACCAACAAGAGAATGATAAAGCTACAGCTCTTCATTT
 CGCCGCAACACAAGGAGCAACGGACATCGTCAAACTAATGCTAACTTCTACACTGGAGACAAGCCGATC
 ATTAATCTCCCTGATGGCAACAAGAAACACTACTTCACAAGTCAGCATTGTTTGATTACGCTGATTTGGCT
 GAGTATTTGATTTCTATGGGGCAAATATGGACAGTCTCGACAATGAATCCCGGTCTCCACTTTTATTAGCT
 GTGACATGCTCAGCATGGAAGCACTGAACTTGCTACTCTCAAAGGTGCAAATGTAACAATTAAAGATCA
 ATGTGGACGGAATTTCTGCATTTGACTGTTCTGCAGCCTGGAGGTTTCAAACACCTTAATAAGGATTTCTT
 GCAGTTAGACACTGTGAAAGCACTGGTGAGCGATGAAGACTACGATGGCTGCACACCTCTGCATTATGCG
 TGTCTGATAGATAAGGTTGACATCAACGGGAACACAGCACTCCATTTAGCTTCCCAAGAAGGACACGCAAA
 AGCCGCGAGGCTACTACTTGACAATGGTGCTTCTGTGATCCTAAATAAAGAGATGGCCACTTTCATACACC
 TTGCAATACGCGGGGGAAAAAGGATGTCGCTTTCACGGCTATTGAGAGTGACAGGTTGGACGAAATAAT
 GGTGACATTTTCCCATGTGTCTTCTTATAAATGCCCCCTCCTGGAGATGATTGAGCATCTTCTGAAGCGT
 ACAGTTGGCTTTTGGACAGATGTCGGACCGAGTCTCCAGGTGACAAAAAAGTCGTGATTTCAATATCAAC
 TACAACCTTCAGATATTTACAGTGCCCCATTTTCATTCAAGAAGTTATCAAAAGAGGAGGCTGGAATAACCTAT
 GAACCACTGATCAGTCTTAACGCTATGGTCTATCACAATCGAATGGAACCTCTTCCCATCCTGTTTGATAA
 GAATACTTACTCATGAAGTGGATGGCGTATGGATTCAAAGCCACATTTTGAACCTGGCAGTGATTCATTA
 GGCCTCATACCACTGACTCTTCTGATTCTTAATTGCATAAATCCTTATGCCAATAACGCAACAGTAATTCAC
 CGTCCAAAACCATTAACAATGAAGGACACCTACTTCACAAGAGTGTGCATGAGCCTTGCTTTGGTATGGG
 TGTCTTTGGAATCATAAAGGAGGTGTGGCAAATTGTCCAACAGAGAGTGAAATACCTGATGGATCAAACTA
 ATCTAATTGATTGGACGATCAATGTTACTGGCCTCATTTTTGTGTCCTCCCTGTGCAGTAACCTCATCAACA
 TTGGCTATTATCAGTGGCAATGTGGAGCTATCGCTGTTTTTGCATCATGGCTGAATTTCTGCTTTATCTGC
 AAAGGTTTGAAAGCTTTGGAATCTATATAGTCATGTTCTGGGAGATTCTACGGACCTTGTTGCGGATCGCT
 GTACTGTTCTTTTTCTCCTCCTGGCATTTGGACTCAGTTTCTACATTCTATTGTATCCACAGACAACCTTCA
 GCACTCCCTACTTCTCACTGATGCAAACCTTCTCAATGATGCTTGGAGATATTAATTACCAAGATGGGTTCC
 TTCATCCACTGATTGAAGACCAAATGCCATATGGAGGCCTTAGCGTGTTTCATCTCATCATTTTCACCATGC
 TGATTCCAATCCTTCTTATGAACTTGCTCATTGTTTGGCCGTGCGAGACATTGCAGAAGTACAACGCAAT
 GCTGCACCTAAAAGAATTGAAATGCAGGTCAACCTTCACACCAGCTTGAAAAAGAACTGCCTTATTGGTT
 GCTAAAACGAGTGGATAAGACCTCCATAACTGTCTATCCAAACAGGCCAAGAATCTGGGGAGTTGCCATCA
 ATTCACCTTTGCTCCTGTTTATCTTTGCTTGTGAGGGATCAACACCAGATGTGCCACCTACCGACACTGCT
 GTGGAAACGGAACCTTTTAAAGCAAAAGCACAGGATGAAAGACATGTCTTCTGCTTCAAAAAACAATGA
 ACTAATTAAGTACTTTCAGAAAATGGAAATTTTTCAGAAGCTGAAGATGAGGAGGAGCAGGATCAGC
 AAAGTTGCAGGGTCAAAAGTCAGAAAATGAACCGCAAGGACAGCAAATGGAATTGTGTGCTAAAAGCAGT
 CAAAGCAAAGGCTGTGTGA

B

<アミノ酸配列>

MRKSLKRMFNSAEAIKRDELYQGLDLEVDGSAQPCTKTVFELISDGDINRVRSFIMKNPTSL
 YSLDEVKATPLHYAAARGDMELMQMIFEETADEVLNVIDCKGNTPLHWAVENNKIESVRAL
 LCRGANPNILNCYLMSPLHNSIQQFHNLKVEVLINHSSTDINLKGELDNTPIVQACSNNNPE
 ALEMLFANNAKTCKKNKLGCIPIHMAVFACSEKCLELVLKQGEKNGYSTYDHINFIDNLKNS
 PLHIAVRTGCVNIVKKCISLGARIDQQENDKATALHFAATQGATDIVKMLTSYTGDKPIINLP
 DGNKETLLHKSALFDYADLAEYLISMGANMDSLDNESRSPLLAVTCSAWKTVNLLSKGA
 NVTIKDQCGRNFLHLTVLPQGGFKHLNKDFLQLDTVKALVSDDEDYDGCTPLHYACRQGV
 GSVNNLLGLNVSLYSKSKDKRSLHFAACYGRINTCLRLLRDVTDARLLNEGDETGMTPLH
 MAAQNGHDKIVNMLLKRGALLSDYNGWTSLSHYATFGGYTRTMQILLDTYMCLIDKVDING
 NTALHLASQEGHAKAARLLLDNGASVILNKEMATFIHLAIRGGKKDVAFTAIQSDRLDEIMVT
 FSHVSSYKCPLEEMIEHLPEAYSWLLDRCRTESPGDKKSRDFNINYNFRYLQCPISFKKLSK
 EEAGITYEPLISLNAVMYHNRMELLSHPVCKEYLLMKWMAYGFKAHILNLAVYSLGLIPLTL
 ILNCINPYANNATVIHRPKPLQMKDITYFTRVCMSTLVFGMGVFGIIEVWQIVQQRVKYLMQ
 TNLIDWTINVTGLIFVSSLCNSINIGYYQWQCGAIAVFASWLNFLLYLQRFESFGIYIVMF
 EILRTLLRIAVLFFLLAFGLSFYILLYPQTTFTSTPYFSLMQTFSMMLGDINYQDGFHLPLIED
 QMPYGGLSVFHLLIIFTMLIPILLMNLIGLAVGDIAEVQRNAALKRIEMQVNLHTSLEKKLPYW
 LLKRVDKTSITYPNRPRIWGVAINSPLLLFIFACEGSTPDVPPTDTAVETELLKQKHRMKDM
 SSSLQKQHELIKILQKMEIIEAEDEEEQDQQSCRVSQKLNKDSKWNCVLKAVKAKAV

C

	Identity
Human	53.9%
Mouse	54.0%
Chicken	62.0%
Green anole	60.4%
Rattlesnake	54.1%
<i>X. tropicalis</i>	62.8%
<i>X. laevis-a</i>	62.7%
<i>X. laevis-b</i>	62.3%
Pufferfish	48.7%
Medaka	48.0%
Zebrafish-b	47.7%
Zebrafish-a	48.1%
Drosophila	33.1%

Fig.24 axTRPA1 の完全長 cDNA 配列

(A) 完全長 cDNA の核酸配列(3336 bp)。

(B) 完全長 cDNA のアミノ酸配列(1121 アミノ酸残基)。水色の文字は 16 個の AR、オレンジ色は膜貫通領域を示す。AR は、hTRPA1 の AR の情報を基に、アミノ酸配列を Clastal W を用いてアライメントを行い、AR の区分けを行った(Gaudet, 2000)。膜貫通領域は、SOSUI でモチーフ検索を行った。

(C) axTRPA1 と各脊椎動物 TRPA1 間のアミノ酸配列の Identity (同一性)を EMBOSS Needle で解析した結果を示した。

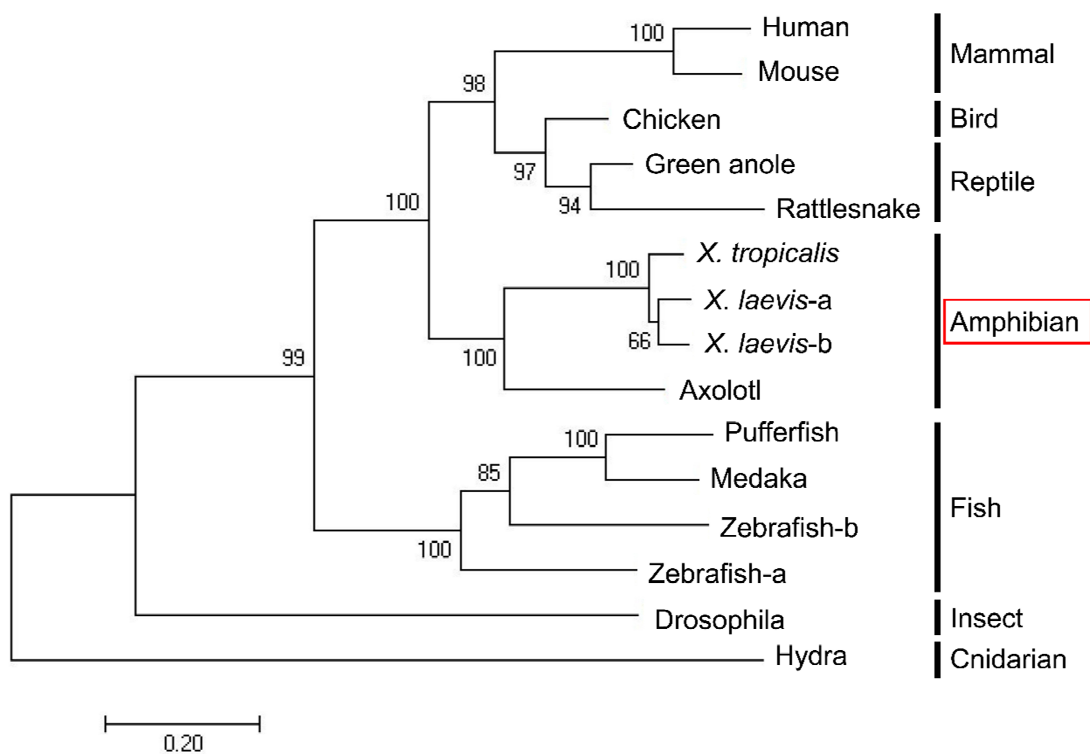


Fig.25 脊椎動物 TRPA1 の分子系統樹

MEGA7 を用いて、TRPA1 の分子系統樹を ML 法で作成した。Bootstrap Replications は 1000 で行った。各動物の TRPA1 のアミノ酸配列は Fig.21 で使用した配列を使った。メダカとヒドラの TRPA1 は、当研究室の八田と村竹が決定したアミノ酸配列を使用した(八田, 卒業論文, 2014; 村竹, 修士論文, 2015)。

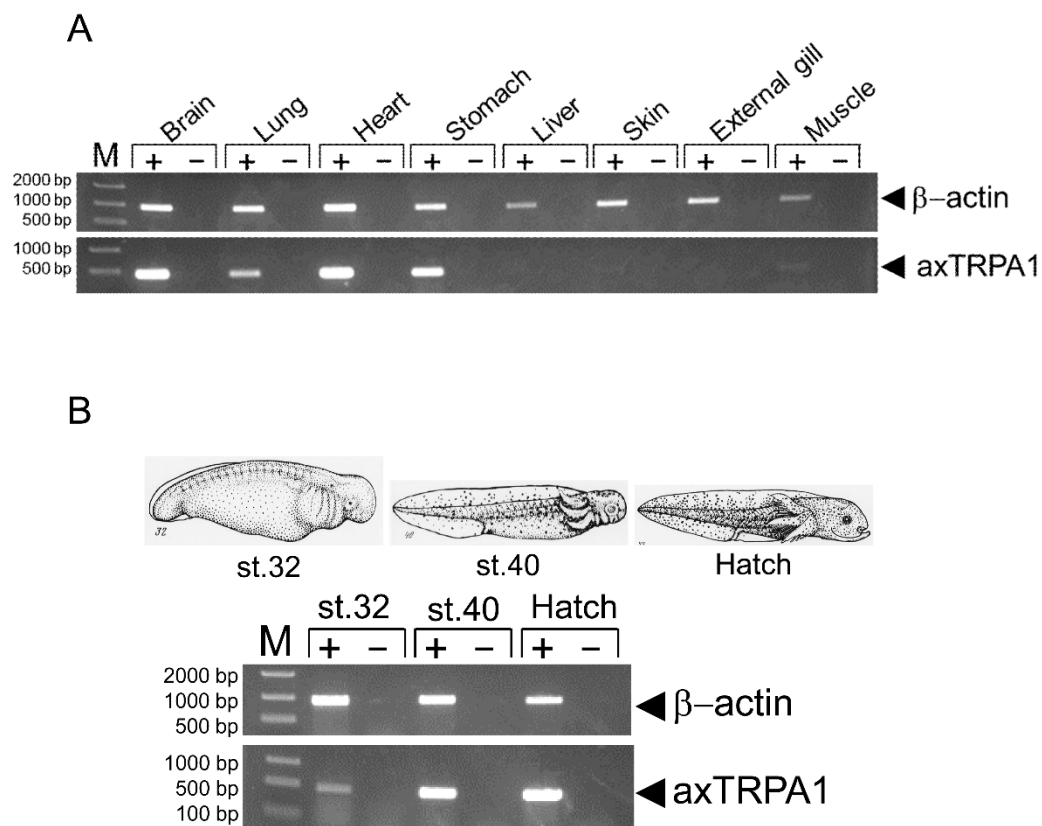


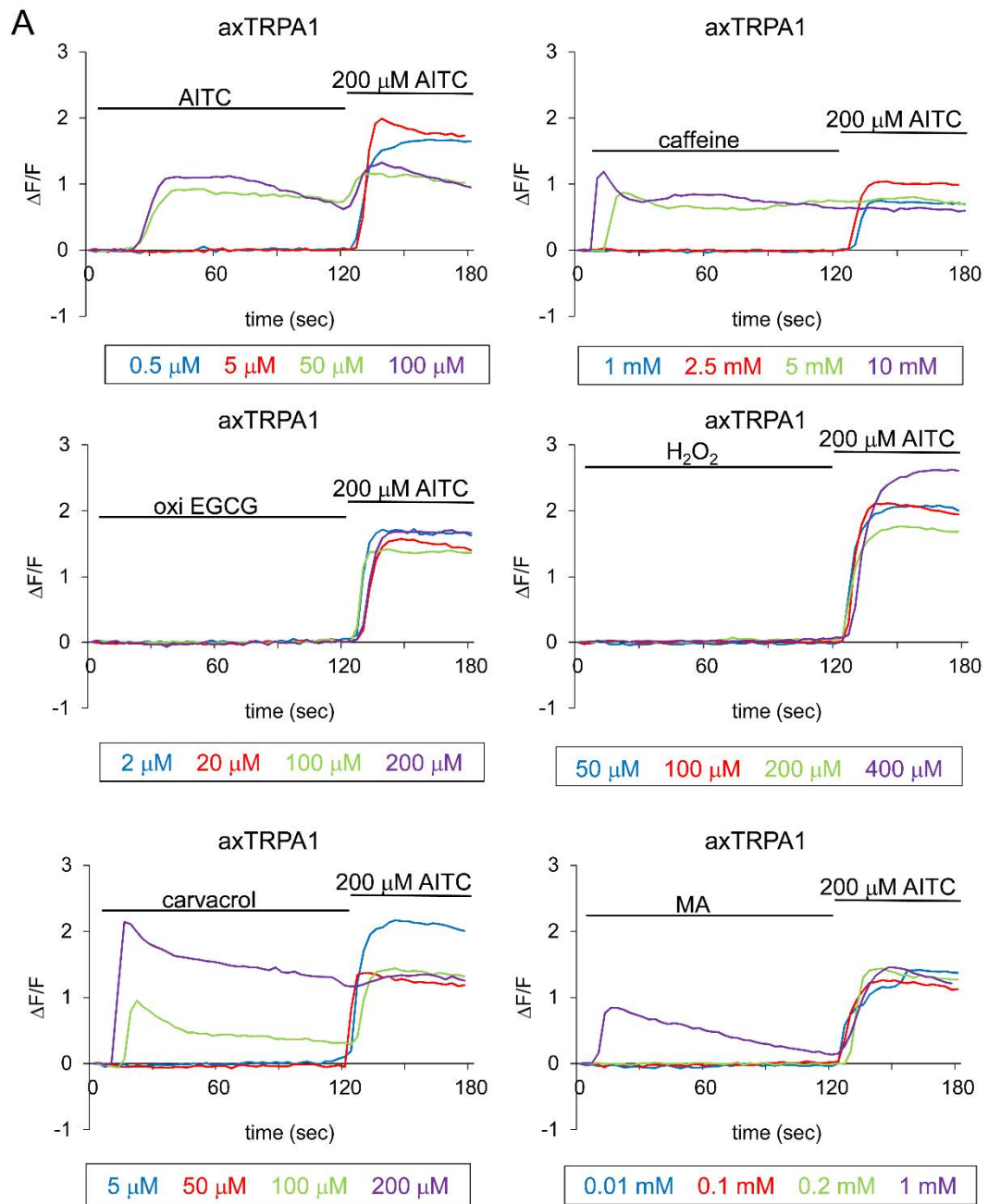
Fig.26 各組織と発生段階における axTRPA1 の発現解析

(A) アホロートルの各組織(脳, 肺, 心臓, 胃, 肝臓, 皮膚, 外鰓, 筋肉)を用いた RT-PCR の結果。

(B) 各発生段階のアホロートルの胚を用いた RT-PCR の結果。各発生段階の胚の写真は、以下の論文から引用した(Bordzilovskaya et al., 1979)。

M はマーカー、+と-は RT(+)または RT(-)を示す。ポジティブコントロールとして、 β -actin を使用した。

(理論値は β -actin が 750 bp, axTRPA1 が 435 bp)



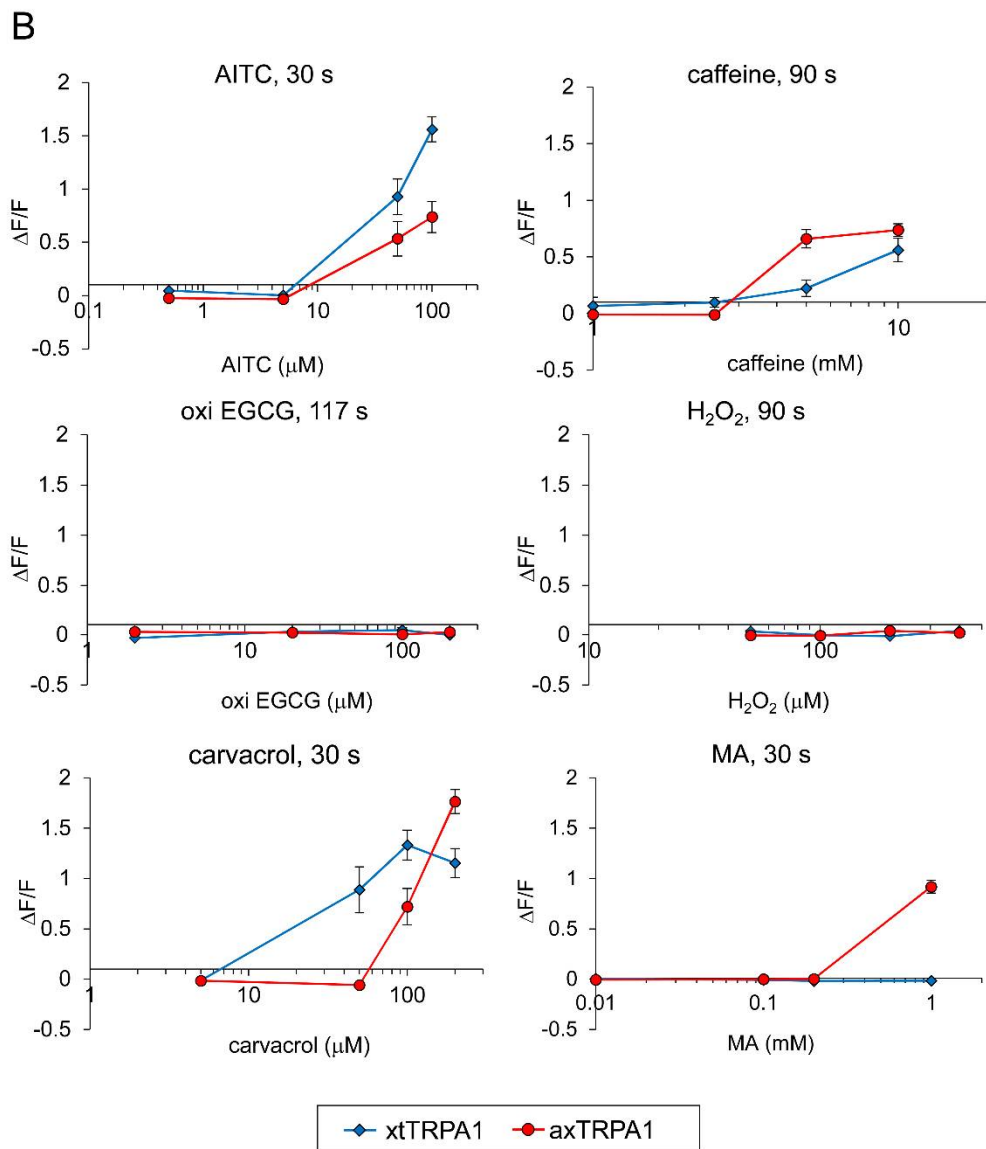
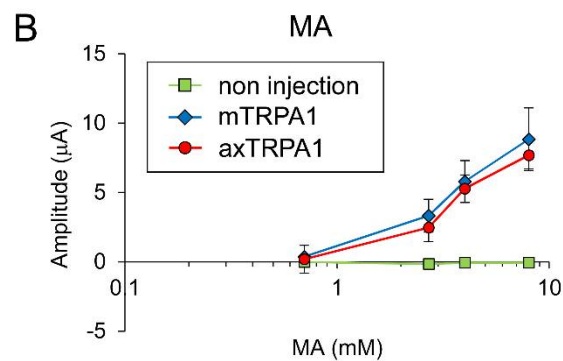
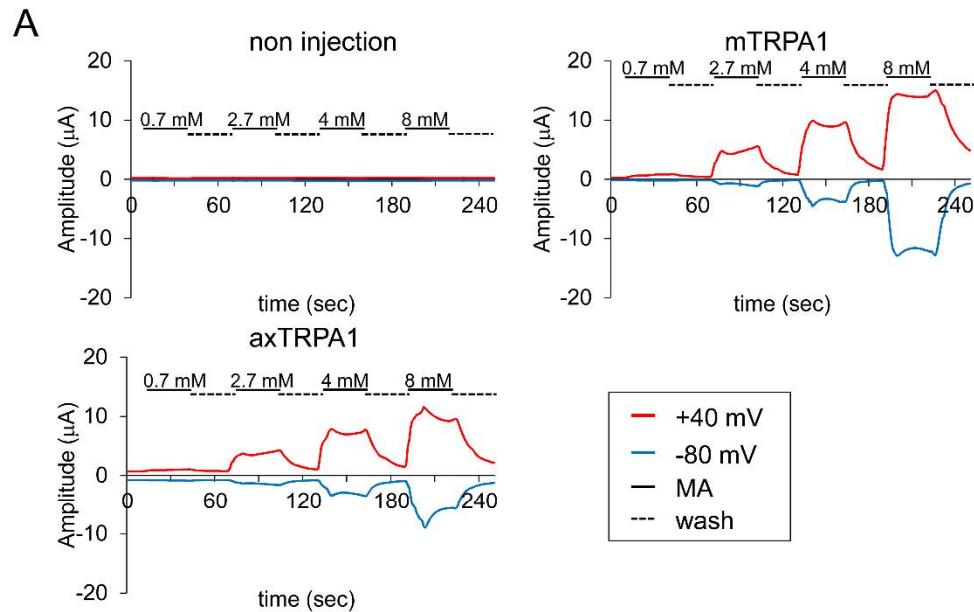


Fig.27 axTRPA1 発現 HEK 細胞の化学物質に対する応答

(A) axTRPA1 を発現させた HEK 細胞に、測定開始 6 秒で 4 種類の濃度の各化学物質 (AITC, caffeine, oxi EGCG, H₂O₂, carvacrol, MA)、120 秒後に 200 μM AITC を添加した時の蛍光強度の平均を示した。縦軸は蛍光強度の変化率(ΔF/F)、横軸は時間(sec)、リガンド添加期間は実線で示した。

(B) xtTRPA1 と axTRPA1 の化学物質に対する各時点の蛍光強度の平均(ΔF/F)を折れ線グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均±SE で示した。(n=10)



C

	Ankyrin repeat 16									
Human	QQASFLHLALHN	KRKEVLT	TI	IRSKRWDECLK	IFSHNSPGNK	PI	TEMI	EYL	PECMKVLLDFC	
Mouse	KQASFLHIALHN	KRKEVLT	TT	IRNKRWDECLQV	FTHNSPSNR	PI	MEMVEYL	PECMKVLLDFC		
Chicken	AVASFFHEA	HNRRKD	VST	VILHKRWEEAVL	TFSHYSSANK	PI	LEMI	EYLPDSFKLVLDNC		
Greenanole	SDASFLHEA	HNRRKEV	NT	ILHKRWEE	SMTTFSHYSSANK	PI	LEMI	EYLPDCLKLVLDNC		
Rattlesnake	SEASFLHEA	HNRRKD	VVK	VILHKRWEE	ISTFSHFSSINK	CA	LEMI	EYLPDCLKLVLDNC		
<i>X. tropicalis</i>	NGASYIHEA	IRFGK	DTVLS	IQSERWEE	ILQTFSHTSS	-YK	CA	LEMI	YHLPESFKTLDRG	
Axolotl	EMATFIHLA	IRGGK	DVART	AIQSDRL	DEIMVTFSHVSS	-YK	PI	LEMI	EHLPEAYSWLLDRG	
Pufferfish	SYTSFLHEAL	QNGRK	DVNA	VIDSDQC	SEALTLFE	-TDT	PQRCPI	VDMI	ELLPDTYKHLLDSC	
Medaka	NHTSFLHEAV	QNGRK	DVNA	VDSRCEEAL	QLFT	-PGTS	QRCP	LDMI	EFLPETYKHLLDCC	
Zebrafish-a	NDASFLHEAV	HNARRE	VNM	VIESDRCEEAM	TTYK	-PNST	KRCI	VMDMI	EFLPESFKHLLDTC	
Zebrafish-b	ADNSFLHEAV	RNERRE	VNATI	IEHERCDE	SMTSFK	-AKS	--RCV	LDI	EFLPESFQHLLDQC	

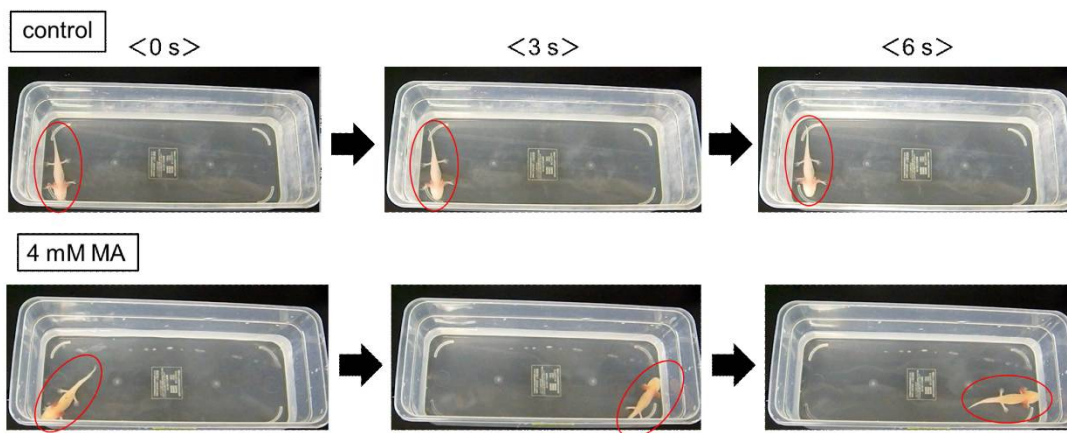
Fig.28 axTRPA1 発現卵母細胞の MA に対する応答性

(A) cRNA を導入していない卵母細胞と mTRPA1、axTRPA1 を発現させた卵母細胞に MA (終濃度:0.7 mM, 2.7 mM, 4 mM, 8 mM)を添加し、二本刺し膜電位固定法で電流応答を解析した時のそれぞれの代表トレースを示した。縦軸は活性電流(μ A)、横軸は時間(秒)で示した。

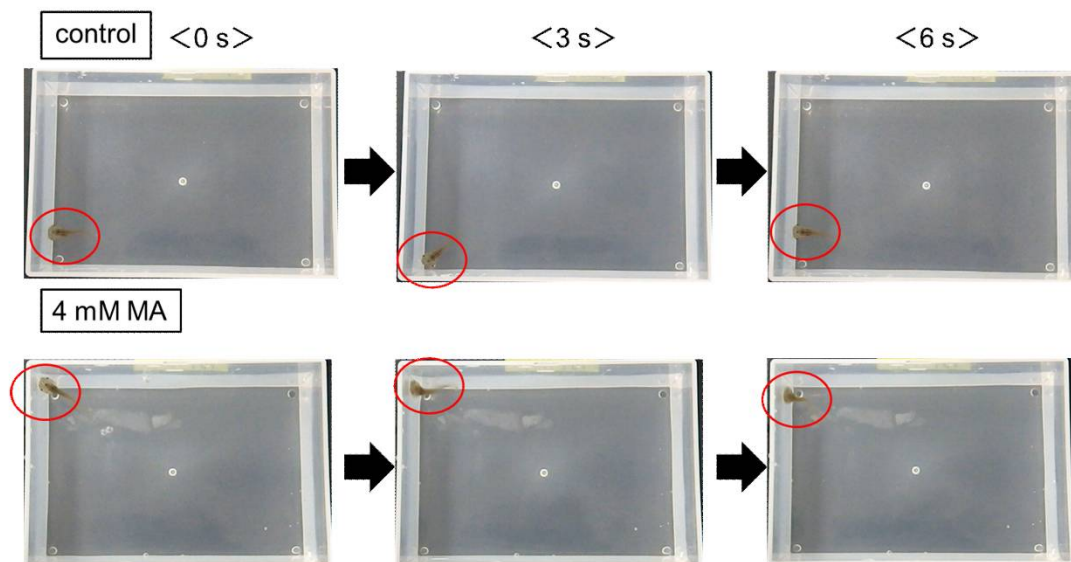
(B) A の各濃度の MA 添加 20 秒後の活性電流の平均を折れ線グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 \pm SE で示した。(n=4) 縦軸は活性電流(μ A)、横軸は MA の濃度(mM)で示した。

(C) 脊椎動物 TRPA1 のアミノ酸の AR16 のアライメント結果を示した。赤の線で囲まれた部位が MA 応答に重要なアミノ酸を示している(Saito et al., 2014)。赤色の文字が活性化、青色の文字が不活性化のアミノ酸を示す。

A



B



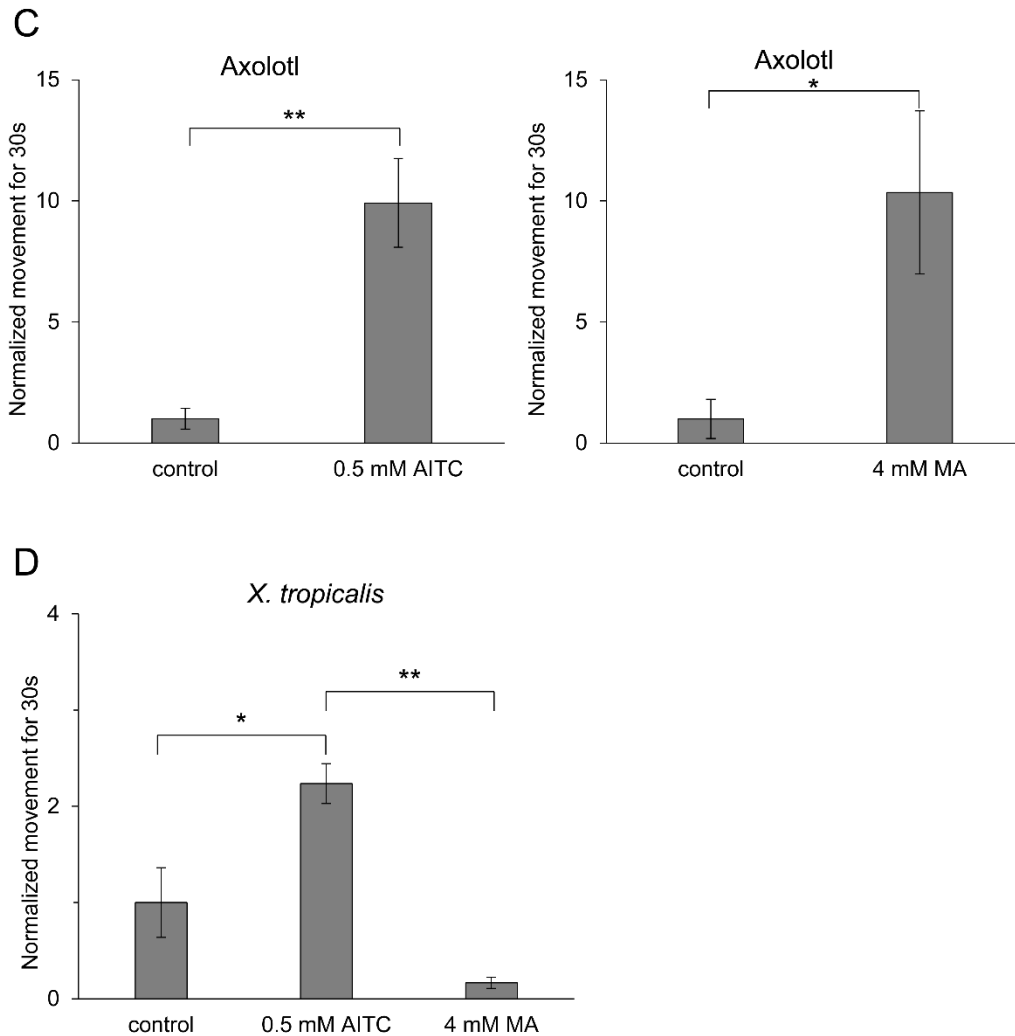


Fig.29 アホロートル亜成体とニシツメガエルの幼生の MA に対する応答

(A, B) control (0.4% DMSO 入り)、4 mM MA を含む飼育水にアホロートル亜成体(A)またはニシツメガエル幼生(B)を入れ、3 分間の遊泳行動の観察と記録を行った。処理開始 0 秒、3 秒、6 秒時点の写真を示した。

(C, D) アホロートル亜成体(C)とニシツメガエル幼生(D)を control (0.4% DMSO 入り)、0.5 mM AITC、4 mM MA を含む飼育水で処理時の、開始から 30 秒間の総移動距離をビデオ画像から算出し、コントロールの値で標準化した時の平均を棒グラフで示した。

それぞれのデータポイントは、平均±SE で示した。(n=5) (T 検定または Tukey-Kramer 法で有意差あり **p<0.01, *p<0.05)

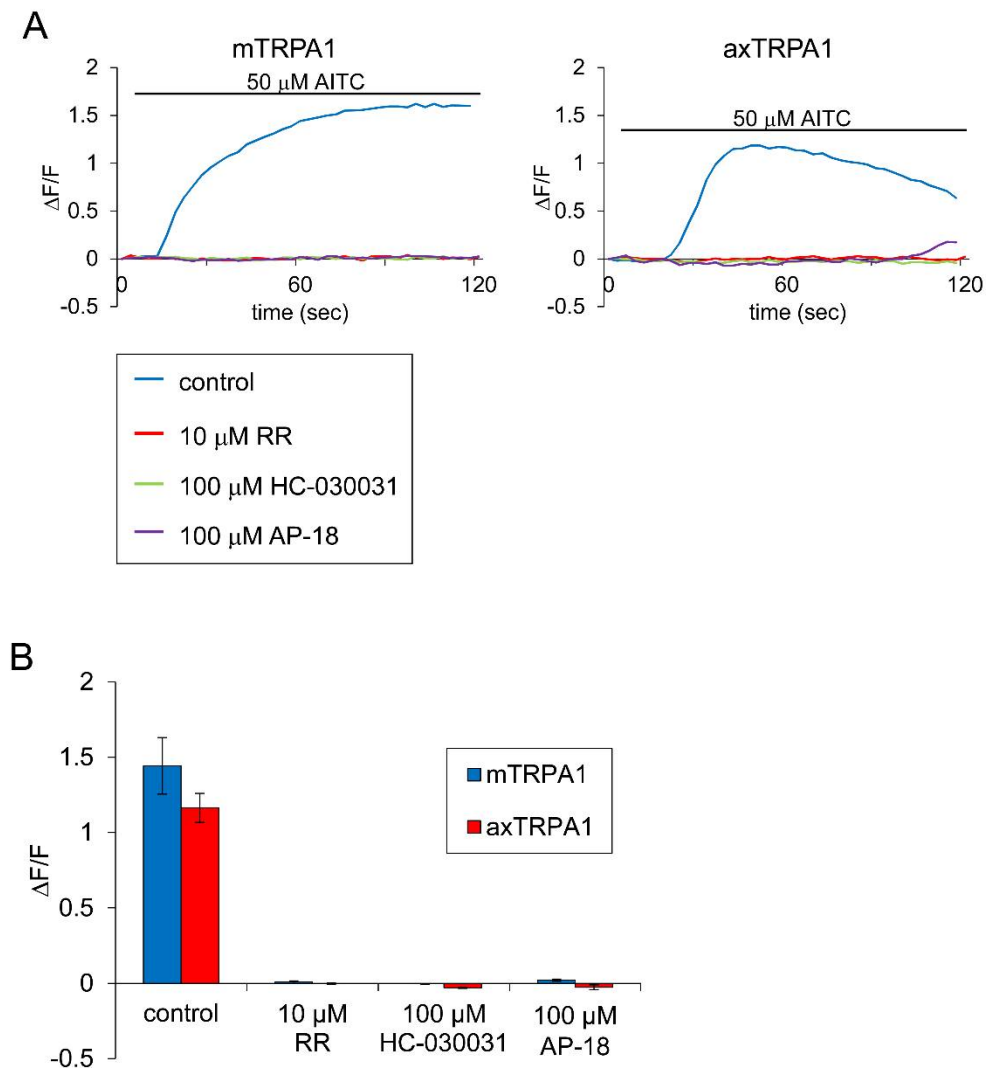


Fig.30 axTRPA1 の AITC 応答に対する阻害剤の効果

(A) mTRPA1、axTRPA1 を発現させた HEK 細胞に、TRP チャンネル阻害剤の 10 μ M RR または TRPA1 阻害剤の 100 μ M HC-030031 と AP-18 存在下で、測定開始 6 秒に AITC (mTRPA1 は 50 μ M、axTRPA1 は 100 μ M) を添加した時の蛍光強度の平均を示した。縦軸は、蛍光強度の変化率($\Delta F/F$)、横軸は時間(秒)、リガンド添加期間は実線で示した。

(B) A で示した 60 秒時点の蛍光強度($\Delta F/F$)を棒グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 \pm SE で示した。(n=10)

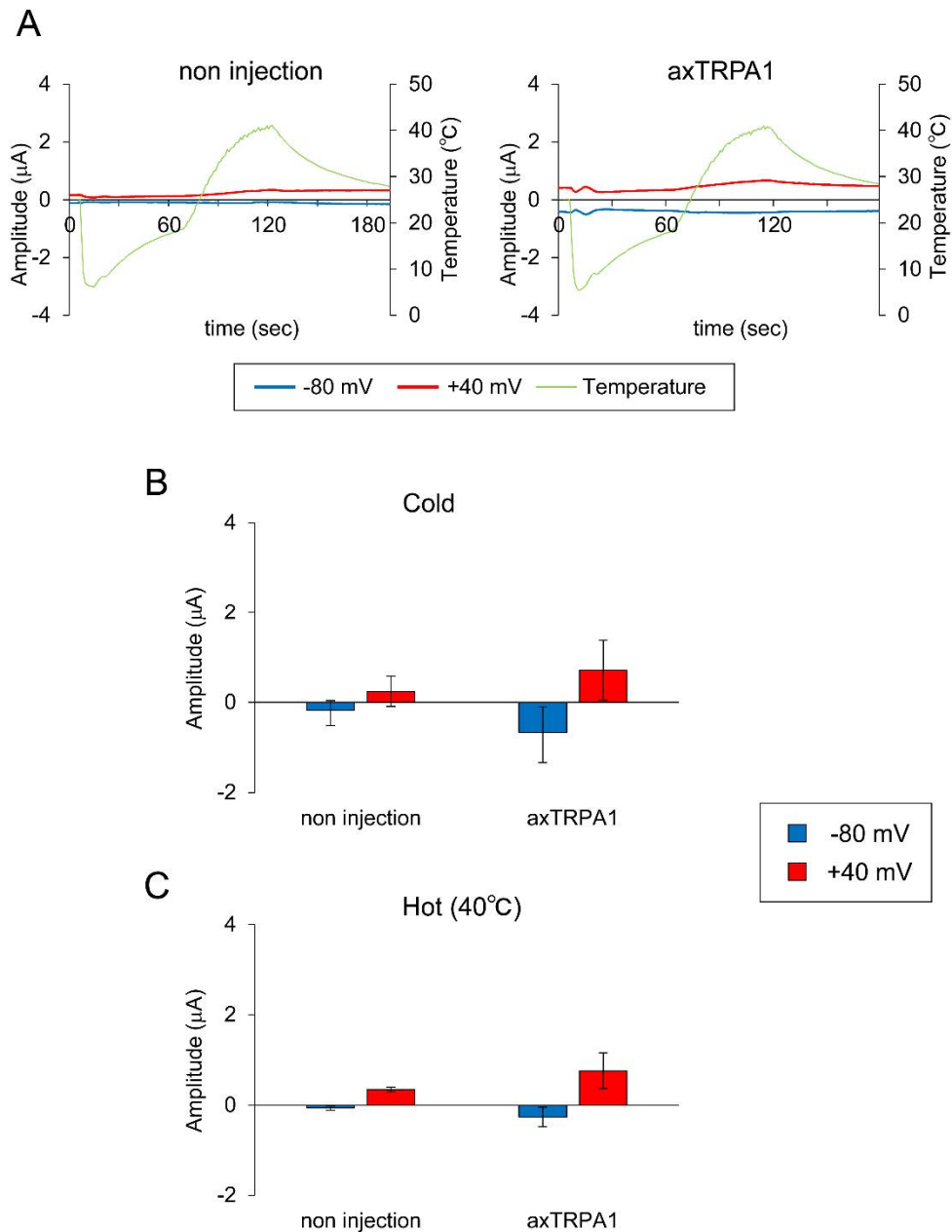


Fig.31 axTRPA1 の温度応答

(A) cRNA を導入していない卵母細胞と axTRPA1 を発現させた卵母細胞に低温と高温 (~40°C)刺激を行い、二本刺し膜電位固定法を用いて電流応答を解析した時のそれぞれの代表トレースを示した。縦軸は活性電流(μA)、横軸は時間(秒)で示した。

(B, C) 低温のピークの活性電流(B)と高温(40°C)の活性電流(C)の平均を棒グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均±SE で示した。(n=5)

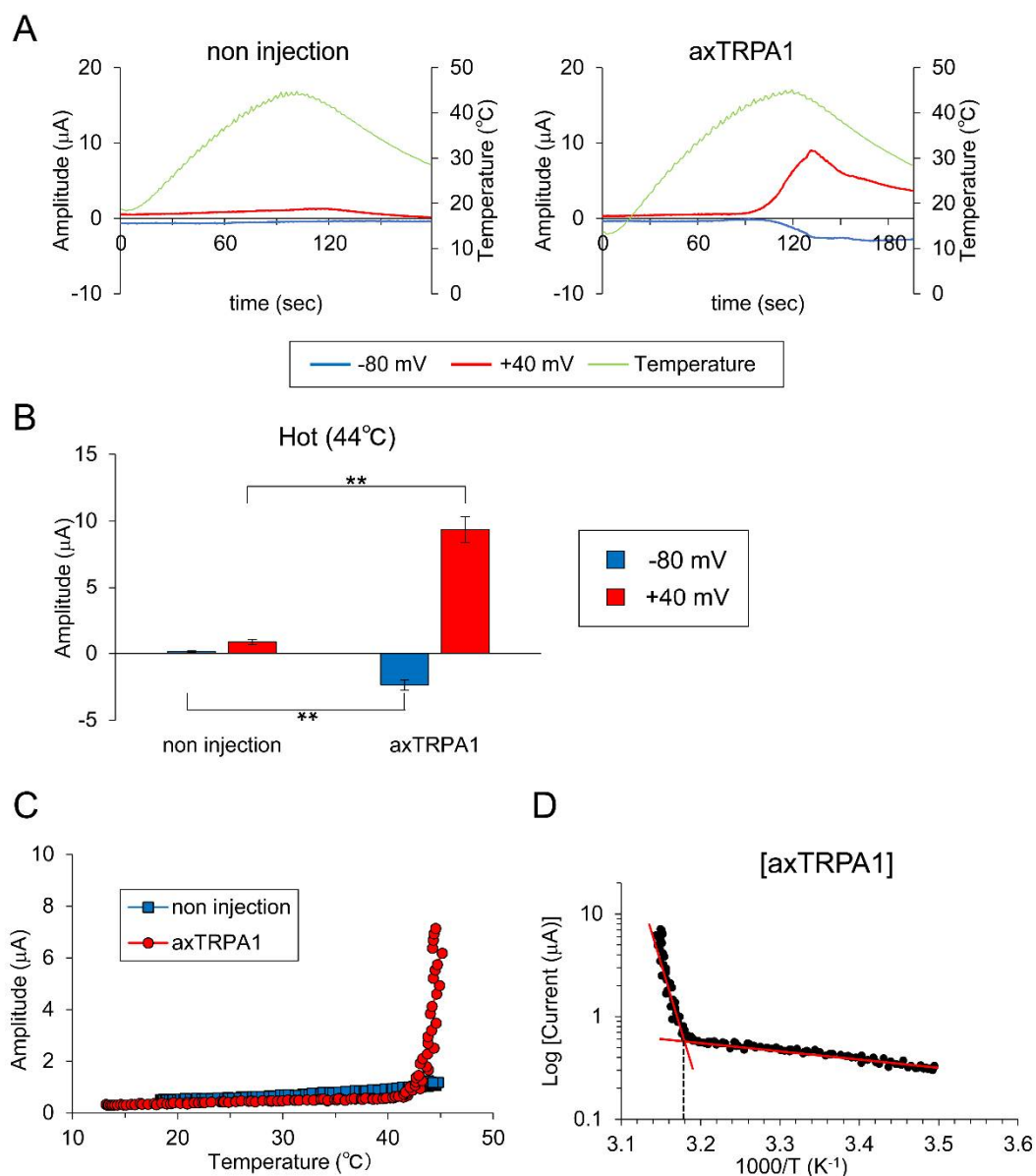


Fig.32 axTRPA1 の高温応答

(A) cRNA を導入していない卵母細胞と axTRPA1 を発現させた卵母細胞に高温刺激($\sim 45^{\circ}C$)を行い、二本刺し膜電位固定法を用いて電流応答を解析した時の代表トレースを示した。縦軸は活性電流(μA)、横軸は時間(秒)で示した。

(B) $44^{\circ}C$ の時の活性電流の平均を棒グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 \pm SEで示した。(n=8) (T検定で有意差あり $**p<0.01$)

(C) Aのトレースを横軸が温度($^{\circ}C$)、縦軸が活性電流(μA)でプロットし、電流と温度の関係を示した。

(D) Aで示した axTRPA1 をアレニウスプロットに示した。

Table.5 両生類 TRPA1 の化学物質と脊椎動物 TRPA1 の温度に対する応答性

<Chemical sensitivity>		
	<i>X. tropicalis</i>	Axolotl
AITC	○	○
caffeine	○	○
oxi EGCG	×	×
H ₂ O ₂	×	×
carvacrol	○	○
MA	×	○

<Temperature sensitivity>		
	Cold	Hot
Human	—	—
Mouse	<17°C	—
Chicken	—	>39°C
Green anole	—	>34°C
Rattlesnake	—	>27°C
<i>X. tropicalis</i>	—	>39°C
Axolotl	—	>41°C
Pufferfish	<8°C	No threshold※
Medaka	—	No threshold※
Zebrafish-a	—	—
Zebrafish-b	<10°C	No threshold※

※ gradual heat-activation (25°C~)

xtTRPA1 と axTRPA1 の各化学物質に対する応答と各脊椎動物の TRPA1 の温度に対する応答性を、表にまとめた(マウスは Story et al., 2003、ガラガラヘビは Gracheva et al., 2010; ニワトリ、グリーンアノールトカゲ、ニシツメガエルは Saito et al., 2012, 2014 の結果を基にした)。

化学物質応答性の表の○は活性化、×は不活性化を示す。

温度応答性の表の—は応答性なしを示す。

第3章 魚類と陸上動物の TRPA1 の高温活性化特性を支える分子基盤の検討

緒言

第1章の結果から、魚類 TRPA1 は閾値のない高温センサーであることが明らかになった。一方、陸上動物(ニワトリ、ガラガラヘビ、ニシツメガエル)の TRPA1 は、明確な高温閾値が存在する高温センサーであることが報告されている。また、第2章で、有尾両生類のアホロートルの TRPA1 の解析を行った結果、閾値を持つ高温センサーであることが明らかになった。よって、脊椎動物 TRPA1 の高温応答性は、魚類と陸上動物で大きく異なっていることが明らかになった。この特性の違いは、水中に生息する魚類は温度変化が少なく、耐性温度の範囲が幅広いため、閾値のない高温センサーを持っており、急速な温度変化の起こりやすい陸上へ進出した両生類、爬虫類、鳥類の TRPA1 は、その動物の生理機能や侵害となる温度に関連して、高温閾値を獲得したと考えられる。そして、侵害となる温度をより鋭敏に感知することが可能になったはずである。一方、さらに哺乳類への進化の過程で高温感受性が失われたと考えられ、哺乳類が獲得した生理機能や温度制御との関わりがあるのかもしれない。

これまでに、TRPA1 の温度感受性の分子機構に関する知見は、いくつか報告されている。まずは、高温に応答する rsTRPA1 と高温に応答しない hTRPA1 の N 末端領域の AR を取り換えたキメラチャネルの解析から、rsTRPA1 の高温感受性には、AR が重要であることが報告されていた(Cordero- Morales et al., 2011)。しかし、16 個の AR のうち、どの AR が高温応答に寄与しているのかについては、特定されていなかった。次に、哺乳類 TRPA1 の低温感受性の違い(hTRPA1 は低温非感受性、mTRPA1 は低温感受性)は、5 番目の膜貫通領域内の hTRPA1 の 875 番目の Val がチャネルの不活性化、mTRPA1 の 878 番目の Gly がチャネルの活性化に重要であると報告された(Chen et al., 2013)。さらに、低温感受性のみを持つ mTRPA1 の AR6 に点変異を入れると、さらに高温に応答することが報告されていた(Jabba et al., 2014)。TRPA1 の一番の特徴的な構造である AR が TRPA1 の温度の認識に重要である可能性が高いと示唆されるが、以上のように温度感受性部位と温度によるチャネルの活性化機構にはいくつか報告があるものの、統一的な結論には至っていないため、詳しい作用メカニズムは分かっていない。

また、TRPA1 以外の温度感受性 TRP チャネルの温度感受性の分子基盤に関してもいくつか報告がある。例えば、低温感受性のラット TRPM8 と高温感受性のラット TRPV1

の C 末端を交換すると、低温感受性と高温受性が入れ替わる(Brauchi et al., 2006)。また、高温感受性のマウス TRPV3 やヒト TRPV1 にランダムに点変異を入れた実験から、ポアドメインのアミノ酸の変異によって、高温と化学物質に対する応答が減少したことから、温度感知や化学物質認識に重要な部位はポアドメインであると主張されていた(Grandl et al., 2008; Yang et al., 2010)。一方、高温感受性のラット TRPV1 とラット TRPV2 のキメラチャネルの解析から、AR 領域と 1 番目の膜貫通領域の間の N 末端領域が高温応答に重要であると示唆されている(Yao et al., 2011)。このように、TRPA1 以外の温度感受性 TRP チャネルにおいても、温度応答の分子機構は不明な点が多い。

高温刺激単独では、43°C以上で活性化する TRPV1 は、高温と化学物質(TRPV1 を活性化しない低濃度のカプサイシンあるいは弱酸)刺激を同時に行うと、体温以下の温度で活性化できるようになることから(Tominaga et al., 1998)、急性炎症性疼痛の発生メカニズムとして注目されている。また、多くの TRP チャネルが疾患やがんの発生に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。よって、温度感受性のメカニズムを解明することは、TRP チャネルを標的とした創薬につながることを期待される。

TRPV1 や TRPA1 は立体構造が解析されているが、実際にどのようにして温度刺激がチャネル開口をもたらしているのかは、現在不明である。そして、本研究によって明らかになった閾値のある高温感受性と閾値のない高温感受性の違いはどのようにして生み出されているのだろうか。

本章では、閾値を持つ陸上動物型と閾値のない魚類型の TRPA1 の高温応答の特性に焦点を当て、その特性の違いを詳細に検討する比較解析を行った。そして、次に魚類の閾値のない高温感受性と陸上動物の閾値のある高温感受性の差異が、TRPA1 の構造のどの部分の違いによるのかを解明するために、陸上動物の rsTRPA1 と水生動物の olTRPA1 の間で、AR を交換したキメラチャネルを作製し、二本刺し膜電位固定法で高温刺激に対する応答を解析した。

材料と方法

1. 発現用プラスミド

mTRPA1 (in pBluescript II SK(-))は久保 義弘博士(生理学研究所)、rsTRPA1 (in pMO)は Dr. David Julius (UCSF)から頂いたプラスミドを使用した。また、olTRPA1 (in pGEMHE)は当研究室の齊藤がクローニングしたプラスミドを使用した(齊藤, 修士論文, 2017)。

cTRPA1 は、黒木が pcDNA3.1/Hygro(-)にクローニングしたプラスミドを鋳型にして (Kurogi et al., 2015)、KOD Fx Neo [TOYOBO]と以下のプライマーセットを用いて PCR (PCR 条件:94°C 2 分, {98°C 10 秒, 57°C 30 秒, 68°C 4 分}×30, 68°C 5 分, 4°C ∞)を行った。増幅された PCR 産物は、切り出しを行い、Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit にサブクローニングし、配列を確認した。その後、EcoRI で切断し、pGEMHE にクローニングした。発現プラスミドは、Pure Link™ HiPure plasmid Midi prep kit を用いてプラスミド単離し、cRNA 合成に使用した。

ニワトリ TRPA1 増幅用プライマー

Forward:5'-TTTTTCTAGACTTAGTCCACCATGAAGCGCTCTCTGTGGC-3'

Reverse:5'-GGGTCTAGATCACATAGAAGTCTACAATAAGC-3'

2. キメラの発現用プラスミドの作製

第 1 章と同様の方法で、rsTRPA1 と olTRPA1 の AR を区切った(Fig.33)。キメラは、rsTRPA1 と olTRPA1 の間で N 末端を交換した RO と OR、そして rsTRPA1 の AR1-10 または 1-6 を持つ olTRPA1 である R(10)O と R(6)O、olTRPA1 の AR1-10 または 1-6 を持つ rsTRPA1 である O(10)R と O(6)R の 6 種類のキメラを作製した(Fig.34)。キメラの作製方法は、第 1 章と同様の方法で行った。変異のないプラスミドを EcoRI で切断し、pGEMHE にクローニングした。

また、ガラガラヘビとメダカの TRPA1 の AR7-10 または AR11-16 を入れ替えたキメラ 4 種(RO(6-10)R, OR(6-10)O,RO(11-16)R, OR(11-16)O)は、上記で作製したキメラを鋳型に使用し、上記と同じ方法で作製した(Fig.35)。

rsTRPA1-Forward:5'-GCGAATTCATGCAGCGCTCGATCTTGAA-3'
rsTRPA1-Reverse:5'-CGGAATTCCTTATGATTTCACTGCTTTGA-3'
olTRPA1-Forward:5'-GCGAATTC ATGAACTTCAGCAGGGATGT-3'
olTRPA1-Reverse:5'-CGGAATTCCTCATTTGCGCTTTGCCTCGA-3'
RO-Forward:5'-ACAATATTTACTTATGAAGTGGGTTCATACGGGAG-3'
RO-Reverse:5'-CGTATGCAACCCACTTCATAAGTAAATATTGTGTAC-3'
OR-Forward:5'-AAAATATCTGGCAATGAAATGGATGGCCTATGGTTT-3'
OR-Reverse:5'-CATAGGCCATCCATTTCAATTGCCAGATATTTTTTGC-3'
R(10)O-Forward:5'-AGGATGCACTCCTTTACATTATGCCTGCAGACTGGG-3'
R(10)O-Reverse:5'-GTCTGCAGGCATAATGTAAAGGAGTGCATCCTTCAT-3'
R(5)O-Forward:5'-CTGCACAGCTCTTCATTTAGCCTGCACACAAGGTGC-3'
R(5)O-Reverse:5'-CTTGTGTGCAGGCTAAATGAAGAGCTGTGCAGTTGT-3'
O(10)R-Forward:5'-GGGCTGCACCCCACTCCATTATGCATGCAAACAAGG-3'
O(10)R-Reverse:5'-GTTTGCATGCATAATGGAGTGGGGTGCAGCCCTCAT-3'
O(5)R-Forward:5'-ATCCACGCCGCTTCATATTGCTGCTATCCAAGGAGC-3'
O(5)R-Reverse:5'-CTTGGATAGCAGCAATATGAAGCGGCGTGGATCGAT-3'

3. その他の方法

cRNA 合成時の制限酵素処理は、mTRPA1、rsTRPA1、cTRPA1、キメラは XhoI、olTRPA1 は NheI で行い、mTRPA1 は T3 プロモーター、それ以外は T7 プロモーターを用いて、cRNA を合成した。

材料、実験動物、二本刺し膜電位固定法については、第 1 章と同様の方法で行った。

結果

1. 脊椎動物 TRPA1 の高温感受性は陸上動物と魚類で大きく異なる

第1章と第2章の解析から、脊椎動物 TRPA1 の高温応答性は、魚類は閾値がなく徐々に高温で活性化する特性を示し、一方、陸上動物(両生類、爬虫類、鳥類)の TRPA1 は、高温閾値を持つ高温センサーであることが報告されていた(Gracheva et al., 2010; Saito et al., 2012, 2014)。

最初に、陸上動物型と魚類型の TRPA1 の高温応答の特性を再確認した。解析には、高温感受性のない mTRPA1、閾値を持つ高温感受性の cTRPA1 と rsTRPA1、閾値がない olTRPA1 の cRNA を卵母細胞にインジェクションし、20-40°C の高温刺激を行い、二本刺し膜電位固定法で解析した(Jabba et al., 2014; Gracheva et al., 2010; Saito et al., 2014)。すると、陸上動物の cTRPA1 と rsTRPA1 は高温に対して、特定の温度から明確に活性化された。これに対して、olTRPA1 は温度の増加とともに徐々に活性化された(Fig.36A, B, C)。次に、これらのデータを基に、アレニウスプロットを作成した。閾値の有無は、アレニウスプロットを書いた際に、屈曲点がある場合を「閾値あり」、屈曲点がなく、徐々に活性化している場合は「閾値なし」と判定した。結果、ガラガラヘビには明確な屈曲があり、閾値は知見に近い $28.35 \pm 0.15^{\circ}\text{C}$ (n=6)であった。ニワトリも同様であったが、報告されている閾値(39°C)よりも低い $33.44 \pm 0.31^{\circ}\text{C}$ (n=6)を示した。一方、メダカは明確な屈曲点がなく、徐々に活性化する高温センサーであることが再現された(Fig.36D)。以上の結果から、脊椎動物の TRPA1 の高温感受性は、閾値の有無により魚類型と陸上動物型の高温応答の特性があることが確認された。

2. TRPA1 を活性化する高温閾値の有無と AR

次に、前述の解析で示された2種の TRPA1 の高温感受性の特性の決定に、TRPA1 の構造ドメインのどの部分が寄与しているのか、アプローチすることにした。これまでに、TRPA1 の温度感受性のメカニズムについては、多くの研究者が研究しているが、はっきりとしたメカニズムは不明なままである。また、魚類と陸上動物の TRPA1 の高温センサー能の差異を支える分子基盤を解明することは、TRPA1 の機能変化と動物の進化との関係を考える上で極めて重要である。

そこで、閾値を持つ高温感受性の代表として rsTRPA1、そして徐々に高温で活性化す

る魚類型の代表として、低温応答性を示さない olTRPA1 を使用し、それらの間でキメラを作製して、高温感受性がどう変化するか解析を行った。rsTRPA1 と olTRPA1 のアミノ酸配列の同一性は、46.4%であった。高温感受性の特性決定の責任部位は、TRPA1 の分子構造の約 60%で構成されている N 末端にある 16 個の AR ではないかと予想した。AR には、多くの化学物質感受性部位がある(Hinman et al., 2006; MacPherson et al., 2007; Takahashi et al., 2008)。さらに、rsTRPA1 の高温感受性は、N 末端の AR が重要であることが報告されていた(Cordero-Morales et al., 2011)。

本研究では、それぞれの N 末端全体を交換したキメラ RO(ガラガラヘビの N 末端を持つメダカ)と OR(メダカの N 末端を持つガラガラヘビ)の 2 種のキメラと 16 個の AR を 3 つの領域(AR1-6, AR7-10, AR11-16)に区切って交換したキメラ R(10)O(ガラガラヘビの AR1-10 を持つメダカ)、R(6)O(ガラガラヘビの AR1-6 を持つメダカ)、O(10)R(メダカの AR1-10 を持つガラガラヘビ)、O(6)R(メダカの AR1-6 を持つガラガラヘビ)の 4 種を作製し、高温応答を検討した(Fig.34)。

まず、メダカの AR をガラガラヘビに置き換えたキメラの解析を行った。その結果、non injection と比較して、3 種のキメラ(RO, R(10)O, R(6)O)は高温に応答した(Fig.37A, B)。これらのデータを基に、アレニウスプロットを作成した。結果、RO は $25.71 \pm 1.22^\circ\text{C}$ (n=5)に閾値を持つ高温感受性を示すことが判明した。しかし、R(10)O と R(6)O は、屈曲点がなく、閾値がない徐々に活性化するメダカ型の特性を示した(Fig.37C)。すなわち、N 末端全体の交換はメダカをヘビ型にすることができたが、AR1-10 の交換ではヘビ型にすることができなかった。以上の結果から、ヘビ型の特性には AR11-16 が重要であることが示唆された。

次に、ガラガラヘビの AR をメダカに置き換えたキメラの温度応答性を解析した。その結果、non injection と比較して、3 種のキメラ(OR, O(10)R, O(6)R)は高温に応答した(Fig.38A, B)。このデータを基にアレニウスプロット作成すると、OR は閾値がない徐々に活性化するメダカ型の特性を示した。そして、O(10)R は閾値のないメダカ型の特性であったが、O(6)R は $25.15 \pm 0.53^\circ\text{C}$ (n=5)に閾値を持つヘビ型の特性を示した(Fig.38C)。以上のことから、N 末端全体または AR1-10 の交換はヘビをメダカ型にできたが、AR1-6 の交換はヘビをメダカ型にできないことが明らかになった。以上の結果から、メダカ型には AR7-10 が重要であることが示唆された(Fig.39)。

以上の解析から、メダカの徐々に高温で活性化する高温感受性とガラガラヘビの閾値

を持つ高温感受性は、それぞれの AR を含む N 末端領域が大きく貢献していることが強く示唆された。また、高温感受性の特性の違いは、メダカ型の特性に AR7-10、ヘビ型の特性に AR11-16 が重要であることが示唆された。

次に、N 末端の AR7-10 と AR11-16 のどちらが陸上動物型と魚類型の TRPA1 の高温感受性の特性の決定に寄与しているのか、検討するために AR7-10 または AR11-16 を交換した RO(7-10)R(メダカの AR7-10 を持つガラガラヘビ)、RO(11-16)R(メダカの AR11-16 を持つガラガラヘビ)、OR(7-10)O(ガラガラヘビの AR7-10 を持つメダカ)、OR(11-16)O(ガラガラヘビの AR11-16 を持つメダカ)の 4 種のキメラを作製し、解析を行った(Fig.35)。結果、4 種のキメラは高温に対して応答した(Fig. 40A, B)。このデータを基に、アレニウスプロットを作成した。その結果、メダカの AR7-10 を持つ rsTRPA1 のキメラ RO(7-10)R は、 $22.87 \pm 0.92^{\circ}\text{C}$ (n=5)の閾値を持つヘビ型の特性を示した。また、残りの 3 種のキメラの RO(11-16)R、OR(7-10)O、OR(11-16)O は、いずれも屈曲点がなく、明確な閾値のないメダカ型の特性を示した(Fig.40C)。

すなわち、

- (1)メダカの AR7-10 を持つ RO(7-10)R の結果から、メダカの AR7-10 はメダカ型にすることができない。
- (2)メダカの AR11-16 を持つ RO(11-16)R の結果から、メダカの AR11-16 はメダカ型にできる。
- (3)ヘビの AR7-10 を持つ OR(7-10)O の結果から、ヘビの AR7-10 だけではヘビ型にすることができない。
- (4)ヘビの AR11-16 を持つ OR(11-16)O の結果から、ヘビの AR11-16 だけではヘビ型にすることができない。

ということが分かった(Fig.41)。

これらすべてのキメラの解析の結果をまとめると、

- (1)メダカ型の特性は、AR1-10 または AR11-16 のどちらかが重要である。
 - (2)ヘビ型の特性は、AR1-6 + AR11-16 または AR7-16 のどちらかが重要である。
- と考えられた。

次に、高温感受性のない TRPA1(ヒト、マウス)、閾値のある陸上動物の TRPA1(ニワトリ、グリーンアノールトカゲ、ガラガラヘビ、ニシツメガエル、アホロートル)、閾値のない魚類型の TRPA1(ゼブラフィッシュ b、フグ、メダカ)のアミノ酸を比較するため

に、アライメントを行った。高温感受性なし、魚類型、陸上動物型の3つのグループの間で、アミノ酸が異なる部位を探索した結果、AR1-6に1ヶ所、AR7-10に3ヶ所、AR11-16に3ヶ所存在した(Fig.42)。よって、これらのアミノ酸の違いが高温感受性の特性の違いに寄与していると考えられる。

考察

1. 魚類と陸上動物の TRPA1 の温度応答性

陸上動物型の TRPA1 と魚類型の TRPA1 の高温応答の特性を解析した結果、陸上動物の cTRPA1 と rsTRPA1 は高温に対して、特定の温度から明確に活性化された。これに対して、olTRPA1 は明確な高温閾値がなく、徐々に活性化することが確認された。

rsTRPA1 の閾値は、知見に近い 28℃であったが、cTRPA1 は報告されている閾値(39℃)よりも低い 33℃であった。その原因として、他のグループと我々のグループで高温刺激の与え方(刺激スピード、温度)などの違いにより、高温閾値の違いが出ている可能性が考えられる。よって、今後他のグループと同じ温度刺激の条件で解析を行う必要があると考えられる。

さらに、脊椎動物 TRPA1 の低温応答は、zTRPA1b、pfTRPA1、mTRPA1 で検出される(Table.6)。哺乳類で低温センサーとして働く TRPM8 を魚類は持っていないため、魚類は TRPA1 が低温センサーとして機能していると考えられる。その後、両生類、爬虫類、鳥類の TRPA1 は、低温センサーの TRPM8 があるため、TRPA1 は低温応答性を失ったのかもしれない。また、マウスの DRG の一部で TRPA1 と TRPM8 が共発現していることが報告されている(Kobayashi et al., 2005)。TRPM8 は、25℃以下の低温を感知するチャネルであり、活性化温度の範囲が広い。よって、mTRPA1 は、さらに侵害となる低温を鋭敏に感知するために、17℃以下の低温で活性化する低温センサーとして、TRPA1 が機能するようになったのではないかと考えられる。

しかし、ヒトやマウス以外の哺乳類、特に冬眠する哺乳類(リスなど)の TRPA1 の温度応答性は全く解析が行われていない。冬眠動物がどのように寒さを感じ、冬眠を開始し、冬眠を終わるのか、その詳細は明らかになっていないが、この機構に TRPA1 を含む温度感受性 TRP チャネルが関与している可能性が考えられる。以上のことから、哺乳類の系統内の TRPA1 の温度応答性が異なっている可能性も予想される。

以上のことから、脊椎動物 TRPA1 の温度応答の特性に違いが見られた要因と動物の進化の観点から、以下のことが考えられる。

(1)魚類は体温が環境の水温によって決まっている。しかし、水中の温度は太陽などの日照によって大きく変化しないため、一日の水温変化が少なく、体温の変動も小さい。そして、魚類の耐性温度の範囲は幅広い。よって、魚類の TRPA1 は、幅広い温度を感知

するために、徐々に活性化する高温センサーを持っている。

(2)一方、両生類、爬虫類、鳥類は、陸上へと進出すると、太陽の日照によってあたためられ、さらに空気中の一日の温度変化は水中よりも大きい。よって、陸上動物の TRPA1 は、生存不可能または侵害となる温度を感知するために、それぞれの動物で特定の温度で活性化する温度センサーを持っている。

と考えられる。

今後、各動物の温度感知と環境温度との関連を解明するためには、モデル動物以外の様々な温度環境または気候に生息する動物やユニークな生理機能を持つ動物に焦点をあてて、TRPA1 の温度感知の仕組み、さらには温度感受性 TRP チャンネルの理解が深まると考えられる。

また、研究手法としては異種性発現系以外に、生体の応答として実際に TRPA1 が発現している DRG といった感覚神経や組織を用いた Ca^{2+} イメージングまたはパッチクランプ法で異種性発現系での温度応答と同じ応答が見られるのか検討していくことで、生体内での TRPA1 の温度応答とその役割について、より詳細に明らかになることが期待される。

2. 温度特性の違いを決定する責任部位について

閾値を持つ高温感受性を示すガラガラヘビと徐々に高温で活性化するメダカの間で、それぞれの N 末端全体を交換した 2 種のキメラと AR1-6 または AR1-10 を交換したキメラ 4 種を作製し、高温応答を検討した結果、陸上動物型と魚類型の高温感受性の性質の違いは、N 末端の AR7-10 または AR11-16 のどちらかあるいは両方が重要であると示唆された。さらに、N 末端の AR7-10 または AR11-16 のどちらが高温応答の特性の決定に寄与しているのか、詳しく検討するために AR7-10 または AR11-16 を交換した 4 種のキメラを作製し、解析を行った結果、メダカの AR7-10 を持つ rsTRPA1 のキメラ RO(7-10)R は閾値を持つヘビ型の性質を示した。また、残りの 3 種のキメラの RO(11-16)R、OR(7-10)O、OR(11-16)O はいずれも明確な閾値のないメダカ型の特性を示した。

N 末端の AR を交換したキメラを作製して、高温応答がどう変化するのか解析した結果、明確な結論には至れていなかったが、N 末端の AR が極めて重要で、メダカ型の特性は AR1-10 または AR11-16 いずれか一方の存在で獲得され、ヘビ型の特性は AR1-6 + AR11-16 または AR7-16 いずれか一方の存在が重要であると示唆された(Fig.41)。

各動物 TRPA1 のアミノ酸配列のアライメントから、高温感受性なし、魚類型、陸上動物型の 3 つのグループの間に、アミノ酸が異なる部位を探索した結果、AR1-6 に 1 ヶ所、AR7-10 に 3 ヶ所、AR11-16 に 3 ヶ所存在した(Fig.42)。よって、これらのアミノ酸の違いが高温感受性の特性の違いに寄与していると予想された。今後、どのアミノ酸が重要なのか決定するために、さらに AR を 1 個ずつ取り換えたキメラを使って、重要な領域を決め、その領域内で両動物の間のアミノ酸が異なる部位の変異体の解析から、どのアミノ酸が高温応答の特性の違いに重要なのか決めることができる。また、今回の解析では、ガラガラヘビとメダカの間で高温応答の特性の違いを解析したが、この責任配列が他の陸上動物の TRPA1 や他の魚類の TRPA1 でも同じなのか、解析する必要がある。

今回の解析では、両動物とも高温応答を示す TRPA1 の AR の交換で解析を行った。解析で明らかになった重要な AR 領域が本当に高温応答の特性の違いに寄与しているのかについては、高温感受性のないマウスまたはヒトの TRPA1 を使った実験が必要である。例えば、今回の解析で明らかになった高温応答の特性に重要な領域を、高温感受性のない mTRPA1 と交換したキメラを作製し、高温応答性がどう獲得されるのか解析することで、これらの部位が高温応答の特性の違いに重要であるか解析できるだろう。

ガラガラヘビとヒトの TRPA1 のキメラの解析から、rsTRPA1 の高温感受性は AR3-8 または AR10-15 が重要であることが報告されている(Cordero-Morales et al., 2011)。今回、明らかになった rsTRPA1 の高温感受性に重要な AR1-6 + AR11-16 または AR7-16 は、報告されている AR 領域とほぼ一致している。また、olTRPA1 の高温応答も N 末端を含む AR が重要であることから、第 1 章で明らかになった zTRPA1b の結果と一致している。また、低温に応答し、高温に応答しない mTRPA1 の AR6 に点変異(S250N, M258L, D261G)を入れると、高温に応答するようになることが報告されている(Jabba et al., 2014)。しかし、このアミノ酸は他の動物の TRPA1 のアミノ酸とは異なっており、陸上動物型の高温感受性とは関連がない考えられる。本研究の結果並びにこれらの知見の結果を統合すると、TRPA1 の温度感受性は N 末端の AR が重要であることが強く示唆された。しかし、TRPA1 の立体構造は明らかになっているが、温度刺激時にどのような構造変化が起きているのかについては、詳しく分かっていない。AR は、細胞内に存在し、細胞膜またはコレステロールやリン脂質と相互作用していることが報告されている(Paulsen et al., 2015)。よって、温度変化により膜流動性が変化することで、AR の構造が変化し、4 番

目と5番目の膜貫通領域のリンカー領域に伝達され、チャネルが開いていると推測される。

また、今回の解析では広範囲のARの交換によって、高温応答の特性が交換されることが明らかになり、ARが温度感受性に大きく寄与していることが示唆された。しかし、AR以外の分子構造が温度感受性の決定に寄与している可能性も考えられる。その候補として、C末端のコイルドコイル領域や陽イオンの透過を制御しているポアドメインが挙げられる。特に、このコイルドコイル領域は、ARと相互作用していると推測されており、ARが温度刺激を認識した後、コイルドコイルの構造が変化することで、チャネルの開口に影響している可能性も考えられる。

hTRPA1の三次元構造が明らかになっており(Paulsen et al., 2015)、この立体構造情報を基に、ガラガラヘビとメダカのTRPA1の予想立体構造を作成、比較し、どの構造部位が異なるのか解析することが可能である。よって、今後はアミノ酸レベルの解析に加え、立体構造レベルの解析を行うことで、温度刺激によってTRPA1がどのように開口するのか詳しく解明できるだろう。そして、TRPA1の温度感知メカニズムの全容が明らかになり、温度感受性TRPチャネルの研究がさらに加速するかもしれない。

いずれにしても、本研究はTRPA1が脊椎動物の進化とともにどのように高温感受性の仕組みを変化させたのか、その分子基盤を解析し、TRPA1の温度感知機構並びに温度感受性TRPチャネル研究に新たな知見を提供することができたと思われる。

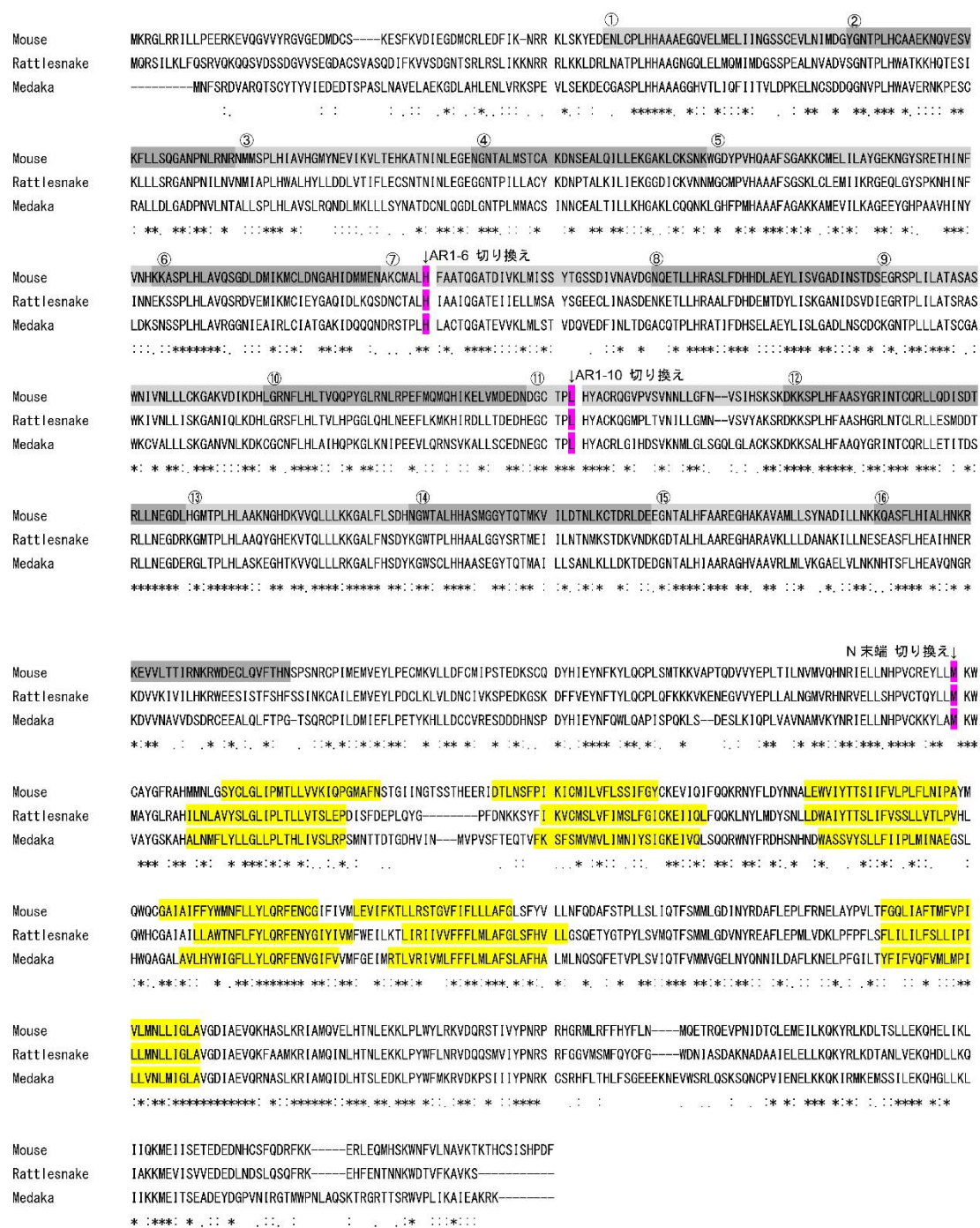


Fig.33 アミノ酸のアライメント

マウス、ガラガラヘビ、メダカの TRPA1 のアミノ酸配列を Clastal W でアライメントした。灰色は AR、黄色は膜貫通領域、ピンク色で塗りつぶした部分はキメラの切り替え点を示している。

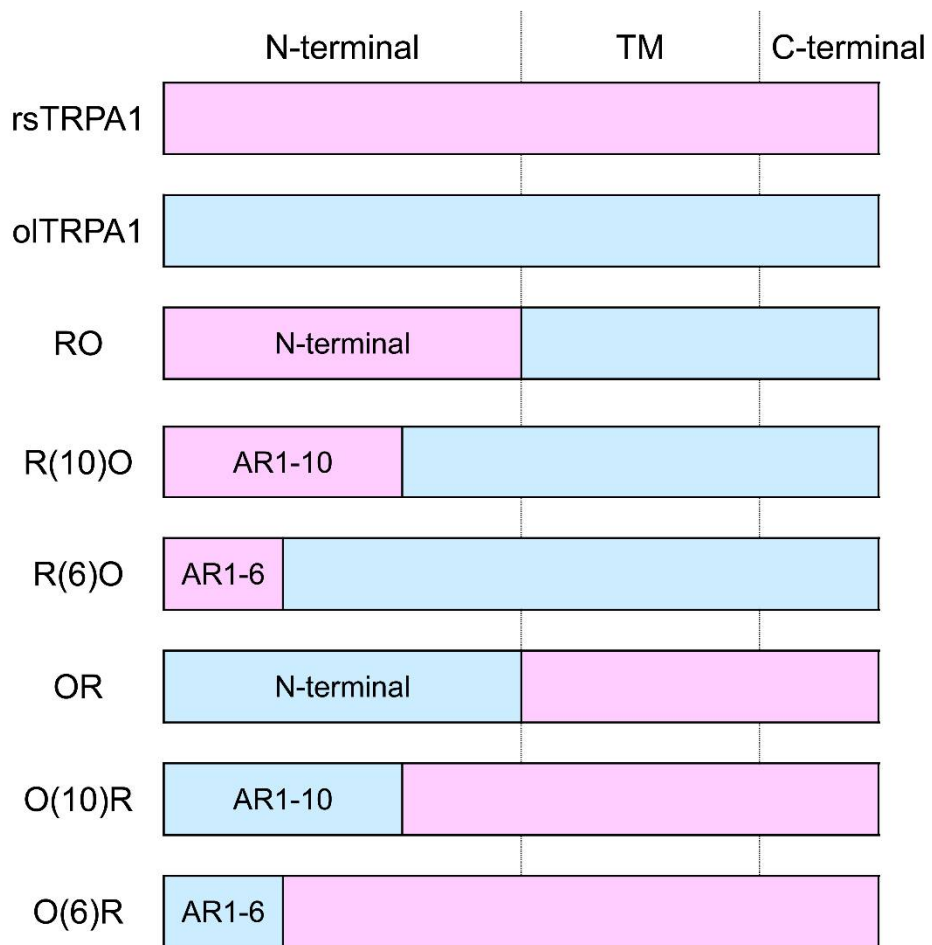


Fig.34 作製した6種のキメラの模式図

作製したガラガラヘビとメダカ TRPA1 の間で、N 末端、AR1-10、AR1-6 を交換したキメラの模式図を示した。

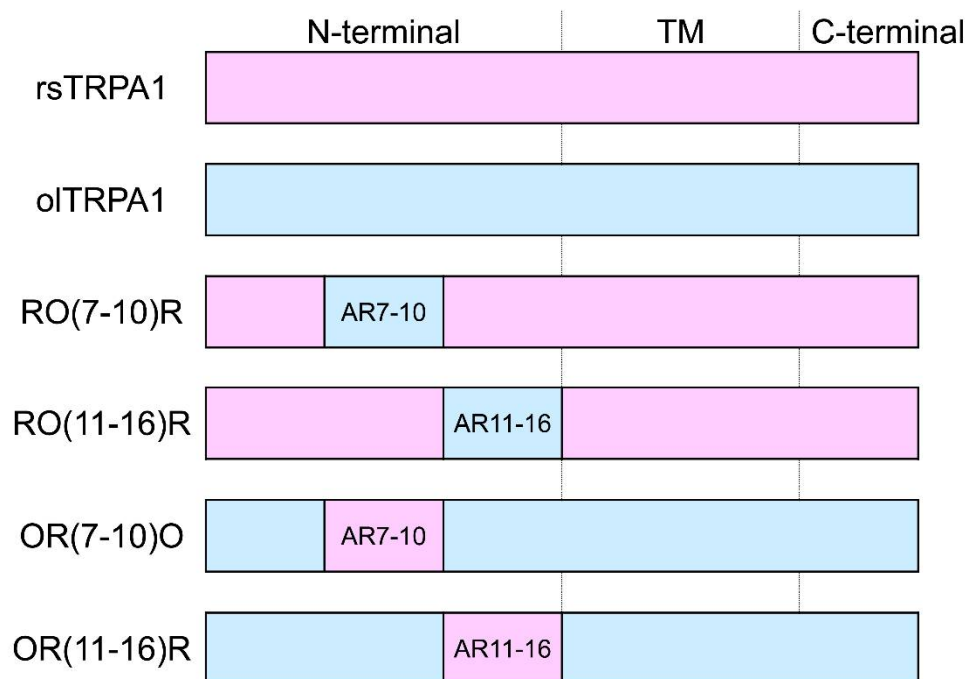
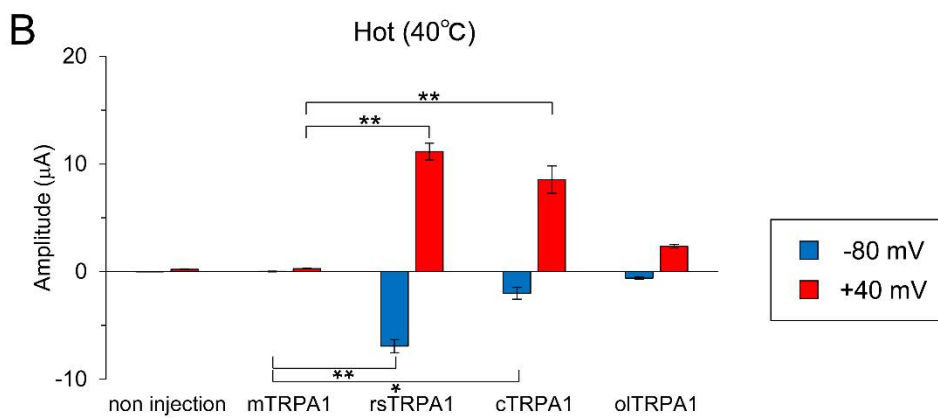
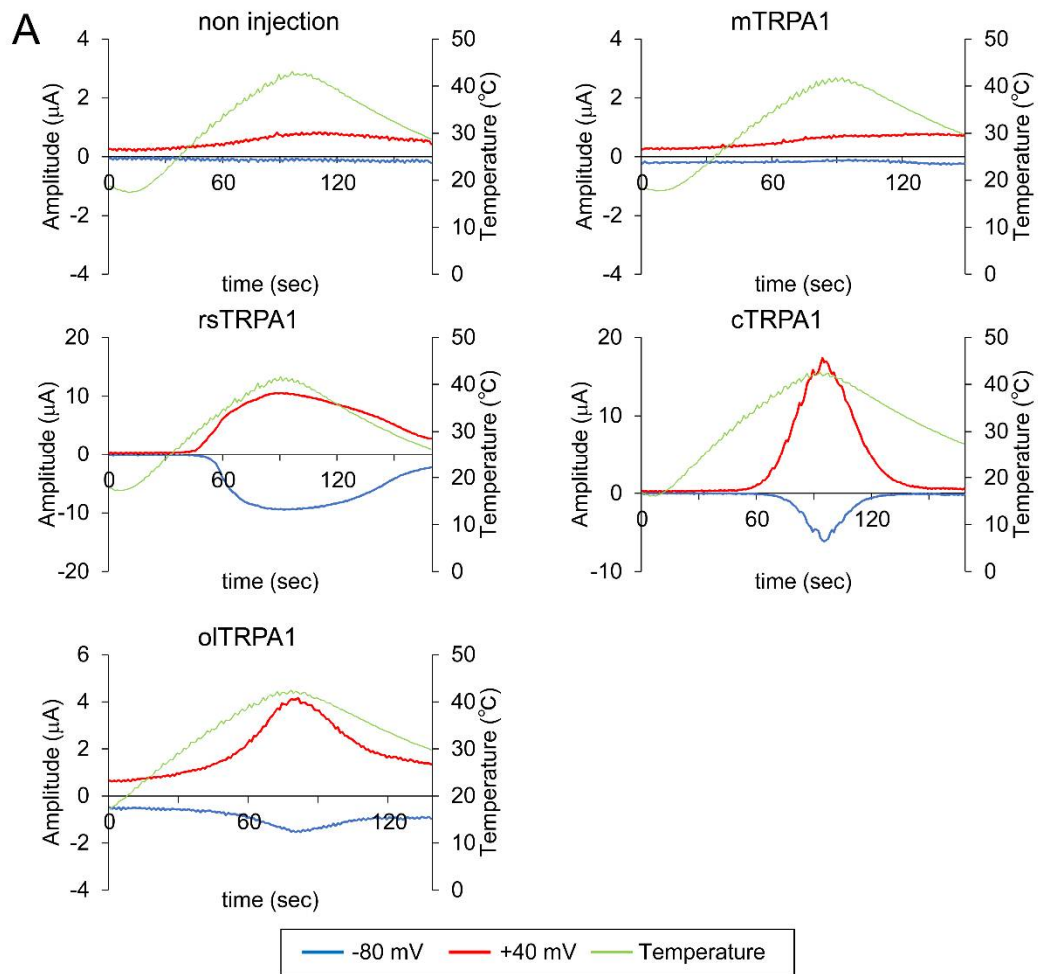


Fig.35 作製した4種のキメラの模式図

作製したガラガラヘビとメダカ TRPA1 の間で AR7-10 または AR11-16 を交換したキメラの模式図を示した。



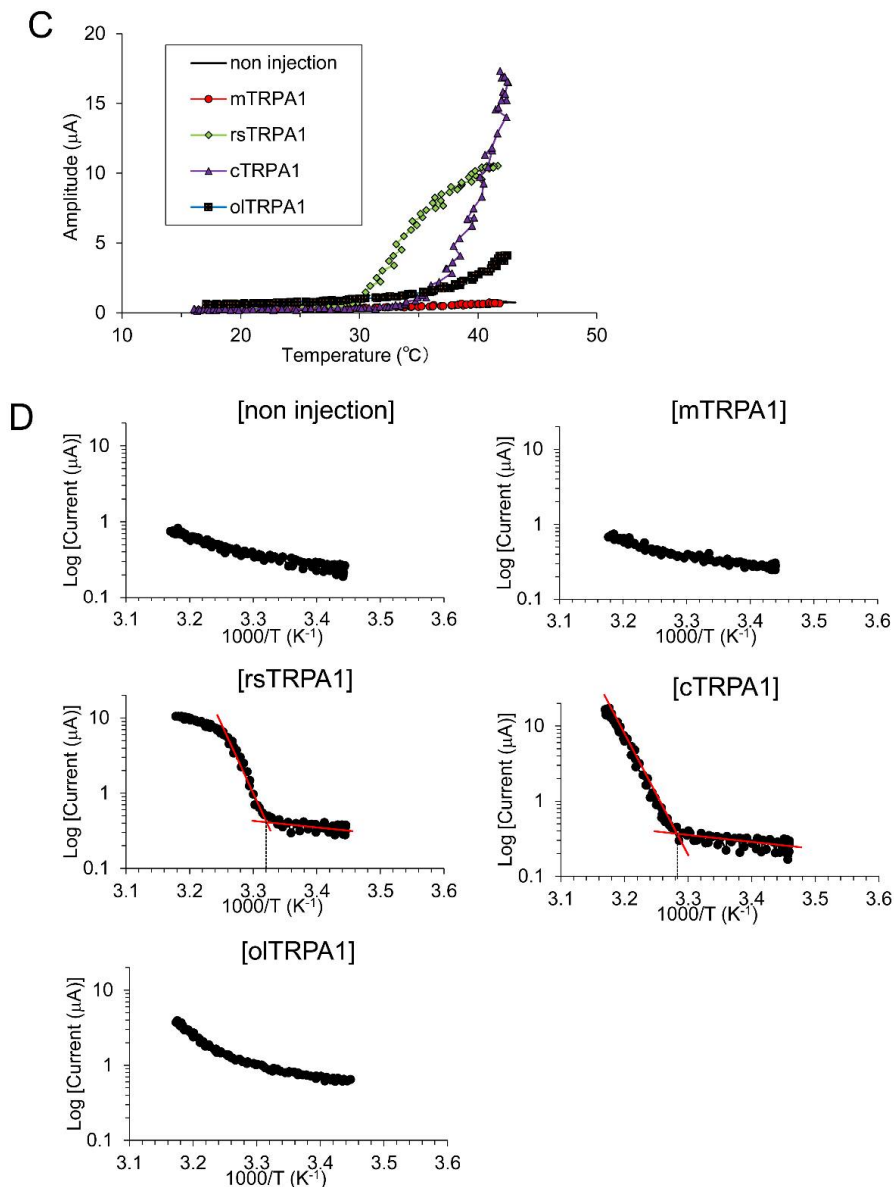


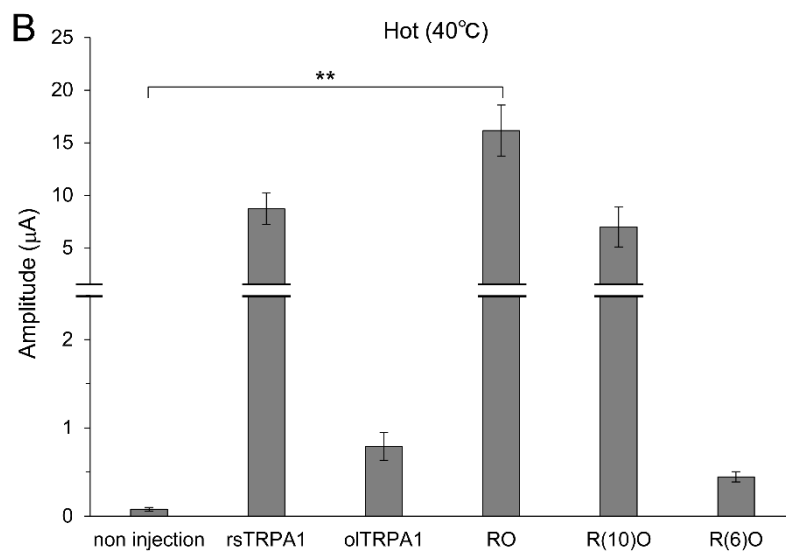
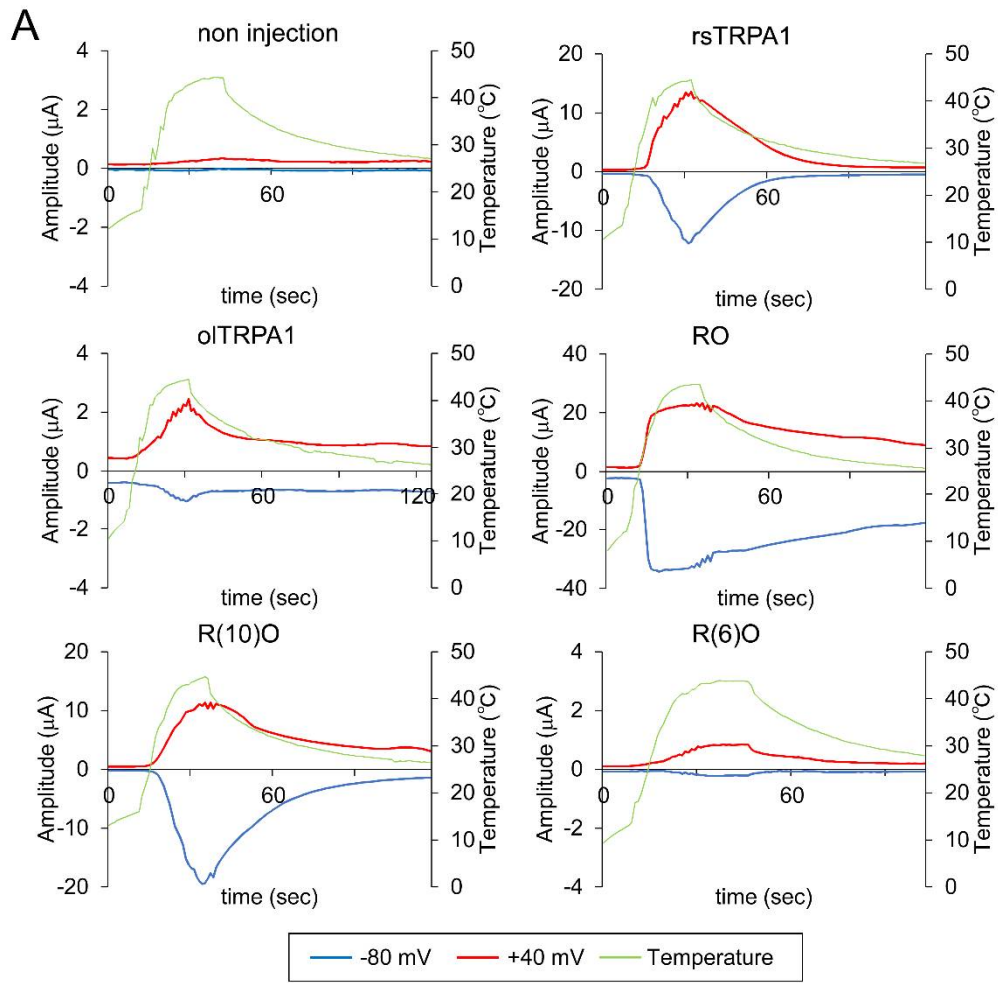
Fig.36 卵母細胞発現系を用いた各 TRPA1 の高温応答の比較

(A) cRNA を導入していない卵母細胞と mTRPA1、rsTRPA1、cTRPA1、olTRPA1 を発現させた卵母細胞に高温刺激を行い、二本刺し膜電位固定法を用いて解析した時のそれぞれの代表トレースを示した。縦軸は活性電流(μA)、横軸は時間(秒)で示した。

(B) 40 $^{\circ}\text{C}$ の時の活性電流の平均を棒グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 \pm SE で示した。(n=6) (Tukey-Kramer 法で有意差あり ** $p<0.01$, * $p<0.05$)

(C) A のトレースを横軸が温度($^{\circ}\text{C}$)、縦軸が活性電流(μA)でプロットし、電流と温度の関係を示した。

(D) A で示した non injection と各 TRPA1 をアレニウスプロットに示した。



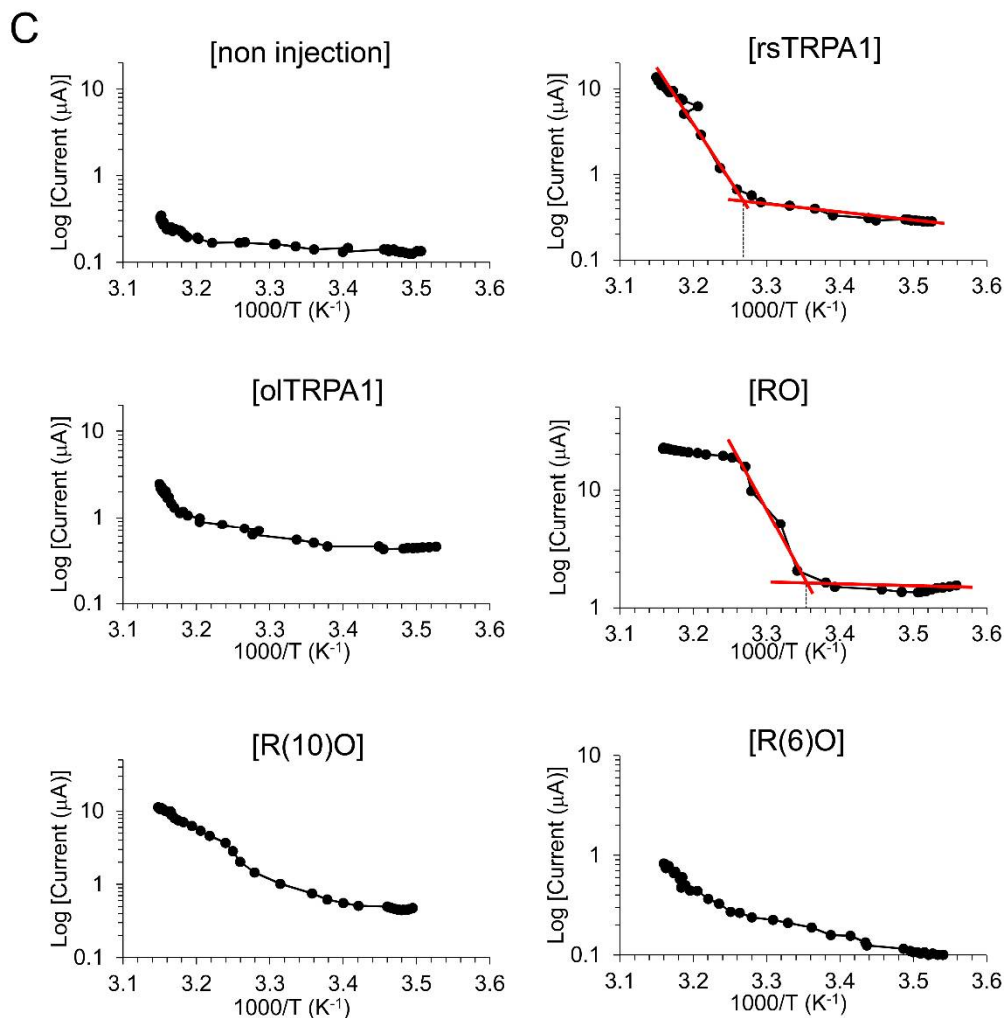
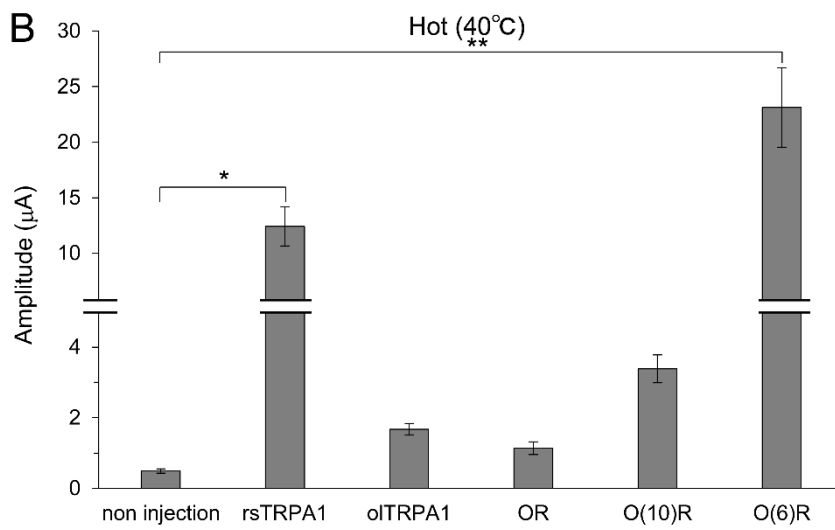
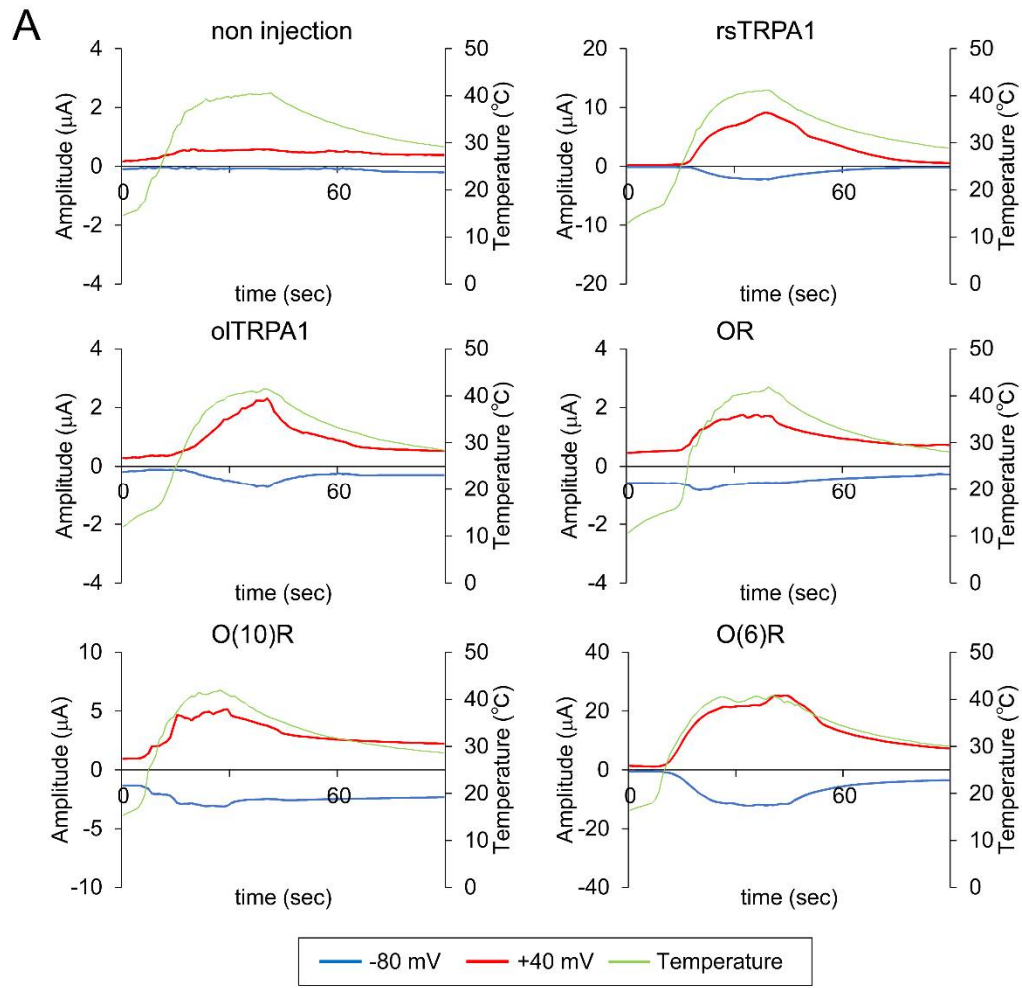


Fig.37 卵母細胞発現系を用いたキメラの高温応答

(A) cRNA を導入していない卵母細胞と rsTRPA1、olTRPA1、各キメラ(RO, R(10)O, R(6)O)を発現させた卵母細胞に高温刺激を行い、二本刺し膜電位固定法を用いて電流応答を解析した時のそれぞれの代表トレースを示した。縦軸は活性電流(μA)、横軸は時間(秒)で示した。

(B) 40°C の時の $+40\text{ mV}$ の活性電流の平均を棒グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 $\pm\text{SE}$ で示した。(n=5) (Tukey-Kramer 法で有意差あり $**p<0.01$)

(C) A で示した non injection、rsTRPA1、olTRPA1、各キメラのトレースをアレニウスプロットに示した。



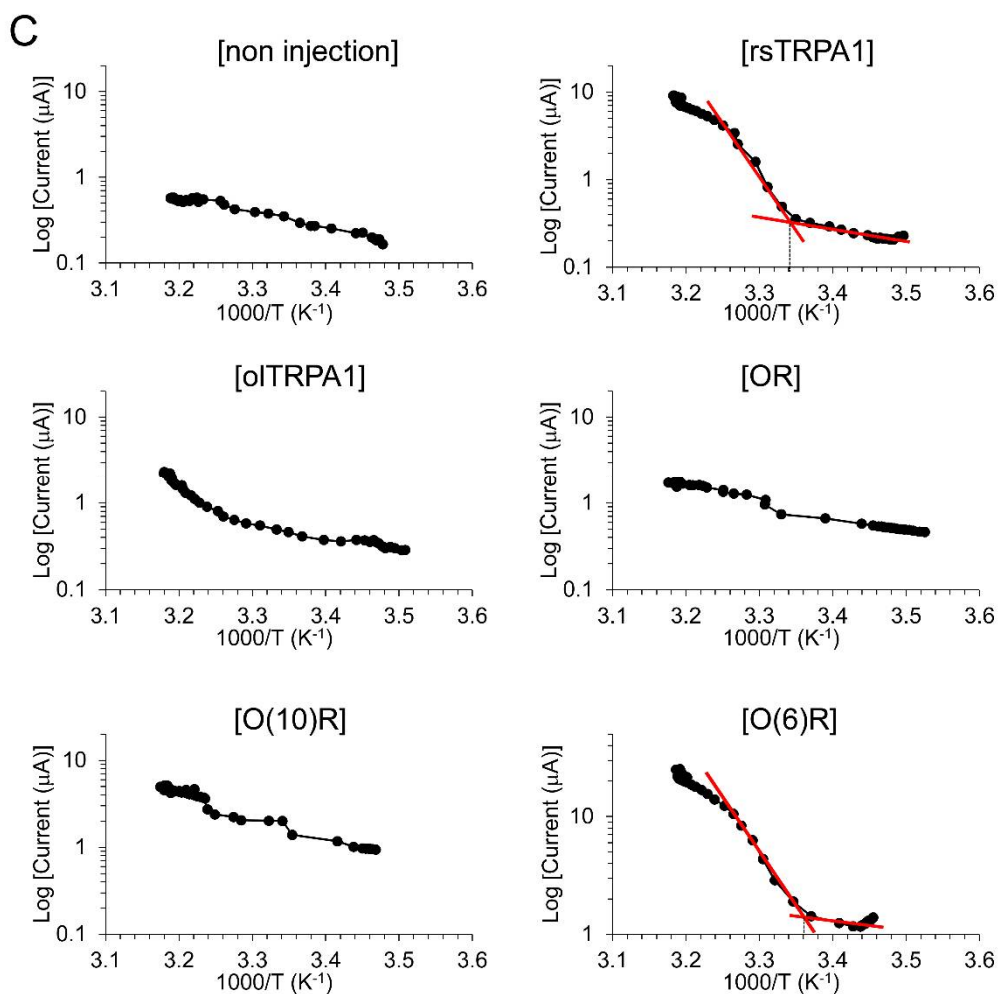


Fig.38 卵母細胞発現系を用いたキメラの高温応答

(A) cRNA を導入していない卵母細胞と rsTRPA1、olTRPA1、各キメラ(OR, O(10)R, O(6)R) を発現させた卵母細胞に高温刺激を行い、二本刺し膜電位固定法を用いて電流応答を解析した時のそれぞれの代表トレースを示した。縦軸は活性電流(μA)、横軸は時間(秒)で示した。

(B) 40°C の時の $+40\text{ mV}$ の活性電流の平均を棒グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均 $\pm\text{SE}$ で示した。(n=5) (Tukey-Kramer 法で有意差あり $**p<0.01$, $*p<0.05$)

(C) A で示した non injection、rsTRPA1、olTRPA1、各キメラのトレースをアレニウスプロットに示した。

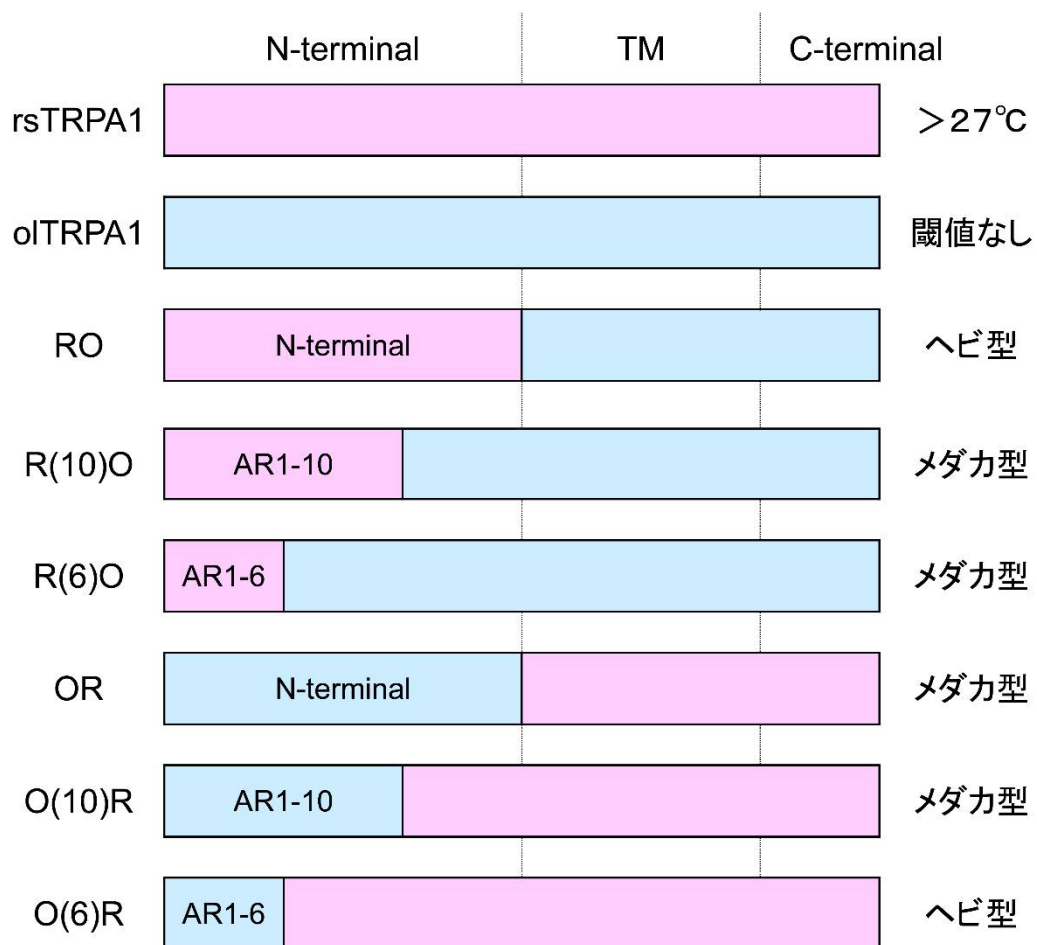
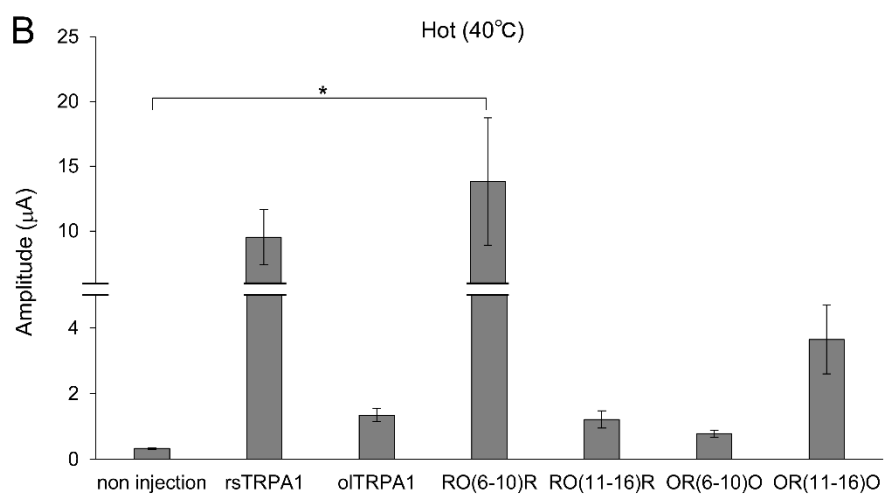
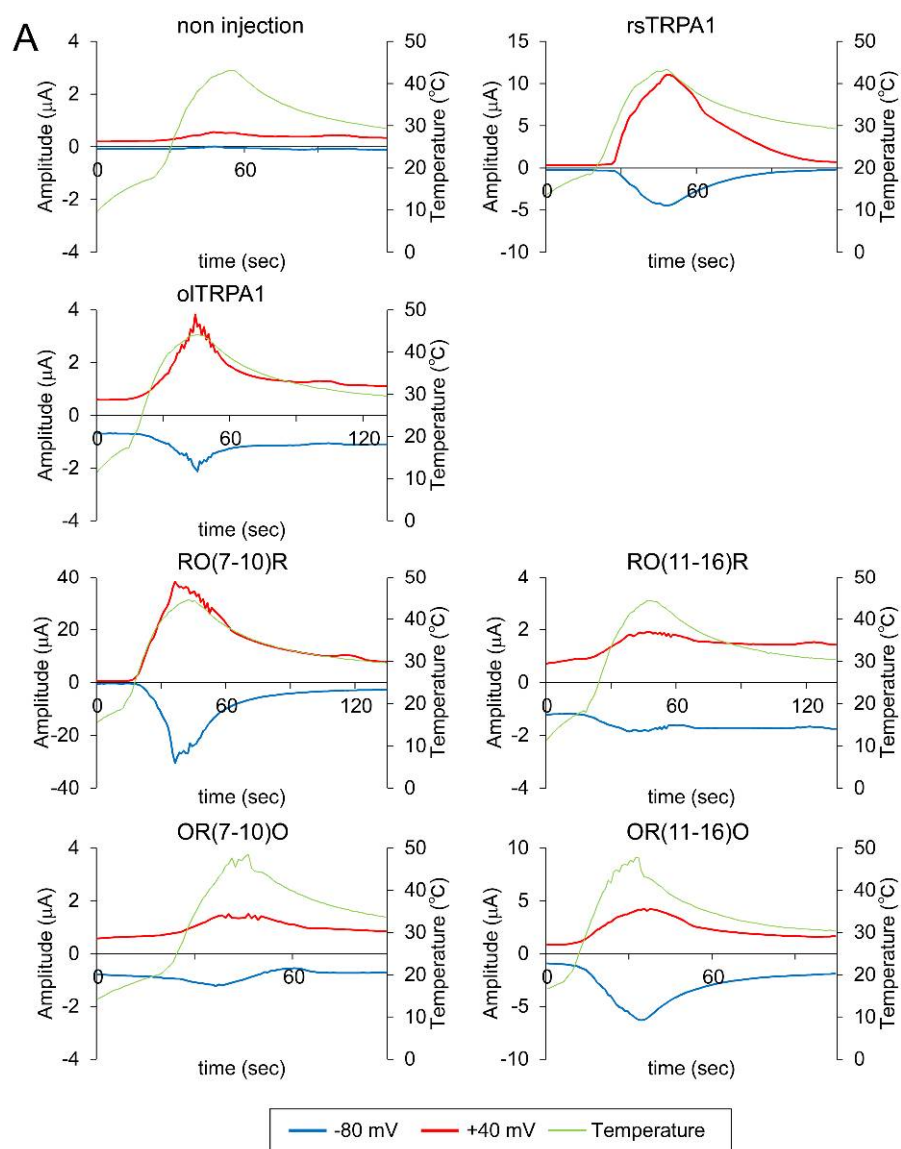


Fig.39 キメラの解析結果

Fig.37 と Fig.38 の解析結果を示した。



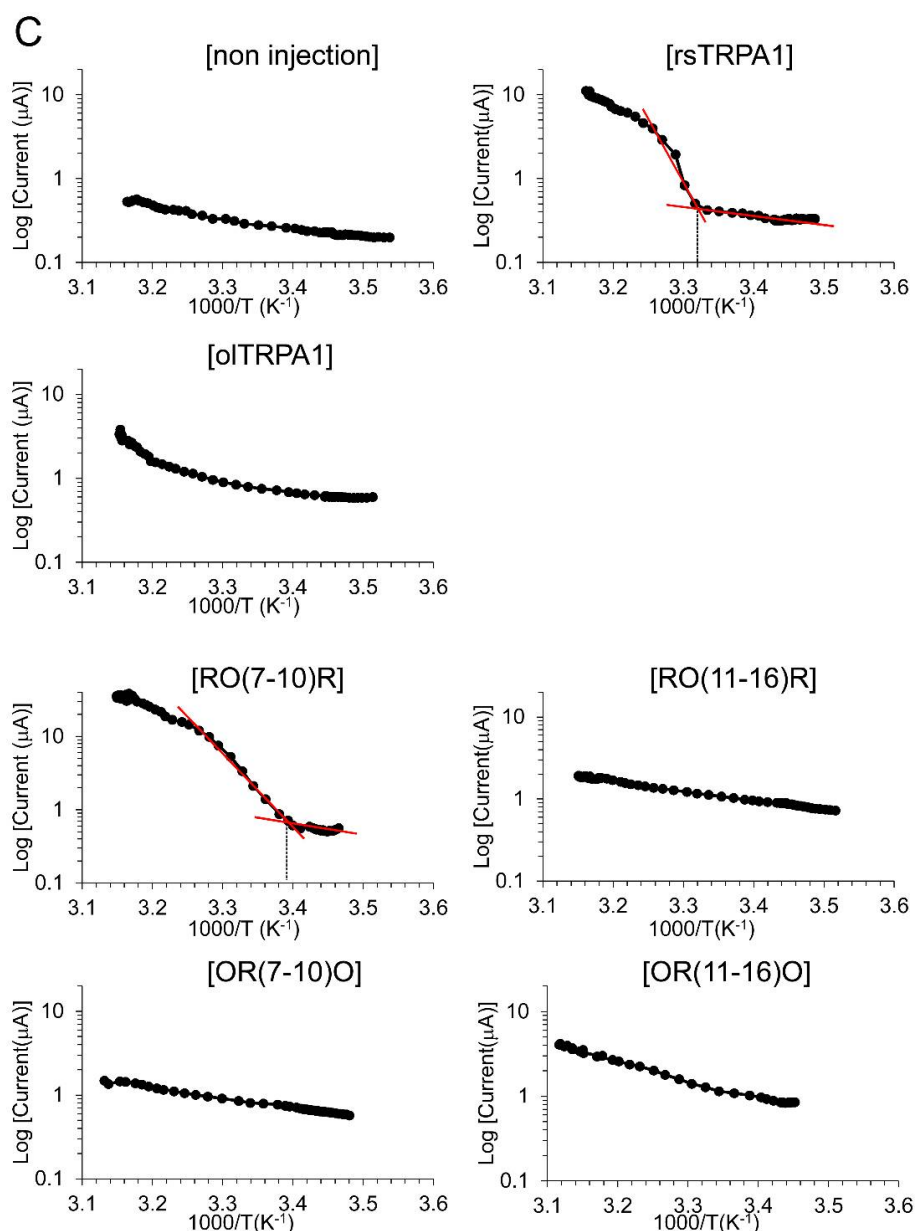


Fig.40 卵母細胞発現系を用いたキメラの高温応答

(A) cRNA を導入していない卵母細胞と rsTRPA1、olTRPA1、各キメラ(RO(7-10)R, RO(11-16)R, OR(7-10)O, OR(11-16)O)を発現させた卵母細胞に高温刺激を行い、二本刺し膜電位固定法を用いて電流応答を解析した時のそれぞれの代表トレースを示した。縦軸は活性電流(μA)、横軸は時間(秒)で示した。

(B) 40℃の+40 mV の活性電流の平均を棒グラフで示した。それぞれのデータポイントは、平均±SE で示した。(n=5) (Tukey-Kramer 法で有意差あり *p<0.05)

(C) A で示した non injection、rsTRPA1、olTRPA1、各キメラのトレースをアレニウスプロットに示した。

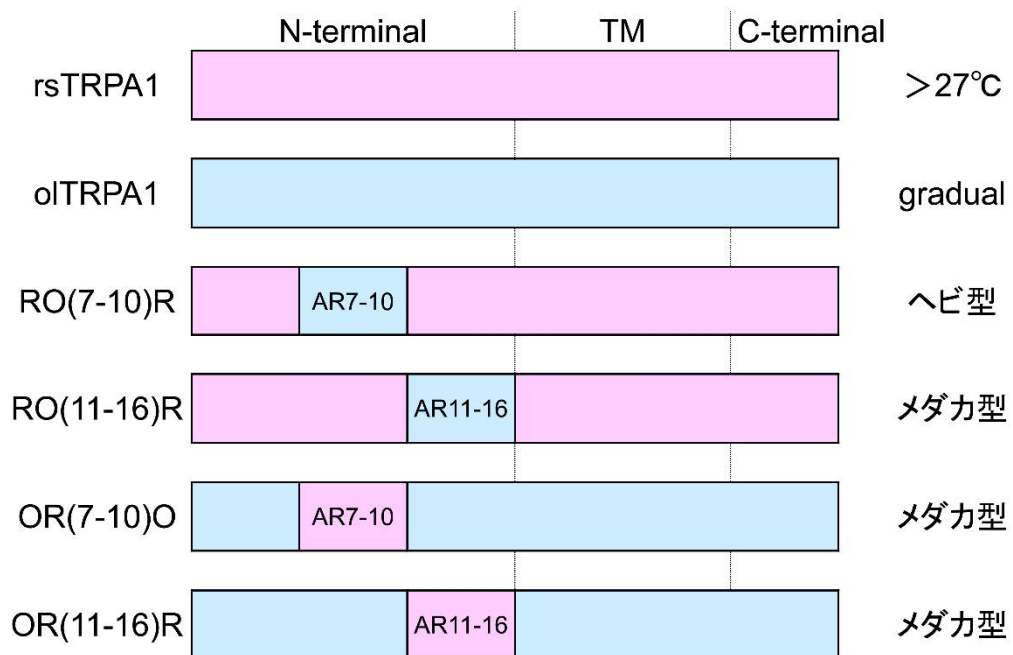


Fig.41 キメラの解析結果

Fig.40 の解析結果をまとめた。

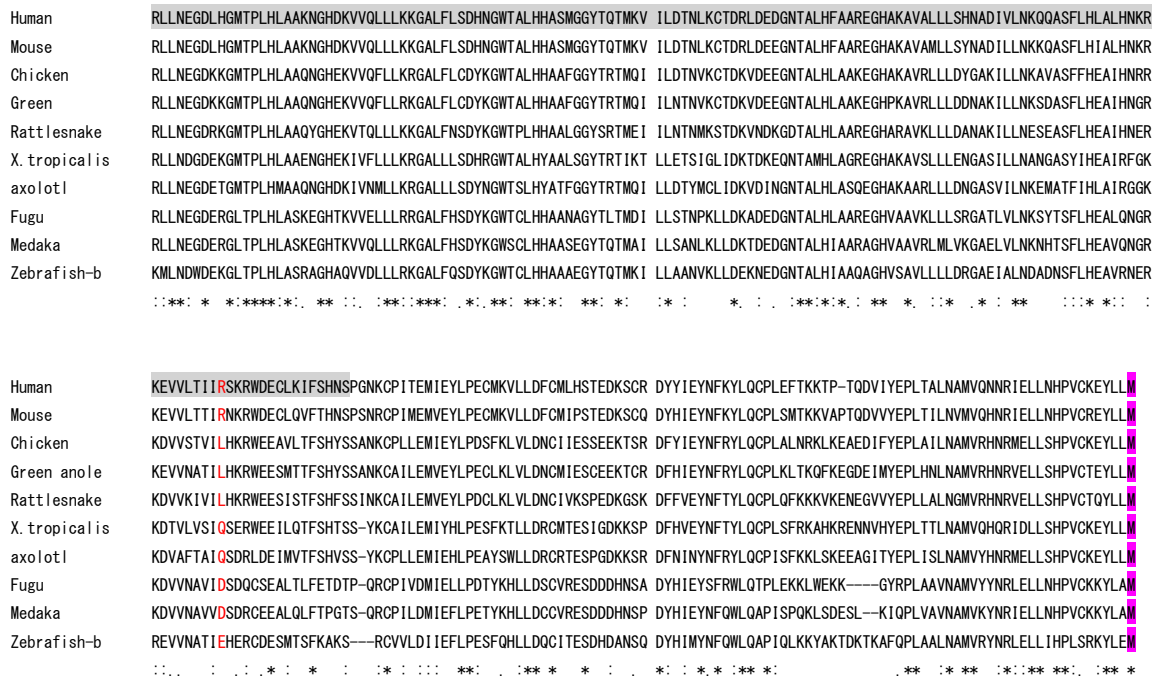


Fig.42 脊椎動物 TRPA1 のアミノ酸のアライメント

脊椎動物の TRPA1 のアミノ酸配列を Clastal W でアライメントした。灰色は AR、黄色は膜貫通領域、ピンク色で塗りつぶした部分はキメラの切り替え点を示している。赤色の文字は、高温感受性なし、陸上動物型、魚類型の TRPA1 の間で異なるアミノ酸の部分を示している。

Table.6 TRPA1 の刺激応答性

Species	Chemical						Thermo	
	AITC	caffeine	oxi EGCG	H ₂ O ₂	carvacrol	MA	Cold	Hot
Human	○	×	○	○	○	○	×	×
Mouse	○	○	○	○	○	○	○ <17°C	×
Chicken	○	○	×	△	○	○	×	○ >39°C
Green anole	○				○	×	×	○ >33°C
Rattlesnake	△	○	×				×	○ >27°C
WC frog	○	○	×	×	○	×	×	○ >39°C
Axolotl	○	○	×	×	○	○	×	○ >41°C
Zebrafish-a	○	○	○	○			×	×
Zebrafish-b	△	○	×	△			○ <10°C	○ No threshold
Pufferfish	○	○	×	○	○	○	○ <8°C	○ No threshold
Medaka	○	○	×	×	○	○	×	○ No threshold
Drosophila	○						×	○ >28°C

陸上生活

水中生活

これまでに報告されている各動物の TRPA1 の化学物質と温度に対する応答性と本研究で明らかになった魚類と axTRPA1 の応答性を表にまとめた。

○は活性化、△は弱い活性化、×は不活性化、空欄は未解析を示す。No threshold は、閾値がなく 25°Cから徐々に高温で活性化する特性を示す。

総合考察

本研究では、魚類のゼブラフィッシュ、フグ、メダカの TRPA1 の化学物質と温度に対する応答性について第 1 章で解析した。その結果、魚類の TRPA1 は、これまでに報告されている陸上動物の TRPA1 の高温応答性とは異なる、閾値がなく徐々に活性化する高温センサーであることが明らかになった。また、第 2 章では動物の生育環境が陸上へと移行する起点にいる有尾両生類の axTRPA1 のクローニングと機能解析を行った。その結果、axTRPA1 は 41°C に閾値を持つ高温センサーとして働いていることが明らかになった(Table.6)。そして、脊椎動物 TRPA1 の 2 種の高温応答の特性はどのような分子構造の違いによって異なっているのか明らかにするために、第 3 章ではキメラを用いて解析を行った。その結果、N 末端の AR が高温応答の特性の違いに重要であることが示唆された。

本研究では、特に以下の 5 点が明らかになった(Table.6)。

- (1) 魚類 TRPA1 は、閾値がなく、25°C 付近から徐々に活性化する高温センサーである。
- (2) zTRPA1b と pfTRPA1 は、低温と高温両方に応答する。
- (3) 水中生活の axTRPA1 は、41°C に閾値を持つ陸上動物型の高温センサーである。
- (4) 脊椎動物 TRPA1 の高温応答の特性の決定は、N 末端の AR が重要である。
- (5) 脊椎動物 TRPA1 の化学物質応答性は動物ごとに異なる。

以上の研究結果から、動物の陸生化と TRPA1 の機能変化について考察すると、動物の生育環境や食性は陸生化に伴って大きく変化したと考えられ、陸上へ進出した有尾両生類から陸上動物型の高温センサーを獲得したと考えられた。水中に生息する魚類は、温度変化が少なく、侵害となる温度範囲が他の動物と比較して広い。一方、生息環境を水中から陸上へと変化させた両生類、爬虫類、鳥類は、日照などの要因によって水中と比較して温度変化が起こりやすい環境へと移行している。おそらく、生息環境中の温度環境や侵害となる温度の感知への対応などが最も影響し、より鋭敏に侵害温度を感知するために TRPA1 の高温応答の特性は閾値を持つ高温センサーへと変化したと考えられる。

環境温度の感知は、動物の生存にとって、重要かつ必須の機能である。よって、動物はそれぞれに適した生息環境を得るために、温度感知機構と温度応答性を発達させている。温度センサーとして機能する TRP チャネルは、同定されて以来多くの研究者

が解析を行ってきた。しかし、詳しい温度感受性 TRP チャネルの温度感知のメカニズムの詳細は不明な点が多い。また、動物が侵害温度を鋭敏に感知するために、温度閾値を持つセンサーの獲得が重要と考えられるが、動物が陸上進化に伴ってどのように感覚センサーを獲得してきたかを明らかにする研究は、全く行われていなかった。本研究では、温度センサーの 1 つ TRPA1 に注目し、動物の陸生化によって TRPA1 の高温応答性が変化していることが明らかになった。哺乳類では、低温から高温までの一定の温度域を 9 種類の温度感受性 TRP チャネルを使って、温度の識別と感知をしている。一方、魚類のゼブラフィッシュは、この 9 種類の温度感受性 TRP チャネルの 3 遺伝子が欠如し、哺乳類と異なる構成で温度を感知していると考えられ、動物の生息環境や生理機能に応じて、温度感受性 TRP チャネルの閾値の変化や使い分けが起こっている可能性が高いと考えられる。しかし、温度感受性 TRP チャネルの研究の多くは哺乳類が中心であり、TRPA1 ほど他の動物の機能解析は行われていない。今後、哺乳類の温度感受性 TRP チャネルと比較解析を行うことで、動物の感覚システム並びに温度感知の仕組みの全体像が明らかになっていくだろう。

また、TRPA1 の化学物質応答性については、AITC、caffeine、carvacrol は多くの動物が応答するリガンドであることが明らかになった(Table.6)。よって、脊椎動物の祖先の動物からその感受性が保存されていると考えられる。哺乳類 TRPA1 で報告されている AITC 応答に重要な Cys は、脊椎動物 TRPA1 間でよく保存されている。また、caffeine や carvacrol に応答する濃度は動物種で異なっていたが、どの動物の TRPA1 も応答する。そのため、AITC に次ぐ TRPA1 のアゴニストであると考えられる。一方、 H_2O_2 や MA は動物種によって応答性が大きく異なる。特に、 H_2O_2 は AR にある特定の Cys の酸化によって活性化する化学物質である。 H_2O_2 は、動物の体内で産生され、非特異的に酸化し、細胞損傷を引き起こす侵害性物質である。しかし、免疫応答に関与し、重要なシグナル分子として働く物質でもある。そのため、体内の H_2O_2 の感知は動物にとって重要な機能であるが、動物種によって H_2O_2 応答性に違いが見られた。また、MA の応答性は同じ両生類でも、応答性の違いが異種性発現系を用いた解析並びに行動解析で観察された(Fig.29)。これらの結果を統合すると、これらの化学物質応答性とその違いは動物の陸生化との関係は低く、動物の生理的な機能や生存戦略、動物の摂食対象の違いによって、その動物固有に応答性の変化が獲得されたと考えられる。

よって、脊椎動物の陸生化に伴って起こった TRPA1 の最も大きな機能変化は「高温応答の特性」であり、よって各動物の生息温度や生理機能に関連する温度を逸脱する温度(侵害温度)を高感度で感知できるように適応したと考えられる。

参考文献

- Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci.* (2008) 28(10), 2485–2494.
- Aparicio S, Chapman J, Stupka E, Putnam N, Chia JM, Dehal P, Christoffels A, Rash S, Hoon S, Smit A, Gelpke MD, Roach J, Oh T, Ho IY, Wong M, Detter C, Verhoef F, Predki P, Tay A, Lucas S, Richardson P, Smith SF, Clark MS, Edwards YJ, Doggett N, Zharkikh A, Tavtigian SV, Pruss D, Barnstead M, Evans C, Baden H, Powell J, Glusman G, Rowen L, Hood L, Tan YH, Elgar G, Hawkins T, Venkatesh B, Rokhsar D, Brenner S. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science.* (2002) 297(5585), 1301-1310.
- Bagriantsev SN, Gracheva EO. Molecular mechanisms of temperature adaptation. *J Physiol.* (2015) 593(16), 3483-3491.
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron.* (2004) 41(6), 849-857.
- Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, Escalera J, Cohn L, Jordt SE. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest.* (2008) 118, 1899-1910.
- Bordzilovskaya NP, Dettlaff TA. Table of stages of normal development of axolotl embryos. *Axolotl Newsletter* (1979) 7, 2-22.
- Brauchi S, Orta G, Salazar M, Rosenmann E, Latorre R. A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J Neurosci.* (2006) 26(18), 4835-4840.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* (1997) 389 (6653), 816-824.
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature.* (1999) 398 (6726), 436-441.
- Chen J, Kang D, Xu J, Lake M, Hogan JO, Sun C, Walter K, Yao B, Kim D. Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nature Commun.* (2013) 4, 2501.
- Cordero-Morales JF, Gracheva EO, Julius D. Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc Natl Acad Sci USA.*

- (2011) 108(46), E1184-1191.
- Corey DP, García-Añoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Géléoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* (2004) 432(7018), 723-730.
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*. (1999) 151(4), 1531–1545.
- Fujita F, Uchida K, Moriyama T, Shima A, Shibasaki K, Inada H, Sokabe T, Tominaga M. Intracellular alkalization causes pain sensation through activation of TRPA1 in mice. *J Clin Invest*. (2008) 118(12), 4049-4057.
- García-Martínez C, Morenilla-Palao C, Planells-Cases R, Merino JM, Ferrer-Montiel A. Identification of an aspartic residue in the P-loop of the vanilloid receptor that modulates pore properties. *J Biol Chem*. (2000) 275(42), 32552-32558.
- Gau P, Poon J, Ufret-Vincenty C, Snelson CD, Gordon SE, Raible DW, Dhaka A. The zebrafish ortholog of TRPV1 is required for heat-induced locomotion. *J Neurosci*. (2013) 33(12), 5249-5260.
- Gaudet R. A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol. Biosyst*. (2008) 4(5), 372-379.
- Gracheva EO, Cordero-Morales JF, González-Carcacia JA, Ingolia NT, Manno C, Aranguren CI, Weissman JS, Julius D. Ganglion-specific splicing of TRPV1 underlies infrared sensation in vampire bats. *Nature* (2011) 476(7358), 88-91.
- Gracheva EO, Ingolia NT, Kelly YM, Cordero-Morales JF, Hollopeter G, Chesler AT, Sánchez EE, Perez JC, Weissman JS, Julius D. Molecular basis of infrared detection by snakes. *Nature* (2010) 464(7291), 1006-1011.
- Grandl J, Hu H, Bandell M, Bursulaya B, Schmidt M, Petrus M, Patapoutian A. Pore region of TRPV3 ion channel is specifically required for heat activation. *Nat Neurosci*. (2008) 11(9), 1007-1013.
- Guler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci*. (2002) 22(15), 6408-6414.
- Gupta R, Saito S, Mori Y, Itoh SG, Okumura H, Tominaga M. Structural basis of TRPA1 inhibition by HC-030031 utilizing species-specific differences. *Sci Rep*. (2016) 6, 37460.
- Hamada FN, Rosenzweig M, Kang K, Pulver SR, Ghezzi A, Jegla TJ, Garrity PA. An internal thermal

- sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature*. (2008) 454(7201), 217-220.
- Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2006) 103(51), 19564-19568.
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assunção JA, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel JH, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire SF, Laird GK, Lloyd D, Kenyon E, Donaldson S, Sehra H, Almeida-King J, Loveland J, Trevanion S, Jones M, Quail M, Willey D, Hunt A, Burton J, Sims S, McLay K, Plumb B, Davis J, Clee C, Oliver K, Clark R, Riddle C, Elliot D, Threadgold G, Harden G, Ware D, Begum S, Mortimore B, Kerry G, Heath P, Phillimore B, Tracey A, Corby N, Dunn M, Johnson C, Wood J, Clark S, Pelan S, Griffiths G, Smith M, Glithero R, Howden P, Barker N, Lloyd C, Stevens C, Harley J, Holt K, Panagiotidis G, Lovell J, Beasley H, Henderson C, Gordon D, Auger K, Wright D, Collins J, Raisen C, Dyer L, Leung K, Robertson L, Ambridge K, Leongamornlert D, McGuire S, Gilderthorp R, Griffiths C, Manthravadi D, Nichol S, Barker G, Whitehead S, Kay M, Brown J, Murnane C, Gray E, Humphries M, Sycamore N, Barker D, Saunders D, Wallis J, Babbage A, Hammond S, Mashreghi-Mohammadi M, Barr L, Martin S, Wray P, Ellington A, Matthews N, Ellwood M, Woodmansey R, Clark G, Cooper J, Tromans A, Grafham D, Skuce C, Pandian R, Andrews R, Harrison E, Kimberley A, Garnett J, Fosker N, Hall R, Garner P, Kelly D, Bird C, Palmer S, Gehring I, Berger A, Dooley CM, Ersan-Ürün Z, Eser C, Geiger H, Geisler M, Karotki L, Kirn A, Konantz J, Konantz M, Oberländer M, Rudolph-Geiger S, Teucke M, Lanz C, Raddatz G, Osoegawa K, Zhu B, Rapp A, Widaa S, Langford C, Yang F, Schuster SC, Carter NP, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle SM, Enright A, Geisler R, Plasterk RH, Lee C, Westerfield M, de Jong PJ, Zon LI, Postlethwait JH, Nüsslein-Volhard C, Hubbard TJ, Roest Crolius H, Rogers J, Stemple DL. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. (2013) 496(7446), 498-503.
- Inoue J, Sato Y, Sinclair R, Tsukamoto K, Nishida M. Rapid genome reshaping by multiple-gene loss after whole-genome duplication in teleost fish suggested by mathematical modeling. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2015) 112(48), 14918-14923.
- Jabba S, Goyal R, Sosa-Pagán JO, Moldenhauer H, Wu J, Kalmeta B, Bandell M, Latorre R, Patapoutian A, Grandl J. Directionality of temperature activation in mouse TRPA1 ion channel can

be inverted by single-point mutations in ankyrin repeat six. *Neuron*. (2014) 82(5), 1017-1031.

Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* (2004) 427(6971), 260-265.

Kang K, Panzano VC, Chang EC, Ni L, Dainis AM, Jenkins AM, Regna K, Muskavitch MA, Garrity PA. Modulation of TRPA1 thermal sensitivity enables sensory discrimination in *Drosophila*. *Nature*. (2011) 481(7379), 76-80.

Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, Nilius B, Voets T. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2009) 106(4), 1273-1278.

Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, Nakatani Y, Qu W, Ahsan B, Yamada T, Nagayasu Y, Doi K, Kasai Y, Jindo T, Kobayashi D, Shimada A, Toyoda A, Kuroki Y, Fujiyama A, Sasaki T, Shimizu A, Asakawa S, Shimizu N, Hashimoto S, Yang J, Lee Y, Matsushima K, Sugano S, Sakaizumi M, Narita T, Ohishi K, Haga S, Ohta F, Nomoto H, Nogata K, Morishita T, Endo T, Shin-I T, Takeda H, Morishita S, Kohara Y. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*. (2007) 447(7145), 714-719.

Kastenhuber E, Gesemann M, Mickoleit M, Neuhauss SC. Phylogenetic analysis and expression of zebrafish transient receptor potential melastatin family genes. *Dev Dyn*. (2013) 242(11), 1236-1249.

Kashio M, Sokabe T, Shintaku K, Uematsu T, Fukuta N, Kobayashi N, Mori Y, Tominaga M. Redox signal-mediated sensitization of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) to temperature affects macrophage functions. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2012) 109(17):6745-6750.

Kashiwagi K, Kashiwagi A, Kurabayashi A, Hanada H, Nakajima K, Okada M, Takase M, Yaoita Y. *Xenopus tropicalis*: an ideal experimental animal in amphibia. *Exp Anim*. (2010) 59(4), 395-405.

Kobayashi K, Fukuoka T, Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Tokunaga A, Noguchi K. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with delta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol*. (2005) 493(4), 596-606.

Kurogi M, Miyashita M, Emoto Y, Kubo Y, Saitoh O. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate activates TRPA1 in an intestinal enteroendocrine cell line, STC-1. *Chem Senses*. (2012) 37(2), 167-177.

Kurogi M, Kawai Y, Nagatomo K, Tateyama M, Kubo Y, Saitoh O. Auto-oxidation products of epigallocatechin gallate activate TRPA1 and TRPV1 in sensory neurons. *Chem Senses*. (2015) 40(1),

27-46.

- Lee SP, Buber MT, Yang Q, Cerne R, Cortés RY, Sprouss DG, Bryant RW. Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. *Br J Pharmacol.* (2008) 153(8), 1739-1749.
- Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF, Patapoutian A. Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* (2007) 445(7127), 541-545.
- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2007) 104(33), 13525-13530
- Miyake T, Nakamura S, Zhao M, So K, Inoue K, Numata T, Takahashi N, Shirakawa H, Mori Y, Nakagawa T, Kaneko S. Cold sensitivity of TRPA1 is unveiled by the prolyl hydroxylation blockade-induced sensitization to ROS. *Nature Commun.* (2016) 7, 12840.
- Brewster MS, Gaudet R. How the TRPA1 receptor transmits painful stimuli: Inner workings revealed by electron cryomicroscopy. *Bioessays.* (2015) 37(11):1184-1192.
- Moparathi L, Survery S, Kreir M, Simonsen C, Kjellbom P, Högestätt ED, Johanson U, Zygmunt PM. Human TRPA1 is intrinsically cold- and chemosensitive with and without its N-terminal ankyrin repeat domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2014) 111(47), 16901-16906.
- Moparathi L, Kichko TI, Eberhardt M, Högestätt ED, Kjellbom P, Johanson U, Reeh PW, Leffler A, Filipovic MR, Zygmunt PM. Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity. *Sci Rep.* (2016) 6, 28763.
- Myers BR, Sigal YM, Julius D. Evolution of thermal response properties in a cold-activated TRP channel. *PLoS One.* (2009) 4(5), e5741.
- Nagatomo K, Ishii H, Yamamoto T, Nakajo K, Kubo Y. The Met268Pro mutation of mouse TRPA1 changes the effect of caffeine from activation to suppression. *Biophys J.* (2010) 99(11), 3609-3618.
- Nagatomo K, Kubo Y. Caffeine activates mouse TRPA1 channels but suppresses human TRPA1 channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2008) 105(45), 17373-17378.
- Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, Kojima R, Okada H, Mochizuki S, Sano Y, Inamura K, Matsushime H, Koizumi T, Yokoyama T, Ito H. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2009) 106(9), 3408-3413.
- Ohkita M, Saito S, Imagawa T, Takahashi K, Tominaga M, Ohta T. 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.* (2012) 287(4), 2388-2397.
- Paulsen CE, Armache JP, Gao Y, Cheng Y, Julius D. Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature.* (2015) 520(7548), 511-517.
- Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science.* (2002) 296(5575), 2046-2049.
- Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, Jegla T, Patapoutian A. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain* (2007) 3, 40.
- Prober DA, Zimmerman S, Myers BR, McDermott BM Jr, Kim SH, Caron S, Rihel J, Solnica-Krezel L, Julius D, Hudspeth AJ, Schier AF. Zebrafish TRPA1 channels are required for chemosensation but not for thermosensation or mechanosensory hair cell function. *J Neurosci.* (2008) 28(40), 10102-10110.
- Saito S, Shingai R. Evolution of Thermo TRP ion channel homologs in vertebrates. *Physiol Genomics.* (2006) 27(3), 219-230.
- Saito S, Fukuta N, Shingai R, Tominaga M. Evolution of vertebrate transient receptor potential vanilloid 3 channels: opposite temperature sensitivity between mammals and western clawed frogs. *PLoS Genet.* (2011) 7(4), e1002041.
- Saito S, Nakatsuka K, Takahashi K, Fukuta N, Imagawa T, Ohta T, Tominaga M. Analysis of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in frogs and lizards illuminates both nociceptive heat and chemical sensitivities and coexpression with TRP vanilloid 1 (TRPV1) in ancestral vertebrates. *J Biol Chem.* (2012) 287(36), 30743-30754.
- Saito S, Banzawa N, Fukuta N, Saito CT, Takahashi K, Imagawa T, Ohta T, Tominaga M. Heat and noxious chemical sensor, chicken TRPA1, as a target of bird repellents and identification of its structural determinants by multispecies functional comparison. *Mol Biol Evol.* (2014) 31(3), 708-722.
- Saito S, Tominaga M. Functional diversity and evolutionary dynamics of Thermo TRP channels. *Cell Calcium.* (2015) 57(3), 214-221.

- Saito S, Ohkita M, Saito CT, Takahashi K, Tominaga M, Ohta T. Evolution of Heat Sensors Drove Shifts in Thermosensation between *Xenopus* Species Adapted to Different Thermal Niches. *J Biol Chem.* (2016) 291(21), 11446-11459.
- Sato A, Sokabe T, Kashio M, Yasukochi Y, Tominaga M, Shiomi K. Embryonic thermosensitive TRPA1 determines transgenerational diapause phenotype of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2014) 111(13), E1249-1255.
- Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature.* (2002) 418(6894), 186-190.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* (2003) 112(6), 819-829.
- Takahashi N, Mizuno Y, Kozai D, Yamamoto S, Kiyonaka S, Shibata T, Uchida K, Mori Y. Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels* (2008) 2(4), 287-298.
- Takahashi N, Kuwaki T, Kiyonaka S, Numata T, Kozai D, Mizuno Y, Yamamoto S, Naito S, Knevels E, Carmeliet P, Oga T, Kaneko S, Suga S, Nokami T, Yoshida J, Mori Y. TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂. *Nat Chem Biol.* (2011) 7(10), 701-711.
- Takahashi N, Mori Y. TRP Channels as Sensors and Signal Integrators of Redox Status Changes. *Front Pharmacol.* (2011) 2, 58.
- Talavera K, Yasumatsu K, Voets T, Droogmans G, Shigemura N, Ninomiya Y, Margolskee RF, Nilius B. Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* (2005) 438(7070), 1022-1025.
- Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J.* (2006) 25(9), 1804-1815.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron.* (1998) 21(3), 531-543.

- Tytgat J, Vereecke J, Carmeliet E. Reversal of rectification and alteration of selectivity and pharmacology in a mammalian Kv1.1 potassium channel by deletion of domains S1 to S4. *J Physiol.* (1994) 481 (Pt 1), 7-13.
- Vriens J, Nilius B, Voets T. Peripheral thermosensation in mammals. *Nature Reviews Neuroscience.* (2014) 15(9), 573-589.
- Wang Q, Tan X, Jiao S, You F, Zhang PJ. Analyzing cold tolerance mechanism in transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *PLOS ONE.* (2014) 9, e102492.
- Xiao B, Dubin AE, Bursulaya B, Viswanath V, Jegla TJ, Patapoutian A. Identification of transmembrane domain 5 as a critical molecular determinant of menthol sensitivity in mammalian TRPA1 channels. *J Neurosci.* (2008) 28(39), 9640-9651.
- Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, Clapham DE. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature.* (2002) 418(6894), 181-186.
- Yang F, Cui Y, Wang K, Zheng J. Thermosensitive TRP channel pore turret is part of the temperature activation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2010) 107(15), 7083-7088.
- Yao J, Liu B, Qin F. Modular thermal sensors in temperature-gated transient receptor potential (TRP) channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2011) 108(27), 11109-11114.
- Yonemitsu T, Kuroki C, Takahashi N, Mori Y, Kanmura Y, Kashiwadani H, Ootsuka Y, Kuwaki T. TRPA1 detects environmental chemicals and induces avoidance behavior and arousal from sleep. *Sci Rep.* (2013) 3, 3100.
- Yu H, Gao J, Lu Y, Guang H, Cai S, Zhang S, Wang Y. Molecular cloning, sequence analysis and phylogeny of first caudata g-type lysozyme in axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Zoolog Sci.* (2013) 30(11), 938-943.
- Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci.* (2007) 10(3), 277-279.
- de la Roche JI, Eberhardt MJ, Klinger AB, Stanslowsky N, Wegner F, Koppert W, Reeh PW, Lampert A, Fischer MJ, Leffler A. The molecular basis for species-specific activation of human TRPA1 protein by protons involves poorly conserved residues within transmembrane domains 5 and 6. *J Biol Chem.* (2013) 288(28), 20280-20292.
- del Camino D, Murphy S, Heiry M, Barrett LB, Earley TJ, Cook CA, Petrus MJ, Zhao M, D'Amours

M, Deering N, Brenner GJ, Costigan M, Hayward NJ, Chong JA, Fanger CM, Woolf CJ, Patapoutian A, Moran MM. TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. J Neurosci. (2010) 30, 15165-15174.

大野 乾 遺伝子重複による進化 岩波書店 (1977)

佐藤 行人, 西田 睦 全ゲノム重複と魚類の進化 魚類学雑誌 (2009) 56, 89-109.

沼田 朋大, 香西 大輔, 高橋 重成, 加藤 賢太, 瓜生幸嗣, 山本伸一郎, 金子雄, 眞本達生, 森泰生 TRP チャネルの構造と多様な機能 生化学 (2009) 64, 962-983.

松井 正文 両生類の進化 東京大学出版会 (1996)

浅野 麻己子 メダカの侵害刺激センサーTRPV1 の刺激応答性の解析 長浜バイオ大学 卒業論文 (2017)

齊藤 寛 メダカ TRPA1 の機能と分布に関する研究 長浜バイオ大学大学院 修士論文 (2017)

坂元 直樹 メダカ TRPV4 の cDNA クローニング 長浜バイオ大学 卒業論文 (2017)

八田 駿 Medaka TRPA1 の cDNA のクローニングと機能解析 長浜バイオ大学卒業論文 (2014)

村竹 勇樹 刺胞動物ヒドラの感覚センサーの同定 長浜バイオ大学大学院 修士論文 (2015)

安田 隆之介 メダカの 2 種の TRPV1 の同定及び機能解析 長浜バイオ大学大学院 修士論文 (2016)

謝辞

本研究は、長浜バイオ大学大学院 動物分子生物学研究室及び、自然科学研究機構 生理学研究所 神経機能素子研究部門にて行いました。本研究を行うにあたり、魅力的なテーマと充実した研究環境を与えてくださり、6年間ご指導、ご助言頂きました齊藤 修教授に厚く御礼申し上げます。

副査をお願い致しました伊藤 正恵 教授、山本 博章 教授には貴重なご意見を頂き、誠にありがとうございました。

そして、電気生理学的解析についてご指導、ご助言頂きました生理学研究所 神経機能素子研究部門の久保 義弘 教授並びに久保研究室の皆様には、心から感謝致します。また、mTRPA1 と pGEMHE のプラスミドを提供していただき、誠にありがとうございました。

プラスミドとして、zTRPA1a と TRPA1b を提供していただいた Dr. David Prober (Harvard University)、pfTRPA1 を提供していただいた Dr. Ardem Patapoutian (The Scripps Research Institute)、rsTRPA1 を提供していただいた Dr. David Julius(UCSF)、xtTRPA1 を提供していただいた富永 真琴 博士(岡崎バイオサイエンスセンター)にはこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。また、アホロートルの飼育や繁殖方法についてご助言いただきました佐藤 伸 博士(岡山大学)ならびに、ニシツメガエルの幼生の飼育についてご指導、ご協力いただきました荻野 肇 教授にはこの場を借りて感謝申し上げます。

研究室配属後から実験のご指導、ご助言して頂きました水戸(黒木) 麻湖 博士には感謝申し上げます。さらに、アホロートルの組織の採取でご協力頂きました水戸 直 助手には、この場をお借りして感謝申し上げます。また、研究を進めていく上で、迷惑をかけ、お世話になった動物分子生物学研究室の皆様には深く御礼申し上げます。

そして、大学、大学院の9年間暖かく見守り、支えてくれた両親に心から感謝します。

最後に、貴重な生命を提供してくれた実験動物に深く感謝するとともに、哀悼の意を示します。