

学位授与記録簿（博士）

バイオサイエンス研究科

氏 名	織田 麻衣
学 位 の 種 類	博士（バイオサイエンス）
授 与 年 月 日	2017 年（平成 29 年）3 月 18 日
学位授与の要件	本学学位規程第 18 条第 1 項該当者（学位規則第 4 条第 1 項）
学位論文の題名	動物の陸生化と TRPA1 の機能変化に関する研究
審査委員 主査	教授 齊藤 修
副査	教授 山本 博章
副査	教授 伊藤 正恵

論 文 内 容 要 旨

動物は、皮膚などの感覚神経や感覚受容器で、機械刺激、温度、化学物質といった複数の侵害刺激を受容している。一方、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、それら各種の動物は、それぞれの環境適応や生存戦略のために、感知、応答する外界刺激の種類、性質、閾値、感度などが異なっている。特に、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はその差は著しい。では、どのような仕組みで感覚の種差が生じるのか、その機構はほとんど明らかにされていない。この問題を解く鍵の候補として、感覚受容センサーの TRPA1 が挙げられる。TRPA1 は、N 末端に 16 個のアンキリンリピートを持ち、主に感覚神経に発現する陽イオンチャネルである。げっ歯類の TRPA1 は、pH、低温(17℃以下)、細胞内 Ca^{2+} 上昇、機械刺激、多くの化学物質によって活性化する侵害刺激センサーである。一方、他の陸上動物(両生類、爬虫類、鳥類)の TRPA1 は閾値を持つ高温センサーであることが報告されている。近年、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性があることが報告されており、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 の応答性は変化を獲得している」と仮説が立てられる。しかし、動物が進化と環境適応に伴い、TRPA1 はどのように応答性の変化を獲得してきたのか、統一的説明には至っていない。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マウス TRPA1 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した。そして、次に水生動物と陸生動物の両方の性質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、各動物の生存環境と TRPA1 の性質を比較することにより、動物が陸生化に伴ってどのような TRPA1 の機能変化を獲得していったのかを考察した。さらに、脊椎動物 TRPA1 の高温応答の特性の違いを決定している分子基盤を明らかにするために、メダカ TRPA1 とガラガラヘビ TRPA1 の間のキメラチャネルの解析によって、高温応答の特性を決定する責任部位の探索を行った。

第1章 魚類 TRPA1 の機能解析

まず、魚類の TRPA1 (ゼブラフィッシュ TRPA1a と TRPA1b, メダカ TRPA1, フグ TRPA1) がどのような性質を持つセンサーなのか明らかにするために、化学物質と温度に対する応答性の解析を行った。その結果、ゼブラフィッシュ TRPA1a は、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みられた。また、温度については、ゼブラフィッシュ TRPA1b が低温と高温両方に応答することが明らかになった。また、メダカ TRPA1 は高温にのみ応答し、フグ TRPA1 は低温と高温両方に応答した。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、活性化温度閾値が明確に決められているのに対して、いずれの魚類 TRPA1 も「閾値がなく徐々に高温で活性化する」という共通の特性を持っていた。以上の結果から、ゼブラフィッシュ TRPA1a は化学物質応答、ゼブラフィッシュ TRPA1b は温度応答に特化し、フグとメダカの TRPA1 は、ゼブラフィッシュの TRPA1a と TRPA1b 両方の性質を示すことが明らかになった。3種の魚類の系統関係については、四肢動物が系統的に分岐した後、真骨魚類は独自の進化をとげ、全ゲノム重複の後、ゼブラフィッシュ、メダカ、フグの順に系統分岐してきたと考えられている。よって、ゼブラフィッシュのみ2種類の TRPA1 を持つことから、もともと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全ゲノム重複に近いゼブラフィッシュでは、a と b で機能を分担しており、その後分岐したフグとメダカでは、おそらく b の祖先遺伝子に由来して、TRPA1 は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た。

第2章 アホロートル TRPA1 のクローニングと機能解析

次に、有尾両生類で一生を水中で生活するアホロートル TRPA1 の cDNA をクローニン

グし、その性質を明らかにすることにした。完全長 cDNA 配列の報告はなく、予想配列はデータベース上に存在していなかった。そこで、まず TRPA1 の EST 配列の発現をアホロートル後根神経で検出し、その配列を基に完全長 cDNA の配列決定を行った。その結果、アホロートル TRPA1 は典型的な TRPA1 の構造を持っていることが明らかになった。次に、アホロートルとニシツメガエル TRPA1 の化学物質応答性について比較解析した結果、多くの化学物質への応答性は両者類似していた。しかし、ニシツメガエル TRPA1 はどの濃度の MA でも応答しないのに対して、アホロートル TRPA1 は MA に応答することが明らかになった。そして、個体を用いた行動解析でも同様の結果が得られた。次に、アホロートル TRPA1 の温度応答性を解析した。結果、低温と 40℃までの高温刺激両方で、有意な応答がみられなかった。しかし、さらに高い温度で刺激を行うと、明らかな活性電流が確認され、アホロートル TRPA1 は、高温閾値を持つ陸上動物型の高温センサーであると考えられた。

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探索

2 種の TRPA1 の高温感受性の特性の決定に、TRPA1 のどの部位が関わっているのか、アプローチすることにした。閾値を持つ高温感受性の代表としてガラガラヘビ、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メダカを使用し、それらの間でキメラを作製し、高温感受性がどう変化するか解析を行った。まず、それぞれの N 末端全体を交換した 2 種のキメラを作製し、高温応答を検討した。その結果、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、それぞれのアンキリンリピートを含む N 末端領域が決定していることが強く示唆された。そこで、さらに細かいアンキリンリピートのキメラチャンネルを作成し解析した結果、メダカ型とヘビ型の高温特性に寄与する部位をある程度特定することに成功した。

以上の結果をまとめると、本研究では以下の 5 点が明らかになった。

- (1) 魚類 TRPA1 は共通に閾値がなく、25℃付近から徐々に高温で活性化される特性を持つ。
- (2) ゼブラフィッシュ TRPA1b とフグ TRPA1 は低温と高温両方に応答する。
- (3) 水中生活をするアホロートル TRPA1 は高温閾値を持つ陸上動物型で、魚類と高温特性が異なる。
- (4) 各動物の TRPA1 の高温活性化特性の決定は、N 末端のアンキリンリピートが重要である。
- (5) 各動物の TRPA1 の化学物質応答性は動物ごとに異なる。

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温度センサーを獲得したと考えられた。陸上という生息環境へ適応するために、生育環境の温度環境が大きく変化しやすいことが最も影響したと考えられる。また、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から、原始的な動物からその感受性が保存されていると考えられた。一方、 H_2O_2 や MA は動物種ごとに応答性が大きく異なるため、動物の陸生化との関係性は低く、動物の生理的な機能や生存戦略によって、その動物で固有に応答性が変化したと考えられた。よって、侵害刺激センサー TRPA1 の脊椎動物の陸上進出に伴って最も変化を獲得したのは、高温感受性の仕組みであると結論付けられた。

論文審査結果要旨

本研究は、感覚神経に発現する侵害刺激センサーの TRPA1 チャンネルに注目し、その化学物質と温度への応答能が、動物の進化過程で環境変化と相関してどう変化したかを解明しようとしたものである。

著者は、まず3種の魚類の TRPA1 の刺激応答性を解析・比較し、その共通の陸上動物とは異なる高温応答特性を発見した。その後、有尾両生類アホロートルの TRPA1 遺伝子を新規に単離してその機能を調べ、有尾両生類から陸上動物型の高温センサー能を獲得していることを突き止めた。更に、陸上動物 TRPA1 と魚類 TRPA1 の間でキメラを作り解析することにより、N 端側のアンキリンリピート部に温度応答特性を決定する部位があることを突き止め、動物は進化的に陸上環境への適応に際して、この部位の機能変化を獲得していったという説を主張するに至った。

本研究は、量的・質的に十分な実験結果に裏打ちされたものであり、得られたそれぞれの研究成果は当該研究領域で初めてであり、学問的価値も高い。また、動物の進化・環境適応と TRPA1 の機能に関する著者の主張は、極めて興味深く、オリジナリティーも高い。また、本研究の成果は「温度センサーである TRP チャンネルがどのような仕組みで、温度で活性化されるのか」という現代生物学の大きな課題に強いインパクトを与えるものと期待される。

以上の結果より、本論文は博士論文に相応しいものと判断した。