

脊椎動物 TRPA1 の高温感受性の分子機構に関する研究

長浜バイオ大学バイオサイエンス学部 特別任用助手 (助成時)

群馬大学大学院医学系研究科 博士研究員 (現在)

織田 麻衣

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。自然界には、生息環境や食性が異なる動物が存在し、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。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その差は著しいと考えられるが、どのような仕組みでこの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、Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)が挙げられる。TRPA1は、6回膜貫通領域を持つ陽イオンチャネルで、N末端に16個のアンキリンリピート(AR)を持ち、主に感覚神経に発現している。齧歯類では、低温(<17°C)、種々の化学物質などにより活性化する侵害刺激センサーとして働いている。近年、様々な動物のTRPA1の機能解析が行われ、陸上動物の鳥類、爬虫類、両生類のTRPA1は、明確な閾値を持つ高温センサーであることが報告された。一方、申請者は、魚類(ゼブラフィッシュ、メダカ、フグ)と有尾両生類(アホロートル)のTRPA1の機能を解析した。結果、魚類は閾値が不明瞭で、徐々に活性化する高温センサーであるのに対して、アホロートルTRPA1は閾値を持つ高温センサーであることが明らかになった(表1)。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。この高温応答の特性の違いは、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動物の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。

表1. 各動物のTRPA1の温度感受性

	Species	Thermosensitivity	
		Cold	Hot
Mammal	Human	x	x
	Mouse	<17°C	x
Bird	Chicken	x	>39°C
Reptile	Green anole	x	>33°C
	Rattlesnake	x	>27°C
Amphibian	X. tropicalis	x	>39°C
	Axolotl	x	>40°C
Fish	Pufferfish	<8°C	閾値なし
	Medaka	x	閾値なし
	Zebrafish-a	x	x
	Zebrafish-b	<10°C	閾値なし

Land ↑
↓ Water

そこで、本研究は、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の構造のどの部位の違いによるのか、キメラチャネルを用いた解析から明らかにした。さらに、どのアミノ酸が高温応答の特性の決定に重要なのか、点変異体を用いた解析を行った。

1. キメラチャネルの作製及び高温応答の解析

高温感受性の特性を決定する責任部位は、TRPA1の分子構造の約60%で構成されている

N 末端の 16 個のアンキリンリピート(AR)が寄与していると予想し、AR を中心に両動物の遺伝子を入れ替え、キメラチャネルを作製した。まず初めに、陸上動物のガラガラヘビ TRPA1 と魚類のメダカ TRPA1 の間で、N 末端のすべての 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。結果、N 末端に依存して高温応答の特性が交換された。

そこで、さらに 8 種の AR のキメラチャネルを作製し解析した。結果、メダカ TRPA1 の高温特性には AR1-10 または AR11-16、ガラガラヘビ TRPA1 の高温特性には AR7-16 または AR1-6+AR11-16 の存在が重要であることが示唆された。また、高温感受性のないマウス TRPA1 とメダカ TRPA1 の間で種々の AR を交換したキメラを作製した。結果、高温応答性のないマウス TRPA1 にメダカ TRPA1 の AR11-16 を導入すると、メダカ型の高温特性を獲得することが示された。以上のことから、メダカ TRPA1 の AR11-16 をガラガラヘビ TRPA1 やマウス TRPA1 に入れると、メダカ型の閾値のない高温センサーにできることから、メダカ TRPA1 の AR11-16 がメダカ型の高温応答の特性の決定に寄与していることが強く示唆された。

2.点変異体の作製及び高温応答の解析

次に、メダカ TRPA1 の AR11-16 のどのアミノ酸がメダカ型の特性の決定に寄与しているのかを明らかにするために、点変異体を用いた解析を行った。高温応答性のないマウス、陸上動物型の高温センサーであるガラガラヘビ、ニワトリ、グリーンアノールトカゲ、ニシツメガエル、そして魚類型の高温センサーであるゼブラフィッシュ、メダカ、フグの TRPA1 のアミノ酸配列をアライメントし、AR11-16 の間で魚類 TRPA1 特異的なアミノ酸を探した結果、14 個の候補アミノ酸が見つかった。そこで、高温に応答しないマウスのアミノ酸をメダカのアミノ酸に変異した点変異体を作製し、高温刺激に対する応答を解析した。マウスの 250 番目の S を N に変異した点変異体が高温応答するようになったという報告があり、S250N をポジティブコントロールとして解析を行った(Jabba et al., *Neuron*, 2014)。結果、Q424L、P427H、V428D、W606C の 4 つの変異体が有意に高温に応答し、アレニウスプロットからメダカ型の高温応答性を示す傾向が得られた。

本研究の結果をまとめると、以下のことが分かった。

- (1) 陸上動物型と魚類型の高温応答の特性を決定する分子基盤は、N 末端のアンキリンリピートの全交換で互いに相手の特性に変化できる。
- (2) N 末端のアンキリンリピートの複数の領域が TRPA1 の高温応答の特性の決定に寄与している。そのうち、メダカ TRPA1 の AR11-16 をマウス TRPA1 やガラガラヘビ TRPA1 に入れると、メダカ型の高温センサーに変化できる。
- (3) 点変異体を用いた解析から、4 つの点変異体(Q424L, P427H, V428D, W606C)はメダカ型の高温応答性を示す。

このことから、AR11-16 にある魚類 TRPA1 特異的な 4 つのアミノ酸が魚類型の高温応答の特性の決定に重要であることが示唆された。