温度生物学ハンドブック

Vol.2

温℃生物学
THERMAL BIOLOGY

温度生物学ハンドブック vol.2 目次

細胞・分子レベルでの温度生物学

1-24 温度感受性 TRP チャネルと環境適応のつながり
Involvement of thermoTRP channels in evolutionary adaptation

1-25 界面張力
Surface tension

1-26 温度依存的な核内輸送の調節
Temperature-dependent regulation of nuclear transport

1-27 ナトリウム-グルコース共輸送体
Sodium glucose co-transporter (SGLT)

1-28 蛋白質の立体構造と温度依存性
Protein structure and thermal stability

1-29 ヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A と熱産生
Histone demethylase JMJD1A and thermogenesis

1-30 Notch シグナルの温度依存性
Temperature dependency of Notch signaling

1-31 温度センサー分子シャペロン sHsp
Temperature Sensor molecular chaperone, sHsp

1-32 小胞体–ミトコンドリア接触場
ER-mitochondria contact site

1-33 ナルディライジン
Nardilysin

1-34 シロイヌナズナ高温耐性付与遺伝子 HsfA1
Heat shock factor A1

1-35 ミトコンドリアによる熱産生
Mitochondrial thermogenesis

1-36 低温応答性シグナル分子 SIRPα
A cold-responsive signaling molecule, SIRPα (Signal regulatory protein α)

1-37 β-酸化
β-oxidation

1-38 骨格筋細胞の分化
Differentiation of skeletal muscle cells

組織・個体レベルでの温度生物学

2-23 Ca^{2+}依存性エンドヌクレアーゼによる低温耐性
Cold tolerance via Ca^{2+}-dependent endoribonuclease in *C. elegans*

2-24 恒温動物と変温動物
Homeotherms and Poikilotherms

2-25　心理ストレス性交感神経反応
Stress-induced sympathetic responses

2-26　変温動物の日内体温制御
Diurnal body temperature control in cold-blooded animals

2-27　悪性高熱
Malignant hyperthermia

2-28　温度感受に関わる感覚神経
Thermosensitive sensory neurons

2-29　哺乳類の低温障害
Hypothermic damage in mammals

2-30　三叉神経を介した生存戦略
Trigeminal nerve-mediated survival strategy

2-31　がんの温度応答性
Thermal sensitivity of cancers

2-32　ヒト褐色脂肪組織の遺伝学
Genetics of brown adipose tissues in humans

2-33　mRNP 顆粒と植物の温度適応
mRNP granules and plant temperature stress adaptation

2-34　線虫 *C. elegans* の温度走性機構
Neural mechanisms underlying thermotaxis in *C. elegans*

温度生物学に関わる研究手法

3-11　パッチクランプ法における温度電流観察
Methods for measuring temperature-dependent currents in patch-clamp

3-12　アレニウスプロットによる TRP チャネルの活性化温度閾値の推定
Estimation of thermal activation thresholds of TRP channels by an Arrhenius plot

3-13　人工再構成系を用いたイオンチャネル解析法
Functional analysis of ion channels in a reconstitution system

3-14　蛍光ナノダイヤモンド
Fluorescent nanodiamond

3-15　ファイバーフォトメトリー法
Fiber photometry

3-16　実験動物の体温計測法
Measurement of body temperature in experimental animals

3-17　2 光子顕微鏡を用いた生体イメージング
In vivo imaging using two-photon microscopy

3-18　X 線 1 分子動態計測
Diffracted X-ray Tracking Method

3-19　細胞内蛍光性タンパク質温度センサー tsGFP
Intracellular fluorescent protein-based thermometer, tsGFP

3-20　外部刺激応答性材料
External stimuli-responsive materials

3-21　細胞膜透過型蛍光性ポリマー温度センサー
Cell Membrane Permeable Fluorescent Polymeric Thermometer

分子・細胞レベルでの温度生物学

温度感受性 TRP チャネルと環境適応のつながり
(Involvement of thermoTRP channels in evolutionary adaptation)

齋藤　茂
（生理学研究所　細胞生理研究部門）

動物が異なる温度条件の環境に適応する進化の過程において、細胞や組織の至適温度が変化していくのに伴い、環境温度の感じ方も変化すると予想される。近年、温度感覚のセンサー分子としてはたらく温度感受性 TRP チャネルの進化的変化と環境適応を結びつける研究が進んでいる。例えば、近縁なツメガエル種を用いた比較解析では、高温センサーとして働く TRPA1 や TRPV1 の温度感受性が、暖かい環境に生息する種のほうが涼しい環境に生息する種より低く、さらに温度刺激に対する活性も低いことが報告されている（図1）。また、ほ乳類においても、高温耐性を持つジリスの一種やラクダでは TRPV1 の熱刺激に対する活性が著しく低下していることが知られている。このように系統的に異なる動物群において、生息地の温度環境に連動した温度感受性 TRP チャネルの種間差が見出されていることから、温度センサー分子も温度適応において重要な役割を担ってきたと考えられる。

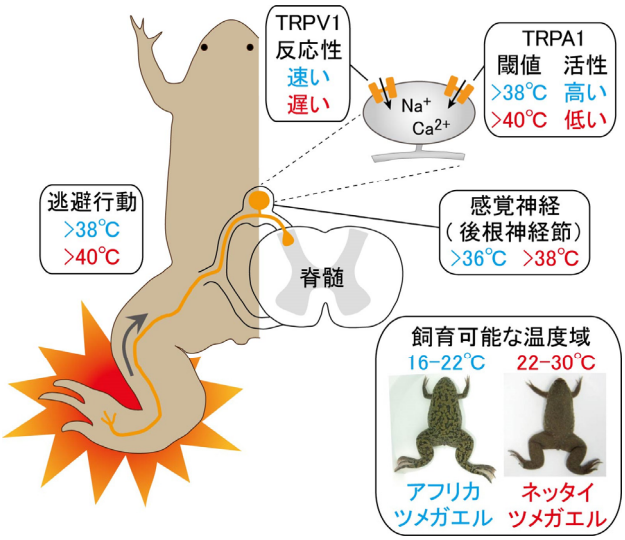


図 1. 異なる温度環境に適応したツメガエル種の温度応答特性の違い。行動、感覚神経、高温センサーにおいて一貫した種間差が生じている。

温度センサーTRP チャネルの生息環境に応じた機能進化とその構造基盤　齋藤茂・富永真琴　生物物理　59:005-008 (2019)

界面張力
(Surface tension)

下川　直史、高木　昌宏
（北陸先端科学技術大学院大学　先端科学技術研究科　マテリアルサイエンス系）

【界面張力・表面張力とは？】 三次元空間内において異なる二相が接触するとき、その接触領域は“面”となる。この面は、界面（二相のうち片方が気相の場合には表面と表現することもある）と呼ばれる。界面を小さくしようとする向きに働く力を、界面張力や表面張力と呼ぶ。界面張力・表面張力の物理的起源として、図1のような空気・水界面を考える。水相の中に存在する分子 A は周りの分子と引力的な相互作用をすることができる。一方、表面に存在する分子 B は先ほどの分子 A と比べると、半分の数の分子としか相互作用できない。1分子あたりのこの引力相互作用を U としたとき、表面の分子の引力相互作用は荒く見積もって $U/2$ となる。1分子の表面での占有面積をΣとすると、単位面積あたりの引力相互作用の損失量は$(U-U/2)/\Sigma=U/2\Sigma$となり、これが表面張力となる。単位は単位面積あたりのエネルギー（J/m^2）または単位長さあたりの力（N/m）として定義される。表面張力をγ、表面積を A とすると表面エネルギーFは $F=\gamma A$ となり、表面積 A が小さくなるほどエネルギーが小さくなる。

【脂質膜での界面張力】 脂質膜でも相分離が起き、界面が形成される（図2の A）。また、疎水基が露出した膜の縁も疎水基と水相の界面が形成される（図2の B）。脂質膜は二次元であるため、これら相境界は“線状”の一次元となる。そのため、この場合の界面張力は界面が線状であることから線張力(line tension)と呼ばれる。単位は先ほどより次元が一つ下がるので力(N)である。相分離界面の線張力はおよそ 3 pN 程度、疎水基が露出した場合は 10 pN 程度という報告がある。温度が上昇すると相分離構造は不安定化し、二相の脂質組成が似通ってくる。すると線張力は低下する傾向にある。特に臨界点近傍ではドメイン形状の大きな揺らぎが観察される。

【相分離界面の線張力測定方法】 相分離や相分離界面の安定性の指標として線張力は重要である。線張力の測定方法としては、ドメイン形状の揺らぎの直接観察から求める Flicker spectroscopy やマイクロピペットによる吸引による測定方法がある。

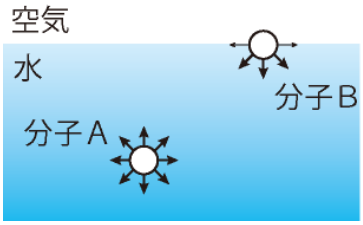


図1　表面張力の模式図

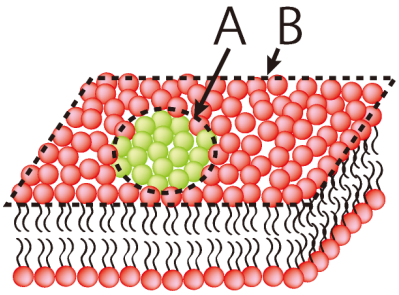


図2　脂質膜での界面

参考文献:
・表面張力の物理学　ドゥジェンヌ、ブロシャール、ケレ　吉岡書店　1-6 (2008)
・Stottrup BL et al. ***J. Phys. Chem. B*** 111: 11091-11094 (2007)
・Tian A et al. ***Phys. Rev. Lett.*** 98: 1-4 (2007)

温度依存的な核内輸送の調節

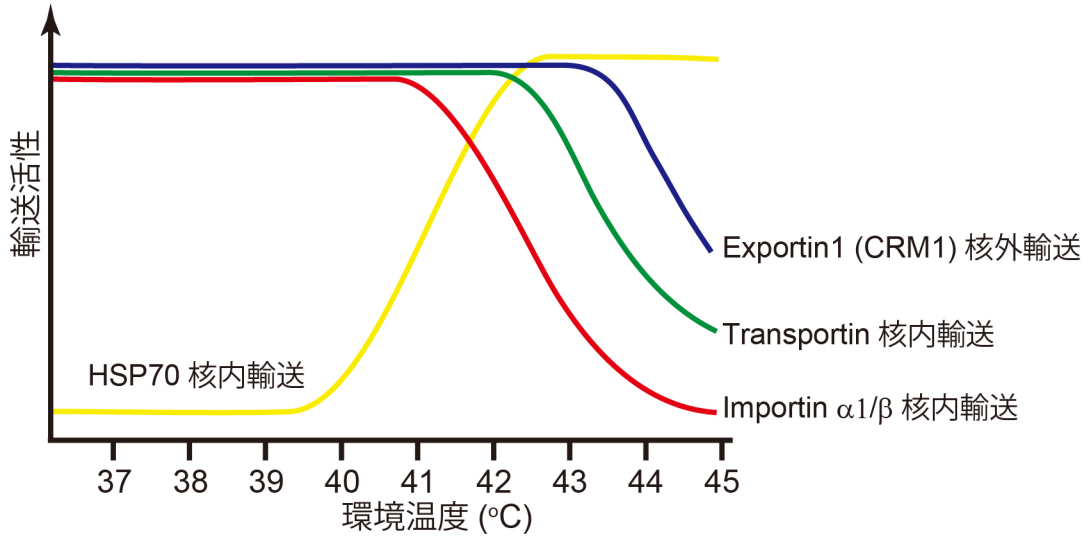
(Temperature-dependent regulation of nuclear transport)

小川　泰
(理化学研究所)

通常、核と細胞質との間での物質の行き来は、輸送因子である約 20 種類の importin βファミリーによって行われる。これらの輸送の方向性を制御しているのは、核内に豊富な GTP 結合型 Ran である。環境温度が上昇すると、これらの輸送経路は段階的に停止する。41～42℃程度で Importin α1/βによる核内輸送経路が停止し、43～45℃で Transportin 依存的な核内輸送と Exportin1(CRM1)依存的核外輸送が停止する。Importin α1/β 依存的輸送経路がより低い温度で停止するのは、アダプター分子 Importin α1 の熱感受性によるものである。一方、分子シャペロンの1つである HSP70 ファミリーは、約 40℃で特異的な輸送因子 Hikeshi によって Ran 非依存的に核内輸送が活性化される。このように、細胞は、熱ストレスの強度に依存して、核-細胞質間輸送活性を制御する。その結果、様々な輸送基質の細胞内局在を変化させて、ストレスに対応していると考えられるが、具体的な働きはまだ解明されていない。

参考文献:
Ogawa Y & Imamoto N. ***J. Cell Biol.*** 217: 2341-2352 (2018)
Kose S et al. ***Cell*** 149: 578-589 (2012)

図1　温度依存的な核-細胞質間輸送の効率の変化

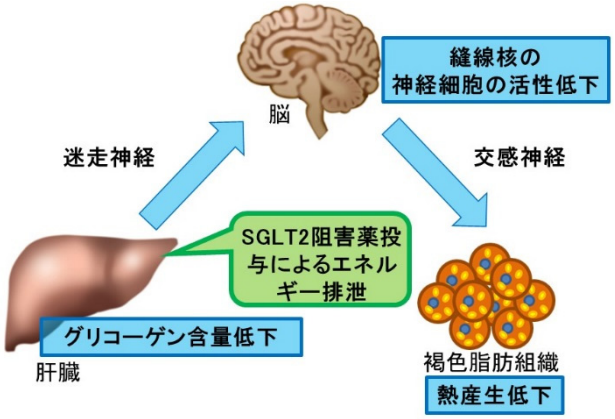


ナトリウムーグルコース共輸送体
(Sodium glucose co-transporter (SGLT))

山田 哲也
（東京医科歯科大学 分子内分泌代謝学分野）

ナトリウムーグルコース共輸送体（sodium glucose co-transporter, SGLT）は Na^+の細胞内外の濃度差を駆動力として糖輸送を行うナトリウム依存性グルコース輸送体であり [1]、SGLT1～6 のアイソフォームが存在することが知られている（表）。そのうちの SGLT2 は腎臓の近位尿細管（S1 セグメント）の管腔側に選択的に発現しており、Na：グルコースを 1：1 の割合で共輸送することで、尿糖再吸収のおよそ 90%を担っている。SGLT2 阻害薬は SGLT2 の活性を阻害することによって尿細管でのグルコース再吸収を抑制し、原尿中のグルコースをそのまま尿として体外に排泄する薬剤であり、糖尿病患者に投与すると血中の過剰なグルコースを尿中に排泄し高血糖を是正させる効果がある。

サブタイプ	輸送基質	発現の組織分布
SGLT1	グルコース、ガラクトース	小腸、気管、心臓、腎臓（S3）
SGLT2	グルコース	腎臓（S1/S2）
SGLT3	Na+、グルコース	小腸、肺、子宮、精巣、腎臓（近位尿細管）
SGLT4	マンノース、グルコース、フルクトース	小腸、肺、肝臓、膵臓、腎臓
SGLT5	グルコース、ガラクトース	腎臓（腎皮質）
SGLT6	ミオイノシトール、キシトール	脊髄、脳、小腸、腎臓（皮質及び髄質）



グルコースの尿中への排泄量を増加させる作用機序から予想されるように、この薬剤を糖尿病状態にあるヒトやげっ歯類に投与すると、血糖コントロールの改善に加え、多くの場合、体重減少が認められる。この体重減少は、尿糖排泄の程度から理論的に予想される程度に比し軽度にとどまることから、その理由を説明するメカニズムの一つとして過食が報告された。しかしながら、近年、SGLT2 阻害薬投薬後に制限給餌を行ってもなお、体重減少効果が限定的であることが報告され、SGLT2 阻害薬投与が過食を誘発するだけでなく、個体のエネルギー消費の抑制を引き起こしている可能性が示唆された。そこで、SGLT2 阻害薬の投与によって引き起こされる負のエネルギーバランスが、個体レベルのエネルギー消費に及ぼす影響を検討したところ、少なくとも褐色脂肪組織の熱産生低下により個体レベルのエネルギー消費が低下すること、さらにそのメカニズムに肝臓－迷走神経－脳－交感神経－褐色脂肪組織と連なる臓器間神経ネットワークが関与することが明らかとなった [2]（図）。

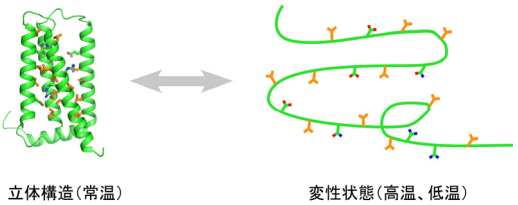
参考文献：

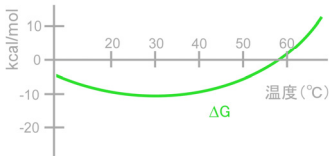
1) Ferrannini E & Solini A. ***Nat. Rev. Endocrinol***. 8: 495-502 (2012)
2) Chiba Y et al. ***PLoS One***. 11: e0150756 (2016)

蛋白質の立体構造と温度依存性
（Protein structure and thermal stability）

藤原　祐一郎
（香川大学　医学部）

蛋白質は私たちの体の主要な構成成分の一つで、細胞質などの親水性環境下あるいは細胞膜内の疎水性環境下において、個々に特有の形、立体構造を持っています。立体構造の変化が蛋白質の機能として出力され、個々の機能が統合されて生体機能として発揮されます。蛋白質の立体構造は、疎水性残基が水と反発して蛋白質内部に潜り込む力（疎水性相互作用）や、残基間の引き合う力（水素結合、イオン結合、etc.）によって熱力学的に最も安定した状態で維持されています。疎水性相互作用や、残基間の結合は温度等によって変わり、一般的に 60℃以上になると、結合が解け疎水性残基が露出し他の蛋白質との絡着が起こります（熱変性・凝集）。中には、可逆的な熱変性を起こすもの、低温変性を起こすもの、100℃以上の高熱耐性を呈するものもあり、出力される機能に温度依存性を持つ蛋白質もあります。





蛋白質の立体構造の安定性は、その変性状態との自由エネルギーの差（ΔG_d）で決まり、数～十数 kcal/mol 程度の小さな値であることが知られています。

$$\Delta G_d = \Delta H_d - T\Delta S_d$$

温度が変化すると、蛋白質変性のエンタルピー（ΔH_d）やエントロピー（ΔS_d）は大きく変化するが、互いに逆方向で打ち消し合い、実際的にはΔG_dには僅かしか影響を与えません。蛋白質変性前後における熱容量の変化（$\Delta C_{p,d}$）がΔH_d、ΔS_dの温度による変化量を決め、蛋白質の立体構造変化の温度依存性を決定すると考えられています。

$$\Delta H_d(T) = \Delta H_d(T_0) - \Delta C_p(T - T_0)$$

$$\Delta S_d(T) = \Delta S_d(T_0) - \Delta C_p \ln(T/T_0)$$　　T: 温度、T_0: 基準となる温度

蛋白質の熱（温、冷）による立体構造変化が機能出力を伴い、変性温度が生理的レンジに最適化され、温度依存性が適度に高い蛋白質が、温度センサー分子として働くと考えられます。

蛋白質の立体構造は X 線結晶構造解析、電子顕微鏡、NMR（核磁気共鳴）などによって解析され、温度依存性は、CD スペクトロメトリー（円二色性分散）、DSC カロリメトリー（示差走査熱量計）に加え、分析超遠心、Thermal-shift assay、NMR、MD simulation（分子動力学計算）などの手法を用いて解析されます。

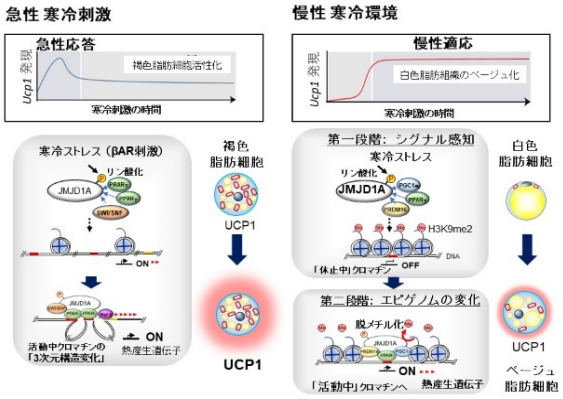
参考文献:

Clapham DE & Miller C. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*** 108: 19492-19497 (2011)
Bergethon PR. ***The Physical Basis of Biochemistry*** Springer (1998)
Schellman JA. ***Biopolymers*** 20: 1989-1999 (1981)

ヒストン脱メチル化酵素 JMJD1A と熱産生
（Histone demethylase JMJD1A and thermogenesis）

酒井 寿郎
（東京大学 先端科学技術研究センター 代謝医学分野）

JMJD1A（別名 JHDM2A または KDM3A）は、ヒストン H3 の 9 番目のリジン（H3K9）に修飾されたジメチルおよびモノメチル（me2/1）の脱メチル化酵素である。ヒストンのメチル化修飾は細胞分裂を経ても維持されるから「細胞記憶」ともいわれる。酵素活性のためには、補酵素として Fe(II)とαケトグルタル酸（αKG）を必要とする。これまでの多数の研究から、脱メチル化活性を介して、JMJD1A は幹細胞の再生、精子形成、性決定、癌、および体重制御などに広範な機能的役割を果たしていることが示されている。



JMJD1A ノックアウトマウスは加齢にともない肥満を呈し、インスリン抵抗性、耐糖能異常、高中性脂肪血症を伴うヒトでいう生活習慣病の症状を呈する。肥満の原因の一つとして、適応型熱産生の低下があげられる。

褐色脂肪細胞のβアドレナリン受容体（βAR）刺激時に JMJD1A の 265 番目のセリンはリン酸化され（図）、熱産生に関与する *Ucp1* や *Adrb1*（β1-AR の遺伝子名）、*Pgc1a*、*Ppara* など約 40 以上の遺伝子を標的とし、急速な遺伝子発現に寄与する。この急速反応に JMJD1A の脱メチル化活性は必要としない。JMJD1A リン酸化により誘導されるクロマチン再構成因子を含んだタンパク質複合体により、クロマチンの3次元構造を変化させたエンハンサー領域とプロモーターの近接により急速に転写誘導する。

JMJD1A はまた、燃えやすい体脂肪（ベージュ脂肪細胞）に変えるエピゲノムスイッチである。JMJD1A は寒冷刺激下のβAR 刺激により、寒冷の環境が慢性に持続すると、白色脂肪組織中の前駆脂肪細胞に局在するβアドレナリン受容体からの細胞内シグナル伝達によって、① ヒストンの脱メチル化酵素 JMJD1A がリン酸化修飾をうけ、これが引き金となり転写因子などのタンパク質と複合体を形成し、熱産生に必要な遺伝子座に局在し、② 白色(前駆)脂肪細胞では凝集して働いていない状態にある熱産生遺伝子のクロマチン構造（ヘテロクロマチン）をほどけたクロマチン構造（ユークロマチン）に活性化して遺伝子が発現できるようにする調節メカニズムである（図）。このようにして、JMJD1A は、① βアドレナリンシグナルを感知し、② エピゲノムを書き換える、二段階のしくみによって「休止中」の熱産生遺伝子を「活動中」に変える。こうしてノルエピネフリンの刺激(βアドレナリンシグナル)は、リン酸化をヒストンのメチル化変化という時間的に緩徐で安定した化学修飾変化へとバトンタッチし、熱産生遺伝子を安定的に発現するベージュ脂肪細胞へと分化させる。

参考文献：

・Abe Y et al. ***Nat. Commun.*** 6: 7052 (2015).
・Abe Y et al. ***Nat. Commun.*** 9: 1566 (2018).

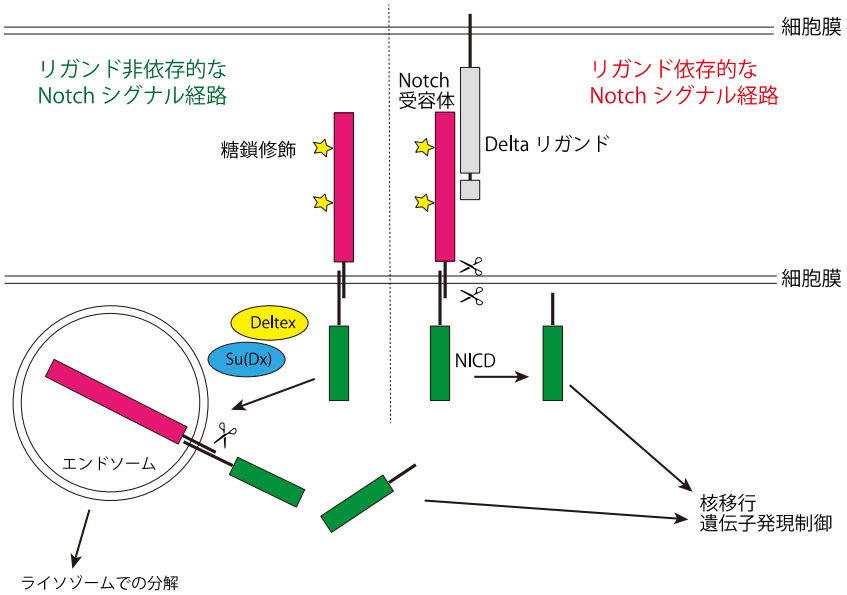
Notch シグナルの温度依存性
（Temperature dependency of Notch signaling）

野村　真
（京都府立医科大学大学院医学研究科）

Notch シグナルは多細胞生物において高度に保存されたシグナル伝達系の1つであり、細胞の増殖、分化、細胞の運命決定の制御に重要な役割を果たしている。Notch シグナルは細胞膜タンパク質である Delta などのリガンドが同じく細胞膜貫通型タンパク質である Notch 受容体に結合することにより細胞内に伝達される。Notch シグナルの伝達には様々な酵素やエフェクター分子が関与しており、これらの分子の発現や局在は Notch シグナルの活性に大きな影響を及ぼす。

Notch シグナルの温度依存性についてはショウジョウバエで研究が進んでいる。Notch 受容体の細胞外ドメインには糖鎖が付加される。この糖鎖修飾を制御する酵素の機能を欠失した変異体は 25℃では正常に発生するが、30℃では神経系の発生に異常が生じる。これは、高温環境下では糖鎖修飾の無い受容体が適切に folding されないことに起因すると考えられている。また、ショウジョウバエでは Notch シグナルの活性は温度にかかわらず一定のレベルに補償されている。この温度補償性には Notch 受容体のエンドサイトーシス経路が重要な役割を果たすことが知られている。Notch 受容体がエンドサイトーシスされると、受容体の切断を介してシグナルを正に伝達する経路、またライソゾーム中で受容体を分解することによりシグナルを負に制御する経路が存在する。これらの経路の活性化には Deltex、Suppressor of Deltex [Su(Dx)]と呼ばれるエフェクター分子が関与しており、これらの分子の機能によって Notch 受容体はリガンド非依存的に細胞内に取り込まれる。胚体外の温度変化に伴いこれらのエンドサイトーシス経路のバランスが調節され、総和としてのシグナル活性を保つ機構が存在することが明らかとなっている。

参考文献:
・Ishio A et al. ***J. Biol. Chem.*** 290: 505-519 (2014).
・Shimizu H et al. ***Cell*** 15: 1160-1174 (2014)



温度センサー分子シャペロン sHsp
（Temperature Sensor molecular chaperone, sHsp）

養王田　正文
（東京農工大学　工学研究院）

Small heat shock protein (sHsp)は分子量 12-43 kDa の比較的小さな熱ショックタンパク質であり、生物界に普遍的に存在する。他の分子シャペロンと比較して地味な存在であるが、細胞内のプロテオスタシスに置いて重要な役割を担っている。約 80 アミノ酸残基からなるα-クリスタリンドメインを有することが特徴である。α-クリスタリンドメインは水晶体のα-クリスタリンに由来し、β-サンドイッチ構造を形成しており、サブユニット間でβ-ストランド同士が相互作用することで安定なダイマーを形成する。sHsp の C 末端に存在する IXI/V モチーフがα-クリスタリンドメインと相互作用して、オリゴマー構造を形成する。これまでに報告されているオリゴマー構造は多様であり、小麦 sHsp は 12 量体、分裂酵母 sHsp は 16 量体、古細菌由来 sHsp は 24 量体を形成する。また、哺乳類の sHsp には複数のオリゴマー構造が存在すると言われている。オリゴマーの状態では、sHsp はシャペロンとしての機能を示さず、熱などのストレス条件下でダイマーに解離することで疎水性に富む領域を露出し、変性タンパク質の不可逆的凝集を抑制する。しかし、オリゴマーが完全に解離しなくともタンパク質の凝集を抑制するという報告もあり、凝集抑制機構に関する統一した見解は得られていない。哺乳類などの sHsp では、N 末端領域の Ser 残基がリン酸化されることで、常温でもシャペロンとしての機能を発現する。sHsp は好冷菌から超好熱菌までのほとんど全ての温度領域の生物に存在し、それぞれの至適生育温度よりも高い温度で構造が転移し、機能を発現する。しかし、その温度感知機構は解明されていない。

参考文献:

・Garrido C et al. ***Int. J. Biochem. Cell Biol.*** 44: 1588-1592 (2012)
・Hanazono Y et al. ***Structure*** 21: 220-228 (2013)

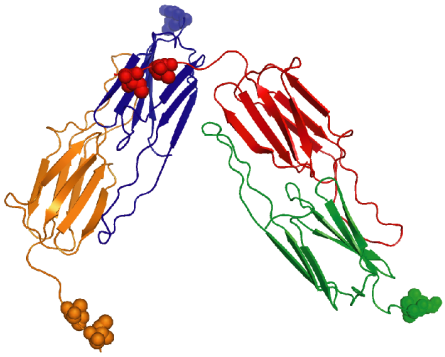


図　sHsp のダイマー構造と IXI/V モチーフを介したダイマー間の相互作用

小胞体–ミトコンドリア接触場
（ER-mitochondria contact site）

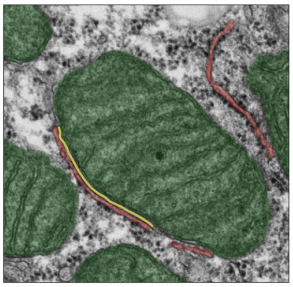
加藤 裕紀、西頭 英起
（宮崎大学　医学部）

真核細胞において、小胞体は分泌・膜タンパク質の合成と品質管理を担い、ミトコンドリアは細胞が消費する大部分のエネルギーを産生している。近年になり、小胞体とミトコンドリアは、両膜間をリボソームが介在しない 30nm 以下に近接させた接触場（図中、黄色線）を介して、相互に影響し合いながら機能することが明らかにされている。ミトコンドリアが接触する小胞体膜は、Mitochondria-associated ER membrane（MAM）と呼ばれ、シグナル分子をはじめさまざまなタンパク質群が局在し機能している。生化学的精製により MAM 画分を単離することが可能で、多くの実験結果から、脂質生合成とその輸送、小胞体からミトコンドリアへの効率的なカルシウム輸送などの生理的機能が示されている。異なるオルガネラ同士を繋留するタンパク質はテザリング因子と呼ばれ、現在までに小胞体–ミトコンドリア間テザリング因子として MFN2、GRP75、Bap31、VDAC など多くの分子が同定されているが、その繋留機構には未解明な点も多い。今後は、個々のオルガネラだけでなく、接触場から広がるシグナルネットワーク、その形成メカニズムや生理的意義を明らかにする必要があり、そこから得られる知見は、さまざまな生命現象や疾患の病態分子メカニズムを解き明かす鍵となる。

参考文献:

・Kato H et al. ***Life Sci. Alliance*** 3: e201900576 (2020)
・Kato H & Nishitoh H. ***Front. Oncol.*** 5: 93 (2015)

図、小胞体とミトコンドリアの接触
（緑:ミトコンドリア、赤:小胞体、黄:接触場）



ナルディライジン
（Nardilysin）

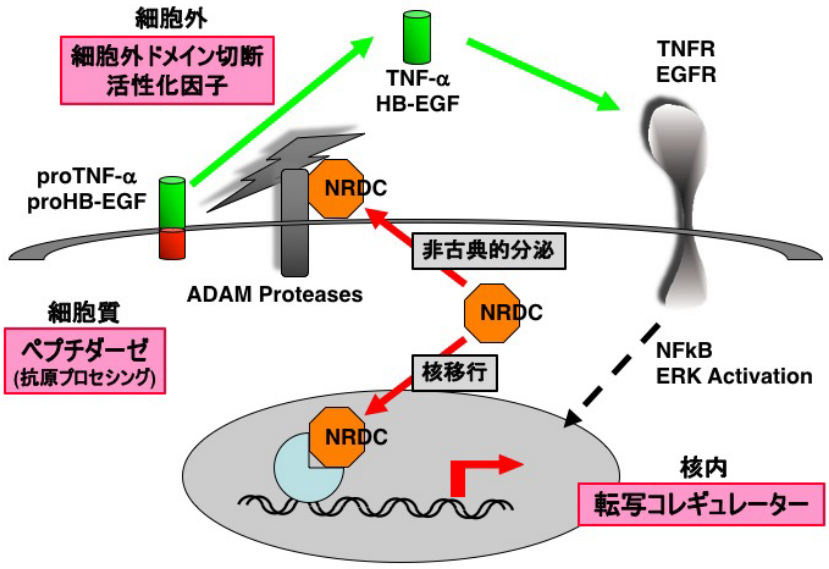
西　英一郎
（滋賀医科大学　薬理学講座）

ナルディライジン（Nardilysin, N-arginine dibasic convertase, NRDC）は M16 ファミリーに属するメタロエンドペプチダーゼで、一次構造上明らかなシグナルペプチドおよび核移行シグナルを有さないが、未知の経路で細胞外に分泌され、核細胞質間をシャトリングする。NRDC は増殖因子 HB-EGF の細胞表面結合タンパク質として同定され、細胞外では HB-EGF や TNF-αなど膜タンパク質の細胞外ドメイン切断（シェディング）を増強すること、核内では転写コレギュレーターとして種々のパートナー分子と協調してはたらくこと、細胞質では抗原プロセシングに関与していることが示されている(図)。また遺伝子改変マウスの解析より、NRDC が血糖値、血圧、脈拍などの恒常性維持や、がん・炎症性疾患の発症進展において重要な役割を果たすことが明らかになっている。

NRDC の体温調節における意義は、全身欠損マウスが低体温（常温で約 1.5℃）、寒冷不耐性を呈したことで明らかとなった。NRDC は、中枢における体温セットポイント設定、皮膚血管による熱放散、褐色脂肪組織における適応熱産生のいずれにも関与していることが示唆された（Nat Commun 2014）が、詳細な分子機構は未解明である。

参考文献:
・Hiraoka Y et al., ***Nat. Commun.*** 5: 3224 (2014)
・ナルディライジンによる体温恒常性維持機構　西英一郎　***医学のあゆみ***　253: 1109-1110 (2015)

図　細胞局在に応じたナルディライジンの多機能性

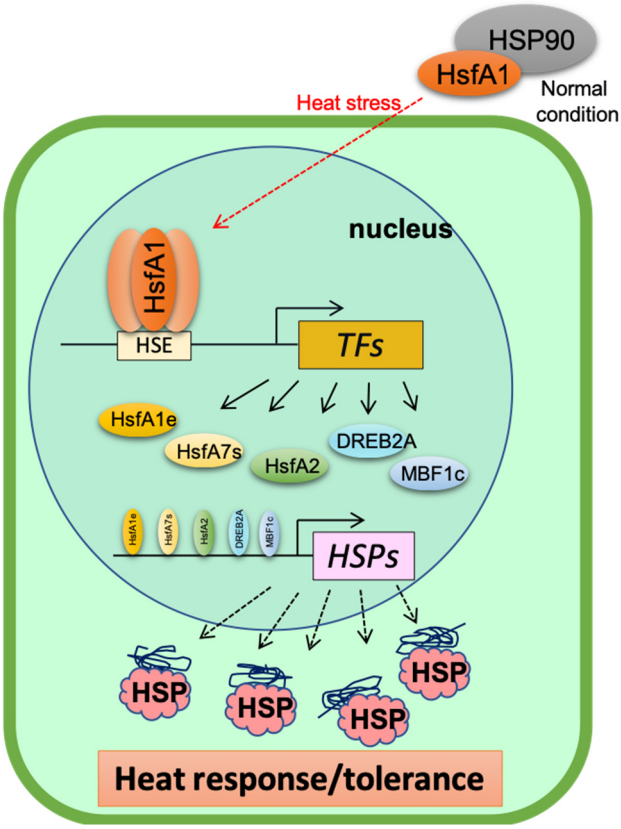


シロイヌナズナ高温耐性付与遺伝子 HsfA1
(Heat shock factor A1)

太治 輝昭
（東京農業大学　生命科学部）

高温に対する応答システムは真核生物で広く保存されている。転写制御機構においては、ショウジョウバエにおける Heat Shock Protein (HSP)のプロモーター解析より明らかとなったシス因子、Heat Shock Element (HSE)は植物でも共通であり、同様に転写因子 Heat Shock Factor (Hsf)が結合して HSP 群の転写誘導を行う。一方、Hsf の多様性という点では、植物以外の生物が 1~4 種類(ショウジョウバエは 1、マウスは 4)のみであるのに対し、植物では 19~52 種類(シロイヌナズナは 21)と多種多様な Hsf を有し、機能分化が認められる。植物の Hsf はその一次配列より A, B, C の 3 つのクラスに分類される。このうち HsfA の A1 グループ(HsfA1)が高温ストレス応答遺伝子群の転写制御に大きく寄与していることが知られている。シロイヌナズナには 4 つの HsfA1 (HsfA1a, HsfA1b, HsfA1d, HsfA1e)が存在し、これらの多重変異体を用いた解析から、HsfA1a, HsfA1b, HsfA1d が高温応答に重要であり、ほとんど全ての高温ストレス誘導性遺伝子の発現がその制御下にあることが明らかとなった。逆に *HsfA1* 過剰発現株は、多くの高温誘導性遺伝子群を発現誘導することで高温耐性が著しく向上することが明らかとなっている。HsfA1 は通常生育条件下では HSP90 や HSP70 と相互作用することで、その多くが核外に局在するが、高温ストレス条件下ではその相互作用が乖離し、核内に局在することで高温応答に関わる転写因子群、さらには *HSP* 群の発現を誘導する。

参考文献:
・Higashi et al. ***Mol. Plant*** 6: 411-422 (2013)
・大濱直彦　***化学と生物*** 53: 696-702 (2015)



温度生物学ハンドブック
1－35

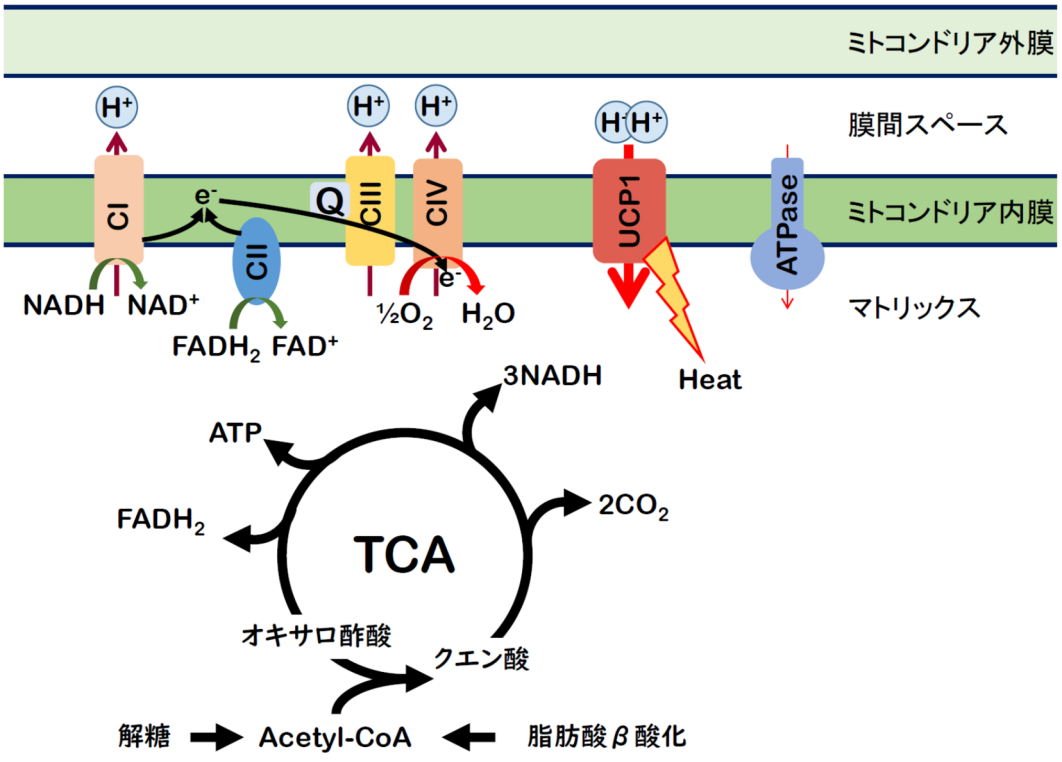
ミトコンドリアによる熱産生
（Mitochondrial Thermogenesis）

神吉 智丈
（新潟大学　大学院医歯学総合研究科）

ミトコンドリアは細胞活動に必要な ATP の大半を合成するオルガネラであるが、ATP 合成以外にも、脂肪酸β酸化、アポトーシスの制御、カルシウムの貯蔵など多くの機能を持ち、熱産生も重要な機能の一つである。解糖系および脂肪酸β酸化により得られたアセチル CoA は、クエン酸回路（TCA 回路）に組み込まれ酸化される。この過程で NAD^+や FAD を還元し、NADH や $FADH_2$を生じる。呼吸鎖複合体は NADH と $FADH_2$から電子を受け取り、酸素を還元する過程で得たエネルギーを用いて、プロトン（水素イオン）をミトコンドリアマトリックスから膜間スペースに輸送することでプロトン濃度勾配を形成する。多くの場合、このプロトン濃度勾配は ATP 合成酵素に利用され、ATP が合成される。しかしながら、褐色細胞やベージュ細胞では、ミトコンドリアに脱共役タンパク質UCP1が多く発現しており、プロトン濃度勾配を解消する過程で熱を放出する。こうした褐色細胞やベージュ細胞における熱産生は、寒冷環境下での体温維持に重要であり、βアドレナリン受容体の刺激によりcAMP-PKAシグナルを介して組織の熱産生呼吸やUCP1が活性化され、熱産生が増加する。

参考文献:

・Lettieri-Barbato D. *Mol. Metab.* 25: 11-19 (2019)
・ストライヤー生化学・第 8 版 （東京化学同人） 第 17 章、18 章



低温応答性シグナル分子 SIRPα

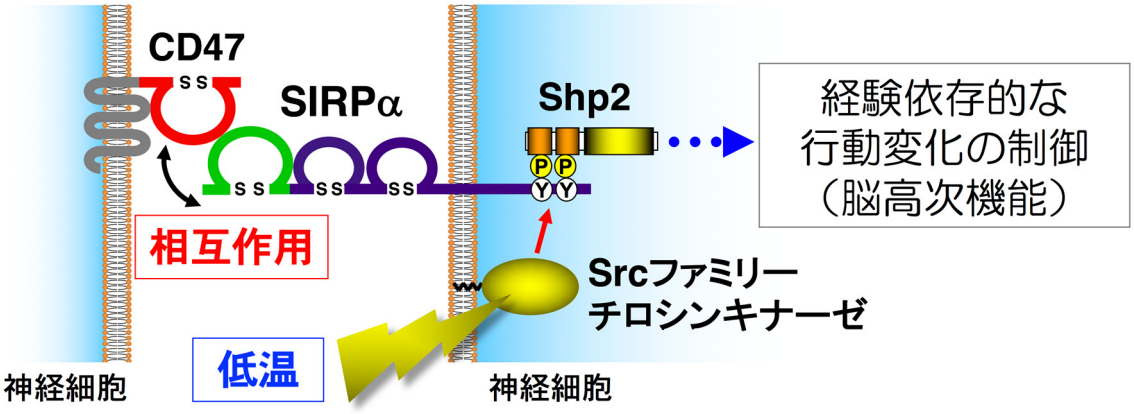
A cold-responsive signaling molecule, SIRPα (Signal regulatory protein α)

大西　浩史
（群馬大学大学院保健学研究科）

SIRPα（Signal regulatory protein α）（別名 BIT, SHPS-1, P84, CD172a）は 1996 年に同定された膜型分子で、細胞内領域にリン酸化を受けてチロシン脱リン酸化酵素 Shp1/Shp2 と相互作用するチロシンリン酸化モチーフ（ITIM: immunereceptor tyrosine-based inhibitory motif）を持つ。SIRPαの細胞外領域は別の膜型分子 CD47 と相互作用して細胞間接触シグナルを形成する。哺乳類において、SIRPαは免疫系のマクロファージや樹状細胞、神経系の神経細胞やミクログリアに高発現しており、免疫系ではマクロファージの貪食作用の抑制や、樹状細胞の恒常性を制御し、中枢神経系ではミクログリアの活性化を抑制することが報告されているが、神経細胞における機能役割は明らかでない。SIRPαは、体温が低下した冬眠動物や休眠中の動物の脳で強くリン酸化を受けることが明らかとなっている。また、実験的に低体温を誘導した動物の脳や培養神経細胞を低温暴露した場合も SIRPαのリン酸化が強く誘導されることから、神経細胞の SIRPαは低温応答性にリン酸化を受けて活性化するシグナル分子と考えられる。神経細胞への低温ストレスは Src ファミリーチロシンキナーゼを介して SIRPαリン酸化を誘導し、リン酸化した SIRPαは Shp2 を介して電位依存性 K^+チャネルβ2 サブユニットや NMDA 受容体のチロシンリン酸化状態を調節する可能性が示されている。SIRPα欠損マウスでは、低体温を伴う強制水泳中の経験依存的行動変化に異常が見られることから、SIRPαシグナルは脳機能制御との関連が予想されるが、制御を受ける神経機能やメカニズムの詳細はまだ明らかではない。

参考文献:

・Ohnishi H et al. ***J. Biol. Chem.*** 271: 25569-25574 (1996)
・Kharitonenkov A et al. ***Nature*** 386: 181-186 (1997)
・Ohnishi H et al. ***J. Neurosci.*** 30: 10472-10483 (2010)
・Maruyama et al. ***J. Neurochem.*** 121: 891-902 (2012)



低温応答性 SIRPαチロシンリン酸化シグナル

β酸化（β-oxidation）

長尾 耕治郎
（京都大学大学院 工学研究科）

β（ベータ）酸化とはミトコンドリアマトリクスにおいて、脂肪酸と補酵素 A（CoA)のチオエステル体であるアシル CoA からアセチル CoA を産生する代謝経路である。右図のように、脂肪酸のα炭素とβ炭素における酸化と水和、チオール開裂により、脂肪酸鎖のカルボキシ基側から 2 炭素ずつアセチル CoA として切り出される。炭素数 16 の飽和脂肪酸からなるパルミトイル CoA を基質として 7 回のβ酸化が繰り返されると、8 分子のアセチル CoA、7 分子の $FADH_2$、7 分子の NADH が産生される。これらのβ酸化の反応産物から、TCA サイクル及び酸化的リン酸化を経て ATP が産生される。

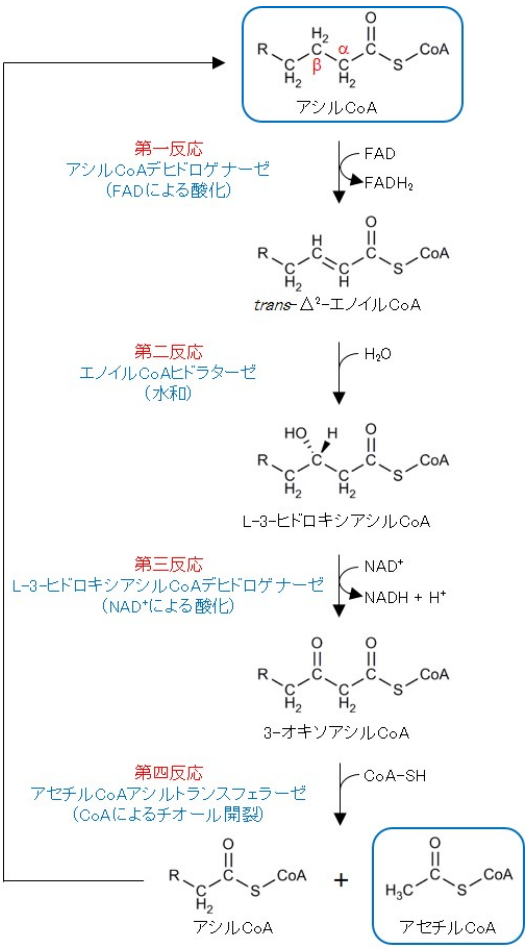


図. アシルCoAのβ酸化

β酸化の反応産物は ATP 産生だけでなく、ミトコンドリアでの熱産生にも利用される。例えば、褐色脂肪細胞におけるβ酸化は脱共役タンパク質 UCP1 による熱産生に使われるミトコンドリア内膜の電気化学的ポテンシャル（プロトン濃度勾配）の形成に重要であると考えられている。しかし、褐色脂肪細胞でのβ酸化に用いられる脂肪酸の由来については議論が分かれており、褐色脂肪組織内の脂肪滴由来の脂肪酸だけでなく、白色脂肪組織や食事由来の脂肪酸、さらには肝臓由来のアシルカルニチンが利用されるとの報告がある。褐色脂肪組織に蓄えられる脂質量には限りがあるため、低温暴露や熱産生の程度および栄養状態に合わせて、由来の異なる脂肪酸がβ酸化に利用されているのかもしれない。

参考文献:

・Lee J et al. ***Cell Rep.*** 10: 266-279 (2015)
・Simcox J et al. ***Cell Metab.*** 26: 509-522 (2017)
・Schreiber R et al. ***Cell Metab.*** 26: 753-763 (2017)
・Shin H et al. ***Cell Metab.*** 26: 764-777 (2017)

骨格筋細胞の分化

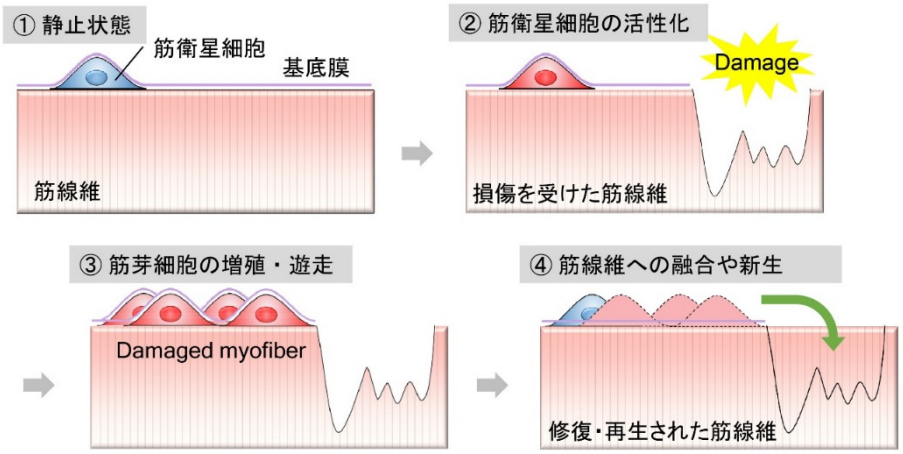
(Differentiation of skeletal muscle cells)

原　雄二
（京都大学大学院　工学研究科）

骨格筋は運動器としての機能だけでなく、熱産生に必要な器官である。筋線維は多くの核を有する長大な細胞であり、骨格筋を形成する基本単位として機能する。筋線維は再生能が高いことが知られており、絶え間ない筋収縮・弛緩に伴うダメージから筋恒常性を維持しているが、温度生物学の観点からも筋再生過程の理解は極めて重要である。筋線維の形質膜と細胞外マトリックスの間隙に存在する幹細胞（筋衛星細胞）は運命決定を受けた後、筋線維の形成に関わる筋前駆細胞（筋芽細胞）に分化する。続いて筋芽細胞は近接する筋芽細胞へ融合することで合胞体（筋管）を形成し、最終的に機能的な筋線維を新生する。あるいは筋芽細胞は損傷を受けた筋線維へ融合し、筋線維の修復をもたらす（図）。骨格筋の再生過程は、幹細胞の分化、細胞融合、極性形成等、様々な細胞現象が関わることから、長らく骨格筋研究の中心課題であり続けてきた。

筋形成過程の理解の上で、筋衛星細胞、筋芽細胞、筋線維などの状態を規定するマーカー分子群が同定されてきた。Pax7, Myf5, MyoD など一連の転写因子群が知られており、それぞれ未分化の筋衛星細胞、活性化された筋衛星細胞、筋芽細胞にて発現が増強され、各段階で機能する遺伝子群の発現誘導に関わる。興味深いことに、転写因子 Myf5 は筋芽細胞だけでなく褐色脂肪細胞でも発現すること、さらに転写制御因子 PRDM16 が発現する細胞群では Myf5 陽性の筋芽細胞は褐色脂肪へと分化することが示された。すなわち褐色脂肪は骨格筋と同じ細胞系譜をとることが明らかになった。

参考文献:
・Chal J & Pourquie O. ***Development*** 144: 2104-2122 (2017)
・Seale P et al. ***Nature*** 454: 961-968 (2008)



組織・個体レベルでの温度生物学

Ca^{2+}依存性エンドヌクレアーゼによる線虫の低温耐性

(Cold tolerance via Ca^{2+}-dependent endoribonuclease in *C. elegans*)

久原 篤、太田 茜
（甲南大学　理工学部）

シンプルな動物である線虫 *C. elegans* の低温耐性が、ヒトにおいて詳細な役割が未知である Ca^{2+}依存性のエンドリボヌクレアーゼ(EndoU)によって制御されることが分かってきたため、紹介する。

線虫の低温耐性とは、例えば、25℃で飼育された野生株が 2℃で死滅するのに対して、15℃飼育個体は 2℃でも生存できる現象である(1)。低温耐性に関わる遺伝子の探索が行われ、温度刺激依存的に発現変動する遺伝子として、ヒトにおいて詳細な役割が未知である EndoU と呼ばれる「Ca^{2+}依存性 RNA 分解酵素(ENDU-2)」の遺伝子が見つかってきた。*endu-2* 変異体の解析から、線虫の EndoU である ENDU-2 が、低温耐性や寿命、産卵数や神経シナプスの刈り込みなど、多様な生命現象に関与していることが分かってきた(2)。特に、低温耐性において、ENDU-2 が筋肉で働くことで、頭部の 1 対の嗅覚ニューロン(ADL)の活動を変化させ、体全体の低温耐性を変化させることが分かってきた(図 1)。さらに、ADL 嗅覚ニューロンが温度に応答すること、ADL 嗅覚ニューロンの中でも ENDU-2 が神経活動を調節することが見つかってきた(2)。ENDU-2 はニューロン内において、カスパーゼ(CED-3)などのプログラム細胞死(アポトーシス)を誘導する遺伝子の発現を調節し、ニューロンのシナプスの数を適切に調節していた。これらの現象が組み合わさり、低温耐性が調節されていた(図 1) (2)。

これまでにヒトと線虫で共通する生体調節メカニズムが多数発見されているため、線虫の ENDU-2 が関わる生体現象もヒトでも共通しているかも知れない。

参考文献:

1. Ohta A et al. ***Nat. Commun.*** 5: 4412 (2014)
2. Ujisawa T et al. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***. 115: 8823-8828 (2018)

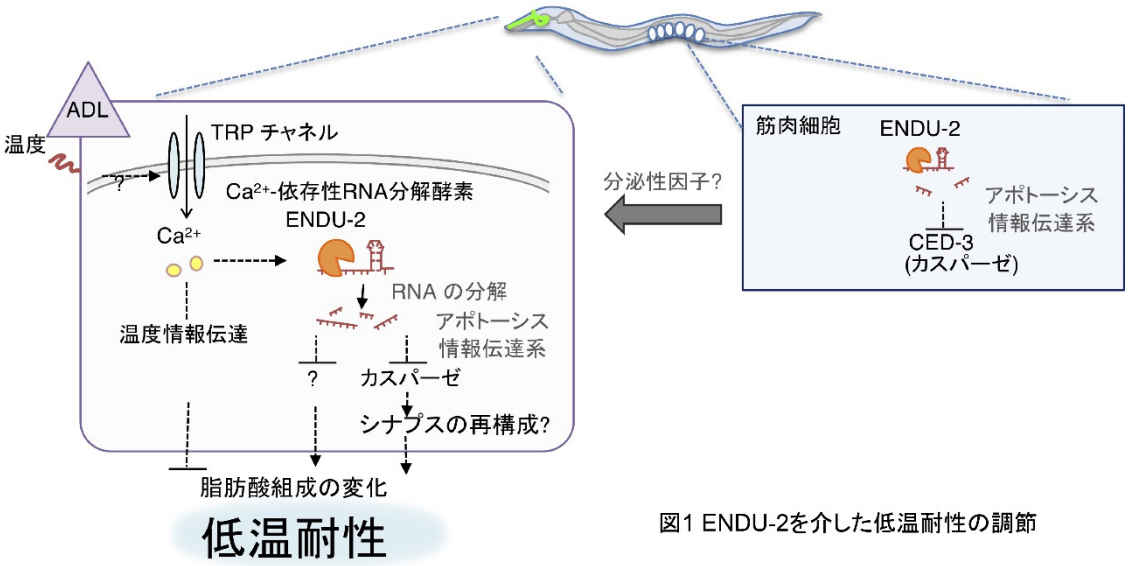


図1 ENDU-2を介した低温耐性の調節

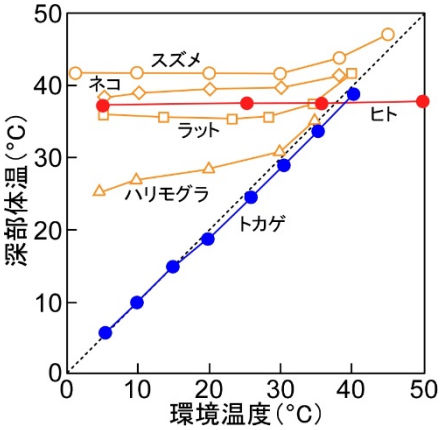
恒温動物と変温動物
（Homeotherms and Poikilotherms）

中村 和弘
（名古屋大学大学院医学系研究科）

体温調節の特徴をもとにした動物の分類では、環境温度にかかわらず深部体温をある一定の温度に保つ能力を持つ動物を恒温動物（homeotherms）と呼び、環境温度の影響を受けて深部体温が変動する動物を変温動物（poikilotherms）と呼ぶ。一般的に、哺乳類と鳥類は恒温動物で、それ以外の動物は変温動物とされることが多い。しかし、哺乳類や鳥類であっても、ハリモグラやカッコウのように深部体温が環境温度の影響を受け、ある程度変動するものも存在する（図参照）。したがって、恒温動物と変温動物を単純かつ明確に区分することは難しい。

変温動物の体温調節は、生命活動に適切な温度環境を探索し、移動する「行動性体温調節」を通じて行われる。一方、恒温動物は、変動する温度環境下で深部体温を一定に保つため、行動性体温調節だけでなく、自らの体内で積極的に（体温を維持するために）熱を産生し、余剰の熱を積極的に放散する「自律性体温調節」を行う。このように、変温動物は体温の熱源の多くを外部に依存することから外温性動物（ectotherms）と呼び、恒温動物は体内に熱源を持つことから内温性動物（endotherms）と呼ぶことも多い。

変温動物は、低温環境で行動が鈍化するなど、その生命活動が環境温度の強い影響を受けるため、一般的に生息域は限定される。一方、恒温動物である哺乳類や鳥類は、進化を通じて恒温性（内温性）を獲得することにより、地球上の多様な温度環境域にその生息域を拡大することに成功した。しかし、その代償として、恒温動物は体温維持のために多量の食物エネルギーを摂取することが必要となった。一般に、恒温動物の体重あたりの摂取エネルギー量は、変温動物の数十倍から百倍にもなる。



図：恒温動物と変温動物の深部体温と環境温度の関係
変温動物であるトカゲの体温（青）は環境温度とほぼ一致して変動するのに対し、恒温動物の体温（オレンジ）は環境温度の変化に対して一定の恒温性を示す。ヒト（赤）は発汗を通じて著しい高温耐性を示す。Hensel H et al.（1973）より改変。

参考文献：
・脳と体温―暑熱・寒冷環境との戦い　彼末一之、中島敏博　共立出版（2000）
・三好智子ら　日本家畜管理学会誌・応用動物行動学会誌　52: 98-105 (2016)
・Hensel H et al. *Temperature and life* (Springer) 509-520 (1973)

心理ストレス性交感神経反応 （Stress-induced sympathetic responses）

片岡 直也、中村 和弘
（名古屋大学大学院 医学系研究科 統合生理学）

心理ストレスによって起こる体温上昇や頻脈、血圧上昇は、交感神経系の活性化によって生じる自律生理反応であり、人を含めた多くの哺乳類で見られる反応である。心理ストレスによって交感神経系を活性化させる生物学的な意義は、野生動物が敵と対峙した際の「戦うか逃げるか（Fight or Flight）」という状況を考えるとわかりやすい。素早く骨格筋や神経系を温め、さらに血液循環を促進することで神経系や筋肉へエネルギー源である糖や酸素の供給を増加させて、身体パフォーマンスを向上させる効果があると考えられる。一方、長期にわたる心理ストレスは様々な症状を引き起こすが、中でも心因性発熱は高体温状態が長期間継続する病態であり、疲労感を伴うことが多いため、日常生活に支障を来すことも少なくない。心因性発熱は感染性の発熱とは異なり、解熱剤（非ステロイド性消炎鎮痛薬：NSAIDs）では解熱できないため、抗不安薬や向精神薬などの薬物療法やカウンセリングなどの心理療法を行って症状を緩和することが多い。

心理ストレス性交感神経反応は脳からの指令によって惹起されるものの、その中枢神経回路メカニズムは未だ不明な点が多い。ラットを用いた研究によって、心理ストレスが脳内の視床下部背内側部から延髄縫線核へ投射する神経細胞を活性化し、プレモーターニューロンを介した交感神経出力が亢進することで体温上昇や頻脈を引き起こすことが明らかとなった。心理ストレス反応を駆動する神経回路メカニズムを明らかにすることで、様々なストレス疾患の発症基盤の解明と新規治療手法の開発につながることが期待される。

参考文献:
・Kataoka N et al. ***Cell Metab***. 20:, 346-358 (2014)
・Oka T. ***Temperature*** 2: 368-378 (2015)
・Nakamura K et al. ***Temperature*** 2: 352-361 (2015)

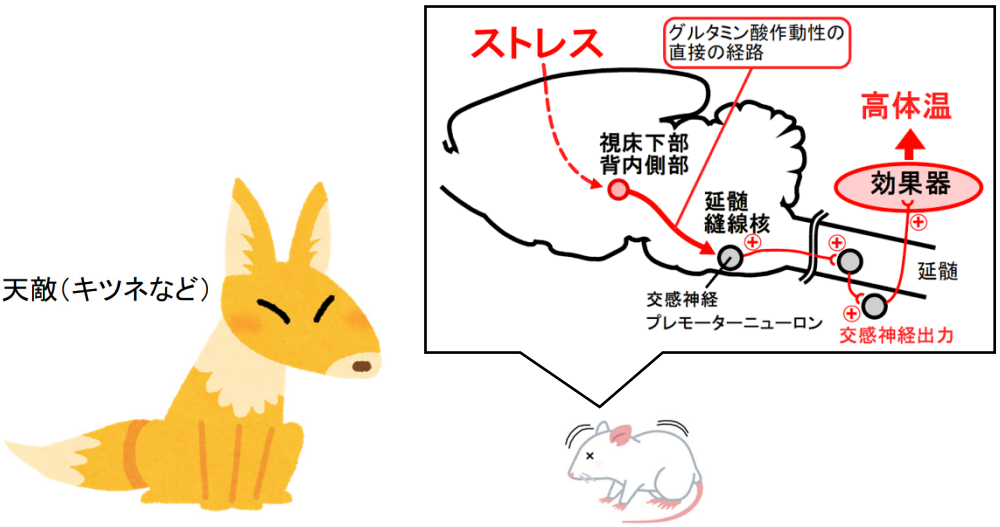


図1：敵と対峙した際のラット脳内の様子

変温動物の日内体温制御

（Diurnal body temperature control in cold-blooded animals）

三宅 崇仁、土居 雅夫
（京都大学大学院 薬学研究科）

変温動物の体温は外気温に大きく左右されるが、ただ外気温の変化をありのままに受け入れているわけではない。一日の中で活発な活動期には高い温度を好み、それによって代謝を上げ、休息期には逆に低い温度を好むことで代謝を下げる。このような行動性の温度選択リズムによって、変温動物も恒温動物と同じように、体温リズムを持つことが知られている。例えば、淡水カメの一種は、朝や夕方ではなく真昼に頻繁に甲羅干しを行って体温を調整する[1]。トカゲの一種は、明暗サイクルに合わせた体温変化を示し、それが恒暗条件でも維持される[2]。淡水魚のゼブラフィッシュは、明暗サイクルに合わせて温度の嗜好性を変化させ、それにより日内の体温制御を行う[3]。

変温動物の日内体温制御は脊椎動物に限ったことではない。昆虫のショウジョウバエにも温度選択リズムがある。実験室で、金属板上に温度勾配を作り、その上にショウジョウバエを放つと、放した直後は散逸するものの、徐々にハエは好みの温度に移動し、30 分後には一定の温度域に集まる様子が観察される。この好みの温度選択にリズムがある[4]（図）。

ショウジョウバエの日内温度選択リズムは、DH31 受容体 (diuretic hormone 31 receptor)を介したシグナルにより制御される[5]。興味深いことに、哺乳類における DH31 受容体ホモログはカルシトニン受容体であり、マウスにおいても本受容体が活動期の体温のリズムを調節する[5]。恒温動物と変温動物とでは体温調節の基本的な仕組みが違うにもかかわらず、進化上保存された共通の受容体シグナルが体温の日内制御を担っているといえる。

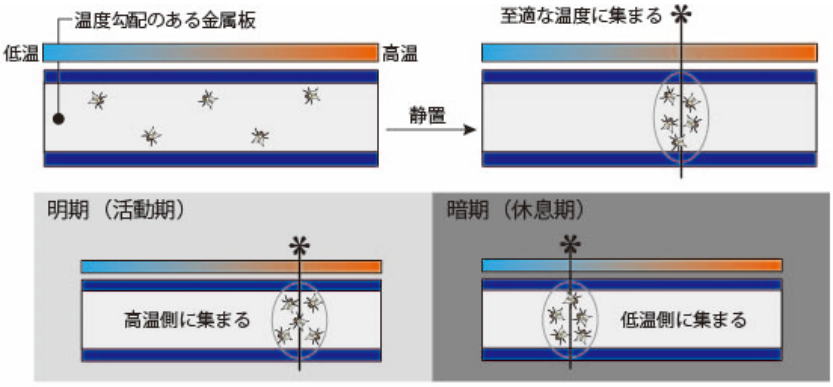


図: ショウジョウバエを用いた温度選択行動試験

参考文献:

[1] Clavijo-Baquet S et al. ***Chelonian Conserv. Biol.*** 16: 62-69 (2017)
[2] Ellis DJ et al. ***Chronobiol. Int.*** 26: 1369-1388 (2009)
[3] López-Olmeda JF et al. ***Chronobiol. Int.*** 26: 200-218 (2009)
[4] Hamada FN et al. ***Nature*** 454: 217-220 (2008)
[5] Goda T et al. ***Genes & Dev.*** 32: 140-155 (2018)

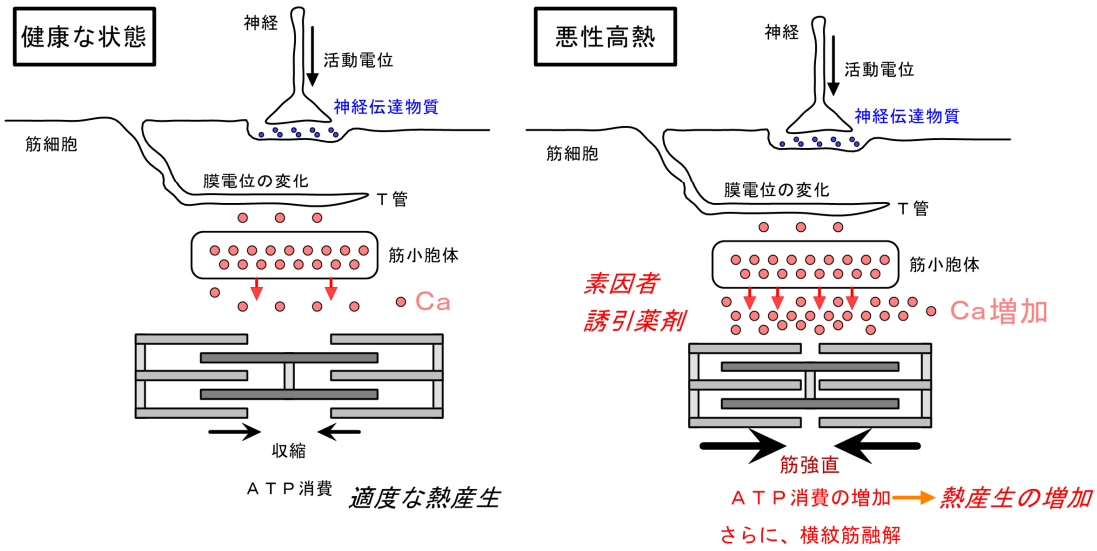
悪性高熱

（Malignant hyperthermia）

神谷　厚範
（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）

悪性高熱症（Malignant hyperthermia: MH）は全身麻酔の重篤な合併症である。頻度は比較的まれ（1/74000 全身麻酔例）であるが、時として致死性（10%程度）である。悪性高熱症は、素因者が、誘発薬剤を用いた全身麻酔を受けると発症し得る。素因者では、骨格筋細胞内の筋小胞体からのカルシウム（Ca）放出が異常に亢進している。また、誘発薬剤は、ハロタン、イソフルラン、セボフルラン等の全ての揮発性吸入麻酔薬、およびスキサメトニウムなどの脱分極性筋弛緩薬であり、これら薬物は筋小胞体からの Ca 放出を亢進させる。このため、細胞内の Ca 濃度が異常に増加し、骨格筋細胞の筋収縮が異常に持続して ATP の消費が亢進し、さらに筋小胞体への Ca 取り込みに伴う ATP 消費も増大して、大量の熱が産生される。また一方、ミトコンドリア内の Ca 依存性のホスホリパーゼ A2（PLA2）活性も亢進し、熱産生は増大する。このため、急激に体温が上昇する。また、酸素消費量が増大し、二酸化炭素の産生も異常に増加する。

初発症状として、呼吸性および代謝性アシドーシス、筋強直（開口障害を含む）などが起こり、その後、急激に、体温が上昇する。深部体温は、15 分間に 0.5℃以上、上昇し，40℃以上に達することもある。横紋筋融解が生じると、赤褐色調の尿（ミオグロビン尿）、血清カリウム値上昇、心停止に至ることもある。また多臓器障害で、筋肉障害（歩行障害等）や意識障害等の後遺症が残る。治療は、誘因薬物の投与中止、ダントロレンの静注と、全身冷却である。



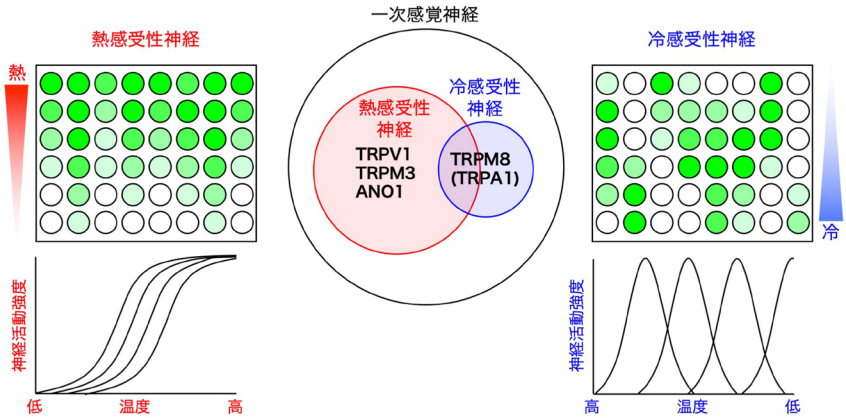
参考文献:
・悪性高熱症患者の管理に関するガイドライン 2016，日本麻酔科学会
・Harrison GG: Control of the malignant hyperpyrexia syndrome in MHS swine by dantrolene sodium. ***Br. J. Anaesth.*** 47: 62-65 (1975)

温度感受に関わる感覚神経 （Thermosensitive sensory neurons）

中川 貴之
（京都大学 医学研究科）

感覚は、古くは、五感、すなわち、視覚、聴覚、触覚、味覚、嗅覚に分類されていたが、現在は、皮膚や皮下深部に加わる刺激を感受する体性感覚（表在感覚、深部感覚）、内臓に加わる刺激を感受する内臓感覚、さらに、視覚、聴覚、味覚、嗅覚、前庭感覚、平衡覚など特異的な感覚器官を有する特殊感覚など多数の感覚に分類されている。感覚神経は、それら外界あるいは生体内から体組織に加わる刺激を電気的シグナルに変換し、その情報を中枢神経（脳）に伝達する求心性神経である。外界から皮膚に加わる温度の感覚は、触覚、圧覚、振動覚、痛覚、痒みなどと同じく体性感覚（表在感覚）に分類され、主に脊髄後根神経節（DRG）や三叉神経節に細胞体を有し、皮膚（末梢）および脊髄後角（中枢）、両方向性に軸索を投射する神経を一次感覚神経として伝達される。この一次感覚神経は、無髄で小型の C 線維、有髄で中型の Aδ線維、大型の Aβ線維に大別されるが、温度感覚（温覚・冷覚）は主に C 線維の自由終末で感受される。近年、二光子共焦点レーザー顕微鏡を用いた in vivo Ca^{2+}イメージングにより、温度（熱/冷）刺激により活性化される DRG 神経 C 線維（TRPV1 陽性神経）のポピュレーションおよびパターンが解析された。その結果、熱刺激の場合、温度の上昇に伴い活性化する神経の割合や強度が一様に増加するのに対し、冷刺激の場合、温度の低下により活性化される神経のパターンが異なり、これらがコードする情報を冷感受として認識している可能性が示された。

一方、一次感覚神経の自由終末で、これら温度刺激を感受する受容器が複数同定されており、熱刺激には TRPV1、TRPM3、ANO1、温刺激には TRPM2、TRPV3、冷刺激には TRPM8 などが関わっている。TRPA1 は、げっ歯類では 15℃以下の冷刺激により活性化されるが、種差があり、哺乳類以外の複数の脊椎動物や昆虫では逆に熱/温刺激で活性化される。ヒトの TRPA1 は通常状態では温度感受性を示さないが、低酸素条件下など一定の条件で、冷刺激で産生される活性酸素種を感受することで間接的に活性化されるが、冷感覚を認識させるかは不明である。

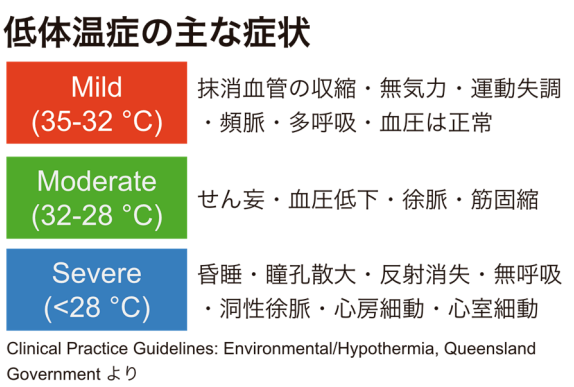


参考文献:
・Wang D et al. *Cell Rep.* 23: 2001-2013 (2018)
・Miyake T et al. *Nat. Commun.* 7: 12840 (2016)

哺乳類の低温障害
（hypothermic damage in mammals）

砂川 玄志郎
（理化学研究所 生命機能科学研究センター 網膜再生医療研究開発プロジェクト）

哺乳類は恒温動物であるが、冬眠や日内休眠を除くと体温の日内変動を超えた低体温は様々な障害を生体に及ぼすことが知られている。臨床では深部体温が 35℃以下を低体温症とし、多くの場合、意識障害を伴う疾患などの基礎疾患に伴う二次性の低体温が多い。低体温の程度によって意識障害は増悪し、28℃では意識はなくなる。呼吸は深部体温 30℃を下回ると換気量が低下し始め、徐々に呼吸数も低下していく。循環に関しては、徐脈も含めた致死性不整脈に伴う全身の臓器の虚血性障害がもっとも大きな問題となる。体温が 28℃を下回ると心拍数は 30～40BPM、24℃を下回ると心静止をきたすと言われている。梗塞組織は不可逆的であるが、低体温であっても心機能が保たれ、虚血障害を回避さえすれば多くの臓器は復温することで機能が回復することも知られており、この特性は体外循環式の人工心肺を用いた心臓手術に応用されている。深部体温が 32℃を下回ると、基礎代謝の上昇、シバリング、抹消血管収縮などの体温調整機能が障害される。他には、低体温は血液の凝固機能を障害することも知られている。すなわち、内因性・外因性の多くの凝固因子が低温により酵素機能を障害され凝固機能が低下する。多くの凝固機能障害は正常体温付近まで復温することで回復することから、可逆的な変化と言える。



Clinical Practice Guidelines: Environmental/Hypothermia, Queensland Government より

これらの低体温障害が生じるメカニズムとして、細胞レベルでは細胞内外のイオン恒常性の破綻が主たる原因だと考えられている。1960 年代に動物実験で低体温によって脳浮腫が生じることが発見された。低温によって ATP 産生が低下し、Na^+/K^+- ATPase の機能が低下することにより、細胞内に流入する Na^+が多くなり、細胞内 Na^+濃度の上昇に伴い、細胞が浮腫を呈する。一方で 10℃以下の深部体温を 1 週間以上経ても特に細胞浮腫を起こさない冬眠動物は何かしらの機構で細胞内外イオン不均衡に抵抗性を有しているがメカニズムはわかっていない。

参考文献:

・Mallet ML. ***QJM - Mon. J. Assoc. Physicians*** 95, 775-785 (2002)
・Boutilier RG. ***J. Exp. Biol.*** 204: 3171-3181 (2001)

三叉神経を介した生存戦略

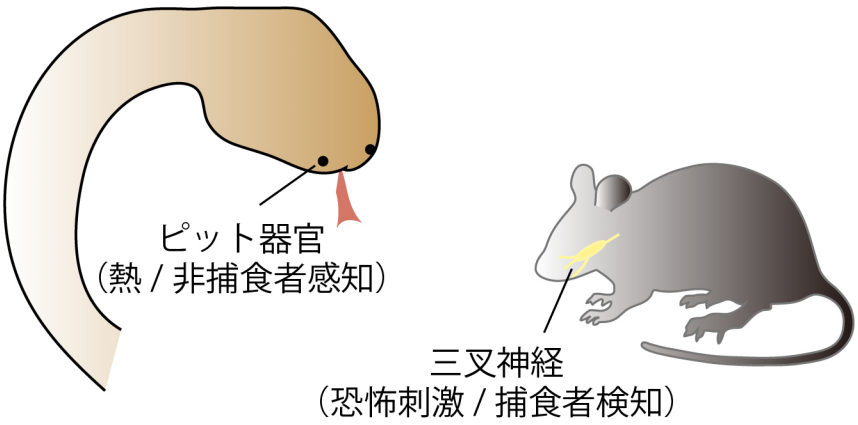
（Trigeminal nerve-mediated survival strategy）

櫻井　勝康
（筑波大学　国際統合睡眠医科学研究機構）

三叉神経は脳神経の第5対で、眼神経、上顎神経、下顎神経からなる。三叉神経はその神経線維を頭部の大部分に投射することにより、顔面を主とした頭部の感覚受容（触覚、痛覚、温覚、冷覚など）を司る。

動物の世界では、三叉神経を介してその生存に必要である捕食行動を行う動物が存在する。一部のヘビやコウモリは三叉神経に支配されたピット器官を介して獲物の体温を検知し、捕食行動を行う[1, 2]。ピット器官を持つヘビは、TRPA1 によって獲物の熱検知を行っていることも明らかにされている。近年の研究により、TRPA1 遺伝子を欠損したマウスは、ヘビの皮に対して恐怖行動が非常に減弱することが明らかにされた [3]。さらに、その恐怖刺激は三叉神経を介して脳内に伝達され、恐怖行動を引き起こしている可能性が示唆されている。非捕食者にとって、捕食者の恐怖刺激は、状況によって様々な行動および生理反応の変化を引き起こす。マウスは三叉神経の TRPA1 を介して捕食者の恐怖刺激に対して行動を変化させることから、同様のメカニズムで体温変化などの生理反応を起こすことにより、生存確率を高めている可能性が考えられる。もし、この仮説が正しければ、捕食者、非捕食者ともに同じ TRPA1 を介してその生存確率を高めていることになり、動物の進化的にも非常に興味深いと考えられる。

参考文献:
[1] Gracheva EO et al. ***Nature*** 464: 1006-1011 (2010)
[2] Gracheva EO et al. ***Nature*** 476: 88-91 (2011)
[3] Wang Y et al. *Nat. Commun.* 9: 2041 (2018)



がんの温度応答性
（Thermal sensitivity of cancers）

畠山　浩人
（千葉大学　大学院薬学研究院）

一般にがんは熱に弱いとされている。正常の組織では、温度の上昇に伴い血管が拡張し血流量の増加による放熱メカニズムが存在する。一方でがん組織（tumor）の血管は、新生血管と呼ばれる収縮能に乏しい未熟な血管が多い。また、がん組織の新生血管は動脈と静脈がはっきりせず、間質圧が高いことも相まって、血流がほとんどない血管も存在しており正常組織と比較してがん組織の放熱能が劣っている [1]。従って、がん組織中の細胞は高温にされられる時間が長くなるため、正常組織よりもがん組織は熱に弱いとされている。この性質を利用してがん温熱療法（ハイパーサーミア）の研究が古くからされており、臨床でも一定の効果が挙げられている。ハイパーサーミアは米国がん研究所によれば，がん組織を高温（～45℃）に暴露させるがん治療法とされる [2]。細胞は 43℃以上になると死んでいくため、43℃で 1 時間～数時間温めることが基本となる。

一方で、すべてのがん細胞（cancer cell）が 43℃で細胞死が誘導されるか定量的な解析の報告は乏しい。最近、卵巣がん細胞において温熱で細胞死が誘導される温度に約 4℃もの差があることが報告された（図 1）[3]。温熱に強い卵巣がん細胞の中には 48℃で 1 時間温められても半数以上の細胞が生き残るものも存在した。がん細胞が温熱に耐性を示す詳しいメカニズムはまだ解明されていないが、抗がん剤に耐性があるように、温熱療法に対しても耐性を示すがん細胞の存在を示唆している。

つまり、がんは熱に弱いとは限らない。今後、がんの温度応答性を考慮した個別化を行うことで、さらに効率よく安全ながん温熱療法へと発展すると期待される。

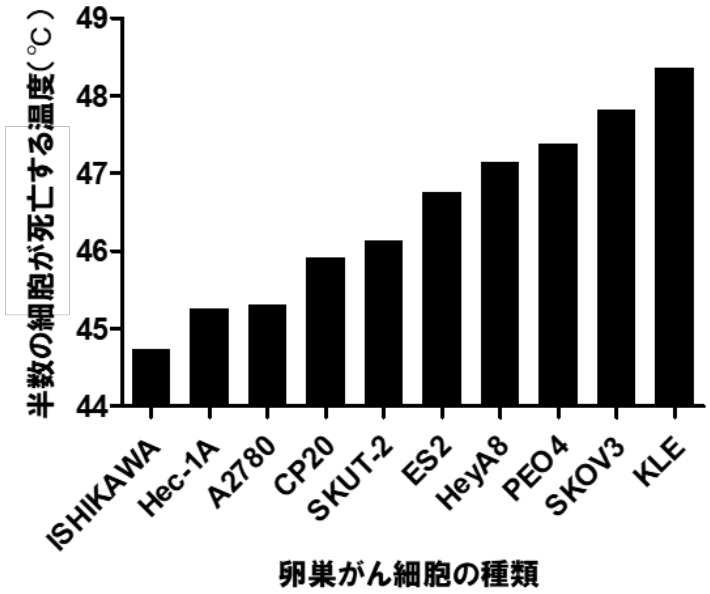


図 1　温熱処置後の卵巣がん細胞の細胞死に至る温度の違い

参考文献:

1) Chechel A. *Pep. Pract. Oncol. Radiother.* 12: 267-275 (2007)
2) https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery/hyperthermia-fact-sheet
3) Hatakeyama H et al. *Cell Rep.* 17: 1621-1631 (2016)

ヒト褐色脂肪組織の遺伝学
（Genetics of brown adipose tissues in humans）

中山 一大
（東京大学　大学院新領域創成科学研究科）

ヒトの褐色脂肪組織（Brown adipose tissue: BAT）の活性は加齢とともに減衰するが、同じ年齢層の集団内でも大きな個人差があることが知られている。日本人成人を対象とした調査では、若年集団でも半数近くの被検者が BAT 活性を示さないことが報告されている。一方、ヨーロッパ人や南アジア人を対象とした検査では、被検者の大多数が寒冷刺激による BAT 活性の増加を示している。このような BAT 活性の個人差には、一塩基多型（single nucleotide polymorphism: SNP）に代表されるゲノム多型が寄与している可能性がある。

成人の BAT の活性が比較的新しい発見である上、その検査には 18F-フルオロデオキシグルコースをトレーサーとした陽電子放出断層撮影等が用いられてきたため、ヒト BAT の個人差に寄与するゲノム多型に関する研究報告はごく限られている。Yoneshiro らは、BAT での熱産生に中心的な役割を果たし、肥満などエネルギー代謝疾患との関連が報告されていた 2 つの遺伝子、Uncoupling 1 protein 遺伝子（*UCP1*）およびβ3 adrenergic receptor 遺伝子（*ADRB3*）の SNP について BAT 活性との関連解析を実施した。その結果、*UCP1* の上流に位置する SNP である -3826A/G（rs1800592）と *ADRB3* 遺伝子の非同義 SNP のひとつである Trp64Arg（rs4994）が、日本人集団における加齢に伴う BAT の減少と関連することが明らかになった。また、Nishimura らは、日本人成人男性を対象とした人工気候室実験の結果、-3826A を含む *UCP1* 周辺の SNP ハプロタイプが、寒冷曝露時の酸素消費量増加と関連していることを報告している。さらに、このハプロタイプは高緯度地域のヒト集団でより高い頻度で存在しており、BAT がヒトの寒冷環境への遺伝的適応に寄与していたことが示唆されている。

一般的な遺伝形質に寄与する多型の同定には、多数（数十万から数百万）の SNP をマーカーとして用いるゲノムワイド関連解析法を用いるのが一般的となっている。ゲノムワイド関連解析法には多数の検体数の必要となるので、近赤外線時間分解分光法など代替測定法の活用なども視野に入れて、より多くの試料を収集することが必要である。

※ハプロタイプ　染色体上での多型部位のアレルの組み合わせの型

UCP1 -3826 A/Gアレル	BAT活性	寒冷曝露時の酸素消費量	肥満感受性	高緯度集団での頻度
A	高い	大きい	低い	高い
G	低い	小さい	高い	低い

参考文献:

・Yoneshiro T et al. ***Int. J. Obes.*** 37: 993-998 (2013)
・Nishimura T et al. ***Sci. Rep.*** 7: 5570 (2017)

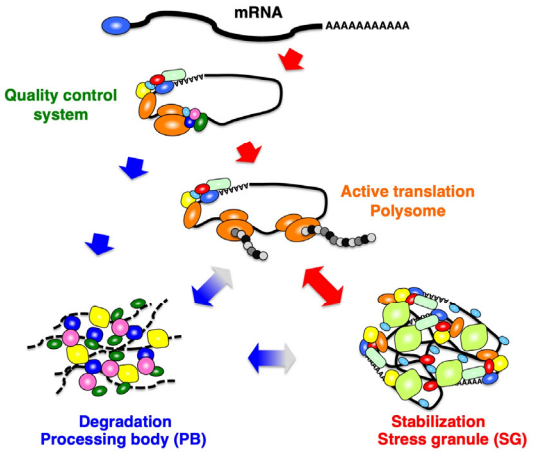
mRNP 顆粒と植物の温度適応

（mRNP granules and plant temperature stress adaptation）

中南　健太郎、関　原明
（理化学研究所　環境資源科学研究センター）

環境刺激に対する植物の適応・応答を理解するためには、mRNA の発現調節に加えて、個々の機能を有するタンパク質の発現レベルを明らかにすることが不可欠である。特に温度などの環境ストレス条件下では、すべての転写された mRNA がタンパク質に翻訳されるわけではなく、不要な mRNA は分解される。さらに、エネルギー消費の多い翻訳は抑制される傾向にあり、mRNA 分子が必要とされるまで保護されるプロセスも機能し、必要なタンパク質のみを翻訳する選択的翻訳が行われる。この転写後調節は、細胞内顆粒であるプロセッシングボディ（PB）やストレス顆粒（SG）などのメッセンジャーリボ核タンパク質（mRNP）顆粒で行われることが知られている。PB では異常な mRNA または除去されるべき mRNA を、脱キャップ酵素やヌクレアーゼなどによって分解する。一方 SG はストレスで誘導される mRNA および RNA 結合タンパク質を含む mRNP 顆粒であり、翻訳まで mRNA を保護する機能を有するため、翻訳開始因子などを含んでいる。近年、それら mRNP 顆粒のコンポーネントの一つとして知られる 5'-3'エキソリボヌクレアーゼ 4（XRN4, PB）、オリゴウリジル酸結合タンパク質（UBP1b, SG）の研究では、それらの欠損変異植物や過剰発現植物が、野生型と比較して低温・高温ストレスなどの環境ストレスに対して耐性や感受性を示し、mRNP 顆粒を介した RNA 制御機構が植物の温度ストレス応答に重要であることが明らかとなってきた。

参考文献:
・Nakaminami K & Seki M. ***Adv. Exp. Med. Biol.*** 1081: 23-44 (2018)
・Nguyen CC et al. ***Front. Plant Sci.*** 7: 853 (2016)
・Nguyen AH et al. ***Plant Cell Physiol.*** 56: 1762-1772 (2015)



mRNP 顆粒による RNA 制御機構

線虫 *C. elegans* の温度走性機構

（Neural mechanisms underlying thermotaxis in *C. elegans*）

松山　裕典、森　郁恵
（名古屋大学　大学院理学研究科附属ニューロサイエンス研究センター）

線虫 *C. elegans* は、透明な体をもった体長 1mm の線形動物で、他の動物に寄生せずに土壌で生活している。*C. elegans* の体は 959 個の細胞からなり、受精卵から成体に至るまでの細胞分裂の系譜がすべて明らかにされている。そのうち 302 個の細胞は神経系を構成する「ニューロン」であり、その構成には個体差がない。さらに、電子顕微鏡による解析から、すべてのニューロンの接続関係がシナプスレベルで明らかにされていることから、線虫は、動物の神経系で行われる情報処理のメカニズムを、単一ニューロンのレベルから全脳レベルに至るまで詳細に研究することができる理想的なモデル動物である。

C. elegans はそのコンパクトな神経系を駆使して、複雑な記憶・学習行動を示すことが知られている。特に、「温度」と「エサ」を関連づけて記憶・学習し、記憶に基づいて精密に行動を制御することができる。*C. elegans* を一定の温度で十分なエサとともに飼育したのち、エサのない温度勾配上に置くと、温度勾配上で飼育温度を探し出し、飼育温度付近にとどまる行動を見せる（温度走性行動, thermotaxis, Hedgecock & Russel 1975, 図 1）。一方、同じ温度で飢餓を経験した *C. elegans* は、飼育温度を避けるように振る舞う（Mohri et al., 2005; Kodama et al, 2006; Nishio et al., 2012, 図 1)。

これまでに、レーザーによるニューロンの破壊実験（Mori & Ohshima, 1995）や分子遺伝学的な解析から、線虫の温度走性行動は非常にシンプルな神経回路で制御されていることが明らかとなった（図 2）。外界の温度刺激を感覚ニューロン AFD と AWC が受け取り、その情報が下流の介在ニューロン AIY, AIZ, RIA で計算・処理され、最終的に頭部体壁筋を制御する運動ニューロン SMD, RMD に情報が伝達されることで、感覚から走性行動への変換が行われていると考えられている。

参考文献:

・Aoki I, Nakano S & Mori I. ***Learn. Mem.: A Compr. Ref., 2nd ed.*** 4: 415-434 (2017)
・Sasakura H & Mori I. ***Invertebr. Learn. Mem.*** 22: 124-139 (2013)

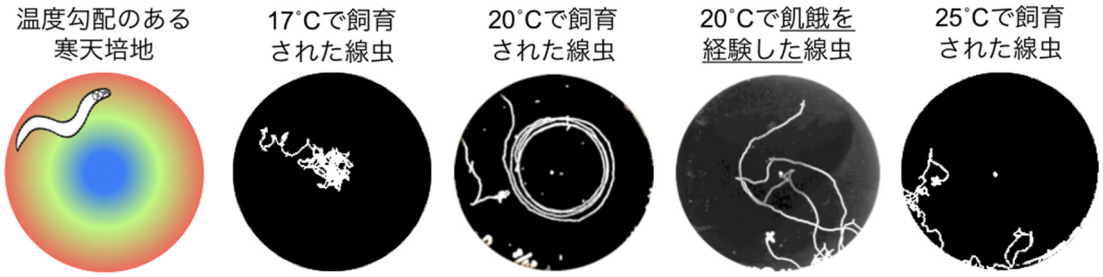


図1: 線虫 *C. elegans* は過去のエサ条件と温度を関連させて学習し、温度走性行動をおこなう。

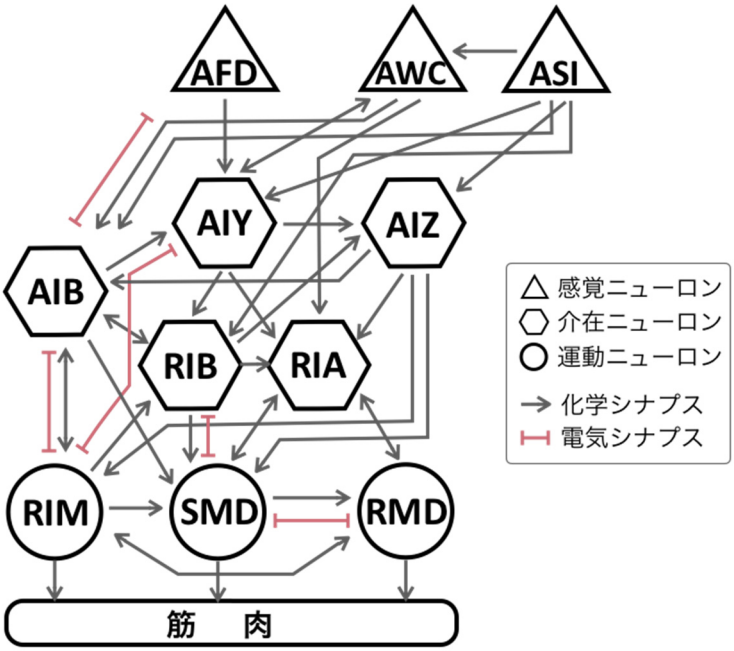


図2: 線虫 *C. elegans* の温度走性行動を制御する神経ネットワーク

温度生物学に関わる研究手法

パッチクランプ法における温度依存的な活性化電流観察

Methods for measuring temperature-dependent currents in patch-clamp

曽我部 隆彰
（自然科学研究機構 生命創成探究センター 温度生物学研究グループ）

TRP チャネルなどの温度依存的な電流を計測するには、細胞外液全体を加熱しながら熱電対やサーミスタで温度計測する方法がよく用いられる。また最近は、近赤外（IR）レーザーを用いた局所的な加熱と温度感受性蛍光プローブによる計測方法も技術的に可能になってきた。ここでは温度による活性化電流を観察する際の留意点と、各測定方法の特徴について説明する。

温度刺激を加える際の留意点

パッチックランプにおいて一番問題となるのが温度変化によるガラスの変形である。溶液を満たした測定チャンバーを加温・冷却すると、チャンバー底面のガラス、細胞が接着したカバーガラス、測定電極がわずかに歪む。さらに、カバーガラスの下に気泡があると膨張・収縮してガラスが動くこともある。これらは電極と細胞間のギガシールの破断につながるため、ホールセルクランプ後にガラス電極を細胞ごと持ち上げる手順を加える。この操作が可能なのはガラス面への接着が弱いHEK293 細胞などで、トリプシン処理が必須な細胞は向いていない。ただし、15～35℃の範囲内であればリフトなしで測定できる場合もある。

重力落下式の灌流であれば予め 60℃に保温した溶液で 50℃程度まで、氷冷した溶液で 10℃程度まで 10～30 秒で到達できる（図 1）。灌流刺激の場合は温度の変化率が流速、流路の径と長さ、チャンバー形状、液面の高さに影響されるため、定量的な温度負荷にはこれらの条件に加えてリフトする細胞の高さを固定し、細胞を流路の中央に配置することが重要となる。チャンバー自体を加熱・冷却することで緩やかな温度刺激も可能だが、活性化電流は小さくなり観測しにくくなる。温度刺激の別法として、灌流チューブをペルチェ素子で覆い細胞周辺をローカルに温度刺激する系も開発されており、リフトのステップを回避できる（文献 1）。また温度変化にともなって、細胞外液とピペット内液との間に生じる液間電位差（liquid junction potential）が有意に変化する。具体的には 25℃から 45℃までの温度上昇で 5 mV 程度である（文献 2）。特に、反転電位やイオン透過性を計算する場合には考慮したい点である。

温度計を用いた温度計測

パッチクランプを施した細胞周辺の温度を計測するために、我々は Warner Instruments 社の温度負荷・測定装置（TC-344B）とサーミスタ（TA-29）を利用しており、温度信号（1 kHz）を A/D コンバータで処理して pClamp で電流と温度を同時記録している。ヘッドステージの反対側にマニピュレータでサーミスタを固定し、先端を細胞から約 50μm 横まで近づける（図 2）。サーミスタは顕微鏡下では巨大で近づけるのに慣れがいるが、測定温度の精度を上げるために必須である。この測定方法はシンプルで導入しやすい一方で、測定値が実際の細胞（膜）の温度変化をどれくらい正確に反映しているか分からないのが欠点である。ちなみに、アフリカツメガエルの卵母細胞を使った電流測定でも同様の温度計測は可能だが、巨大な細胞全体（直径 1 mm）へ一様に温度刺激を負荷することは難しく、活性化温度閾値の厳密な定量には向いていない。

温度感受性プローブを用いた温度計測

近年、細胞内の温度を蛍光で観察できるプローブが開発され、温度計測の空間的解像度が飛躍的に向上した(「蛍光性ポリマー温度センサー」、「遺伝子導入が可能な蛍光性温度センサー」、および「細胞内蛍光性タンパク質温度センサー tsGFP」の項を参照)。これらによって、TRP チャネルの温度依存的電流を計測しながら、チャネルが局在する細胞膜領域の温度変化を定量化できる技術基盤が整ったといえる。このシステムは我々も実用化に向けて構築中であり、参考までにいくつかのポイントを記す。まず温度変化を蛍光強度で測定するので、強い光源、高感度のカメラ、温度プローブの励起・蛍光に対応するフィルターやスプリッターが欠かせない。また、前述のように細胞をリフトすると温度変化によって細胞が動き回るためイメージングには適さない。共焦点顕微鏡とパッチクランプを組み合わせ、IR レーザーで細胞一個を局所加熱すればガラスの変形や細胞の動きは無視できるレベルになり、理論的には細胞膜の温度変化を観測しながら温度依存的な電流の発生を捉えることができる。しかし、共焦点顕微鏡のシステムではROIをスキャンする時間が律速となって、温度測定の時間分解能が温度計を用いた方法より著しく劣るのが大きな課題である。

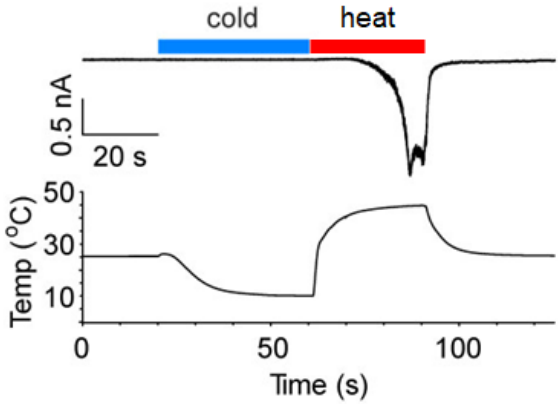


図 1. 灌流による温度刺激とショウジョウバエ Painless チャネルの熱活性化電流の例

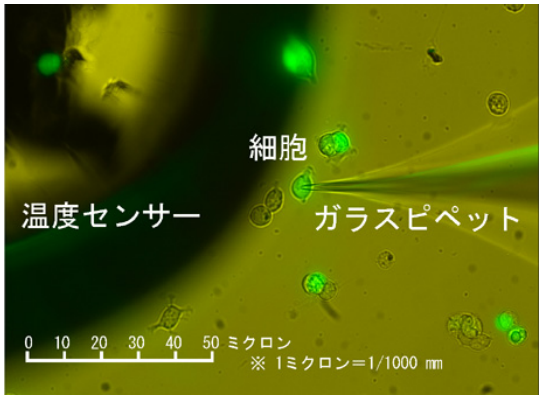


図 2. 測定電極とサーミスタの位置

参考文献:
1) Dittert I et al. *J. Neurosci. Methods* 151: 178-185 (2006)
2) Sokabe T et al. *J. Neurosci.* 28: 9929 -9938 (2008)

アレニウスプロットによる TRP チャネルの活性化温度閾値の推定
(Estimation of thermal activation thresholds of TRP channels by an Arrhenius plot)

齋藤　茂
（生理学研究所　細胞生理研究部門）

温度感受性 TRP チャネルの活性化温度閾値の推定法としてアレニウスプロットが頻繁に用いられる。アレニウスの式から予想される通り、化学反応速度は温度に対して指数関数的に変化する。温度感受性 TRP チャネルにおいても、温度とイオン透過速度（イオン電流として計測できる）の関係はアレニウスの式に従うと考えられる。一般的に、酵素やチャネルなどのタンパク質は温度上昇に伴い活性が高くなるが、温度感受性 TRP チャネルの大きな特徴は特定の温度域を境にして急激に活性が上昇する点である。そこで、研究対象の温度感受性 TRP チャネルについて温度刺激に対するイオン電流を測定し、Y 軸と X 軸をそれぞれ電流値と温度でプロットしたグラフを作成する。その際に Y 軸は対数プロットとする。温度依存的な電流の変化が小さいベースラインと直線的に電流値が上昇している部分の交点を閾値と定義して、活性化温度閾値を推定する。異なる種類の TRP チャネルの活性化温度閾値を比較する際にはアレニウスプロットによる推定値は客観的な指標として利用することができる。ただし、チャネルによっては活性が上昇する変曲点が明確ではない場合もあり、アレニウスプロットを適応することが難しい場合もある。

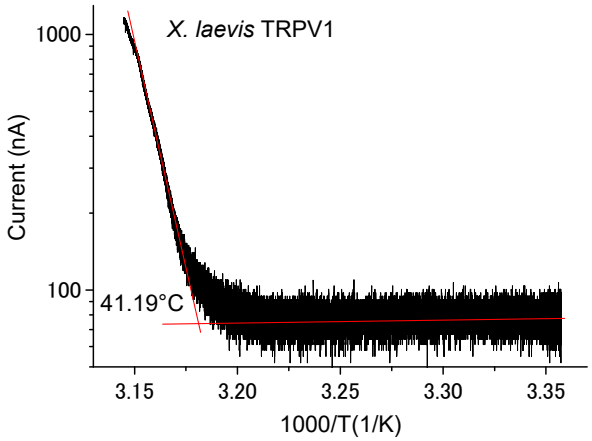


図 1. アレニウスプロットの一例。アフリカツメガエルの TRPV1 に熱刺激を加えた際に得られた電流応答を用いている。X 軸はアレニウスの公式に従って、絶対温度の逆数（1/T）を用い、表示を見やすくするために値を 1000 倍にしている。この例では活性化温度閾値は約 41℃であった。

参考文献:

Saito S et al. ***J. Biol. Chem.*** 291 : 11446-11459 (2016)

人工再構成系を用いたイオンチャネル解析法

（Functional analysis of ion channels in a reconstitution system）

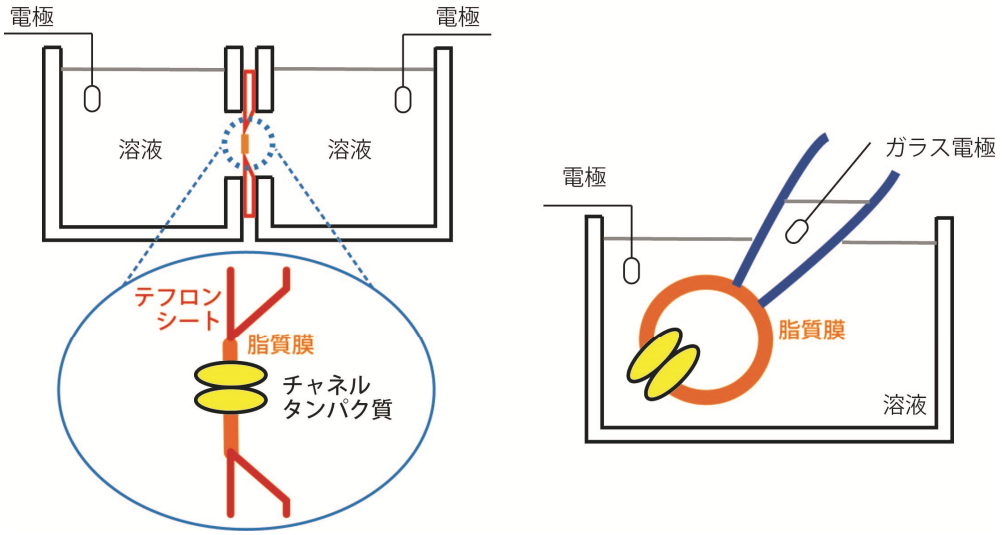
内田 邦敏
（福岡歯科大学 口腔歯学部）

人工再構成系を用いたイオンチャネル解析法とは、人工的に調製した脂質二重膜にチャネルタンパク質を埋め込み、その機能を電気生理学的に解析する方法であり、その構成要素は、水、塩類、脂質、精製膜タンパク質のみである。この実験系の大きな特徴の 1 つは、これらすべての構成要素をほぼ自由にコントロール可能であることである。イオンチャネル研究のために人工再構成系を適用する理由は、1）チャネルの機能そのものの理解を深めるために、単純な再構成系が必要な場合、2）細胞ではコントロールすることがほぼ不可能な細胞膜脂質の影響を検討する場合、3）パッチクランプ法などでは実験が不可能な場合、などが挙げられる。その方法には脂質平面膜法やリポソームパッチクランプ法などあるが、近年 Contact bubble bilayer 法など改良された方法も開発されている。膜タンパク質の中でも TRP チャネルは分子量が大きく、4 量体で機能的なチャネルを形成するため、機能を維持した状態でのタンパク質精製並びに再構成が困難であった。しかし、2009 年に Rohacs らのグループが脂質平面膜法を用いたラット TRPM8 チャネルの解析に成功したことを契機として、温度感受性 TRP チャネルの人工再構成系を用いた解析も行われつつある。

参考文献:

・ 老木成稔. 最新パッチクランプ実験技術法（岡田泰伸/編）. pp153-183（2011）
・ Iwamoto M et al. ***Sci. Rep.*** 16: 9110 (2015)
・ Zakharian E et al. ***PLoS One*** 4: e5404 (2009)

脂質平面膜法（チェンバー法、左）とリポソームパッチクランプ法（右）



蛍光ナノダイヤモンド
（Fluorescent nanodiamond）

外間　進悟、原田　慶恵
（大阪大学　蛋白質研究所）

細胞内の温度を計測するために、これまでに、タンパク質型、ポリマー型、蛍光低分子型温度センサーなど様々な温度センサーが開発されてきた。その中でも近年、ナノサイズのダイヤモンドが新たな温度センサーとして注目されている。タイプⅠb に分類される人工ダイヤモンドは内部に 100 ppm 程度不純物として窒素原子を含んでいる。この窒素原子に空孔が隣接する窒素空孔中心（NVC：Nitrogen vacancy center）（図 1a）は 550 nm の光で励起されると 600-800 nm の蛍光を発する。このような蛍光性のダイヤモンドを物理的に粉砕することで得たナノサイズのダイヤモンドを、蛍光ナノダイヤモンド（FND：Fluorescent nanodiamond）と呼ぶ。FND の蛍光は非常に安定で、褪色（ブリーチング）や明滅（ブリンキング）をおこさず長時間のイメージングが可能となる[1]。

図 1b に NVC のエネルギーダイヤグラムを示す。NVC 内部に存在する電子はスピン三重項状態であり、基底状態は $m_s = 0$ と縮退した $m_s = \pm 1$ にエネルギー分裂している。このエネルギー分裂はゼロ磁場分裂（D）と呼ばれ、外部磁場のない状態では 2870 MHz 程度である。

興味深いことに、$m_s = \pm 1$ から励起された電子は、その一部が項間交差を経て蛍光を発することなく、$m_s = 0$ へと緩和する。一方、$m_s = 0$ から励起された電子は蛍光を発して元の $m_s = 0$ へと緩和する。したがって、一定時間 NVC を光励起し続けると、ほぼ 100%の電子を $m_s = 0$ へと偏極させることができる。このように $m_s = 0$ へと高偏極した電子に、2870 MHz に相当するマイクロ波を照射すると $m_s = 0$ から $m_s = \pm 1$ へと電子スピン共鳴に基づく遷移が起こる。$m_s = \pm 1$ へと遷移した電子の一部は、蛍光を発することなく $m_s = 0$ へと緩和することから、$m_s = 0$ と $m_s = \pm 1$ の間で生じる磁気共鳴現象を蛍光強度の変化として計測することができる。このような現象は光検出磁気共鳴（ODMR：optically detected magnetic resonance）と呼ばれる。ゼロ磁場分裂 D は温度依存性を持つため、ODMR により D の変化を計測することによって、温度計測を行うことができる（図 1c）[2, 3]。

1.杤尾豪人、外間進悟、原田慶恵　***生化学*** 86: 145-153（2014）
2. Acosta V et al. ***Phys. Rev. Lett.*** 104: 070801 (2010)
3. Sotoma S et al. ***Chem. NanoMat.*** 4: 15-27 (2018)

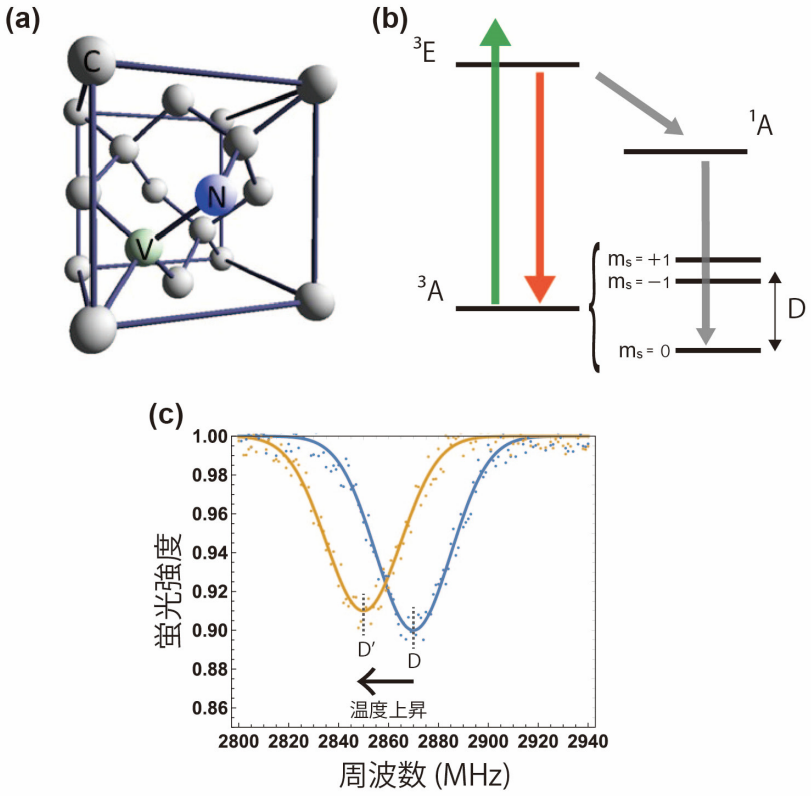


図 1. 窒素空孔中心による温度計測原理

（a）ダイヤモンド結晶内部の窒素空孔中心模式図。C：炭素、N：窒素、V：空孔。（b）エネルギー準位模式図。（c）ODMR スペクトルの温度依存性。温度上昇による共鳴周波数の変化（D→D'）をスペクトルから求めることができる。

ファイバーフォトメトリー法
（Fiber photometry）

人羅（今村） 菜津子、南 雅文
（北海道大学 大学院薬学研究院）

In vivo 蛍光検出法の一つ。臓器に蛍光プローブを導入後、光ファイバーを埋め込み、光ファイバーを介して励起光の照射と蛍光の検出を行う。装置は、レーザーあるいは LED 光源、ダイクロイックミラー、ファイバーパッチケーブル、 光検出器やカメラなどの検出系から成る。Cre マウスやウイルスベクターを用いた遺伝学的手法により蛍光プローブを導入する細胞を限定することで、特定の細胞群における蛍光変化を *in vivo* 自由行動下でリアルタイムに捉えることができる。神経活動に伴う細胞内カルシウムイオン濃度上昇を蛍光強度の増大に変換することができる Genetically encoded calcium indicators (GECI) と組み合わせることで、脳局所における神経活動を観察できる（「3-9. Ca^{2+} プローブ」参照）。ただし、空間分解能は低いため、個々の細胞からの蛍光を区別したり、細胞内局在を観察したりすることは難しい。そのような場合には、小型顕微鏡 miniscope を使用するなど、目的に応じて使い分けることが必要である。

参考文献:
・Kudo Y et al. ***Neuroscience*** 50: 619-625 (1992)
・Gunaydin LA et al. ***Cell*** 157: 1535-1551 (2014)
・Kim CK et al. ***Nat. Methods*** 13: 325-328 (2016)

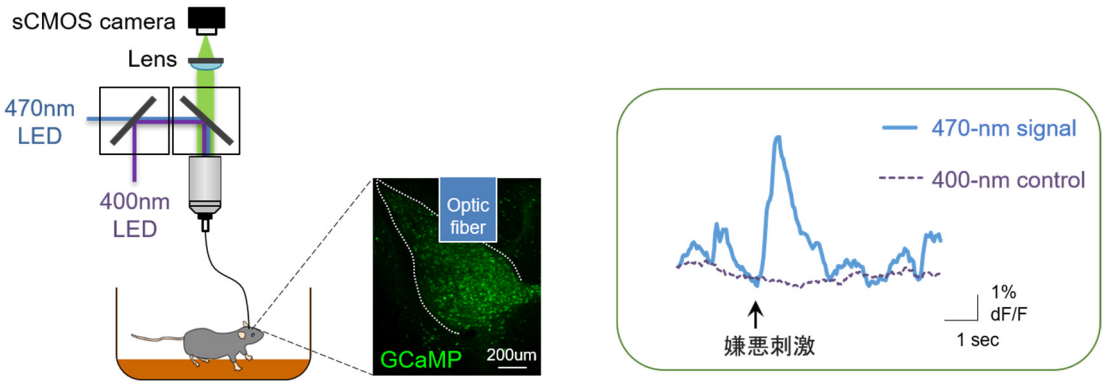


図: ファイバーフォトメトリー法の模式図
この例では、緑色の GECI である GCaMP を神経細胞に発現させ、カルシウム濃度依存的な 470 nm に対する蛍光と、カルシウム濃度非依存な 400 nm に対する蛍光を検出している。両者の比を取ることで神経活動を反映した蛍光強度変化を算出できる。

実験動物の体温計測法

（Measurement of body temperature in experimental animals）

柴崎　貢志
（群馬大学医学系研究科 分子細胞生物学）

実験動物の体温計測を行う場合、以下の方法がある。

一つは熱電対あるいはサーミスターを用いた市販機器を使用する方法である。この場合、それらをマウスやラットの肛門から直腸に刺入して体温計測を行う。このため、麻酔下で有用な手法であり、誤差が少ない体温測定が可能である。

サーモカメラを利用した非接触型の体温計も市販されている。この手法は簡便ではあるが、実験誤差が大きいという問題がある。

もうひとつの手法はテレメトリーシステムを用いることである。この方法では、計測した生体信号を無線で送る送信器を実験動物の腹腔内に埋め込む。その手術から動物が回復した後に、実験動物を受信器にのせて、自由行動下で電圧変化として深部体温を記録する。体温と共に、心電図、脈拍、呼吸数、脳波、活動量などの情報も記録が可能である。各社から様々なサイズの送信器と受信器が発売されているので、実験目的に応じて選択が可能である。VHF（周波数 30～300Mhz）の電波を用いるテレメトリーは、機材が比較的安価であることなどから、これまで汎用的な手法として利用されている。この方法の特長は、安価であることに加え、小型軽量の発信機の実用化が進んでいることである。一方、データ取得時に電波の届く範囲が短くなることなどが課題とされている。一つのアンテナで、最大 256ch の生体情報を群生飼育下で、受信記録が可能な機種も販売されている。1 台の受信ユニットで最大で 256 台の送信器からのデータを取得する事も可能である。データ取得のための特別なプラットフォームや専用の計測ケージが必要なく、様々な実験環境に対応する事が出来る。送信器本体内にメモリーを搭載した機種もあり、最大で 2 時間のデータを内部に保持可能である。

テレメトリー法を用いる際の律速は開腹手術が必要な点であり、まずは送信器の体内留置の手術法に習熟する必要がある。初めて実験を行う場合には、経験者から手技を伝授してもらうのが効率的である。

参考文献

・Uchida K et al. ***Pflugers Archiv.*** 459: 765-774 (2010)

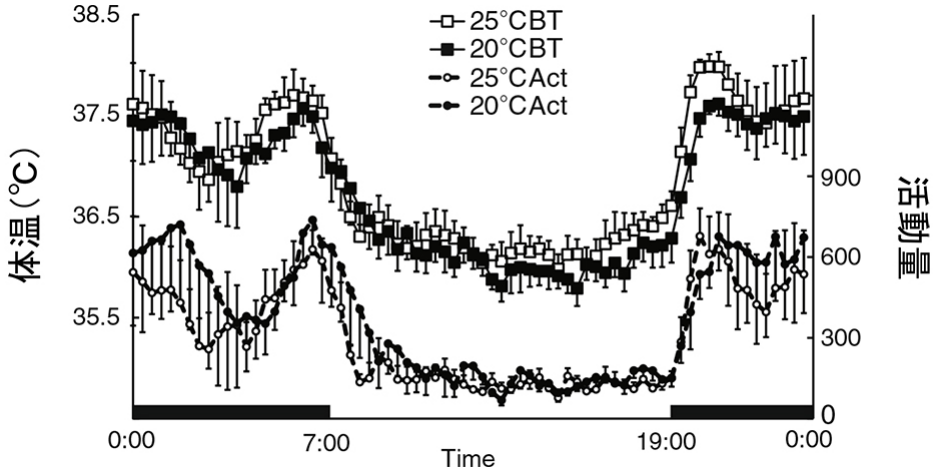


図: テレメトリー法を用いたマウスの体温と活動量の測定

体温測定用の送信器をマウスの腹腔内に埋め込んだ。そして、体温と活動量の計測を行った。この実験例では、室温（25℃）と寒冷環境（20℃）の2つの飼育条件にて体温（図中のBT）、活動量（図中の Act）の計測を行った。参考文献1より改訂。

2 光子顕微鏡を用いた生体イメージング
（In vivo imaging using two-photon microscopy）

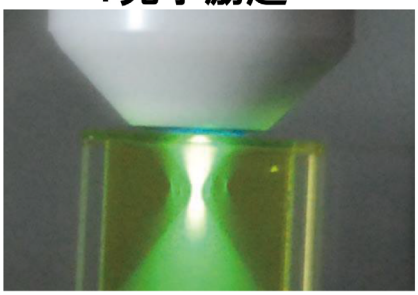
江藤 圭
（生理学研究所 生体恒常性発達研究部門）

2 光子顕微鏡は生体イメージングに最適な顕微鏡であり、神経科学をはじめ様々な研究領域において、広く使用されている。2 光子顕微鏡の動作原理である 2 光子励起は、蛍光分子に 2 つの光子が同時に相互作用することで起きる。通常の蛍光顕微鏡では、1 つの蛍光分子が1つの光子のエネルギーを吸収することで、蛍光が生じる（1 光子励起）。一方、2 光子励起では 2 つの光子（波長は 1 光子励起の 2 倍）が同時に1つの蛍光分子に吸収されることで起きる。2 光子励起の発生確率は極めて低いことから、顕微鏡の焦点面でのみ蛍光が生じる。そのため、生じた蛍光を全て像の形成に用いることがでる。また、焦点面以外の蛍光を除去する必要がなく、ピンホールの設置が不要である。さらに、フェムト秒パルスレーザーを用いて焦点のみを励起することで熱による組織傷害も減少するため、長時間観察も可能である。そして、1 光子励起に比べて長波長の光（近赤外光）を使用できるため、組織透過性が高く、生体深部組織の観察を行うことができる。これらの特性から、2 光子顕微鏡は生体脳深部のイメージングに適している（鍋倉、江藤 2010）。2 光子顕微鏡を用いた生体イメージングの例として、神経細胞の樹状突起やスパインのイメージングが挙げられる。スパインは神経細胞間のつなぎ目であるシナプスであり、1μm ほどの微小構造であるが、2 光子顕微鏡を用いることで生きたマウスの脳でスパインを観察することができる。また、同一個体の同一シナプスを数か月にわたって繰り返し観察することも可能であるため、学習、障害のシナプスへの影響を長期に渡って追跡することが可能である（Kim and Nabekura 2011）。もう一つの例として、GCaMP などのカルシウム感受性蛍光蛋白質を神経細胞に発現させることで、神経活動を観察することが可能である。大脳皮質だけでなく(Ishikawa et al., 2018)、視床、海馬などの深部領域、さらに脊髄や末梢神経など様々な部位で神経活動を単一細胞レベルの解像度で生きた固体から計測することができる。

参考文献:

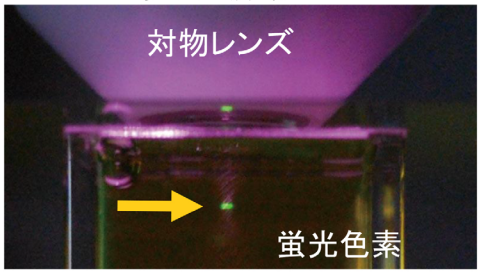
・鍋倉 淳一、江藤 圭 日本薬理学雑誌 135: 104-108 (2010)
・Kim SK, Nabekura J. ***J. Neurosci.*** 31: 5477-5482 (2011)
・Ishikawa T et al. ***Pain*** 159: 1592-1606 (2018)

コンフォーカル顕微鏡
1光子励起



- 短波長の励起光(350-650nm):
  組織透過性が低い
- 広域の励起:
  高侵襲性、背景光の問題
- ピンホールが必要

2光子顕微鏡
2光子励起

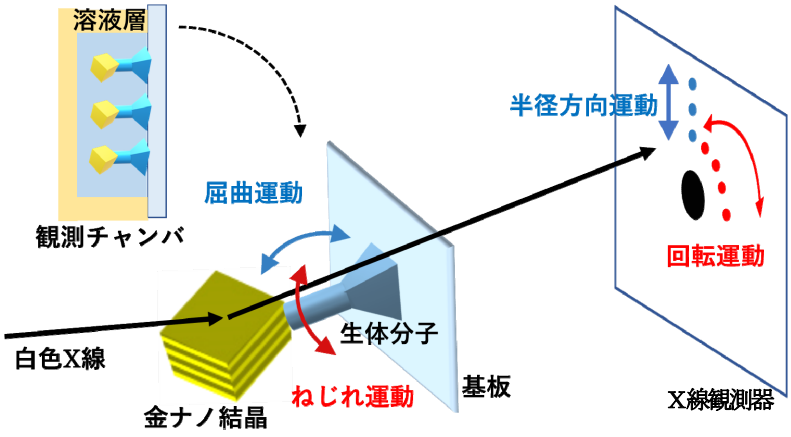


- 長波長の励起光（700-1000nm):
  組織透過性が高い
- 局所の励起:低侵襲性
- 生じた蛍光を効率よく検出できる

X 線 1 分子動態計測法
(Diffracted X-ray Tracking Method)

清水 啓史
（福井大学 学術研究院 医学系研究科）

X 線 1 分子動態計測法は金ナノ結晶を観測プローブとし、放射光白色 X 線を観測光として生体分子 1 分子の構造変化を実時間動画記録する観測法である。生体分子を基板に固定し、基板に固定した側とは逆側に金ナノ結晶を取り付ける。蛋白質の構造変化を計測する際には、基板との固定位置、ナノ結晶との固定位置を慎重に検討し、観測したい構造変化を妨げないように設計することが重要である。適切な固定方法を選んだサンプルに放射光白色 X 線を照射すると、蛋白質の構造変化を金ナノ結晶からの回折点の動きとして 2 次元X線観測器でとらえることができる。白色X線を使用した場合、結晶面の傾きが変化しても連続的に回折条件を満たすため、回折点の動きを広い空間範囲で追跡することができる。観測の時間・空間分解能は観測対象に合わせて調整可能だが、筆者の標準的なセットアップでは、0.1 度程度の動きを検出可能な空間分解能、サブミリ秒の時間分解能で観測している。



X線 1 分子動態計測法の概略図
生体分子の屈曲運動は金ナノ結晶からの回折点の半径方向運動として、ねじれ運動は回転運動として計測される。

参考文献:
・Shimizu H. *Biochim. Biophys. Acta.* 1864: 129361 (2020)
・Shimizu H et al. *Cell* 132:67-78 (2008)

細胞内蛍光性タンパク質温度センサー tsGFP
(Intracellular fluorescent protein-based thermometer, tsGFP)

坂口 怜子
(京都大学 iCeMS)

細胞内において平均的・局所的な温度変化や温度分布は、生理学的な応答や情報伝達を担っていると考えられる。この温度挙動を観察するために、細胞内蛍光性タンパク質温度センサー(thermosensor GFP; tsGFP)は強力なツールである。

tsGFP は、サルモネラ菌由来の温度依存的な転写因子である TlpA タンパク質と、緑色蛍光タンパク質(GFP)から構成されている。TlpA の構造が変化する融解温度は 37 ℃付近であり、可逆的に単量体と二量体の構造をとる。tsGFP は、この TlpA の温度感知部位を、GFP の N 末端および C 末端に融合させることで作製した(図 1)。TlpA の熱安定性を調節することによって、検出可能な温度帯が異なる変異体が設計されている。そのうち tsGFP1 は 37 ℃付近で大きな蛍光レシオ変化を示し、哺乳類の体温付近の温度変化を鋭敏に評価できる細胞内温度センサーとして機能する。タンパク質ベースのセンサーを用いる利点として、遺伝子上で細胞内局在化シグナルを融合するだけで、細胞内小器官など狙った場所にセンサーを局在させられることが挙げられる。実際に、細胞質だけでなく、ミトコンドリア型(tsGFP1-mito)、小胞体型(tsGFP1-ER)、細胞膜型(tsGFP-F)温度センサーが開発され、それぞれの温度変化計測が可能である。

HeLa 細胞において、ミトコンドリア型温度センサーtsGFP1-mito を発現させた結果、ATP 産生とミトコンドリア温度に相関があることが見出されている。さらに、細胞内における蛍光レシオ分布を解析すると、ミトコンドリア内において温度の不均一性が存在することが確認された。このように、tsGFP は、生体内における温度シグナルの意義の解明に必須のツールであると考えられる。

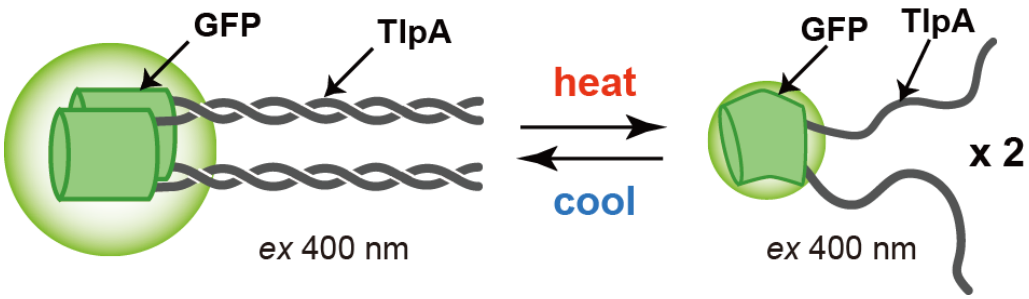


図1 温度センサーtsGFP の温度感知メカニズムの模式図。温度に依存して TlpA の構造が単量体から二量体へと可逆的に変化し、それに伴って GFP の蛍光発色団の環境が変化し、これが蛍光特性の変化として検出される。

参考文献:

・Kiyonaka S et al. *Nat. Methods* 10: 1232-1238 (2013)
・坂口怜子, 清中茂樹, 森泰生 *医学のあゆみ* 252: 256-257 (2015)

外部刺激応答性材料
(External stimuli-responsive materials)

村上 達也
（富山県立大学 工学部）

物理的な外部刺激として、熱、光、磁場、圧力などがある。これらの刺激に応答するナノ材料は多種存在するが、筆者の知る限り、生物医学分野でもっとも一般的なものは、光応答性ナノ材料である。この理由として、光源が容易に入手可能であり、場合によっては光学顕微鏡（特に近赤外レーザーを搭載する多光子励起顕微鏡）も利用できることが挙げられる。いずれの材料も光照射によって励起され、発光（蛍光、リン光）、熱生成のいずれかの過程を経由して失活する。これらの過程の割合は励起状態の寿命、系間交差の効率によって決まる。系間交差効率が高く、かつ励起三重項寿命が長ければ、酸素分子と反応して活性酸素種も生成しうる(図) [1]。光源について言えば、近赤外光（650–900 nm）がヒトへの影響が少ないことが知られており[2]、特に医療適用される 808 nm レーザーが実験室レベルでも頻用される。細胞レベルでは(HeLa)、この光は cytochrome c oxidase の銅錯体によって吸収され、細胞増殖が活性化される[3]。近赤外領域に強い吸収を示すナノ材料を挙げると、半導体性カーボンナノチューブ、金ナノロッドがある。

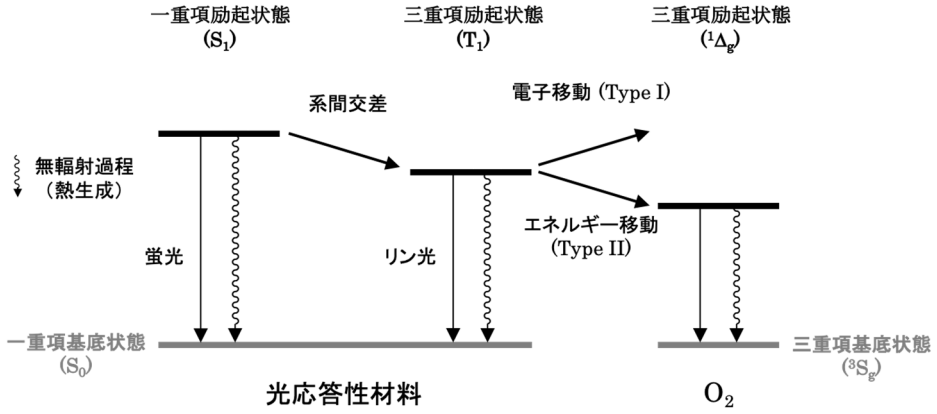


図. Jablonski diagram

参考文献:
[1] Murakami T et al. *Chem. Pharm. Bull.* 65: 629-636 (2017)
[2] Weissleder R et al. *Nat. Biotechnol.* 19: 316-317 (2001)
[3] Karu T et al. *J. Photochem. Photobiol. B.* 49: 1-17 (1999)

細胞膜透過型蛍光性ポリマー温度センサー
（Cell Membrane Permeable Fluorescent Polymeric Thermometer）

岡部 弘基
（東京大学　大学院薬学系研究科）

蛍光性ポリマー温度センサー（Fluorescent Polymeric Thermometer, FPT）は細胞内温度イメージングに有効である（別の項目参照）。蛍光性ポリマー温度センサーの細胞内導入にはマイクロインジェクション法による細胞内直接導入に加えて、膜透過型センサー[1,2]を用いた細胞への取り込みも可能である。マイクロインジェクション法は導入する FPT の濃度を調節できるほか、スキルによっては細胞へのダメージを最小限に止められる一方、多数の細胞や組織中細胞への導入には不向きである。これに対し、細胞膜透過型 FPT を用いた細胞導入は先述の弱点を克服するだけでなく、ごく簡便な導入方法である。細胞膜透過性 FPT はカチオン性ユニットを有しており、5w/v%グルコース水溶液として細胞と短時間（10 分程度）共培養するだけで高効率の細胞導入を可能とする。導入条件（濃度と培養時間）は細胞種ごとに最適化が必要であるが、通常 0.01–0.03w/v%で 10 分程度である。これまでに HeLa、COS7、NIH/3T3、CHO、MOLT-4、酵母細胞などでの導入が報告された。なお、細胞膜透過の機構は不明であり、グルコース水溶液以外の溶媒では導入効率が著しく低下する。

細胞膜透過性 FPT を用いた応用として、マウス脳スライスの神経細胞への導入例がある[3]。マウス脳急性スライスを 0.8w/v%の膜透過型 FPT のグルコース水溶液で 10 分培養することで、ほぼ全ての細胞に FPT が導入された。この研究では、マウス脳スライスに導入された FPT の蛍光を蛍光寿命イメージング顕微鏡（FLIM）にて検出することにより、定常状態および刺激依存的な温度分布とその変化の解析に応用した。これにより、脳スライス内の神経細胞にはその種類や部位に応じた不均一な温度分布が存在すること、また脳浮腫において虚血刺激に伴う神経細胞内温度の上昇がその機序の一端であることが発見された[3]。

図. 細胞膜透過型蛍光性ポリマー温度センサー（FPT）とそれを用いたマウス脳スライス細胞の温度イメージング

参考文献:
[1] Hayashi T et al. *PLoS One* 10: e0117677 (2015)
[2] Inada N et al. *Nat. Protoc.* 14: 1293-1321 (2019)
[3] Hoshi Y et al. *J. Neurosci.* 38: 5700-5709 (2018)

温度生物学

THERMAL BIOL.

文部科学省科学研究費補助金「新学術領域研究」

温度を基軸とした生命現象の統合的理解（温度生物学）

http://www.nips.ac.jp/thermalbio/