

文部科学省科学研究費補助金「新学術領域研究（研究領域提案型）」  
**温度を基軸とした生命現象の統合的理解（温度生物学）**

# Thermal Biology

## Newsletter No.1



# Contents 目次

## 領域代表挨拶 01

「分子から個体まで温度が関わる生命現象の解明を目指して」  
富永 真琴（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

## 研究組織 02

総括班

計画班

（研究項目）

A01：「温度センシング」の研究連携

A02：「温度応答システム」の研究連携

## 計画研究の研究概要 03

（研究項目）

A01-1：富永 真琴、高木 昌宏、久原 篤

A01-2：今本 尚子

A01-3：梅田 眞郷

A01-4：原田 慶恵、岡部 弘基

A02-1：中村 和弘、山田 哲也

A02-2：土居 雅夫

A02-3：南 雅文、柴崎 貢志

## 第1回 領域会議：概要 15

会期 平成27年11月29日（日）～30日（月）

会場 北陸先端科学技術大学院大学

## 第1回 領域会議：若手の声 16

小瀬 真吾（理化学研究所）

高橋 圭（東北大学大学院 医学系研究科）

## 本領域の活動 18

シンポジウム開催報告

岡部 弘基（東京大学大学院 薬学系研究科）

## トピックス 19

「心理ストレスによって体温が上昇する仕組み」

中村 和弘（名古屋大学大学院 医学系研究科）

「脂質平面膜法を用いた温度感受性TRPチャネルの機能解析」

内田 邦敏（岡崎統合バイオサイエンスセンター）

## 今後の活動予定・編集後記 25

## 領域代表挨拶

「分子から個体まで温度が関わる生命現象の解明を目指して」



岡崎統合バイオサイエンスセンター

**富永 真琴**

温度は、分子の存在状態と反応性を規定する最も基本的な物理量です。生物においては、エネルギー産生、生体分子の生合成、細胞内外の情報伝達などの生命現象すべてにおいて、温度に影響される生化学的反応が必須の役割を果たしています。さらに、温度は、血圧、代謝、生体リズムをはじめとする様々な生理機能に影響を与えることから、生体の恒常性維持においても最も重要な因子の一つです。カプサイシン受容体TRPV1遺伝子クローニングの成功を契機として、細胞膜上に発現する温度センサー分子の研究が進みました。

一方、細胞内にも温度に応答する分子群が存在しますが、これら細胞内分子と細胞膜分子による2つの温度センシング機構のクロストークを明らかにした研究はこれまでにありません。個体レベルにおいても、生体の温熱恒常性維持を担う神経機構の一端は明らかにされたものの、環境温度変化による代謝や生体リズムの変動機構、体温調節行動の仕組みについては不明のままです。また、細胞小器官の局所温度が変化することが明らかになり、その時空間的な変化が細胞や個体の様々な生理機能に影響を及ぼすことが推定されています。近年、細胞内や臓器内の局所温度を正確に計測・制御する技術が確立されつつあり、その応用によって温度と生命活動についての新しい生物学研究を推進することが可能となってきました。温度研究者は生理学、神経科学、生物物理学、細胞生物学、生化学等、そのバックグラウンドが広く、お互いをあまり知りません。日本が温度研究をリードしている状況から、いろいろな方向から温度に関わる生命現象を研究するグループを作って世界の「温度生物学」を牽引しようと思います。

このような現状を踏まえ、細胞膜と細胞内の温度センシング機構が協働して、細胞が温度を感知し機能発現にいたるメカニズムの解明を進めたいと思います。そして、感知された温度情報が統合され、個体レベルでの体温・代謝調節、生体リズム調節、行動制御などの生理現象にいたる生体メカニズムも明らかにしたいと考えています。加えて、温度分布と温度感知の空間的不均一性と時間的変動の発生機序と生理的役割も明らかにできたらと思います。このように、温度の感知・応答・生体調節・体温制御等、温度に関係する多様な分子や生命現象をこれまでにない視点から捉える「温度生物学」を確立して、生命機能における温度の新たな普遍的役割を追求したいと考えています。「温度生物学」研究に多くの研究者が加わることを期待しています。

# 研究組織

## 総括班

富永 真琴	岡崎統合バイオサイエンスセンター	領域代表・事務局
今本 尚子	理化学研究所	若手・女性研究者育成
梅田 真郷	京都大学大学院 工学研究科	広報・HP管理
原田 慶恵	京都大学 物質-細胞統合システム拠点	リソース・実験技術の管理・普及
中村 和弘	名古屋大学大学院 医学系研究科	若手・女性研究者育成 国際シンポジウム
土居 雅夫	京都大学大学院 薬学研究科	国際シンポジウム
南 雅文	北海道大学大学院 薬学研究院	リソース・実験技術の管理・普及
岡部 弘基	東京大学大学院 薬学系研究科	リソース・実験技術の管理・普及
柴崎 貢志	群馬大学大学院 医学系研究科	リソース・実験技術の管理・普及

## 計画班

### 研究項目A01「温度センシング」の研究連携

#### A01-1 TRPチャンネルおよび膜脂質による温度センシング機構の解明

富永 真琴	岡崎統合バイオサイエンスセンター
高木 昌宏	北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科
久原 篤	甲南大学 理工学部 統合ニューロバイオロジー研究所

#### A01-2 細胞質・細胞核の温度センシング機構の解明

今本 尚子	理化学研究所
-------	--------

#### A01-3 細胞内温度センシングとエネルギー代謝制御機構の解明

梅田 真郷	京都大学大学院 工学研究科
-------	---------------

#### A01-4 細胞内外における局所温度の最先端計測技術の開発と実践

原田 慶恵	京都大学 物質-細胞統合システム拠点
岡部 弘基	東京大学大学院 薬学系研究科

### 研究項目A02「温度応答システム」の研究連携

#### A02-1 体温と代謝の自律性・行動性調節を担う神経回路機構の解明

中村 和弘	名古屋大学大学院 医学系研究科
山田 哲也	東北大学大学院 医学系研究科

#### A02-2 生体の温度センシング・温度応答・体温制御における概日時計機構の役割の解明

土居 雅夫	京都大学大学院 薬学研究科
-------	---------------

#### A02-3 温度による行動制御の基盤となる快・不快情動生成機構の解明

南 雅文	北海道大学大学院 薬学研究院
柴崎 貢志	群馬大学大学院 医学系研究科

# 計画研究の研究概要

計画研究 研究項目A01-1

富永 真琴【とみなが まこと】

自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター (生理学研究所) 細胞生理研究部門 教授

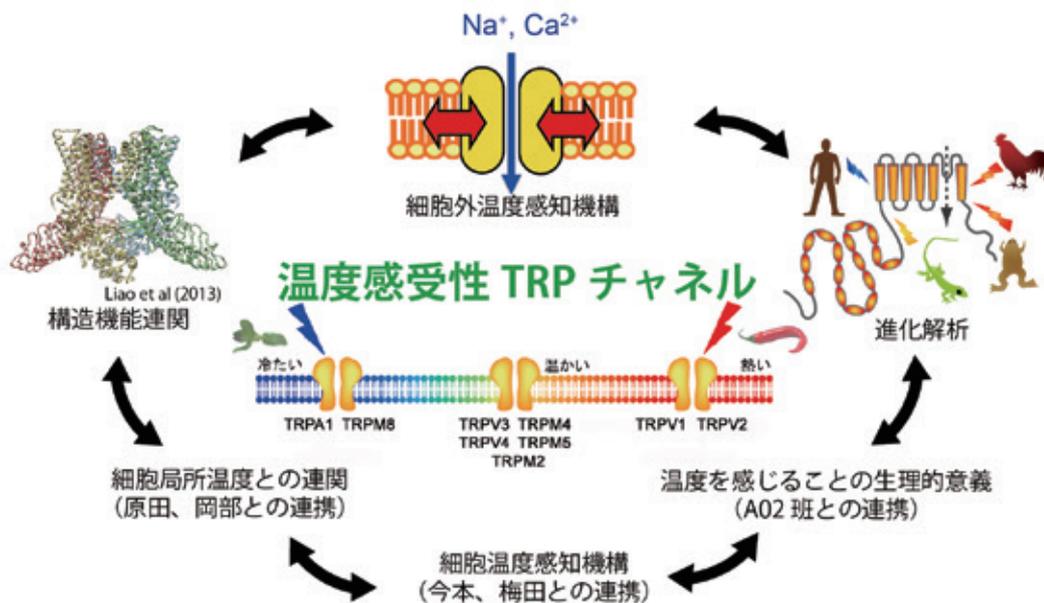


## 研究課題名

TRPチャンネルおよび膜脂質による温度センシング機構の解明

## 研究概要

細胞がどのようにして細胞外環境温度を感知するのかを、細胞膜に発現するイオンチャンネル (温度感受性TRPチャンネル・カルシウム活性化クロライドチャンネル) や膜脂質に焦点をあてて解析する。温度は昆虫から哺乳類までの幅広い生物種において様々な生理機能を制御している。こうした温度感受性TRPチャンネルの生理学的意義の解析を行う。また、「温度がどのようにしてイオンチャンネルの開口をもたらすのか」という疑問に答えるべく、人工脂質二重膜を用いた温度感受性チャンネルの開口機構解析も行う。細胞膜等の局所加熱によって細胞内温度がどのように変化してイオンチャンネル開口につながるかを、共焦点顕微鏡・細胞内温度計測プローブ・IRレーザーを駆使して解析する。加えて、温度感受性TRPチャンネルの進化解析を行う。さらに、他の計画研究との共同研究によって、温度感受性TRPチャンネルが脳神経回路機能やマウス温度依存的行動に及ぼす影響の解明や温度感受性TRPチャンネルとリズム形成機構の連関の解明も目指したい。



## 論文

1. Sun W et al. Lack of TRPV2 impairs thermogenesis in mouse brown adipose tissue. *EMBO Rep.* (in press)
2. Uchida K et al. Stimulation-dependent gating of TRPM3 channel in planar lipid bilayers. *FASEB J.* (in press)
3. Takayama et al. Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 5213-5218 (2015).

計画研究 研究項目A01-1

高木 昌宏【たかぎ まさひろ】

北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科 教授



研究課題名

TRPチャンネルおよび膜脂質による温度センシング機構の解明

研究概要

細胞膜には、イオンや分子を輸送するチャンネルやシグナル分子と結合する受容体が存在しており、温感、冷感などさまざまなシグナル伝達過程に関与するといわれている。細胞膜において、飽和脂質やコレステロールが豊富な秩序相からなる「相分離マイクロドメイン構造」の存在が示唆され、「ラフト」と呼ばれている。

このラフトとよばれる相分離構造形成の背景には、脂質間の疎水的相互作用、さらには頭部における親水的な相互作用（水素結合やイオン結合など）が関係し、そこに含まれる膜受容体やチャンネルは、ラフトの動的挙動（ダイナミクス）の影響を少なからず受けていると考えられるが、その詳細は明らかになっていない。

我々は、膜のダイナミックな構造変化を、2次元（2D）ダイナミクス（ラフトを中心とした膜相分離状態の変化）と、3次元（3D）ダイナミクス（エンドサイトーシス、エキソサイトーシス、オートファジーに代表される膜形態変化）に分類して、温度や膜流動性が相分離構造の変化、そして信号伝達に与える影響について調べる研究を行っている。

具体的には、以下に示す通り人工細胞（細胞サイズリボソーム）を用いた研究と、培養細胞（免疫細胞、神経細胞）を用いた膜ダイナミクス研究を並行して行う。温感、冷感はもちろん、痛み、鎮痛、酸化ストレス、老化（特にアルツハイマー病関連）に焦点を当てて研究を進める計画である。

【研究対象】 膜ダイナミクスと信号伝達

- ・分子間の相互作用から生まれる秩序（自己組織化）
- ・秩序を保ちつつ起こる変化（2D, 3D ダイナミクス）
- ・ダイナミクスと信号伝達
- ・感覚刺激（温感冷感など）と膜ダイナミクス

【研究方法】 人工膜と生細胞の研究を並行

膜ダイナミクス解析（人工細胞・生細胞）

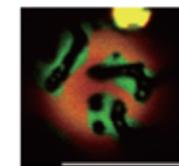
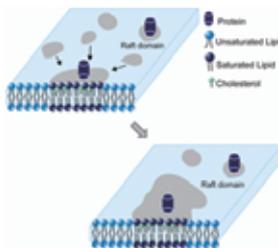
- ・荷電脂質と秩序形成
- ・非対称膜（より生細胞に近いモデル）
- ・膜輸送と細胞骨格

生理活性物質（病原物質含む）と膜ダイナミクス

- ・冷感、温感（メントール、カプサイシン）
- ・痛み、鎮痛（局所麻酔薬）
- ・酸化ストレス、アルツハイマー病（アミロイドβ）（神経細胞毒性モデル）

2次元ダイナミクス  
(相分離構造)

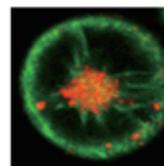
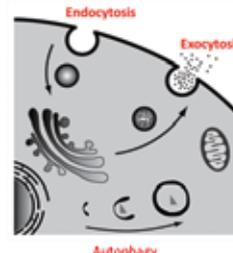
ラフト(相分離構造)の集積



荷電脂質を含む人工膜の相分離構造

3次元ダイナミクス  
(形の変化)

膜構造のダイナミックな変化



細胞のラフト(赤)と微小管(緑)

論文

1. Shimokawa N et al, Physical properties of the hybrid lipid POPC on micrometer-sized domains in mixed lipid membranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17: 20882-20888 (2015).
2. Himeno H et al. Charge-induced phase separation in lipid membranes. *Soft Matter* 10: 7959-7967 (2014).
3. Hamada T et al. Size-dependent partitioning of nano/micro-particles mediated by membrane lateral heterogeneity. *J. Am. Chem. Soc.* 134: 13990-13996 (2012).

計画研究 研究項目A01-1

久原 篤【くはら あつし】

甲南大学 理工学部 生物学科 生体調節学研究室 / 統合ニューロバイオロジー研究所 准教授

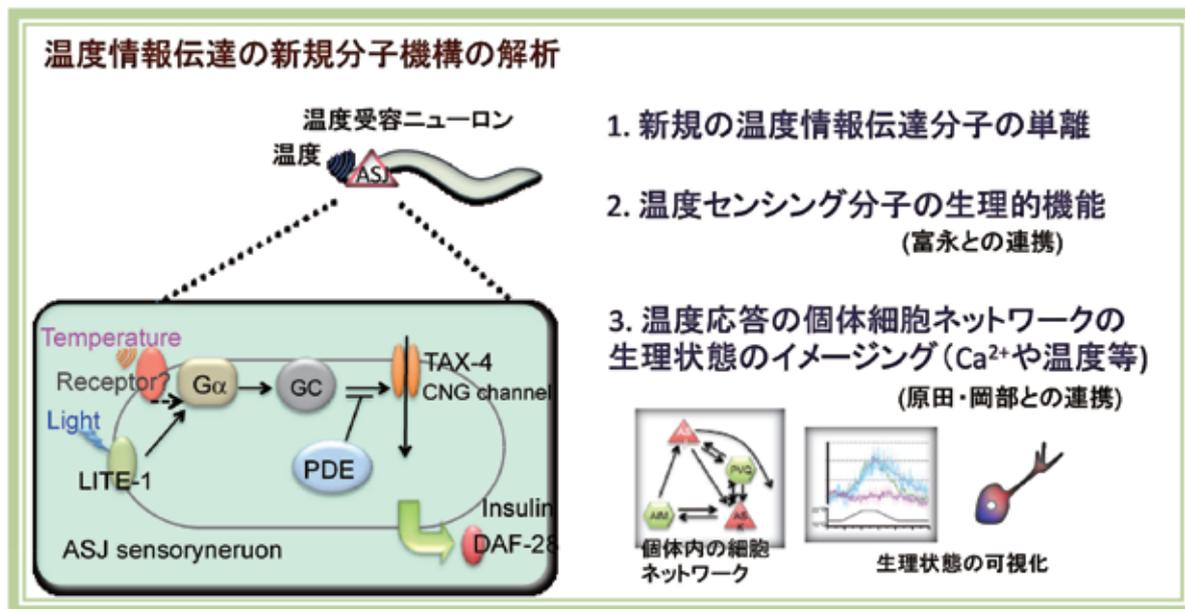


研究課題名

TRPチャンネルおよび膜脂質による温度センシング機構の解明：  
3量体Gタンパク質を介した温度情報伝達の解析

研究概要

動物の温度受容伝達機構の多様性の理解に向け、温度センシング機構における新規の分子の同定をめざす。具体的には、TRPチャンネルに加え、これまでに見つかってきかた3量体Gタンパク質を介した温度情報伝達を解析モデルとして、温度情報伝達と生体の温度応答に関わる新規の分子の単離を行う。解析系としては、シンプルな動物 (*C. elegans*) の温度に対する応答を用いて、トランスクリプトーム解析や遺伝学的解析から、特定の温度刺激や変異体において発現量が変化している遺伝子のプロファイルを作成し、温度情報伝達および生体の温度適応に関わる新規の遺伝子の同定を目指す。また、温度応答時の神経細胞内の温度の測定を行う。感覚情報伝達や生体調節に関わる分子生理機構は、下等動物からヒトまで保存されているものも多いため、新規の温度センシング機構が見つかることが期待される。



論文

- Ohta A, Ujisawa T et al. Light and pheromone-sensing neurons regulate cold habituation through insulin signaling in *C. elegans*. *Nat. Commun.* 5: 4412 (2014).
- Kuhara A et al. Neural coding in a single sensory neuron controlling opposite seeking behaviors in *C. elegans*. *Nat. Commun.* 2: 355 (2011).
- Kuhara A et al. Temperature sensing by an olfactory neuron in a circuit controlling behavior of *C. elegans*. *Science* 320: 803-807 (2008).

計画研究 研究項目A01-2

今本 尚子【いまもと なおこ】

国立研究開発法人理化学研究所 今本細胞核機能研究室 主任研究員

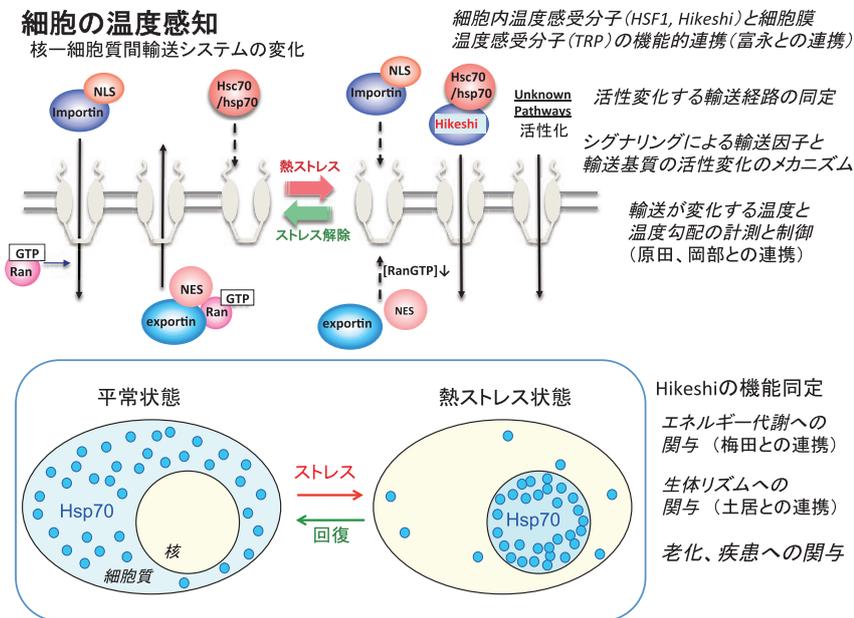


研究課題名

細胞質・細胞核の温度センシング機構の解明

研究概要

環境温度は、遺伝子発現制御の要となる核—細胞質間輸送を変化させることで、細胞の恒常性維持や外界の刺激応答に大きな影響を与えると考えられる。私たちは、平常時に活発に働くImportin輸送が熱ストレス時に低下し、熱ストレス時に分子シャペロンHsp70を核に運ぶHikeshi（火消し）輸送が新たに駆動することを見つけた。Hikeshiをノックダウンすると、細胞は熱ストレスダメージから回復せずに死滅する。Hikeshiを欠失したマウスは生後48時間以内に致死となる。Hikeshiの変異はヒト神経変性疾患を誘引する。このように、Hikeshiの欠失や変異は細胞と個体レベルの生理に思いがけない影響を与えることがわかってきた。核—細胞質間輸送のシステムを変化させる細胞の温度感知機構と、熱ストレスで見つけたHikeshiの未知機能を明らかにする。



論文

1. Edwardson S et al. Leukoencephalopathy and early death associated with an Ashkenzai-Jewish founder mutation in the Hikeshi gene. *J Med. Genet.* (in press)
2. Kimura M et al. Identification of cargo proteins specific for the nucleocytoplasmic transport carrier transportin by combination of an *in vitro* transport system and stable isotope labeling by amino acid in cell culture (SILAC)-based quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 12: 145-157 (2013).
3. Kose S et al. Hikeshi, a nuclear import carrier for Hsp70s, protects cells from heat-shock induced nuclear damage. *Cell* 149: 578-589 (2012).

計画研究 研究項目A01-3

梅田 眞郷【うめだ まさと】

京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻 教授

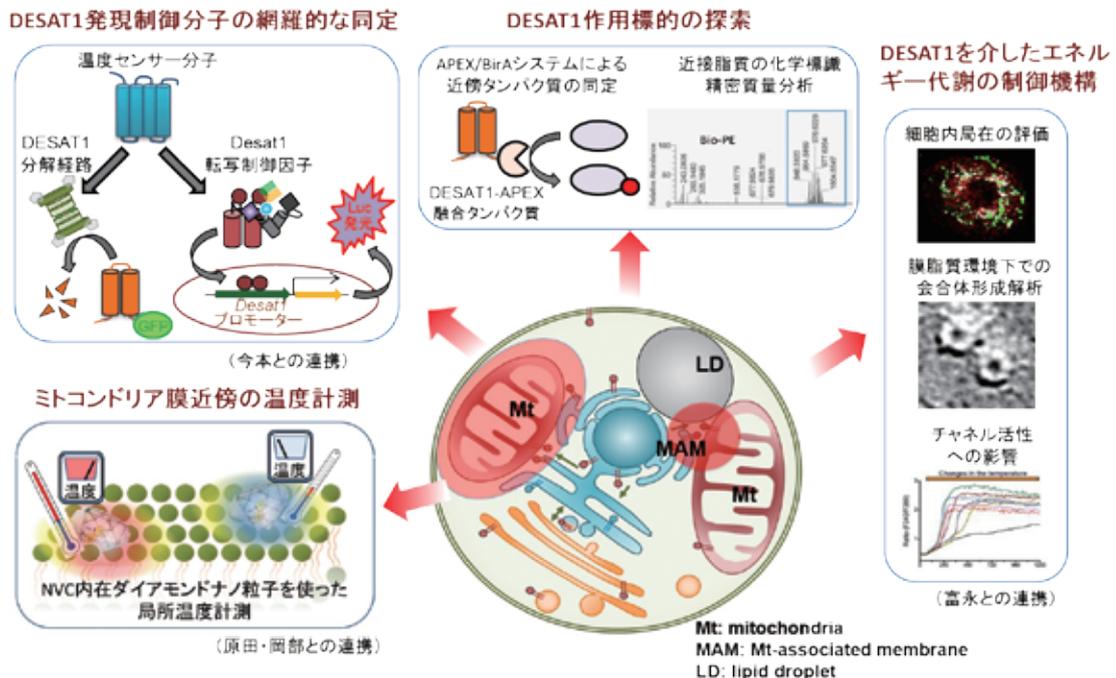


研究課題名

細胞内温度センシングとエネルギー代謝制御機構の解明

研究概要

動物細胞が環境温の変動をいかに感知し、ミトコンドリアを始めとする細胞内エネルギー代謝機構を代償的に変化させているのか、その分子機構を明らかにする。具体的には、細胞内微細局所の温度変化に应答して発現が変動し、エネルギー代謝状態を制御することを見出した脂肪酸不飽和化酵素DESAT1に着目し、その発現制御分子をゲノムワイドRNAiスクリーニングにより網羅的に同定する(図左上)。次に、APEX/BirAシステムと質量分析装置を駆使してDESAT1の作用標的分子を探索する(図中央上)。さらに、同定したDESAT1の発現制御機構とミトコンドリアでのエネルギー代謝と熱産生機構との連関を解明するために、細胞内局所の温度計測(図左下)や細胞生物学的、生化学的および生理学的解析(図右)を行う。これら一連の解析を通して、細胞内での温度センシング機構並びに温度変化に应答したエネルギー代謝の制御機構を体系的に明らかにする。



論文

- Ogawa R et al. Development of a novel tetravalent synthetic peptide that binds to phosphatidic acid. *PLOS ONE* 10: e0131668 (2015).
- Murate M et al. Transbilayer distribution of lipids at nano scale. *J. Cell Sci.* 128: 1627-1638 (2015).
- Takeuchi K et al. Changes in temperature preferences and energy homeostasis in dystroglycan mutants. *Science* 323: 1740-1743 (2009).

計画研究 研究項目A01-4

原田 慶恵【はらだ よしえ】

京都大学 物質-細胞統合システム拠点 教授

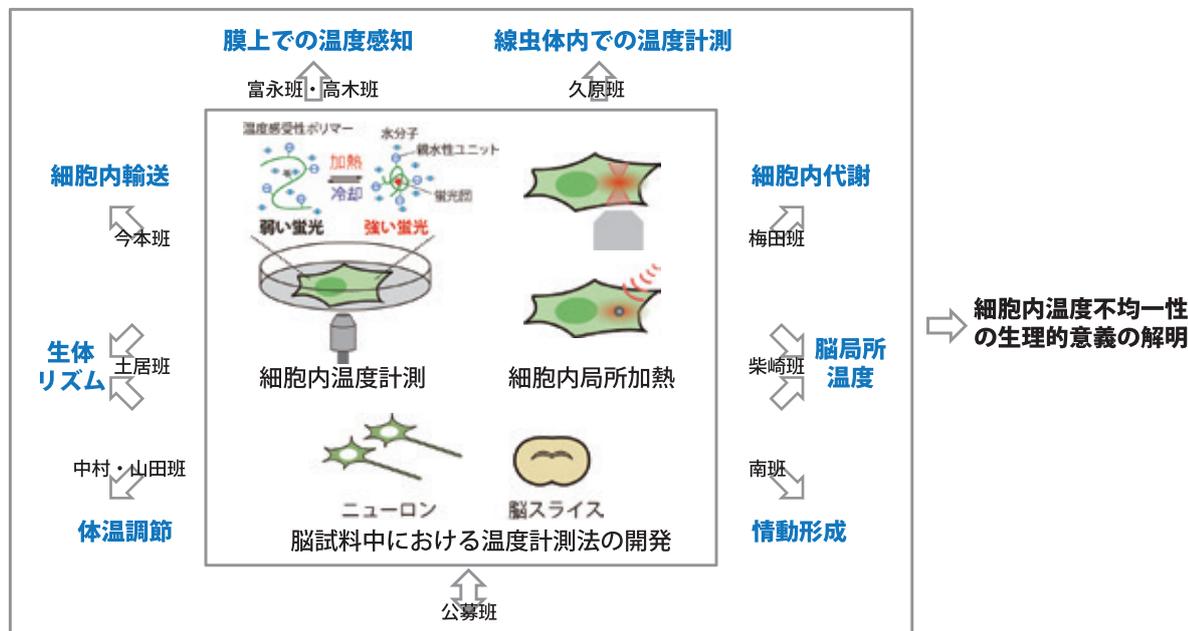


研究課題名

細胞内外における局所温度の最先端計測技術の開発と実践

研究概要

本研究では、定量性及精度に優れた細胞内温度計測・操作法の開発と応用に取りくむ。これまでに、蛍光性ポリマー温度センサーと定量的蛍光イメージング法を組み合わせることにより、生細胞内に細胞機能に関連した有意な温度変化や空間的に不均一な温度分布が存在することを発見した。しかし、この細胞内温度変動の生成機構や細胞における温度センシング機構への関与は不明である。そこで本研究では、細胞内における温度計測法や局所加熱法を用いて細胞内温度の変動やそれを維持する機構を探索するとともに、細胞内温度の刺激応答性、恒常性、周期的変動を調べる。さらに、脳組織試料における細胞内温度計測へ応用し、組織・個体レベルでの温度調節における細胞内温度変化の役割と意義の解明を目指す。



論文

1. Iwasa T et al. Synergistic effect of ATP for RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation. *Sci. Rep.* (in press)
2. Sotoma S et al. Comprehensive and quantitative analysis for controlling the physical/chemical states and particle properties of nanodiamonds for biological applications. *RSC Adv.* 5: 13818-13827 (2015).
3. Yoshinari Y et al. Observing the rotational diffusion of nanodiamonds with arbitrary nitrogen vacancy center configurations. *Phys. Rev. B* 88: 235206 (2013).

計画研究 研究項目A01-4

岡部 弘基【おかべ こうき】

東京大学大学院 薬学系研究科 生体分析化学教室 助教

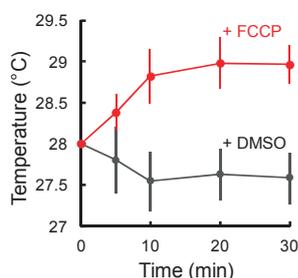
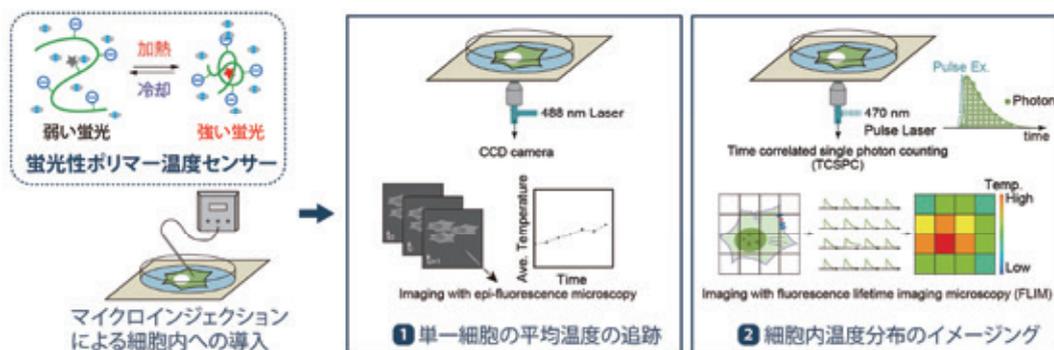


研究課題名

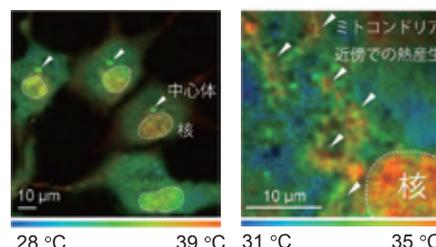
細胞内外における局所温度の最先端計測技術の開発と実践

研究概要

本研究では、計画代表の原田と「細胞内外における局所温度の最先端計測技術の開発と実践」に取り組む。特に、細胞内における温度計測法の改良や細胞内温度に関する新規計測法の開発を行う。さらに、レーザー光や発熱材料を用いて細胞内局所の温度を加熱する方法の開発も合わせて行う。細胞内温度計測と操作法を用いることで、細胞内の温度の出入りを定量的に説明するとともに、A01班員との共同により細胞内温度センシングに関与する分子機構と細胞内温度の変動の関連を説明する。更に、神経細胞や脳組織での温度計測法へと拡張し、A02班員との共同で温度応答を担う生理現象における細胞内温度変動を説明することで、細胞内温度変動の生理的意義の説明を目指す。



ミトコンドリア刺激



定常状態における細胞内温度分布

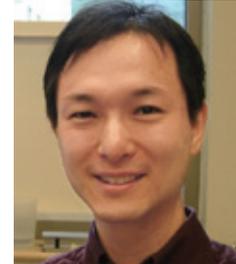
論文

- Okabe K et al. Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Commun.* 3: 705 (2012).
- Zhang J et al. Dynamic association-dissociation and harboring of endogenous mRNAs in stress granules. *J. Cell Sci.* 124: 4087-4095 (2011).
- Gota C et al. Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 2766-2767 (2009).

計画研究 研究項目A02-1

中村 和弘【なかむら かずひろ】

名古屋大学大学院 医学系研究科 細胞科学講座 統合生理学分野 教授

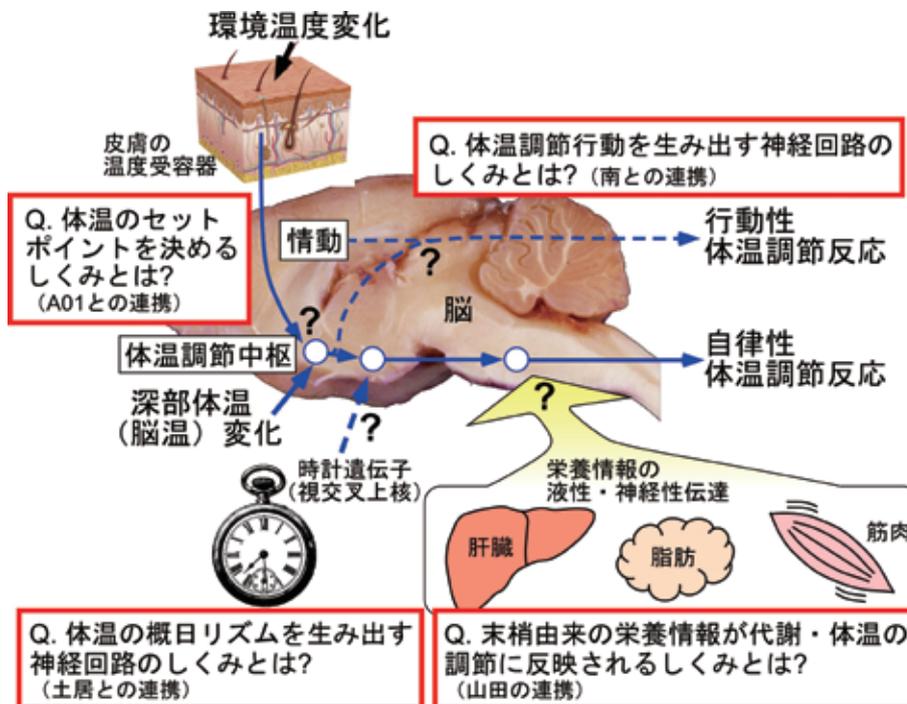


研究課題名

体温と代謝の自律性・行動性調節を担う神経回路機構の解明

研究概要

温熱恒常性は恒温動物の生命活動に必須の性質である。本研究では、温熱恒常性の新たな中枢機構をラット・マウスの個体レベルで解明する。そのために、研究代表者が得意とする*in vivo*電気生理学、神経解剖学、光遺伝学などの手法と、本学術領域内の細胞内・脳内局所温度計測・制御技術や研究分担者の代謝解析技術を駆使し、温度生物学研究のフロンティアを開拓する以下の重要問題に取り組む。1) 体温調節中枢が体温のセットポイントを決める仕組みとは? 2) 末梢のエネルギー貯蔵器官からの栄養情報が脳の体温調節系へ作用する仕組みとは? 3) 体温調節行動を生み出す脳の温度感覚や情動回路の仕組みとは? 4) 体温の概日変化がリズム中枢から体温調節系へ作用する神経機構とは? 温熱恒常性の仕組みに関するこれらの新知見を通じて、本領域の目標「温度を基軸とした生命現象の統合的理解」に貢献する。



論文

1. Kataoka N et al. Psychological stress activates a dorsomedial hypothalamus–medullary raphe circuit driving brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia. *Cell Metab.* 20: 346-358 (2014).
2. Nakamura K et al. A thermosensory pathway mediating heat-defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 8848-8853 (2010).
3. Nakamura K et al. A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nat. Neurosci.* 11: 62-71 (2008).

計画研究 研究項目A02-1

山田 哲也 [やまだ てつや]

東北大学大学院 医学系研究科 内科病態学講座 糖尿病代謝内科学分野 准教授

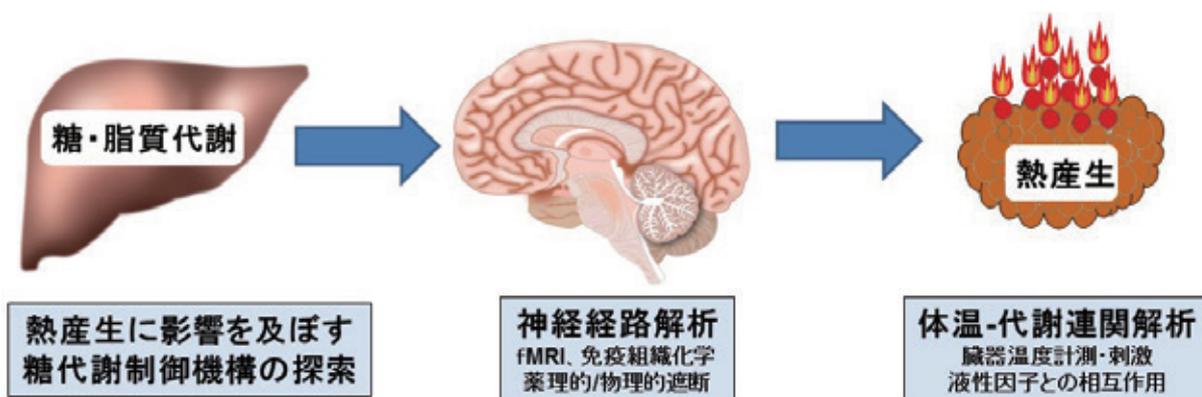


研究課題名

体温と代謝の自律性・行動性調節を担う神経回路機構の解明

研究概要

哺乳類は恒温性を維持する為に、摂取したエネルギーの相当量を熱産生に消費している。近年、ヒト成人にも存在することが明らかとなった褐色脂肪組織は、熱産生に特化した組織であり、体温調節や個体レベルでのエネルギー消費において重要な役割を担っている。我々は、内臓脂肪での熱産生亢進を端緒とする摂食抑制シグナル(論文3)や肝臓から発信され褐色脂肪の熱産生を制御するシグナル(論文1、2)など、エネルギー代謝と体温調節のクロストークに神経ネットワークが重要な役割を果たしていることを世界に先駆けて発見した。本研究では、「肝臓の代謝変化が、褐色脂肪の熱産生に影響を及ぼすメカニズム」に重点を置き、体に備わっている熱産生とエネルギー代謝調節のクロストークのメカニズムを解明する。具体的には、①新しい肝臓-褐色脂肪関連の発見、②脳内の情報統御機構、③レプチン、インスリンなど液性シグナルとの脳内での相互作用の解明を目指す。



論文

1. Tsukita S et al. Hepatic glucokinase modulates obesity predisposition by regulating BAT thermogenesis via neural signals. *Cell Metab.* 16: 825-832 (2012).
2. Uno K et al. Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity *Science* 312: 1656-1659 (2006).
3. Yamada T et al. Signals from intra-abdominal fat modulate insulin and leptin sensitivity through different mechanisms: neuronal involvement in food-intake regulation.. *Cell Metab.* 3: 223-229 (2006).

計画研究 研究項目A02-2

土居 雅夫【どい まさお】

京都大学大学院 薬学研究科 医薬創成情報科学専攻 システムバイオロジー分野 准教授

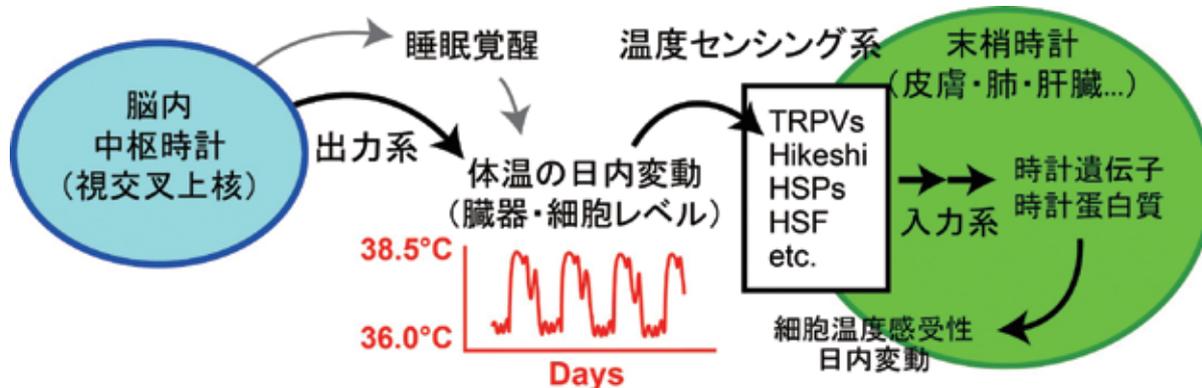


研究課題名

生体の温度センシング・温度応答・体温制御における概日時計機構の役割の解明

研究概要

体内時計に焦点を当て、温度変化が体内時計の位相を変化させる仕組み、脳内のサーカディアンリズム中枢が体温の日内変動を生み出すための神経回路、個体・組織・細胞内の局所温度のサーカディアンリズム、ならびに、温度センシングにおける昼夜の温度感受性変化を生み出す分子機構を解明する。温度が影響を与える生理現象は多岐に渡るが、その中でも温度が細胞時計の時刻をシフトさせるという現象は温度というインプットと時刻の変化というアウトプットが明確に定義された非常に単純なシステムであり、単一細胞内の分子レベルにおいて温度と概日時計の接点を探ることが可能となる。本研究ではこの細胞レベルでの温度概日時計連絡機構を明らかにすると共に、生体レベルにおける体温変動の発生機序、それに伴う局所体温変化、温度センシング機構の時間依存性を追跡し、温度情報の発生から受容プロセスに至るすべての過程を統合的に理解することを目指す。



温度と体内時計に関する本研究計画の概念図

論文

1. Doi M et al. Gpr176 is a Gz-linked orphan G-protein-coupled receptor that sets the pace of circadian behaviour. *Nat. Commun.* (in press)
2. Doi M et al. Circadian regulation of intracellular G-protein signalling mediates intercellular synchrony and rhythmicity in the suprachiasmatic nucleus. *Nat. Commun.* 2: 327 (2011).
3. Doi M et al. Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient *Cry*-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nat. Med.* 16: 67-74 (2010).

計画研究 研究項目A02-3

南 雅文【みなみ まさぶみ】

北海道大学大学院 薬学研究院 医療薬学部門 医療薬学分野 薬理学研究室 教授

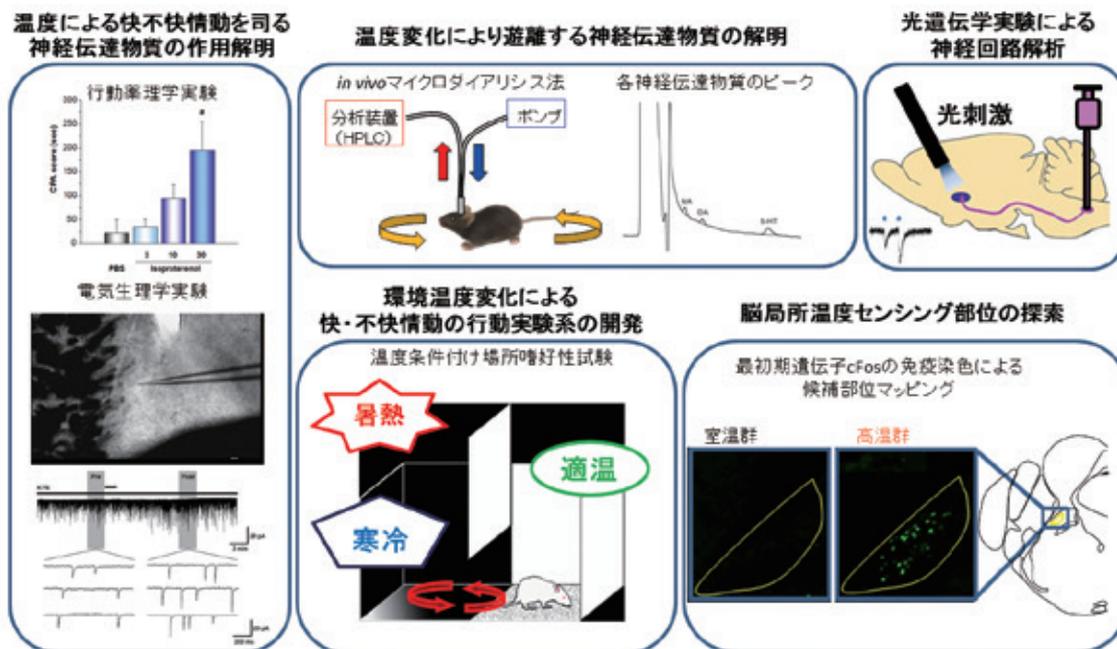


研究課題名

温度による行動制御の基盤となる快・不快情動生成機構の解明

研究概要

環境温度選択は、多くの動物に共通してみられる体温調節機構であり、「行動性体温調節」と呼ばれるが、これには、温度により惹起される快・不快情動が重要である。快情動による場所の選好である「場所嗜好性」と不快情動による場所の忌避である「場所嫌悪性」により、場所すなわち環境温度の選択がなされる。本研究では、不快情動生成に重要である扁桃体・分界条床核内神経情報伝達と、快情動生成に重要である側坐核内神経情報伝達に着目し、0~40℃の温度環境での快・不快情動生成の神経機構を明らかにする。さらに、脳局所温度計測・制御デバイスを活用し、領域内での共同研究を密に進めることにより、脳局所温度センシングによる快・不快情動生成と代謝・生体リズム制御の分子機構や生体リズムに起因する脳局所温度変化の生理的意義を明らかにする。



論文

1. Ide S et al. Opposing roles of corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y within the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis in the negative affective component of pain in rats. *J. Neurosci.* 33: 5881-5894 (2013).
2. Kudo T et al. Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice. *J. Neurosci.* 32: 18035-18046 (2012).
3. Deyama S et al. Activation of the  $\beta$ -adrenoceptor-protein kinase A signaling pathway within the ventral bed nucleus of the stria terminalis mediates the negative affective component of pain in rats. *J. Neurosci.* 28: 7728-7736 (2008).

計画研究 研究項目A02-3

柴崎 貢志【しばさき こうじ】

群馬大学大学院 医学系研究科 脳神経発達統御学講座 分子細胞生物学分野 准教授



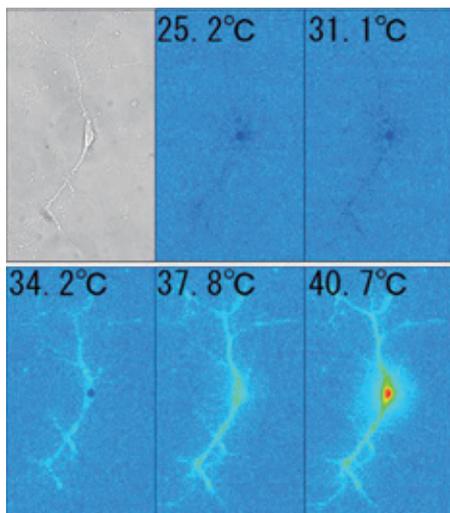
研究課題名

温度による行動制御の基盤となる快・不快情動生成機構の解明：  
脳内温度による恒常的神経活動向上の分子基盤解明

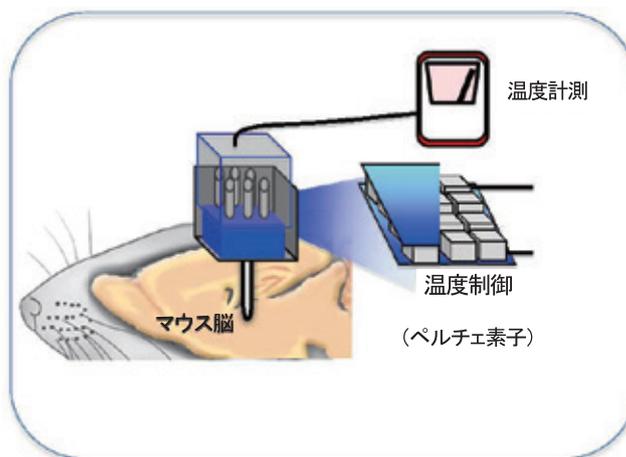
研究概要

ヒトなどの哺乳類は脳内の温度を37℃付近に保つために多くのエネルギーを費やしている。しかし、なぜ脳の温度を37℃に保つのかという理由にはあまり目が向けられてこなかった。我々は体温程度の温度（34℃以上）により活性化する温度センサー・TRPV4が脳内温度により恒常的に活性化し、神経細胞が興奮しやすい土台環境を産み出していることを突き止めた。この知見は、脳内温度を情報源として、これを翻訳し、神経情報伝達に活かす機構の存在を意味している。本研究では、脳内温度によるTRPV4活性化の下流シグナルの同定を行う。同時に、臓器局所の温度測定システムを応用した脳局所ごとの温度分布の解析や臓器局所の加温・冷却システムを用い、脳内温度変動が神経活動に及ぼす影響を個体レベルで検討する。てんかんや神経変性疾患における脳内温度の変化やTRPV4活性化変動も解析し、脳内温度による恒常的神経活動向上の分子基盤解明を目指す。

TRPV4 を介した神経活動の向上



臓器局所の温度計測・制御



(南との連携)

(リソースとして班員への技術指導)

論文

1. Shibasaki K et al. TRPV4 activation at the physiological temperature is a critical determinant of neuronal excitability and behavior. *Pflügers Archiv*. 467: 2495-2508 (2015).
2. Shibasaki K et al. A novel subtype of astrocytes expressing TRPV4 regulates neuronal excitability via release of gliotransmitters. *J. Biol. Chem.* 289: 14470-14480 (2014).
3. Shibasaki K et al. Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potential by TRPV4. *J. Neurosci.* 27: 1566-1575 (2007).

## 第1回 領域会議：概要

会期：平成27年11月29日（日）～30日（月）

会場：北陸先端科学技術大学院大学

### 計画班員による研究発表

#### A01「温度センシング」

TRPチャンネルによる温度センシング機構の解明

富永 真琴

2次元、3次元膜ダイナミクスと細胞信号伝達

高木 昌宏

温度適応の分子生理機構

久原 篤

細胞質・温度センシング機構の解明

今本 尚子

昆虫のユニークなエネルギー代謝と体温調節の分子機構

梅田 真郷

細胞内外における局所温度の最先端計測技術の開発と実践

原田 慶恵・岡部 弘基



#### A02「温度応答システム」

体温と代謝の自律性・行動性調節を担う神経回路機構の解明

中村 和弘

肝臓と褐色脂肪組織による臓器連関がエネルギー代謝調節に及ぼす影響の解明

山田 哲也

概日時計 温度生理学研究のプラットフォーム

土居 雅夫

温度による行動制御の基盤となる快・不快情動生成機構の解明

南 雅文

てんかん原性域の局所温度上昇に伴う病態悪化と温度センサーTRPV4

柴崎 貢志



## 第1回 領域会議：若手の声



### 小瀬 真吾

国立研究開発法人理化学研究所 今本細胞核機能研究室 専任研究員

新学術領域研究「温度生物学」の第1回班会議は、2015年11月29-30日に北陸先端科学技術大学院大学で開催されました。初回の班会議でしたが、計画代表者だけでなく、大学院生なども含め総勢約40名の参加者で行われました。私は、計画研究今本班の連携研究員として参加させて頂きました。班会議では、富永領域代表による領域発足の挨拶から始まり、各計画研究概要の紹介と議論が、翌日は、領域全体の研究方向性の確認や今後の行事内容と日程等について議論されました。今回は計画班のみの班会議ということもあり、各計画研究の詳細については別項を参照して頂き、私自身がこの研究領域に参加することになった経緯と班会議に参加しての感想をごく簡単に述べさせて頂きたいと思います。

私は細胞内の核—細胞質間タンパク質輸送についての研究を行ってきました。本研究領域は「温度」をキーワードに様々な生命現象を理解することを目指していますが、過去の自分の研究を振り返ってみると「温度」というものが案外キーワードになっていたことに気づかされました。最初は、運搬体分子 Importin  $\beta$  の核膜孔通過に関する解析です。分子の選択的な核膜孔通過過程は、ATP/GTPなどの加水分解反応を伴う温度・エネルギー依存的な反応であ

ると考えられていました。しかし、Importin  $\beta$  はそのような加水分解反応を使用せずに低温下でも核膜孔を通過できることを初めて示しました。そして次に、本研究領域参加のきっかけとなった運搬体分子 Hikeshi の同定です。熱ストレス時には、通常温度時とは異なり、Hikeshi 依存的な輸送経路が活性化することで分子シャペロン HSP70 を核に運ぶことを明らかにしました。しかし、熱ストレスを細胞がどのように感知し、Hikeshi 輸送経路が活性化するのか、その仕組みは不明なままです。

私達は熱ストレスというやや非生理的温度とも言える刺激を中心に解析を行ってきました。しかし、Hikeshi が熱以外のストレスや個体発生にも機能していることを示唆するデータが得られつつあります。かつて熱ショックタンパク質と呼ばれた分子群も、その後、分子シャペロンという普遍的機能が明らかになり、研究分野が大きく発展しました。本研究領域では、計画研究だけでも、モデル生物は多岐に渡り、技法も最先端のものです。計画班による共同研究も既に活発に開始されており、「温度」という視点を通して、自分たちが想像していなかった生命分子機構を明らかにしていければと考えています。





## 高橋 圭

東北大学大学院 医学系研究科 糖尿病代謝内科学分野 助教

私どもは研究者であると同時に医師でもあり、東北大学病院糖尿病代謝科で主として糖尿病や肥満患者さんを診療しています。糖尿病は血糖値が高くなる病気、肥満は体重が重くなる状態です。血糖値や体重は、全身にある各臓器の代謝状態の総和で決まると理解されています。各臓器の代謝がどのように連携し、その結果として個体レベルで代謝の総和が調節制御されているかについてはまだ十分に解明されていませんが、それらを発見し、臨床応用できれば、国内外に大勢いる患者さんを健康に保ち、さらには医療費抑制などの形で社会全体に貢献できるため、大変やりがいのある仕事に取り組んでいると考えています。

熱産生に特化した組織である褐色脂肪組織は、エネルギー代謝において重要な役割を担っており、近年非常に注目されています。これまでも、主として実験動物を用いた研究により褐色脂肪組織に関する様々な基礎的な知見が明らかになりつつありますが、まだ多くのことが未知であります。褐色脂肪組織はヒト成人にも存在することから、基礎研究から得られる知見はヒトに応用できる可能性を秘めています。私どもは現在、実験動物およびヒトの両方に焦点を当てて褐色脂肪組織ならびに他臓器との連関に関する研究を進めて

おり、温度生物学の研究成果を臨床現場で生かすことを目指しています。

領域会議には、私の上司である研究分担者の山田准教授とともに参加しました。会場ではたくさんの先生方が私どもの研究内容に興味を持って下さり、関心の高さをうれしく思いました。多くのご質問やご意見なども頂戴しましたので、それらを励みに今後の研究に取り組んでまいります。また、諸先生方の研究発表を拝聴し、実に多様で独創的な研究が行われていることに驚きました。十分に理解できなかった部分もありましたが、きちんと勉強していけるように頑張ります。今後ともご指導いただきますよう、よろしくお願い申し上げます。



# 本領域の活動

## シンポジウム開催報告：「温度生物学の幕開け」

東京大学大学院 薬学系研究科 生体分析化学教室 助教  
岡部 弘基

学会名：第53回日本生物物理学会年会

開催日時：2015年9月13日（日） 13:00-16:20

会場：金沢大学 角間キャンパス 自然科学本館

シンポジウムタイトル：温度生物学の幕開け The Dawn of Thermal Biology

オーガナイザー：岡部 弘基・久原 篤

### プログラム

- 岡部 弘基・船津 高志（東京大学大学院 薬学系研究科）  
「生細胞内における温度計測と操作による温度生物学」
  - 服部 一輝・一條 秀憲（東京大学大学院 薬学系研究科）  
「ASK1 signaling regulates brown adipocyte maturation」
  - 富永 真琴（自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター）  
「TRPチャンネルによる温度感知の分子機構」
  - 中村 和弘（名古屋大学大学院 医学系研究科）  
「体温の中樞神経調節」
  - 今本 尚子（理化学研究所）  
「熱ストレスで駆動する核-細胞質輸送を担うHikeshi」
  - 大山 廣太郎・鈴木 団・石渡 信一（早稲田大学 理工学術院）  
「局所熱パルス法による単一細胞の機能制御」
- 宇治澤 知代・大西 康平・三浦 徹・太田 茜・○久原 篤（甲南大学 理工学部、統合ニューロバイオロジー研究所）  
「線虫*C. elegans*における経験に依存した低温馴化機構」

久原篤先生と私は生物物理学会年会において、新学術領域研究温度生物学との共催によりシンポジウム「温度生物学の幕開け」をオーガナイズした。

物理量である温度は、細胞内生化学反応や細胞内外の情報伝達などを司るだけでなく、代謝やリズムといった生理機能に影響を与えている。さらに近年、生物物理学分野においては、細胞内に適応可能な分子温度センサーや定量的イメージング技術の進展から、細胞内温度計測への挑戦が始まろうとしている。これらの研究から得られた、細胞内部の局所的な温度が時空間的に変動するとの発見は、古典的生化学における緩慢な温度変化とは本質的に異なり、ダイナミックな生命現象におけるシグナリングに貢献している可能性がある。

このような背景のもと、温度を基軸とした生物学の新たな領域の開拓を目指す本領域の生物物理学領域への紹介と、温度という最も根本的な物理因子がどのように生物学として寄与しうるかの議論を目的に、細胞・個体の両階層を標的とした最新の温度生物学研究者を招待した。

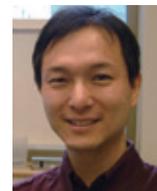
シンポジウムは、学会初日午後という学会期間中最もシンポジウムの多い時間帯にも関わらず盛況であった。演者からは、膜上の温度感受性TRPチャンネル、ヒートショック応答や褐色脂肪組織での熱産生、体温調節や低温馴化の神経回路といった温度の感知と応答に関する最新生物学研究に加えて、細胞内温度計測や細胞の局所熱刺激による細胞応答といった生物物理学研究が紹介された。全体を通して、多岐にわたる分野縦断の特徴が強く、議論も内容の理解に向けたものが多数を占めた。シンポジウムに対する評価としては、新規性の高い科学的側面が好評であった半面、専門分野の極めて大きな広がりによる相乗的取りくみや有機的連携への困難さといった今後の課題も浮き彫りとなった。これらを今後の新学術領域研究の発展に生かすとともに、研究が進んだ将来における分野の成熟化も強く期待したい。最後に、素晴らしい講演をして頂いた演者の先生方に深く御礼申し上げる。

# トピックス

## 心理ストレスによって体温が上昇する仕組み

名古屋大学大学院 医学系研究科 統合生理学分野 教授

中村 和弘



### はじめに

温度は生体内のあらゆる分子（蛋白質、脂質、糖鎖など）の構造や機能に大きな影響を与えます。したがって、生体内の温度、つまり体温は生命活動にとって非常に重要な意味を持ちます。特に、人間を含めた恒温動物は、環境温度にかかわらず、深部体温を一定に保つ能力を持ちます。例えば、寒い環境では、筋肉がふるえることで積極的に熱を産生し、環境中に失われる熱を補うことによって深部体温の低下を防ぎます。最近では、褐色脂肪組織という特殊な脂肪組織で代謝を上げて熱を産生する、非ふるえ熱産生と呼ばれる現象も知られるようになってきました。暑い環境では、皮膚の血流を増やし、汗をかくことで体内の熱を積極的に環境中へ放散し、体温の上昇を防ぎます。

恒温動物のこのような体温調節反応はすべて、脳内の神経回路システムによって制御されます。私達の研究グループは、これまでに、体温調節反応を制御する基本的な神経回路とその仕組みを明らかにしてきました（参考文献1, 2）。この体温調節の神経回路は、寒冷環境や暑熱環境で体温を一定に保つだけでなく、感染や飢餓などの様々な環境ストレスから生命を守るためにも機能することがわかってきました。例えば、感染時には、この神経回路が熱産生を亢進させ、また、熱放散を抑制することで、体温を上昇させます。これが、誰もが風邪をひいた時に経験する発熱とよばれる生体防御反応です。体温を上昇させることで、体内に侵入した病原体の増殖至適温度よりも高い温度にしてその増殖を抑制するとともに、一部の免疫細胞の病原体攻撃活性を亢進させます。

私達は最近、この神経回路が心理ストレスに反応して体温を上昇させることを見出しました。心理ストレスによって体温が上昇する反応は、多くの哺乳動物で観察されます。このストレス反応の生物学的意義として、野生動物が天敵に狙われた際に素早く体温を上昇させることで神経系や筋肉を温め、それによって身体パフォーマンスを上げることで、「戦うか逃げるか」という生命の危機をより有利に切り抜けることを可能にしていると考えられています。しかし一方で、現代社会では人間関係ストレスなどの社会的なストレスによって、生活に支障を来すほどの体温上昇が生じる心因性発熱に苦しんでいる患者さんも多くおられます（参考文献3）。心因性発熱にしても、動物で見られるストレス性体温上昇にしても、風邪の時に飲む解熱剤は効きませんので、このストレス症状は治療が難しいのが現状です。したがって、この体温上昇を引き起こす仕組みを理解する研究は大きな意義を持っています。

### 心理ストレスによって活性化される神経細胞

心理ストレスによる体温上昇の仕組みを調べるために、私達は、ラットの個体関係によって生じる社会心理ストレスモデルである社会的敗北ストレスを用いて実験を行いました（参考文献4）。このストレスを受けたラットでは、すぐに褐色脂肪組織での熱の産生が起こり、それによって体温は2℃程度上昇します（図1-A；参考文献4, 5）。

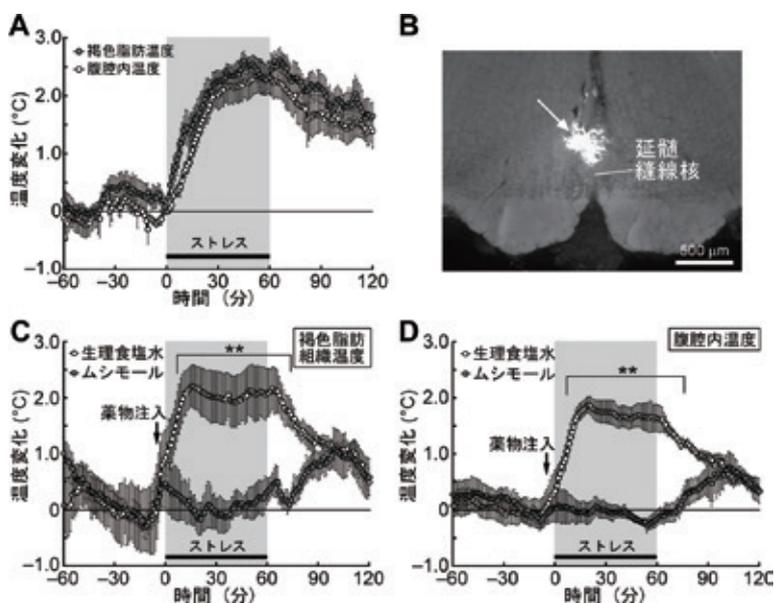


図1. 心理ストレスを受けたラットの褐色脂肪熱産生と体温上昇  
A：社会的敗北ストレスを受けたラットの褐色脂肪組織温度と腹腔内温度（深部体温）の上昇。B-D：延髄縫線核への神経抑制剤（ムシモール）の微量注入（B）は、社会的敗北ストレスによる褐色脂肪熱産生（C）と体温上昇（D）を抑制した（\*\* $P < 0.01$ ）。参考文献4より改変して転載。

そこでまず、心理ストレスによって活性化される脳内の神経細胞を探索すると、延髄の縫線核と呼ばれる部位に分布する交感神経プレモーターニューロンが活性化されることを見つめました（図2-A）。この交感神経プレモーターニューロンは、褐色脂肪熱産生や皮膚血管収縮の調節を通じて体温調節に関わることを私達が以前に報告した神経細胞群でした（参考文献6）。つまり、心理ストレスの信号によって延髄縫線核の交感神経プレモーターニューロンが活性化され、それによって褐色脂肪熱産生をはじめとする体温上昇の交感神経反応が惹起される可能性が示唆されました。

次に、延髄縫線核へ心理ストレス信号を伝達する上流の神経細胞を探索するために、神経伝達とは逆向きに運ばれる神経トレーサーを延髄縫線核に注入しました（図2-B）。すると、視床下部の背内側部と呼ばれる部位の神経細胞がたくさんトレーサーで標識されました。さらに、社会的敗北ストレスをラットに与えると、これらの標識された細胞が活性化されました（図2-C, D；参考文献4）。つまり、この神経細胞

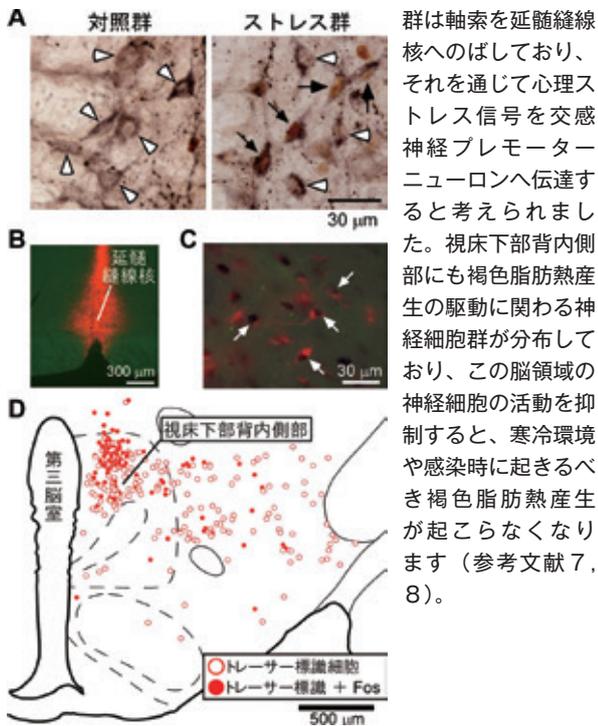


図2. 心理ストレスによる交感神経プレモーターニューロン (A) と視床下部背内側部ニューロン (B-D) の活性化  
A: 延髄縫線核のVGLUT3陽性 (交感神経プレモーター) ニューロン (黒色) が社会的敗北ストレスによって神経活性化マーカーのFos (茶色) を発現した (右、矢印)。参考文献5より改変して転載。B-D: 延髄縫線核へ逆行性神経トレーサー (赤色) を注入すると (B)、視床下部背内側部の多数の神経細胞体が標識され、社会的敗北ストレスを与えると、標識細胞の多くがFosを発現した (C, D)。Cは視床下部背内側部のトレーサー標識ニューロン (赤色) におけるFos (黒色の細胞核) の発現 (矢印) を示す。参考文献4より改変して転載。

**心理ストレス性体温上昇を駆動する神経伝達路**

このように、通常の体温調節や感染時の発熱に機能する延髄縫線核や視床下部背内側部の神経細胞が心理ストレスで活性化されることがわかりましたが、こうした神経細胞は本当に心理ストレスによる体温上昇に機能するのでしょうか？この点を明らかにするために、私達は、神経活動を抑制する薬物を延髄縫線核あるいは視床下部背内側部へ微量注入しました (図1-B)。その結果、社会的敗北ストレスによる褐色脂肪熱産生ならびに体温上昇反応は消失しました (図1-C, D; 参考文献4)。したがって、心理ストレスで活性化された延髄縫線核と視床下部背内側部の神経細胞が心理ストレス性体温上昇に機能すると考えられました。また、さらなる解析から、視床下部背内側部から延髄縫線核の交感神経プレモーターニューロンへは、グルタミン酸を使った神経伝達が行われており、それによって心理ストレス性体温上昇が駆動されることが示唆されました。しかし、視床下部背内側部から延髄縫線核へはこのような直接の神経伝達以外にも、中間の中継核を介した間接路も存在するため、本当に視床下部背内側部から延髄縫線核への直接の神経伝達が心理ストレス性の褐色脂肪熱産生や体温上昇を駆動できるのかは疑問でした。

私達は、この点をさらに検証するため、最新の光遺伝学の技術を用いて、特定の2つの脳領域間の神経伝達を特異的に光刺激する実験を行いました (図3)。光を受けると開口

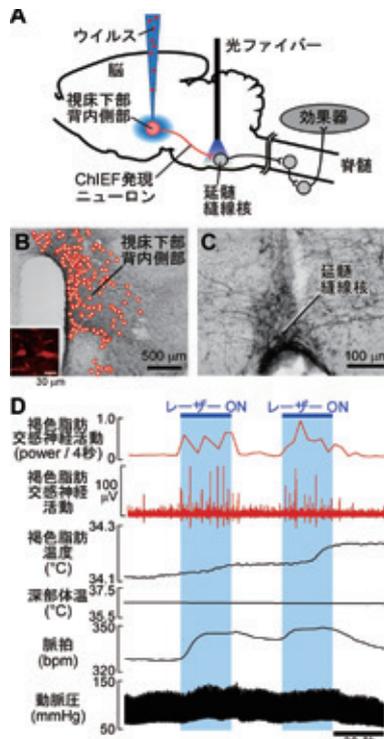


図3. 視床下部背内側部から延髄縫線核への直接の神経連絡を光刺激する実験

ウイルスを使って視床下部背内側部のニューロンにChIEFを発現させると (A)、細胞体 (B、挿入写真、赤丸は分布を示す) だけでなく、延髄縫線核へ伸びた軸索終末にもChIEFが輸送された (C)。光ファイバーを脳に挿入して延髄縫線核に光照射すると (A)、褐色脂肪組織の交感神経活動と温度、脈拍、動脈圧が上昇した (D)。参考文献4より改変して転載。

すると、褐色脂肪組織の交感神経活動が活性化し、褐色脂肪熱産生が起こりました。また同時に、脈拍と血圧 (動脈圧) も上昇し、まるで心理ストレスを受けたときと同じような生理反応が生じました (図3-D)。この実験結果から、視床下部背内側部から延髄縫線核への直接の神経伝達が心理ストレス性の熱産生や頻脈などを駆動することがわかりました (図4; 参考文献4)。



図4. 心理ストレスによる交感神経反応 (褐色脂肪熱産生と頻脈) と神経内分泌反応 (ストレスホルモン分泌) の駆動メカニズム

心理ストレスの信号が視床下部背内側部へ入力されると、2種類の神経細胞群が活性化される。一つの細胞群 (赤) は延髄縫線核へ軸索をのばしており、グルタミン酸を放出することにより交感神経プレモーターニューロンを活性化する。それにより、交感神経系の活性化を通じて褐色脂肪熱産生と頻脈が生じ、体温が上昇する。一方、視床下部背内側部のもう一つの神経細胞群 (緑) はストレス信号を視床下部室傍核へ送り、そこから下垂体-副腎皮質内分泌系を介してストレスホルモンを分泌させる。参考文献4, 9より改変して転載。

ChIEFを発現した視床下部背内側部の神経細胞体を光で刺激しても、同様に褐色脂肪熱産生や脈拍上昇が起こりますが、延髄縫線核にグルタミン酸受容体拮抗薬を微量注入しておくことで、それらの反応は抑制されました(参考文献4)。したがって、やはり熱産生や頻脈を駆動する視床下部背内側部から延髄縫線核への神経伝達は、グルタミン酸を伝達物質として使う、興奮性の伝達であることがわかりました(図4)。さらに、視床下部背内側部からは、交感神経系を介して熱産生を駆動する信号だけでなく、内分泌系へ働きかけてストレスホルモンを分泌させる信号も出力されることを見出しました(図4;参考文献4)。このように、視床下部背内側部は、心理ストレスの信号を交感神経系と内分泌系へ伝達することで、ストレスに対する多様な自律生理反応を駆動する中枢として機能すると考えられます。

#### おわりに

これらの私達の研究から、多様な温度環境で深部体温の恒常性を守り、感染したときには発熱を起こすことで生命を守る体温調節の神経回路が、心理ストレスによる熱産生や体温上昇にも機能することを明らかにしました。私達がラットで観察した心理ストレス性体温上昇は一過性のストレス反応ですが、継続的に強いストレスを与えると、人間で見られるような慢性的な心因性発熱のような状態にもなります。ストレス反応が慢性化する仕組みはまだわかっておらず、それを明らかにすることで、根本的な治療が難しい心因性発熱の画期的な治療法の開発につながる可能性があります。

私達が証明した視床下部背内側部から延髄縫線核への神経伝達は、心理ストレスの熱産生だけでなく、寒冷時の熱産生や感染時の発熱をも駆動すると考えられます。寒冷時や感染時には、視床下部背内側部は体温調節中枢(視索前野)からの信号を受けて熱産生を駆動しますが、心理ストレスの信号は、情動や心理ストレスを処理する大脳辺縁系などの脳領域から視床下部背内側部へもたらされると考えられます。しかし、その仕組みは明らかになっていません。心理ストレス性体温上昇に機能する神経回路をたどっていくと、もしかしたら、私達が「情動」や「ストレス」と呼ぶものの脳内での実体が見えてくるかもしれません。それはまさに、温度生物学が秘めた大きな可能性といえます。

#### 参考文献

1. Nakamura K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301: R1207-R1228 (2011).
2. 中村和弘: 体温調節の中樞神経機構. *日本臨牀* 70: 922-926 (2012).
3. Oka T et al. Mechanisms of psychogenic fever. *Adv. Neuroimmune Biol.* 3: 3-17 (2012).
4. Kataoka N et al. Psychological stress activates a dorsomedial hypothalamus-medullary raphe circuit driving brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia. *Cell Metab.* 20: 346-358 (2014).
5. Lkhagvasuren B et al. Social defeat stress induces hyperthermia through activation of thermoregulatory sympathetic premotor neurons in the medullary raphe region. *Eur. J. Neurosci.* 34: 1442-1452 (2011).
6. Nakamura K et al. Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. *J. Neurosci.* 24: 5370-5380 (2004).
7. Nakamura Y et al. Direct pyrogenic input from prostaglandin EP3 receptor-expressing preoptic neurons to the dorsomedial hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 22: 3137-3146 (2005).
8. Nakamura K et al. Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292: R127-R136 (2007).
9. 中村和弘: 心理ストレスと体温上昇. *Brain Nerve* 67: 1205-1214 (2015).

## 脂質平面膜法を用いた温度感受性TRPチャネルの機能解析

生理学研究所 (岡崎統合バイオサイエンスセンター) 細胞生理研究部門 助教  
内田 邦敏



### はじめに

イオンチャネルの解析は、主に、培養細胞などの異所的発現系にパッチクランプ法などの電気生理学的手法を適用して行われます。しかし、これらの方法では、イオンチャネルそのものの機能を正確に捉えられない場合もあります。脂質平面膜法は、水、塩類、脂質、精製膜タンパク質のみで構成される単純な再構成系であり、その大きな特徴の一つが、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す。温度は細胞内の酵素をはじめとするすべての分子の活性・動きに影響を与えることから、温度依存的なイオンチャネル機能の解析には単純な再構成系が必要であり、脂質平面膜法は有用な実験法の一つであると言えます。今回、私は温度依存性TRPチャネルの一つで侵害熱刺激受容に参与することが報告されているTRPM3チャネルの脂質平面膜法を用いた解析に成功しましたので、その結果並びに脂質平面膜法についてご紹介します。

### 脂質平面膜法を用いたイオンチャネルの解析

イオンチャネルの機能解析は、主に、カエル卵母細胞や培養細胞への異所的発現系に電気生理学的手法 (パッチクランプ法など) を適用して行われます。イオンチャネル解析のための脂質平面膜法とは、生体膜の代わりに人工的に調製した脂質二重膜にチャン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、水、塩類、脂質、精製膜タンパク質のみの再構成系です。この実験系の大きな特徴は、水、塩類、脂質及び膜タンパク質の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す。イオンチャネル研究のために脂質平面膜法を適用する理由は、1) チャン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そもそも実験が不可能な場合、などが挙げられます。その方法には、チェンバー法とリポソームパッチクランプ法などがあります。いずれの場合もサンプル調製の基本的な手順は同じですが、チェンバー法は他の方法と比較して、簡便で安定的に測定が可能です (参考文献1)。チェンバー法は、あらかじめテフロンシートに開けた口径50~200 $\mu$ mの穴に脂質二重膜を貼り、そこへ精製したイオンチャネルタンパク質を膜融合により埋め込みます。イオンチャネルの活性は、2相の溶液間を行き来するイオンの流れを各相に浸した電極によって検出します (図1)。脂質平面膜法を用いた解析は、イオノフォアをモデルとした研究から始まり、その後、結晶構造解析がなされた原核生物由来のカリウムチャネル (KcsA) などを用いた研究が多くなされています。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した。2009年、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 (参考文献2, 3) を契機として、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ります。

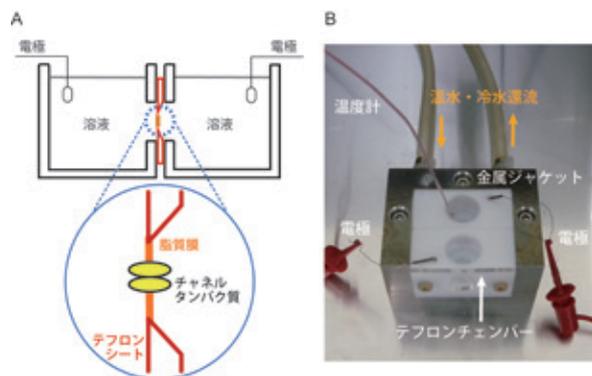


図1. 脂質平面膜法

A: 2つの溶液層で50-200 $\mu$ mの穴の開いたテフロンシートを挟んで固定します。穴に人工的に脂質膜を貼り、そこにチャンネルタンパク質 (本研究ではTRPM3チャネル) を入れます。チャンネルを通して溶液層間を移動するイオンの流れを電極で検出します。B: 実際のチェンバーの写真。2つの溶液相がネジで固定されており、金属ジャケット内に固定されています。金属ジャケット内を水が還流するようになっており、温水もしくは冷水を還流することで温度を変化させることができます。溶液温度を温度計で測定しています。

### 温度感受性TRPチャネル

TRP (transient receptor potential) チャネルは非選択的な陽イオンチャネルであり、機械刺激などの物理刺激から辛み物質、ステロイドなど多くの刺激にตอบสนองする多刺激受容体というユニークな性質を持ちます。そのうち10のTRPチャネルは温度依存性を持ち、温度センサーとして機能していることが明らかになりつつあり、これらのチャネルは「温度感受性TRPチャネル」とも呼ばれます (図2)。主に感覚神経や皮膚に発現する温度感受性TRPチャ

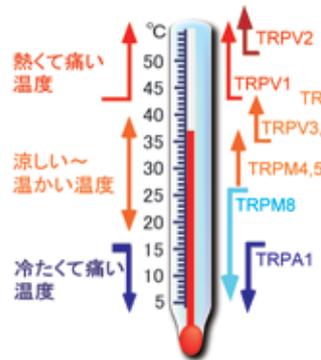


図2. 温度感受性TRPチャネル

現在までに10の温度感受性TRPチャネルが報告されており、低温から高温までの幅広い温度域をカバーしています。その中でも、例えばTRPV1が43 $^{\circ}$ C以上で活性化されるように明確な温度閾値を持っているチャネルとTRPM4, 5のように明確な閾値を持たないものもあります。TRPM3は電気生理学的解析が少なく、明確な閾値を持つかどうかは明らかになっていません。

ネル (TRPV1、TRPV2、TRPM3、TRPM8、TRPA1、TRPV3、TRPV4) は外界温度を感じるセンサーとしての機能を持っていると考えられています。また、温度感受性TRPチャネルは大きな温度変化に暴露されない深部臓器にも発現しており、温度センサー以外の生理的役割があると考えられています。しかし、例えば脳神経に発現するTRPV4が体温で活性化されることが神経の興奮性に重要であることが報告された(参考文献4)ように、近年、深部体温を感じるものが生理機能維持に重要な役割を担っている可能性も示唆され始めています。このように生理機能が明らかにされつつある一方で、温度感受性TRPチャネルが温度をどのように感じているか、言い換えると、温度感受性TRPチャネルが温度によって開口するメカニズムはいくつかのアプローチからの検討がなされているものの、その答えは未だ全く得られておりません。その要因の一つには、温度が細胞内の酵素や脂質の流動性も含めすべての分子の活性・動きに影響を与えることから、カエル卵母細胞や培養細胞などを用いた異所的発現系の解析では温度感受性TRPチャネルそのものの機能を捉えることが難しいという点があげられます。温度依存的なイオンチャネル活性化メカニズムを知るためには単純な再構成系が必要であり、脂質平面膜法は有用な実験法の一つであると言えます。

#### 脂質平面膜法を用いたTRPM3チャネルの機能解析

TRPM (melastatin) 3チャネルは、ストア作動性イオンチャネルの1つとしてクローニングされたカルシウム透過性の高い非選択的陽イオンチャネルです。その生理的役割はあまり明らかにされていませんが、神経ステロイド(硫酸プレグネノロン)や電位作動性カルシウムチャネル阻害剤であるニフェジピンによって活性化されることが報告されています(参考文献5)。2013年、TRPM3チャネルの温度依存性が報告され、TRPM3ノックアウトマウスの解析から侵害熱刺激受容に関与していることが報告されました(参考文献6)。しかし、温度によるTRPM3チャネル活性化に関する詳細な検討はないため、今回、私は脂質平面膜法を用いてTRPM3チャネルの機能解析を行うことにしました。TRPM3チャネルタンパク質N末にmycタグを付加したタンパク質をHEK293細胞に強制発現させ、DDMにより可溶化しました。可溶化サンプルから抗myc抗体を用いた免疫沈降法によりTRPM3チャネルタンパク質を精製し、これを脂質二重膜に埋め込み、電気生理学的な解析を行いました。その結果、TRPM3チャネルの活性化剤であるニフェジピンは用量依存的にTRPM3チャネルを活性化しました(図3)。一方、硫酸プレグネノロンは単独処置では活性化がみられず、培養細胞を用いた既報とは異なる結果となりました。近年、PIP<sub>2</sub>がTRPチャネルの活性に必須な脂質という報告があることから、硫酸プレグネノロン存在下でPIP<sub>2</sub>を添加したところ、強いTRPM3チャネルの活性がみられました。興味深いことに、ニフェジピンで活性化した場合はTRPM3チャネルのコンダクタンスは電位に関係なく15 pSでしたが、硫酸プレグネノロンとPIP<sub>2</sub>存在下では膜電位が正の時は23 pS、膜電位が負の時は15 pSと電位依存的に変化することがわかりました。脂質(PIP<sub>2</sub>)によってTRPM3チャネルの電位依存性が変化することが示唆されました。

TRPM3チャネルの温度依存性について検討した結果、42℃まで温度を上昇させてもTRPM3チャネルの活性はみ

られません(図4A)。一方、ニフェジピン存在下ではコンダクタンスが高温になるほど大きくなる傾向が認められましたが、その温度依存性はとても小さいものでした(図4B)。また、温度依存的な開口確率の大きな変化も認められませんでした。一方、PIP<sub>2</sub>存在下では温度依存的な活性化がみられましたが、その温度依存性は他の温度感受性TRPチャネルと比較して小さいものでした。以上の結果から、温度依存的なTRPM3チャネル活性化には、この再構成系に存在しない何らかの因子が重要な役割を担っている可能性が示唆さ

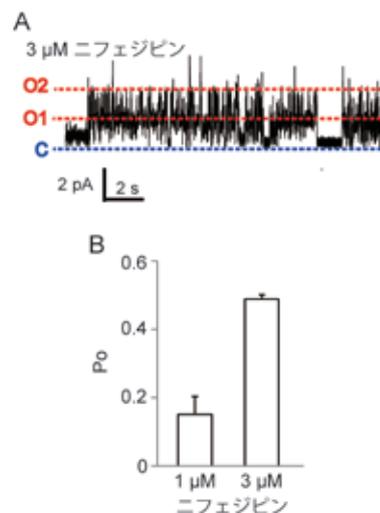


図3. ニフェジピンによるTRPM3チャネルの活性化  
A. 膜電位+100mVにおける3μMニフェジピンによるTRPM3活性化。この場合は、少なくともTRPM3チャネルが2つ開いていること(O2)が確認できます。B. TRPM3の開口確率(Po)はニフェジピンの濃度が高いほど大きくなります。  
れしました。(参考文献7)

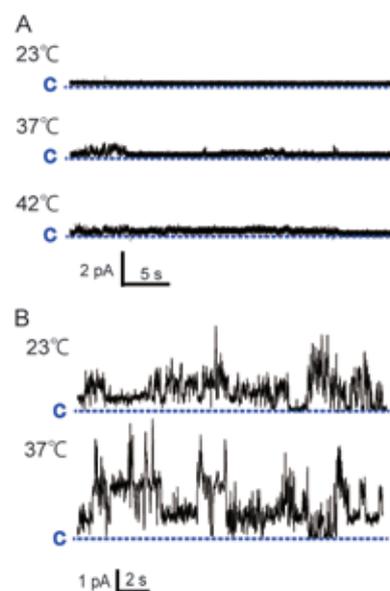


図4. 温度依存的なTRPM3チャネルの活性化  
A. 温度を42℃まで上昇させてもTRPM3チャネルの活性化はみられなかった。この場合、膜にTRPM3チャネルが再構成されていることを確認するために、低濃度のリガンドが添加されています。B. 3μMニフェジピン存在下でのTRPM3チャネル活性は室温(23℃)から37℃まで上昇させても大きな変化はみられませんでした。

## おわりに

今回はTRPM3チャンネルを例に、脂質平面膜法について紹介しました。TRPM3チャンネルの温度依存的な活性化が直接的な作用でないという知見は、この単純な実験系によって初めて得られた結果です。一方で、TRPM8チャンネルやTRPV1チャンネルでは脂質の条件等の違いはありますが、少なくとも再構成系でも温度依存的な活性化はみられており(参考文献3, 8)、温度感受性TRPチャンネル群の中でもその活性化メカニズムは大きく異なる可能性があります。このように、単純な人工再構成系を用いることが、細胞膜温度センサーであるTRPチャンネルが温度を感知し電気信号に変換するメカニズムの理解につながると期待されます。近年、多くの平面膜を機械的にいくつも同時に張りチャンネル活性を測定するハイスループットシステム(参考文献9)、非対称膜を作製した上で溶液の高速還流を可能にした方法(Contact bubble bilayer法、参考文献10)などいくつもの新しい再構成系の手法が開発されてきています。これにより、他の電気生理学的手法よりも高効率なイオンチャンネルの機能解析が可能となることも期待されます。今後は、結晶構造解析、蛍光イメージング技術や高速原子間力顕微鏡などを用いたタンパク質構造を動的に観察する技術から得られる知見と電気生理学的な機能解析とを組み合わせることで、イオンチャンネルの構造機能連関の理解を深めていきたいと考えています。

## 謝辞

TRPM3の機能解析は、イリノイ大学医学部Eleonora Zakharian先生との共同研究により実施しました。現在、脂質平面膜法の研究は、所属研究室である岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理研究部門富永真琴教授のご指導のもと行っております。また、福井大学医学部老木成稔先生並びに岩本真幸先生より多くの助言を賜りました。ご協力を賜りました先生方に、心より御礼申し上げます。

## 参考文献

1. 老木成稔：チャンネル分子研究のための脂質平面膜法, 最新パッチクランプ実験技術法(岡田泰伸/編), pp153-183, 吉岡書店(2011)。
2. Zakharian E et al. Inorganic polyphosphate modulates TRPM8 channels. *PLOS ONE*. 4: e5404 (2009).
3. Zakharian E et al. Gating of TRPM8 channels activated by cold and chemical agonists in planar lipid bilayers. *J. Neurosci*. 30: 12526-12534 (2010).
4. Shibasaki K et al. TRPV4 activation at the physiological temperature is a critical determinant of neuronal excitability and behavior. *Pflügers Archiv*. 467: 2495-2507 (2015).
5. Wagner TF et al. TRPM3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic  $\beta$  cells. *Nat. Cell Biol*. 10: 1421-1430 (2008).
6. Vriens J et al. TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 70: 482-494 (2011).
7. Uchida K et al. Stimulation-dependent gating of TRPM3 channel in planar lipid bilayers. *FASEB J*. in Press (2015).
8. Cao et al. TRPV1 channels are intrinsically heat sensitive and negatively regulated by phosphoinositide lipids. *Neuron* 77: 667-679 (2013)
9. Kawano R et al. Automated parallel recordings of topologically identified single ion channels. *Sci. Rep.* 3: 1995 (2013).
10. Iwamoto M et al. Contact bubble bilayers with flush drainage. *Sci. Rep.* 16: 9110 (2015).

## 今後の活動予定

### 2016年3月24日 (木) 第93回日本生理学会大会にてシンポジウム

「温度生物学～温度と生命の関わり合い～」(中村、富永)

会場：札幌コンベンションセンター

### 2016年6月15日 (水) 第68回日本細胞生物学会大会にてシンポジウム

「温度生物学の創成(展開を目指して)」(原田、今本)

会場：京都テルサ

### 2016年6月28日 (火)～29日 (水) 第2回領域会議

会場：札幌市教育文化会館

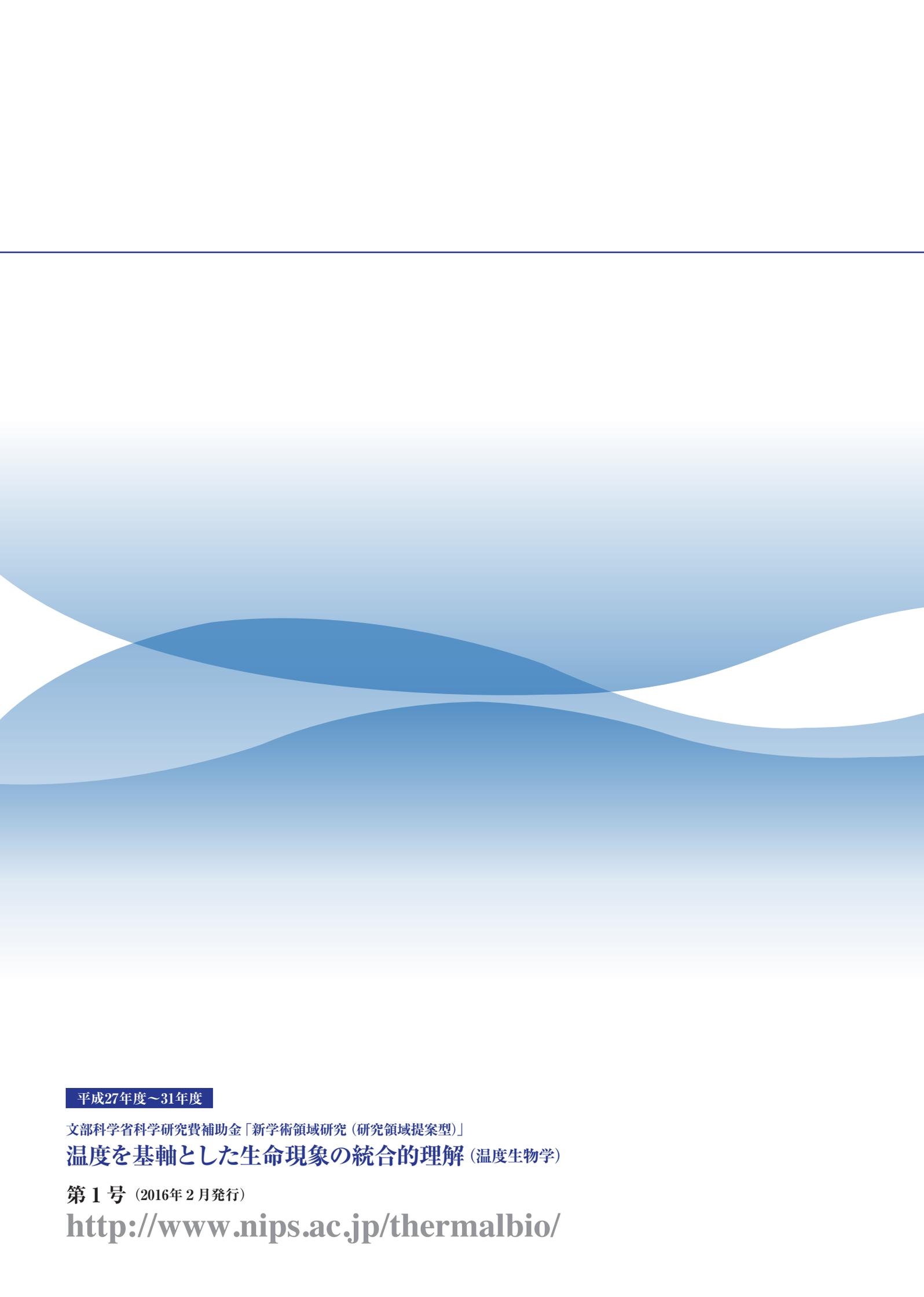
---

## 編集後記

京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻 教授  
梅田 眞郷

大学での教養科目として「温度生物学概論」を開講してから10年となり、当初は10名程度であった受講生も最近は100名を越えるようになった。特に文系の学生の数も増え、法学や経済学の思わぬ視点からの読み応えのあるレポートも楽しめるようになってきた。単位取得率の高い“神科目”としての評判ばかりでなく、若い人も「温度」と生物や社会との関わりに興味を持つようになってきたのだと、自分には言い聞かせている。今後は、「石の上にも三年」の言葉通り3度目のチャレンジで採択された「温度生物学」研究の成果を、出来るだけ多くの方々に伝えられるよう努力していきたい。

今回の創刊号は手探りの状態であったが、原・長尾・山口の研究室スタッフ諸氏により紙面のデザイン・構成・編集作業の方針が決定され、スタートを切ることが出来た。年末の忙しい中に原稿をお送り頂いた研究班員の方々、表紙のデザイン画を提供して頂いたGuardian Design代表・中洲幸氏と共に、ここに感謝申し上げたい。最後に、今後とも紙面の向上に努めて参りますので、「温度生物学」ホームページ(<http://www.nips.ac.jp/thermalbio/>)上のfacebookにご意見・ご感想をお寄せください。



平成27年度～31年度

文部科学省科学研究費補助金「新学術領域研究（研究領域提案型）」

**温度を基軸とした生命現象の統合的理解**（温度生物学）

第1号（2016年2月発行）

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