

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.3



# Contents 目次

<b>領域代表挨拶</b> 「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)	01
<b>研究組織</b> 総括班 計画班、公募班 (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	02
<b>計画班の研究成果</b> A01: 富永 真琴、高木 昌宏、久原 篤、内田 邦敏、今本 尚子、 梅田 眞郷、原田 慶恵、岡部 弘基 A02: 中村 和弘、山田 哲也、土居 雅夫、南 雅文、柴崎 貢志	04
<b>第3回 領域会議：概要</b> 会期：2017年1月19日(木)～20日(金) 会場：自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター	17
<b>第3回 領域会議：若手の声</b> 江藤 圭 (生理学研究所) 大屋 愛実 (名古屋大学大学院 医学系研究科)	18
<b>第2回 若手の会：概要</b> 会期：2017年1月18日(水) 会場：西浦温泉 ホテル東海園	20
<b>本領域の活動</b> 国際共同研究加速基金活動報告 富永 真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター) 原 雄二 (京都大学大学院 工学研究科) 増田 周作 (東京大学大学院 理学系研究科) 学会・シンポジウム開催報告 梅田 眞郷 (京都大学大学院 工学研究科) 齋藤 茂 (岡崎統合バイオサイエンスセンター) 岡部 弘基 (東京大学大学院 薬学系研究科) 富永 真琴 (岡崎統合バイオサイエンスセンター) 柴崎 貢志 (群馬大学大学院 医学系研究科) アウトリーチ活動報告 高木 昌宏 (北陸先端科学技術大学院大学)	21
<b>トピックス</b> 「侵害熱センサー・TRPV2が有する特殊な生理機能；メカノセンサーとして神経回路形成を促進」 柴崎 貢志 (群馬大学大学院 医学系研究科) 「プロリン水酸化抑制を介したTRPA1の冷感受性獲得機構」 中川 貴之 (京都大学 医学部附属病院)	30
<b>温度生物学 用語集 作成のお知らせ</b>	36
<b>今後の活動予定</b>	37
<b>編集後記</b>	

## 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**

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)」が3年目を迎え、昨年4月に公募班員23名 (A01 10名、A02 13名) が加わってからも1年が経ちました。広範なバックグラウンドの研究者が集まり、領域内連携も少しずつ進んでいることを1月に岡崎で開催された第3回領域会議で実感しました。また、その直前の「若手の会」で本研究領域を推進していってくれるであろう若い研究者の熱意を目の当たりにしました。本新学術領域 (5年) も中盤にさしかかり、領域としての成果を出していかなければならない時期です。研究連携をさらに推進していきたいと思っています。

「温度がいかに感知されて、それがどのように生物の応答を導くか」という疑問に答えを出すことを目指していますが、分子レベルから個体レベルまですべての生物学的現象は温度に影響を受けることから、「生命における温度の機能的意義 (存在意義?) とは何か?」という生命科学の大きな問題にも挑戦していこうと考えており、それは、「温度生物学」という「既存の学問分野の枠に収まらない新興・融合領域」の創成につながると思います。

昨年度は、多くの学会で共催シンポジウムを開催して「温度生物学」の概念周知につとめました。4月には、IMPACTというイギリスの科学雑誌 (Impact is a series of high-quality, open access and free to access science reports designed to enable the dissemination of research impact to key stakeholders. The publication features content from the world's leading research agencies, policy groups, universities and research projects.) が私たちの新学術領域研究「温度生物学」を紹介してくれました。9月には、領域として初めて京都で公開国際シンポジウムを開催します。こうした企画を通して、我が国発の「温度生物学」研究を世界に向けて発信していきたいと考えています。

# 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	大阪大学 蛋白質研究所	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 先端科学技術研究科
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
内田 邦敏	福岡歯科大学 口腔歯学部

#### 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	大阪大学 蛋白質研究所
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

## 公募班

### A01班 「温度センシング」の研究連携

西山 賢一	岩手大学 農学部附属寒冷バイオフィロンティア研究センター
小野 崇人	東北大学大学院 工学研究科
井上 飛鳥	東北大学大学院 薬学研究科
大倉 正道	埼玉大学大学院 理工学研究科
藤原 祐一郎	大阪大学大学院 医学系研究科
中野 雅裕	大阪大学 産業科学研究所
井藤 彰	九州大学大学院 工学研究院
佐藤 陽子	東亜大学 医療学部
江藤 圭	生理学研究所
神谷 厚範	国立循環器病研究センター

### A02班 「温度応答システム」の研究連携

深田 吉孝	東京大学大学院 理学系研究科
武田 憲彦	東京大学大学院 医学系研究科
酒井 寿郎	東京大学 先端科学技術研究センター
田中 光一	東京医科歯科大学 難治疾患研究所
神吉 智丈	新潟大学大学院 医歯学総合研究科
塩見 邦博	信州大学 学術研究院 繊維学系
中川 貴之	京都大学 医学部附属病院
藤田 潤	京都大学大学院 医学研究科
小川 涉	神戸大学大学院 医学系研究科
浅野 知一郎	広島大学大学院 医歯薬保健学研究院
野村 真	京都府立医科大学大学院 医学研究科
高橋 将文	自治医科大学 分子病態治療研究センター
中村 隼明	基礎生物学研究所



# 計画班の研究成果

## 計画研究 研究項目A01

**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

HP : <http://www.nips.ac.jp/cs/>

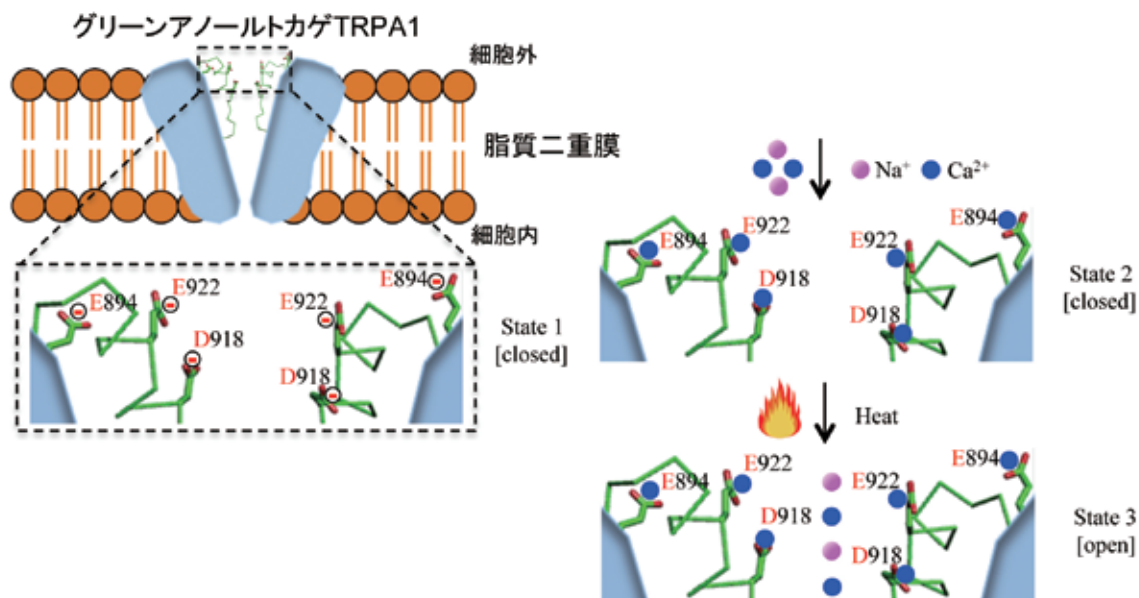


### 研究課題名

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

- ①進化におけるカエルの温度感受性変化とTRPV1の熱感受性の変化：アフリカツメガエルと西ツメガエルはともにアフリカに生息するが、生息域の環境温度が異なり、アフリカツメガエルはより高温刺激への感受性が強い。アフリカツメガエル熱センサーTRPA1の熱感受性は西ツメガエルTRPA1より強かった。今一つの熱センサーTRPV1の熱感受性も2つのカエルで異なり、アフリカツメガエルTRPV1は繰り返し熱刺激で脱感作し、西ツメガエルTRPV1は逆に感作して、その活性が次第に大きくなった。アフリカツメガエルTRPV1と西ツメガエルTRPV1のキメラ体解析および点変異体解析によって、この機能の違いに関わるアンキリンリピートドメインの3つのアミノ酸残基を同定した。アフリカツメガエルTRPV1と西ツメガエルTRPV1では、カプサイシン感受性も異なり、それに関わる1つのアミノ酸残基も同定した。
- ②グリーンアノールトカゲTRPA1の熱による活性化への細胞外Ca<sup>2+</sup>の必要性：グリーンアノールトカゲTRPA1 (gaTRPA1)は細胞外にCa<sup>2+</sup>が存在するときのみ約35度の熱刺激で活性化する。一方、AITCのような化学物質刺激による活性化には細胞外Ca<sup>2+</sup>は関係ない。gaTRPA1の熱による活性化は細胞外Ca<sup>2+</sup>濃度依存性だが、熱による活性化温度閾値は影響を受けないことが明らかとなった。ニワトリTRPA1とヘビTRPA1の機能解析とそれらのアミノ酸比較によって、gaTRPA1のポアに近い細胞外ドメインの3つの酸性アミノ酸を中性化することによって熱による活性化能が生じることが明らかになった。(下図)



### 論文

1. Saito et al. Evolution of heat sensors drove shifts in thermosensation between *Xenopus* species adapted to different thermal niches. *J. Biol. Chem.* 291: 11446-11459 (2016).
2. Kurganov et al. Heat and AITC activate green anole TRPA1 in a membrane-delimited manner. *Pflüger Archiv. Eur. J. Physiol.* 466A: 1873-1884 (2014).
3. Kurganov et al. Requirement of Extracellular Ca<sup>2+</sup> Binding to Specific Amino Acids for Heat-evoked Activation of TRPA1. *J. Physiol.* 595: 2451-2463 (2017).

## 計画研究 研究項目A01

## 高木 昌宏 [たかぎ まさひろ]

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 教授

HP : <http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/takagi/>

## 研究課題名

TRPチャネルおよび膜脂質による温度センシング機構の解明：荷電脂質膜における相分離構造、膜孔形成と温度効果

## 研究概要

脂質ラフトが信号伝達を調節するというモデルが考えられ、活発な研究が展開されている。我々は、膜ダイナミクスを、2次元(2D)ダイナミクス(相分離状態変化)と3次元(3D)ダイナミクス(エンド・エキソサイトーシス、オートファジー等の形態変化)に分類して研究を行っている。

研究に用いる細胞サイズリポソームは、直径 $10\mu\text{m}$ 程度であり、顕微鏡観察が可能である等、数々の利点がある。反面、生体模倣の観点からすると、問題点もある。つまり、生体模倣膜における二次元・三次元ダイナミクスに関する研究は、ほとんどが電的に中性なリン脂質が用いられている。しかし、細胞膜において二重膜の内膜に負電荷脂質が多く局在し、膜電位の発生に寄与している事、さらには、細胞内のオルガネラにおいても、例えば、ミトコンドリアにおけるカルジオリピンのような負電荷脂質(ジホスファチジルグリセロール)の存在が明らかになっている。

そこで負電荷脂質(DOPG, DPPG)を含む脂質膜での相分離挙動の観察を行った。荷電脂質と中性脂質の2成分系において、相分離が起きた後さらに温度を下げると、荷電脂質に富む領域から膜孔(ポア)が形成されることを実験的に明らかにし、理論背景を基礎に、数値シミュレーションにより2D、3Dダイナミクスの共役現象を再現する事ができた。

これらの成果は、2Dダイナミクスと3Dダイナミクスが共役している事、また数理科学的手法が、膜ダイナミクスに関する解釈に力を発揮する事も示していると考えている。

現在、感覚刺激因子や疾患因子が2D、3Dダイナミクスに与える影響、特に線張力に与える影響について、解析を行ない業績が出始めている。

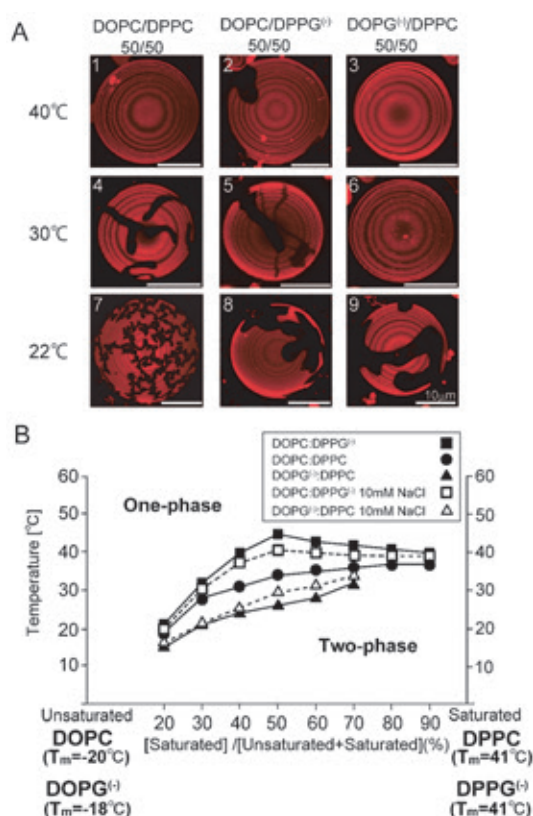


Fig. A. Microscopic images of phase separation. Dark and red regions indicate saturated lipid-rich So phase and unsaturated lipid-rich Ld phase, respectively.

B. Phase boundaries between one-phase and two-phase regions

## 論文

1. Shimokawa N et al. Phase diagrams and ordering in charged membranes, Binary mixtures of charged and neutral lipids. *J. Phys. Chem. B.* 120: 6358-6367 (2016).
2. Himeno H et al. Coupling between pore formation and phase separation in charged lipid membranes. *Phys. Rev. E.* 92: 062713 (2015).
3. Himeno H et al. Charge-induced phase separation in lipid membranes. *Soft Matter.* 10: 7959-7967 (2014).

計画研究 研究項目A01

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 教授

HP : <http://kuharan.com>



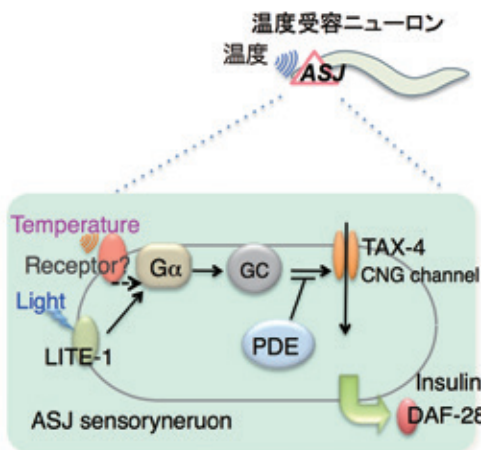
研究課題名

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

温度は生体反応に直結する環境情報であるため、温度に対する応答や適応は生命にとって重要である。本研究では、動物の温度適応に関する分子生理メカニズムを明らかにするために、シンプルな線虫*C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*) の低温適応を指標に解析を進めている。低温適応とは、20°Cで飼育された個体は、2°Cで死滅するのに対して、15°Cで飼育された個体は、2°Cで生存できる現象である。これまでに、分子遺伝学的解析から、頭部に左右1対存在するASJと呼ばれる光を受容する感覚ニューロンが温度を受容し、Gタンパク質経路で伝達し、ASJのシナプスからインスリンを分泌することで、腸に働きかけ低温適応が制御されることが分かってきた(論文3)。ASJ感覚ニューロンでは、温度と光の情報が共通の3量体Gタンパク質やグアニリル酸シクラーゼで伝達されることが見つかった(論文2)。低温適応に関わるさらなる遺伝子を同定するために、インスリン経路の下流ではたらく分子をDNAマイクロアレイ解析で調べた、その結果、予想外にも精子で発現している遺伝子が多数含まれていた。遺伝学的解析から、腸のインスリン経路が精子に影響を与え、低温適応を調節していることが示唆された。さらに、分子遺伝学とカルシウムイメージングを組み合わせた解析から、精子が頭部のASJ温度受容ニューロンの3量体Gタンパク質経路をフィードバック制御することが示唆された(論文1)。つまり、温度適応において、精子が頭部の温度受容ニューロンの感度を調節するという新しい概念が示唆された。

温度情報伝達の新規分子機構の解析



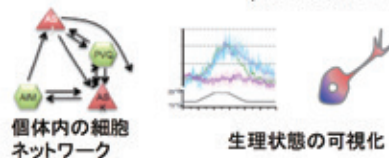
1. 新規の温度情報伝達分子の単離

2. 温度センシング分子の生理的機能

(富永との連携)

3. 温度応答の個体細胞ネットワークの生理状態のイメージング(Ca<sup>2+</sup>や温度等)

(原田・岡部との連携)



論文

1. Sonoda S et al. Sperm affects head sensory neuron in temperature tolerance of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Rep.* 16: 56-65 (2016).
2. Ujisawa T et al. Diverse Regulation of Temperature Sensation by Trimeric G-Protein Signaling in *C. elegans*. *PLoS ONE* 11: e0165518 (2016).
3. 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).



## 計画研究 研究項目A01

## 内田 邦敏 [うちだ くにとし]

福岡歯科大学 細胞分子生物学講座 分子機能制御学分野 講師

HP : <http://www.fdcnet.ac.jp/col/info/teacher/kouza/saibou.html#yakuri>

## 研究課題名

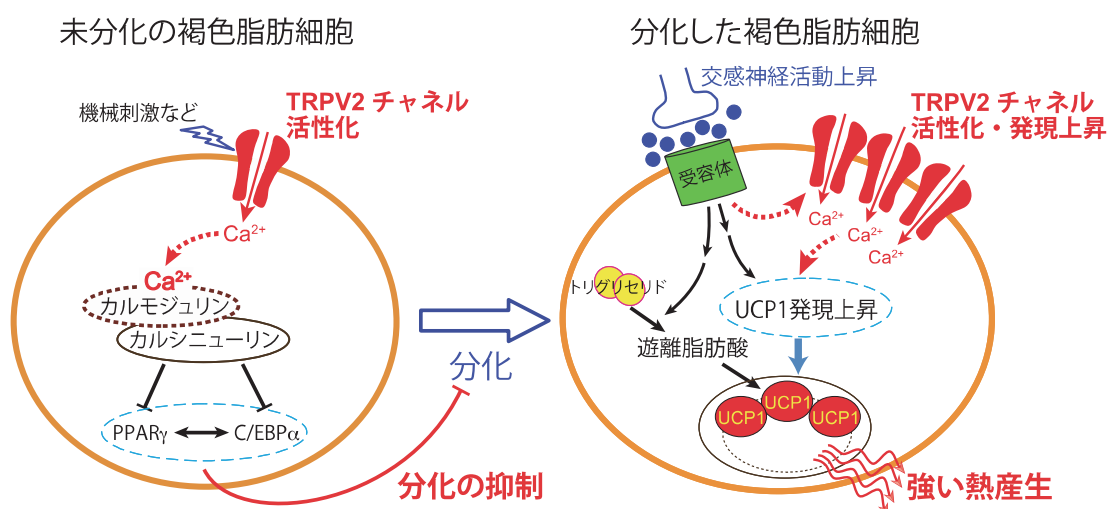
TRPチャンネルおよび膜脂質による温度センシング機構の解明：  
温度感受性チャンネルTRPV2の褐色脂肪組織における生理的役割

## 研究概要

温度感受性TRPチャンネルは、細胞外の環境温度センサーとして機能しており、現在までに11種 (TRPV1、V2、V3、V4、M2、M3、M4、M5、M8、A1、C5) が報告されています。私たちは、これら温度感受性TRPチャンネルの機能解析並びに生理的役割の検討から、温度感受性TRPチャンネルが温度によって活性化されるメカニズム並びにその意義を明らかにすることを目的として研究を進めています。

感覚神経や迷走神経に発現する温度感受性TRPチャンネル (TRPV1、TRPM8など) の活性化は交感神経活動の亢進に伴う褐色脂肪組織からの熱産生を起こしますが、褐色脂肪組織における温度感受性TRPチャンネルの役割は明らかにされていませんでした。今回、褐色脂肪細胞には温度感受性TRPチャンネルの中ではTRPV2チャンネルが多く発現しており、熱産生並びに分化に関与していることを見出しました (図参照)。TRPV2チャンネルを欠損した褐色脂肪細胞では、寒冷環境に暴露された際にみられる熱産生を担う分子群 (UCP1、PGC1- $\alpha$  など) の発現量上昇が弱くなっており、また、TRPV2チャンネルを欠損したマウスでは、褐色脂肪細胞において熱産生機能が低下しており、冷たい刺激にさらされた時に体温を維持できなくなっていました。一方、未分化の褐色脂肪細胞にもTRPV2は発現しており、TRPV2の活性化はカルシニューリンの活性化を介して分化を抑制することがわかりました。

今後、交感神経活動に伴って活性化されるアドレナリン $\beta$ 3受容体シグナル及び熱産生に伴う細胞内温度上昇がTRPV2チャンネルをはじめとした温度感受性TRPチャンネルを活性化するメカニズムを明らかにしていきたいと考えています。



## 論文

1. Sun W et al. Activation of TRPV2 negatively regulates the differentiation of mouse brown adipocytes. *Pfugers Arch.* 468: 1527-1540 (2016).
2. Sun W et al. Lack of TRPV2 impairs thermogenesis in mouse brown adipose tissue. *EMBO Rep.* 17: 383-399 (2016).
3. Uchida K et al. Stimulation-dependent gating of TRPM3 channel in planar lipid bilayers. *FASEB J.* 30: 1306-1316 (2016).

計画研究 研究項目A01

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

HP : [http://www.riken.go.jp/research/labs/chief/cell\\_dyn/](http://www.riken.go.jp/research/labs/chief/cell_dyn/)

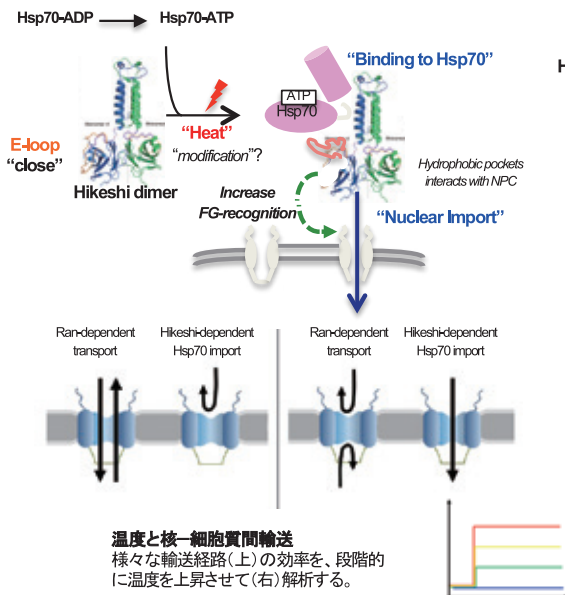


研究課題名

細胞質・細胞核の温度センシング機構の解明

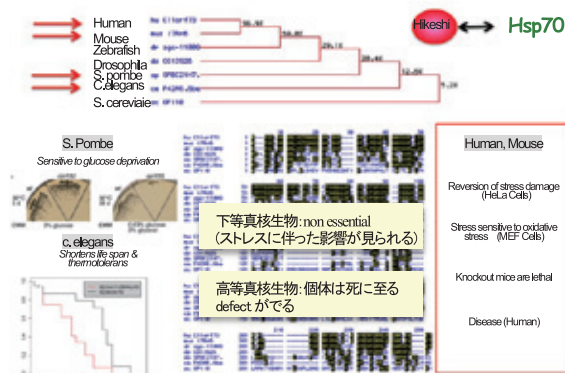
研究概要

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、細胞の生理機能に大きな影響を与える。私たちは、平常時に活発に働くImportin輸送は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) 輸送が駆動することを見つけた。結晶構造解析からHikeshiはダイマーを形成してATP-型Hsp70に結合することがわかった。蛍光相互相関法で、熱がこの結合に寄与する重要な一つの要因であることが判明した。また、Hikeshiは核膜孔複合体と相互作用することで、Hsp70を核に運ぶ活性がある (左上図)。Hikeshiは進化的に保存された分子である。下等真核生物では必須遺伝子ではないが、高等真核生物では、Hikeshi欠損は変異で、個体は死にいたるdefectがでる (右図)。熱ストレス以外に見られるHikeshiの影響は、Hsp70との相互作用を通じたHSF1の活性制御によるものであることがわかってきた。また、核—細胞質間輸送が熱ストレスで変化するメカニズムを解析するため、誤差0.2℃以下の高精度な温度制御ができる実験系の樹立に成功しており、現在、様々な核—細胞質間輸送経路の輸送効率を様々な温度で詳細に解析をしている (左下図)。



Hikeshi が担う Hsp70 の核内輸送モデル(左)

Hikeshi は真核生物で保存された因子である(下)



論文

- Kimura M et al. Extensive cargo identification reveals distinct biological roles of the 12 Importin pathways. *eLife* 21184 (2017).
- Edvardson S. et al. Leukoencephalopathy and early death associated with an Ashkenazi-Jewish founder mutation in the Hikeshi gene. *J. Med. Genet.* 53: 132-137 (2016).
- Song, J. et al. Structural and functional analysis of Hikeshi, a new nuclear transport receptor of Hsp70s. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 71: 473-483 (2015).

## 計画研究 研究項目A01

## 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 生体認識化学分野 教授

HP : <http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/umeda-lab/>

## 研究課題名

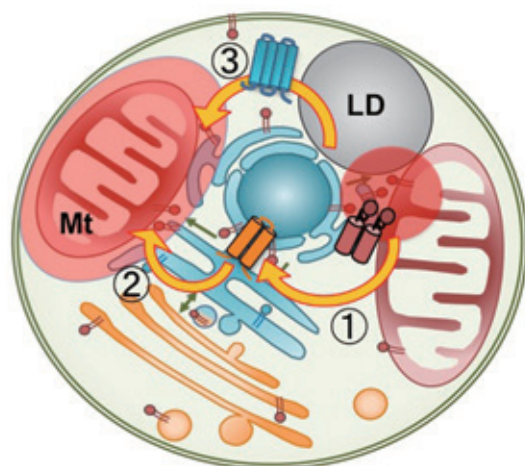
細胞内温度センシングとエネルギー代謝制御機構の解明

## 研究概要

様々な動物細胞が環境温の変動にตอบสนองしてミトコンドリアを始めとするエネルギー代謝機構を代償的に変化させることが知られている。しかし、個々の細胞がどのようにして細胞内の温度を感知し、ミトコンドリアのエネルギー代謝レベルを変化させているのか依然不明である。

我々は、ショウジョウバエの脂肪酸不飽和化酵素が、細胞内の温度変化に鋭敏にตอบสนองして発現が変動することを見出した。また、この脂肪酸不飽和化酵素の発現制御に関わるタンパク質分解経路を特異的阻害剤と遺伝子発現抑制実験、プロテアーゼ活性測定により同定した。さらに、種々の領域の欠失変異体や点変異体を用いた解析から、上記分解経路への感受性に影響を与えるモチーフを脂肪酸不飽和化酵素内に同定した(下図①)。今後、この発現制御機構の最上流因子を分子遺伝学および生化学的なアプローチにより同定することで、細胞内の温度変化を感知する機構の解明を目指す。

また、CRISPR/Cas9システムにより樹立した脂肪酸不飽和化酵素欠損細胞を用いた解析から、脂肪酸不飽和化酵素がミトコンドリアの脂質組成の制御のみならず、ミトコンドリアの形態制御にも関わることで、エネルギー代謝の制御に強く関与することを明らかにした(下図②)。さらに我々は脂肪酸とミトコンドリア機能との連関を研究する中で、脂肪滴からミトコンドリアへの脂肪酸動員へ関わる新規輸送体タンパク質を同定した(下図③)。このように、温度変化にตอบสนองした脂肪酸の代謝経路制御とミトコンドリア機能が機能連関することにより、エネルギー代謝が制御される機構を明らかにしつつある。今後、分子機構のさらなる検証のみならず、制御に関わる因子の同定を進めることで、細胞内温度センシングに関わる分子群の同定および温度変動にตอบสนองしたエネルギー代謝制御の分子機構の解明を進める計画である。



Mt : mitochondria LD : lipid droplet

- ① 連続するプロリン残基に依存した脂肪酸不飽和化酵素の分解経路の同定
- ② 脂肪酸不飽和化酵素によるミトコンドリア機能制御
- ③ SLC25輸送体によるミトコンドリアへの新規脂肪酸輸送経路の発見

## 論文

1. Ogawa R et al. Development of a novel tetravalent synthetic peptide that binds to phosphatidic acid. *PLoS ONE* 10: e0131668 (2015).
2. Kato U et al. Role for phospholipid flippase complex of ATP8A1 and CDC50A in cell migration. *J. Biol. Chem.* 288: 4922-4934 (2013).
3. 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

原田 慶恵【はらだ よしえ】

大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質ナノ科学研究室 教授

HP : <http://www.protein.osaka-u.ac.jp/nanobiology/>



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

最も基本的な物理量である温度は、細胞内分子の状態や生化学反応の活性を司ることで、細胞機能や生体の主要生理機能に強く影響する。これまでに高性能な蛍光性温度センサーと高い定量性を備えた蛍光イメージング技術を用いた、単一細胞内の温度測定法や、生細胞内における温度分布のイメージング法により、単一生細胞内には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、このような細胞内温度の不均一性を保つメカニズムやその生理的意義は一切不明であった。

本研究では、温度と関連した主要な生理機能を担う神経細胞に着目し、神経細胞の温度計測法を開発し、神経細胞に特徴的な構造体や状態変化における細胞内温度変動解析に取り組んでいる。まず、細胞内温度分布を正確に検出するため、蛍光寿命イメージング顕微鏡法を用いた。温度センサーの蛍光寿命は温度に依存して変化するが、センサー濃度や励起光強度などに依存せず、温度の選択的な解析を可能とする。本研究では、共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡に時間相関単一光子計測法による蛍光寿命検出器を連結したシステムを構築した(図1)。次に、この顕微鏡システムを用いて、細胞抽出液に溶解した蛍光性ポリマー温度センサーの蛍光寿命測定を行った。平均蛍光寿命の測定条件や算出法を最適化した結果、図2に示す温度算出の構成曲線を得た。続いて、神経様細胞に温度センサーをマイクロインジェクション法により導入し、蛍光寿命イメージング顕微鏡により観察することで、細胞内温度イメージングを行った(図3)。今後は、細胞内において観察された特徴的な温度分布や変動の原因と意義を解明する予定である。

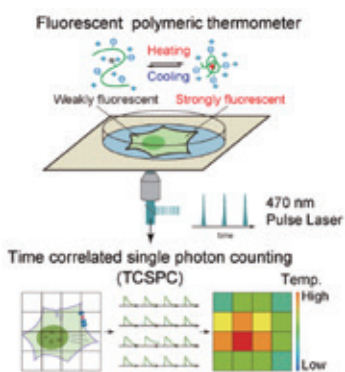


Fig.1 Scheme for imaging of intracellular temperature by fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy

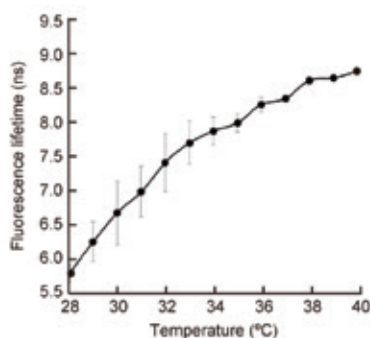


Fig.2 Relationship between temperature and fluorescence lifetime of fluorescence polymeric thermometer

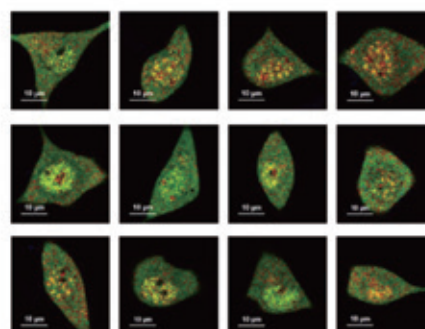


Fig.3 Imaging of temperature in neuron-like cells by fluorescence lifetime imaging microscopy

論文

1. Han Y-W et al. The application of fluorescence-conjugated pyrrole/imidazole polyamides in the characterization of protein-DNA complex formation. *Biomater. Sci.* 4: 391-399 (2016).
2. Iwasa T et al. Synergistic effect of ATP for RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation. *Sci. Rep.* 5: 18177 (2015).
3. Han Y-W et al. Construction and characterization of Cy3- or Cy5-conjugated hairpin pyrrole/imidazole polyamides binding to DNA in the nucleosome. *Biomater. Sci.* 2: 297-307 (2014).

## 計画研究 研究項目A01

## 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

HP : <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~funatsu/>

## 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

最も基本的な物理量である温度は、細胞内分子の状態や生化学反応の活性を司ることで、細胞機能や生体の主要生理機能に強く影響する。これまでに高性能な蛍光性温度センサーと高い定量性を備えた蛍光イメージング技術を用いた単一細胞内の温度測定法や生細胞内における温度分布のイメージング法により、単一生細胞内には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、このような細胞内温度の不均一性を保つメカニズムやその生理的意義は一切不明であった。

本研究では、細胞内の局所温度変動の意義を調べるため、細胞内局所の加熱法を開発した。1480 nmの赤外レーザー光を対物レンズにより集光させて照射することにより、水分子を直接加熱することが可能である。そこで、温度計測が可能な蛍光顕微鏡システムに赤外レーザー照射システムを導入し(図1)、その加熱効率を独自の細胞内温度計測法により検証した。図2に示すように、赤外レーザーの出力依存的に溶液や細胞内の温度を一過的かつ定量的に加熱可能である事が分かった。続いて、細胞内の局所を加熱しながら細胞内温度イメージングを行ったところ、細胞内局所に人工的に形成した温度勾配を観察することに成功した。この熱源はレーザー照射停止により完全に消失し、可逆的である事も確認した。次にこの加熱法を用いて、細胞内局所加熱による細胞応答として、ストレス顆粒形成の再構成に成功した。今後、細胞内局所温度と細胞機能の関係の解明に貢献すると期待している。

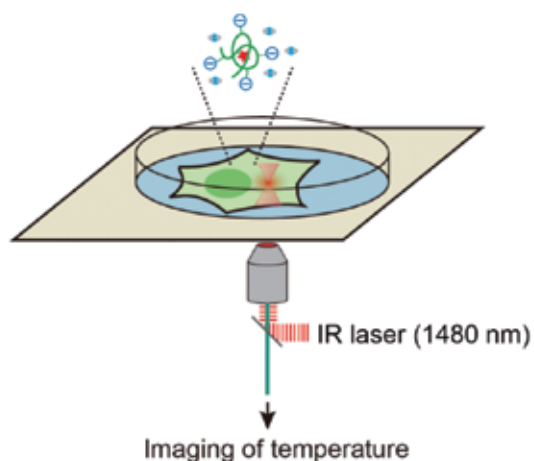


Fig.1 Scheme for heating of local area of a single living cell using a focused IR laser equipped in an inverted fluorescence microscope

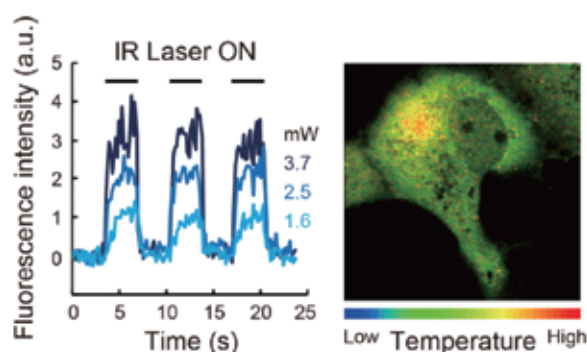


Fig.2 The detection of temperature change in solution (left) and in a single COS7 cell (right) when IR laser was irradiated.

## 論文

- Hattori K et al. ASK1 signalling regulates brown and beige adipocyte function. *Nat. Commun.* 7: 11158 (2016).
- Okabe K et al. Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Commun.* 3: 705 (2012).
- Gota C et al. Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 2766-2767 (2009).

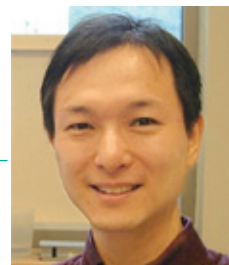


計画研究 研究項目A02

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

HP : <https://www.med.nagoya-u.ac.jp/physiol2/>



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

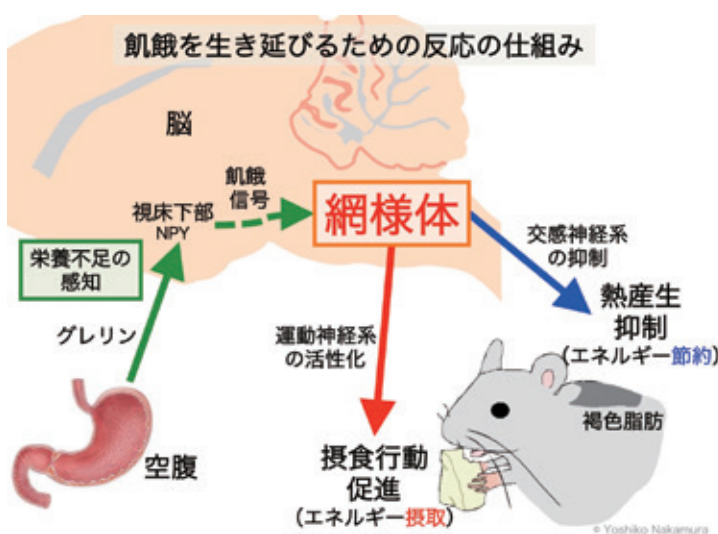
研究概要

私達は最近、「飢餓を生き延びるために哺乳類の脳に備わった神経回路の重要な仕組み」を解明しました(論文1)。

人を含めた哺乳類では、空腹や飢餓になると、熱の産生に代表されるエネルギー消費を減らすとともに、食物を摂取する行動を促進します。これら2つの「飢餓反応」は脳の視床下部が空腹を感知することで生じますが(図)、視床下部から飢餓反応の発現に至る神経回路はわかっていませんでした。特に、これらの飢餓反応は交感神経系と運動神経系という独立した神経系によって調節されることから、この2つの神経系を脳がどのように統合的に調節して飢餓反応を引き起こすのかは長年の謎でした。

私達は、ラットとマウスを用いた個体レベルの生理学や解剖学、そして最新の分子生物学を応用した神経活動操作技術を駆使することにより、飢餓時にエネルギー消費(熱産生)の抑制とエネルギー摂取の促進(咀嚼、唾液分泌)を同時に指令する神経細胞を延髄の網様体(もうようたい)に発見しました(図)。網様体の神経細胞を刺激すると熱産生が抑制されるとともに咀嚼・唾液分泌が起こり、摂食量が増加しました。一方、網様体の神経細胞を抑制すると飢餓信号が送られても熱産生が低下しませんでした。

哺乳類の進化過程は飢餓と戦ってきた時代がほとんどであり、私達が発見した網様体の神経細胞は、飢餓を生き抜くために進化過程で獲得したものであると考えられます。飽食の現代でも過剰なダイエットや拒食症などの問題があり、こうした飢餓状態では網様体の神経細胞の働きによって熱産生が抑制され、低体温症に陥る可能性があります。また、何らかの障害や病気によってこの神経細胞が必要以上に活性化されると、エネルギーの消費が抑制されるとともに摂取が促進され、肥満や成人病につながる可能性があります。今後さらに研究を進め、こうした病態を改善する新たな手法の開発につなげたいと考えています。



論文

1. Nakamura Y et al. Medullary reticular neurons mediate neuropeptide Y-induced metabolic inhibition and mastication. *Cell Metab.* 25: 322-334 (2017).
2. Chiba Y et al. Dapagliflozin, a sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor, acutely reduces energy expenditure in BAT via neural signals in mice. *PLoS ONE* 11: e0150756 (2016).
3. 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).

## 計画研究 研究項目A02

## 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

HP : <http://www.diabetes.med.tohoku.ac.jp/>

## 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

## 【目的】

SGLT2阻害薬は腎臓での糖再吸収を抑制し、糖を尿糖として排泄する薬剤である。この薬剤をげっ歯類に投与すると、血糖コントロールの改善に加え体重減少が認められるが、その程度は限定的であることが知られている。ヒトにおいても、尿糖排泄によるエネルギー喪失から理論的に予測される体重減少よりも、実際の体重減少は約30%少ないことが報告されている。これらより、SGLT2阻害薬が個体レベルのエネルギー消費の低下をもたらす可能性を想起した。

## 【方法】

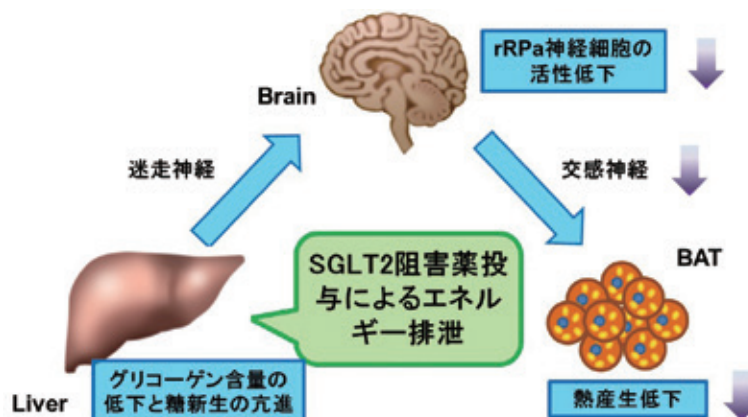
通常食給餌のC57BL/6マウスにSGLT2阻害薬であるダバグリフロジン（ダバ）を経口投与した後、個体レベルの酸素消費量を測定し、褐色脂肪組織(BAT)の熱産生や遺伝子発現およびBATを支配する交感神経の活性を検討した。さらにこの交感神経のプレモーターニューロンが存在する延髄縫線核 (rRPa) のc-fos発現レベル (=ニューロン活性の指標) を検討した。

## 【結果】

ダバ投与18時間後に、エネルギー消費量の指標である酸素消費量は対照群に比べ有意に低下していた。そこでエネルギー消費に重要な役割を担うBATの温度を測定したところダバ投与群で有意に低下しており、熱産生関連遺伝子であるUCP1の発現低下も認められた。また、ダバ投与によりrRPaのc-fos発現低下が低下し、実際に交感神経活性の指標であるBATのノルエピネフリン (NE) ターンオーバーも低下していた。一方、肝臓においてはダバ投与6時間後にグリコーゲン分解と糖新生の亢進が見られた。次にこのような肝糖代謝の急性な変化がBAT熱産生低下の誘因となった可能性を想起し、その臓器連関経路の解明を試みた。迷走神経肝臓枝を選択的に切離したマウスにおいては、興味深いことに、ダバ投与後のBAT UCP1発現低下やNEターンオーバーの低下、およびrRPa c-fos発現低下など一連の変化は認められなかった。

## 【結論・考察】

SGLT2阻害薬投与後の個体レベルのエネルギー消費の低下は、交感神経活性の低下によってBAT活性が抑制されたことによるものと考えられた。また、この変化は肝臓-迷走神経-脳-交感神経-BATと連なる神経ネットワークを介しており、SGLT2阻害薬投与により生じた負のエネルギーバランスを肝臓が感知することで、BATの活性抑制に繋がった可能性が示唆された。本研究はSGLT2阻害薬投与がBAT活性の抑制を通じて、個体レベルのエネルギー消費が低下させることを初めて示したものであり、薬理学的のみならず新たな個体のエネルギー代謝調節メカニズムの存在を示唆するものとして生理学的にも興味深い。\*本研究は名古屋大学 統合生理学分野 (中村和弘 教授) と共同で行なわれた。



## 論文

1. Chiba Y et al. Dapagliflozin, a Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor, Acutely Reduces Energy Expenditure in BAT via Neural Signals in Mice. *PLoS ONE* 11: e0150756 (2016).

計画研究 研究項目A02

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

HP : <http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/system-biology/doimasao/>

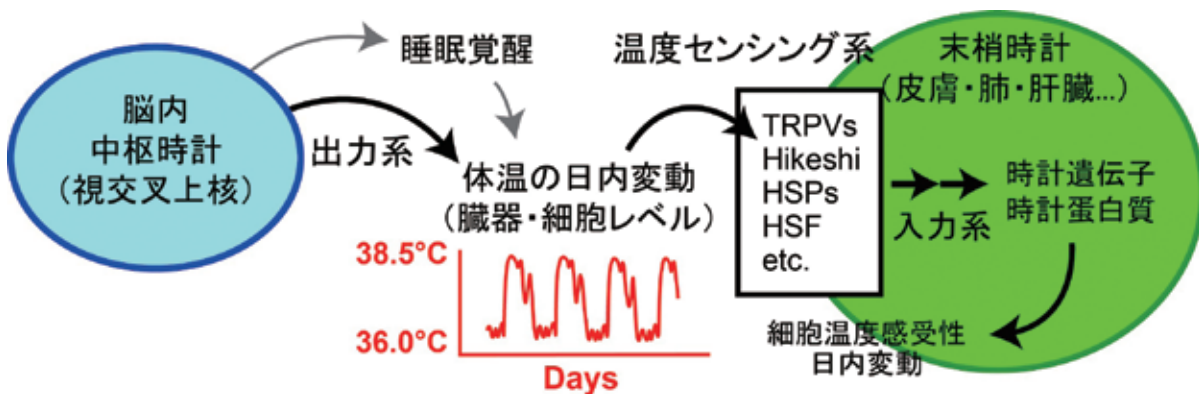


研究課題名

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の解明を目指す。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。これまでに、温度と体内時計機構の接点となりえる中核時計蛋白質PER2の蛋白質変動プロファイルを簡便に培養細胞レベルでとらえる方法を樹立することができた (Tainaka et al, *Chronobiol Int*, *in press*)。また、脳内中枢時計からの体温制御機構の調査においてはHikeshiや中枢時計に発現するGPCRを標的とした探索研究を推し進めている (Goto et al, *Endocr J*, *in press*)。本研究班では細胞レベルでの温度概日時計連絡機構を明らかにする共に、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している。



温度と体内時計に関する本研究計画の概念図

論文

1. Tainaka M and Doi M et al. Circadian PER2 protein oscillations do not persist in cycloheximide-treated mouse embryonic fibroblasts in culture. *Chronobiol. Int.* (in press).
2. Goto K and Doi M et al. G-protein-coupled receptor signaling through Gpr176, Gz, and RGS16 tunes time in the center of the circadian clock. *Endocr. J.* (in press).
3. Doi M et al. Gpr176 is a Gz-linked orphan G-protein coupled receptor that sets the pace of circadian behavior. *Nat. Commun.* 7: 10583 (2016).

計画研究 研究項目A02

南 雅文 [みなみ まさぶみ]

北海道大学大学院 薬学研究院 薬理学研究室 教授

HP : <http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakuri/>



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

【組織学的解析】

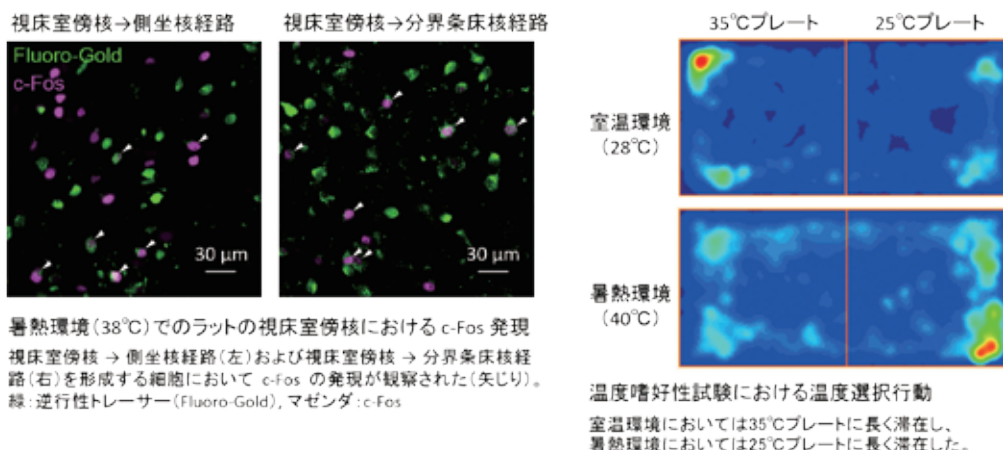
神経活動マーカーであるc-Fos発現を指標に暑熱環境(38℃)により神経活動が亢進する脳領域をラットを用いて調べた。暑熱環境暴露によりc-Fos発現上昇が認められたのは次の脳領域であった: 前帯状皮質、視床室傍核、手綱核、扁桃体、分界条床核、視索前野、視床下部室傍核、青斑核、腕傍核、中脳水道周囲灰白質。逆行性トレーサーを用いて検討を行った結果、視床室傍核c-Fos陽性細胞の多くが、側坐核および分界条床核に神経投射を送っていた。今後は、視床室傍核→側坐核経路および視床室傍核→分界条床核経路を光遺伝学的に操作することにより不快情動が惹起されるか否かを検討する。

【神経伝達物質遊離測定】

不快情動生成に関与していることが明らかとなっている腹側分界条床核内ノルアドレナリンの関与を調べるため、ラットに暑熱・寒冷ストレスを負荷した際のノルアドレナリンレベルをインビボマイクロダイアリス法により計測した。室温環境に比較し、暑熱環境および寒冷環境(8℃)において、ノルアドレナリンレベルが有意に上昇した。今後は、暑熱・寒冷環境から室温環境に戻した際に快情動が惹起されるか否かを側坐核内ドパミン遊離を指標として検討する。さらに、分界条床核内ノルアドレナリンと側坐核内ドパミンを同時計測することで環境選択時における快・不快情動をモニタリングすることを試みる。

【行動実験】

暑熱環境下における場所嗜好性・嫌悪性に関わる脳領域を明らかにするために、2種のプレート温度に加え、気相温度を制御できる行動実験系を構築した。イボテン酸を用いた破壊実験により分界条床核の関与を検討したが、分界条床核破壊後に温度嗜好性は変化しなかった。今後は、上述の神経伝達物質遊離測定により分界条床核内ノルアドレナリン神経情報伝達の関与が示唆されているので、破壊実験に比べより選択性の高い実験方法として分界条床核内拮抗薬投与の効果を検討する。



論文

1. Kaneko T et al. Activation of adenylate cyclase-cyclic AMP-protein kinase A signaling by corticotropin-releasing factor within the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis is involved in pain-induced aversion. *Eur. J. Neurosci.* 44: 2914-2924 (2016).
2. 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).
3. 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).



計画研究 研究項目A02

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

HP : <https://www.nips.ac.jp/cs/sibaHP/shibasaki.html>

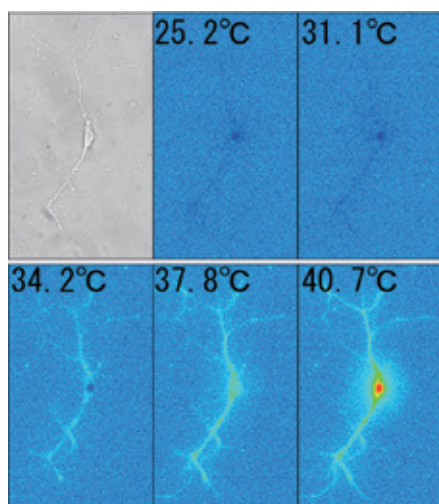


研究課題名

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

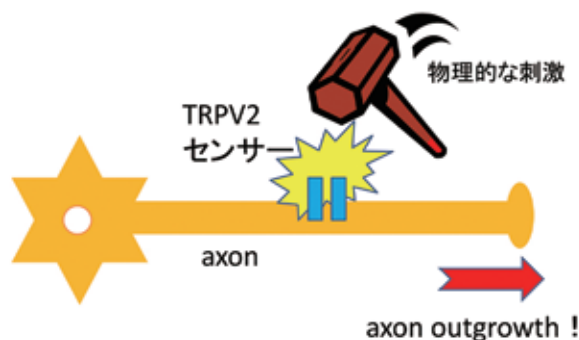
研究概要

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ていた。さらに研究を進め、TRPV4が*in vivo*において脳内温度を利用して海馬の興奮性を規定する主要な温度センサー分子であり、正常行動の制御に必須であることを明らかにした。また、以前に我々は侵害熱センサーTRPV2（52℃以上の熱刺激で活性化）がいつから発現開始しているのかを調べ、マウスでは胎生中期から全ての感覚神経細胞に発現することを見いだしていた。子宮内の胎児は母体内で均一な温度環境に存在するため、TRPV2が熱センサー以外の機能を持ち、神経細胞の発生・分化に関わることが示唆された。その後解析を進めた結果、TRPV2はメカノセンサーとして機能し、TRPV2活性化により軸索伸長が促進することで円滑で効率的な神経回路形成を行うことを明らかにした（Shibasaki et al. *J. Neurosci.* 2010）。今回、我々はTRPV2がどのような分子機構でメカノセンサーとして物理刺激に反応し、軸索伸長を促しているのかを解析した。そして、細胞膜上に機械刺激が付加するとまずアクチン（細胞骨格）に変動が生じ、この変動がTRPV2に伝わることでその活性化が生じることを明らかにした。また、TRPV2活性化に伴うCa<sup>2+</sup>流入が、細胞内に存在するTRPV2局在を変化させ、機械刺激付加が生じている場所へとTRPV2を瞬時に集積させ、微弱な機械刺激を増幅させることも突き止めた。



TRPV4を介した神経活動の向上

TRPV2はメカノセンサーとして軸索伸長を促す



TRPV2による神経回路形成制御

論文

1. Sugio S et al. TRPV2 activation requires interaction with the actin cytoskeleton and enhances growth cone motility. *FASEB J.* 31: 1014-1019 (2017).
2. Shibasaki K. TRPV4 ion channel as important cell sensors. *J. Anesth.* 30: 1014-1019 (2016).
3. Shibasaki K et al. TRPV4 activation at the physiological temperature is a critical determinant of neuronal excitability and behavior. *Pflügers Arch.* 467: 2495-2508 (2015).



## 第3回 領域会議：概要

会期：2017年1月19日（木）-20日（金）

会場：自然科学研究機構 岡崎コンファレンスセンター

### 計画班員および公募班による研究発表

#### 第1日目 1月19日（木）

10:00 領域代表挨拶

##### A01班による発表

10:05~12:10

A01計画 富永 真琴  
 A01計画 高木 昌宏  
 A01計画 久原 篤  
 A01公募 井上 飛鳥  
 A01公募 藤原 祐一郎

13:30~14:10

A01計画 今本 尚子  
 A01計画 梅田 眞郷  
 A01公募 西山 賢一  
 A01計画 原田 慶恵・岡部 弘基  
 A01公募 井藤 彰  
 A01公募 江藤 圭

16:10~16:30 全体討論

16:30~18:30 ポスター発表

#### 第2日目 1月20日（金）

##### A02班による発表

8:50~11:55

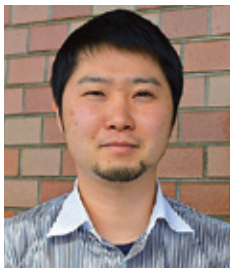
A02計画 中村 和弘  
 A02計画 山田 哲也  
 A02公募 酒井 寿郎  
 A02公募 神吉 智丈  
 A02公募 小川 涉  
 A02計画 土居 雅夫  
 A02公募 深田 吉孝

12:55~15:00

A02計画 南 雅文  
 A02計画 柴崎 貢志  
 A02公募 中川 貴之  
 A02公募 野村 真  
 A02公募 中村 隼明



## 第3回 領域会議：若手の声



### 江藤 圭

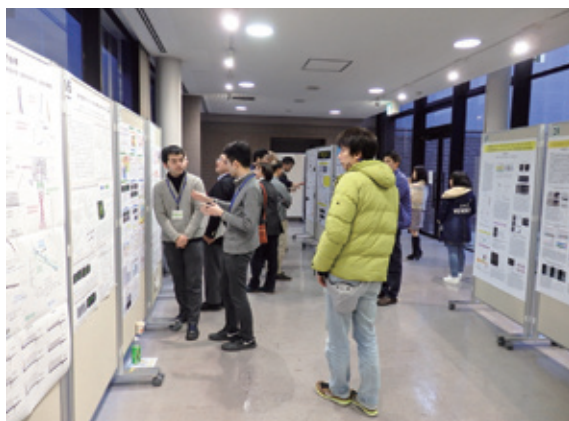
生理学研究所 基盤神経科学研究領域 生体恒常性発達研究部門 助教

第3回領域会議は前日の若手の会に引き続き2017年1月19日から20日に愛知県岡崎市の岡崎コンファレンスセンターで開催されました。本領域会議では活発な議論が行われ、神経科学、脂質、体内時計、精子、進化などの生物系の話に加え、工学系の話もあり、幅広い内容の最先端の温度生物学に関する知識を得ることができ大変勉強になりました。また、休憩時間、懇親会では参加された先生方と密にディスカッションすることができ大いに刺激になりました。前回の領域会議では共同研究のお話を実際に進めさせていただいたおかげで研究が劇的に進歩いたしました。今回の領域会議におきましても、とても興味深い新たな共同研究のお話をさせていただくことができ、多様な分野の研究者が集う研究領域ならではの恩恵だと痛感しております。

私は、痛みの脳内処理機構に興味を持ちこれまで研究を行ってきました。痛みと温度は感覚処理として共通する点も多く、末梢における温度情報が脳、特に一次体性感覚野と呼ばれる感覚処理の中核でどのように処理されているかを明らかにすることを目的として本領域に参加させていただいております。私の研究では、生きた動物の深部組織を観察するの

に適した2光子顕微鏡と呼ばれる新しい顕微鏡を用いて、S1神経細胞が温度に対してどのように応答するかをイメージングにより明らかにしようとしています。今回の領域会議では、非常にプレリミナリーなデータですが、温・冷刺激によるS1神経細胞の応答様式の一旦をご紹介させていただきました。発表直後のご質問だけでなく、発表後もポスターなどでも様々なご意見、アドバイス、質問をいただくことができました。自分が思いもしない新しい視点からのご意見もいただけ、大変参考になりました。

公募班員としての残り期間も1年となりましたが、残り期間で少しでも成果を出し、温度を基軸とした生命現象の統合的理解を目指す本研究領域に微力ながらも貢献できるよう精進していきたいと存じます。今後とも何卒宜しくお願い致します。





## 大屋 愛実

名古屋大学大学院 医学系研究科 統合生理学分野 研究員

2017年1月19~20日に行われた第3回領域会議に、計画研究中村班の研究員として参加させていただきました。ここでは、私自身がこの研究領域に参加することになった経緯と今回の領域会議の感想を述べさせていただきます。

私は学生時代、内分泌細胞におけるホルモン分泌の可視化解析に取り組み、細胞内のどのようなシグナル伝達によってホルモン分泌が制御されるのかを解析しました。その研究の中で、分泌されるホルモンが生体においてどのような生理的意義を持つかに興味を持ち、博士号取得後は生理学を学びたいと考え、中村研究室の門戸を叩きました。これまで*in vitro*の研究をしてきた私にとって、現在の*in vivo*レベルの研究は新たに学ぶことが多く、生命維持のために存在する個体内の緻密な制御機構の数々に感動する毎日です。

現在私は、肥満発症における視床下部メラノコルチン受容体の分子メカニズムの解明に取り組んでいます。視床下部のメラノコルチン系を介した神経調節は全身の代謝制御に機能し、その破綻は肥満につながります。しかし、これまで、メラノコルチン受容体蛋白質の脳内での局在分布が不明であったた

め、視床下部神経回路における代謝制御の分子メカニズムの理解は進んでいません。現在、私たちは免疫組織化学的手法を用いて、視床下部におけるメラノコルチン受容体蛋白質の局在を明らかにし、その局在と代謝制御との機能的連関の解明を目指しています。そして、高脂肪食摂取や加齢など、肥満につながる環境要因がメラノコルチン受容体の局在を変え、肥満を起こすという仮説を検証していきたいと考えています。

私は領域会議には第2回から参加していますが、毎回“温度”というキーワードがこんなにも多岐にわたる研究に共通していることに驚きます。そして先生方が、自分の専門とは異なる分野の研究に対しても的確な指摘をし、熱い議論を交わし、精力的に共同研究を進めていらっしゃる姿を見ると、私自身、もっと自分の引き出しを増やして、領域会議で何う話をより深く理解し自分の糧に出来るようにしたいと感じました。今回の会議で頂いたアドバイスをもとに、これからも精進して参りたいと思いますので、今後ともご指導ご鞭撻のほどよろしくお願いいたします。





## 第2回 若手の会：概要

会期：2017年1月18日（水）

会場：西浦温泉 ホテル東海園

### プログラム

12:30~12:35 開催の挨拶

12:35~13:55 セッション1：トピカル講演

橋高 裕貴 (A01) (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

宇治澤 知代 (A01) (甲南大学)

片岡 直也 (A02) (名古屋大学)

三宅 崇仁 (A02) (京都大学)

14:15~15:55 セッション2：A02 班発表

唐澤 直義 (自治医科大学)

杉尾 翔太 (群馬大学)

山下 俊一 (新潟大学)

井ノ上 雄一 (京都大学)

高橋 宙大 (東京大学)

高橋 圭 (東北大学)

藤原 庸右 (東京大学)

大屋 愛実 (名古屋大学)

吉種 光 (東京大学)

天野 大樹 (北海道大学)

16:15~18:25 セッション3：A01 班発表

猪股 直生 (東北大学)

伊藤 可梨 (京都大学)

鈴木 苑実 (岩手大学)

大西 康平 (甲南大学)

沢里 克宏 (岩手大学)

山野井 遊 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

武田 駿介 (東京大学)

高山 靖規 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

時 ベイニ (東京大学)

齋藤 茂 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

木下 将希 (京都大学)

鈴木 喜郎 (岡崎統合バイオサイエンスセンター)

秋山 大宗 (京都大学)

20:40~22:10 セッション4：テクニカルセッション

内田 邦敏 (福岡歯科大学)

大倉 正道 (埼玉大学)

岡部 弘基 (東京大学)

江藤 圭 (生理学研究所)

中野 雅裕 (大阪大学)



# 本領域の活動

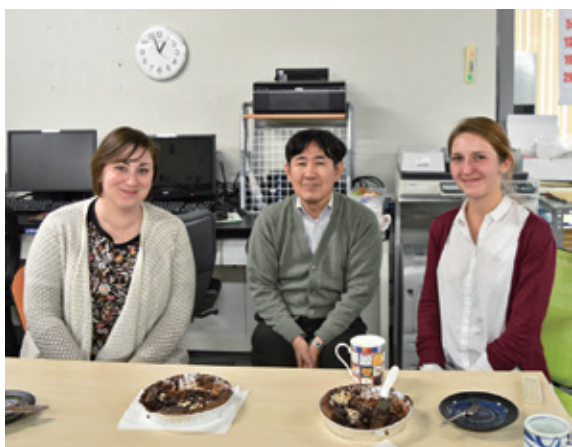
## 国際共同研究加速基金

岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理研究部門 教授  
富永 真琴

渡 航 先：スウェーデンLund市のLund大学から  
渡航期間：2016年11月17日－2017年3月2日

国際共同研究加速基金の支援を受けて、スウェーデンLund市のLund大学（1666年創立の非常に古い大学で、世界の50以上の国に660を超える協定校を持っています）の大学院生でDepartment of Biologyに所属するInga Tuminaiteさんが約3ヶ月半の間、岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理研究部門に滞在して実験を行いました。Inga Tuminaiteさんは、平成26年度JSPS サマー・プログラム外国人研究者として（そのときはundergraduate）来日し、6月中旬から8月末まで細胞生理研究部門で研究を行いました。犬は恒温動物ですが、冬期極寒環境（外気温-22度）で無毛の鼻の表面温度は2度近くまで低下することが知られています。解剖学的に犬組織は多孔構造で密な感覚神経のinnervation、血管分布があります。よって、われわれ人間と異なる温度感知機構が犬の鼻に存在するのではないかと推測されました。犬の冷刺激受容体TRPM8がヒトとは異なる活性化温度閾値を持つとする論文があったことから、犬TRPM8遺伝子をクローニングして、Ca<sup>2+</sup>イメージング法、パッチクランプ法を用いて機能解析を行いました。ヒトやマウス・ラットTRPM8と同じような活性化温

度閾値を含む性質を有することが分かりました。曝露温度依存的な活性化温度閾値の変動（私たちがヒトおよびラットTRPM8について2013年に報告しました）も観察されました。そこで、別の温度感受性分子の関与を考え、犬TRPA1チャンネルの遺伝子クローニングと機能解析を計画しました。Lund大学Department of Biology, Ronald H.H. Kröger教授とは、これまでも共同研究を進めてきました。Lund大学では、主に解剖学的解析を行い、岡崎統合バイオサイエンスセンターにおいて複数の温度感受性候補分子の遺伝子クローニングと機能解析を行う共同研究です。犬TRPA1遺伝子を得て、Ca<sup>2+</sup>イメージング法、パッチクランプ法を用いて機能解析を行いました。今のところ、ヒトTRPA1と大きく異なる性質はつかめておらず、明らかな温度感受性も確認できていません。細胞生理研究部門では、博士研究員Sandra Derouicheと密にディスカッションして実験を進め、岐阜大学獣医学科から犬組織の供給も得て、複数の分子の遺伝子発現解析を行いました。文部科学省が進める海外との共同研究推進拠点の1つとなってパイプを太くし、さらに共同研究を進めたいと思っています。



左からSandra、富永、Inga



スウェーデン ルンド大学



## 国際共同研究加速基金

京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻 准教授  
原 雄二

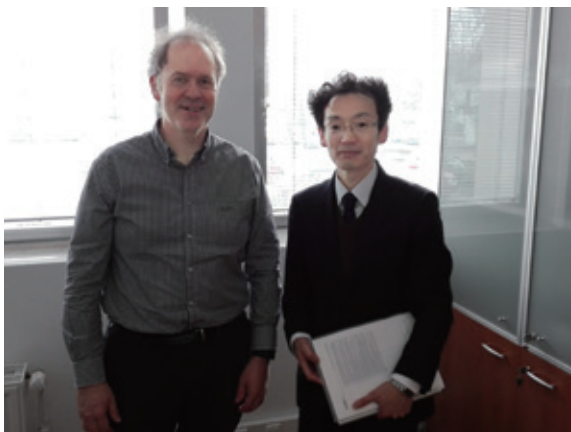
渡 航 先 : Laboratory of Biophotonics and Pharmacology, University of Strasbourg  
渡航期間 : 2017年3月9日 - 13日

国際共同研究加速基金のご支援の元、フランス・ストラスブール大学 バイオフォトニクス・薬学研究所に所属するYves Mély博士、Andrey Klymchenko博士の研究室を訪問し、共同研究を行って参りました。同研究所は、細胞・生体組織における生命現象を標的とした様々な検出プローブや、蛍光寿命顕微鏡をはじめとする最新鋭の検出装置の開発を中心に研究を行っています。私たちは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をめざしています。特に細胞内微細局所の温度変化に応答して発現が変動し、エネルギー状態を制御する脂肪酸不飽和化酵素に着目していますが、当研究には、生体膜環境を鋭敏に感知し、さらにミトコンドリア等の細胞内小器官の膜局所温度を検出する方法が必要不可欠です。そこで、これまで生細胞における種々のプローブを精力的に開発して来られたYves Mély博士、Andrey Klymchenko博士と共同研究を行うことに致しました。

今回はまずMély博士、Klymchenko博士が開発した膜環境の変化を認識するプローブについて、その使用方法の詳細をご指導いただきました。新規プローブは論文で発表されたとおりに検出できないことは多々あります。実際、今回使用したプローブについても事前に使用いたしましたが、取り扱いが難しく、期待通りの結果は得られておりま

せんでした。しかし実際ご指導いただいたことで、私たちの樹立した様々な細胞株において、膜構造の乱れを感知することに成功いたしました。膜環境を感知するプローブはこれまでも報告例はありますが、特殊な装置が必要なこと、さらにデータの信頼性という観点からも新たな方法が待たれていました。そのような点からも今後の研究へ応用できるものと期待されます。さらに、今後の共同研究を見据えて、細胞内小器官の微細領域を標的とした、新規温度センサーの開発についても有意義なディスカッションを行なうことができました。今回の共同研究をさらに発展させ、生細胞における膜局所温度の測定法開発を行うことで、細胞内での温度感知機構ならびに温度変化にตอบสนองしたエネルギー代謝の制御機構を明らかに致します。

今回の滞在中には、University of Strasbourg - RIKEN Workshop on Membrane Lipidologyにも参加する機会をいただき、大学院生・土谷正樹君が口頭発表を行いました。同ワークショップでは膜脂質に関する最新の知見を得ることが出来、非常に有意義な会でありました。最後に、滞在中ご指導いただきましたYves Mély先生、Andrey Klymchenko先生、および両先生をご紹介いただきディスカッションにもご参加いただいた小林俊秀先生にこの場をお借りして深く御礼申し上げます。



Yves Mély先生のオフィスにて



Laboratory of Biophotonics and Pharmacology の全景

## 国際共同研究加速基金

東京大学大学院 理学系研究科 生物科学専攻 深田研究室 博士課程1年 (渡航時: 修士2年)

増田 周作

渡 航 先 : David Marc Virshup lab, Duke-NUS Medical School, Singapore  
 渡航期間 : 2016年12月10日-21日, 2017年3月15日-26日

私が研究対象としている概日時計は24時間周期で変化する環境に適応するために多くの生物が備えている機構であり、時計遺伝子とその産物の転写・翻訳フィードバックが中心となって駆動していると考えられている。生体は概日時計によって各時刻に最適化されているため、海外旅行などで時差のある地域に移動した際には、現地時間に同調するまで時差ぼけが生じる。今回私が滞在したシンガポールは日本に比べて1時間遅いだけなので、日本時間で行動することで早寝早起きができ、普段よりむしろ健康的な生活を送ることができた。

今回の渡航の目的は、デビッド・バーシャップ先生 (Dr. David Marc Virshup, Duke-NUS Medical School) との共同研究を円滑に進めるための打ち合わせ及び詳細な実験手法などの情報共有だ。12月と3月の二回にわたり、それぞれ11日間ずつ渡航した。バーシャップ先生は概日時計の転写翻訳フィードバックの中心因子であるPER2タンパク質に着目し、そのリン酸化修飾による時計の周期調節の仕組みと、この仕組みが概日時計の大きな謎である温度補償性にかかわる可能性について追究してきたこの分野のトップランナーである。PER2のリン酸化部位は $\beta$ -TrCPサイトとFASPSサイトの二か所が知られている。低温では様々な酵素反応が遅くなるが、CK1によるPER2の $\beta$ -TrCPサイトのリン酸化は低温でも効率よく進行する。このリン酸化は $\beta$ -TrCPによるPER2のユビキチン化およびそれに続く分解を促進する。一方高温では温度依存的なリン酸化部位であるFASPSサイトのリン酸化が $\beta$ -TrCPサイトのリン酸化を抑

制することによってPER2を安定化する。すなわち低温における時計の角速度の低下をPER2のリン酸化部位を変えて分解を促進することによって補償するというモデル (ホスホスイッチモデル) を提唱している。私はこのリン酸化制御のさらなる解析を共同研究として行うにあたり、情報交換や実験を行い、今後の方針を固めた。バーシャップ先生らのアイデアやプランを共有でき、非常に有意義な議論が行えた。

バーシャップ研究室での実験はポストドクのラジェッシュ (Dr. Rajesh Narasimamurthy) に教えてもらった。シンガポールは移民の割合が多く、ルーツもマレー系や華人系、インド系など様々である。研究室内も多国籍であり、ラジェッシュはインド人だった。ラジェッシュはインド訛りの英語で丁寧に実験手法や解釈を説明してくれた。

偶然にも二回の渡航のどちらもフロアパーティの開催と重なっており、多くの学生や研究者たちと話すことができた。彼らは私の英会話能力に特典配慮してくれるわけではなかったが、積極的に自分から話さなければ会話についていくのはなかなか難しかったが、英語に不慣れた日本人扱いせず自然に接してくれたのでありがたかった。

今回の渡航によって共同研究がよりスムーズに行えるようになったと思う。実験手法の共有や論文文化に向けてどちらがどういったデータを取るかなどのプランを固めることができた。また、初めて会う人に英語で話しかける度胸もつき、個人的にも非常に良い経験となった。将来機会があればまた海外で研究したいと思う。

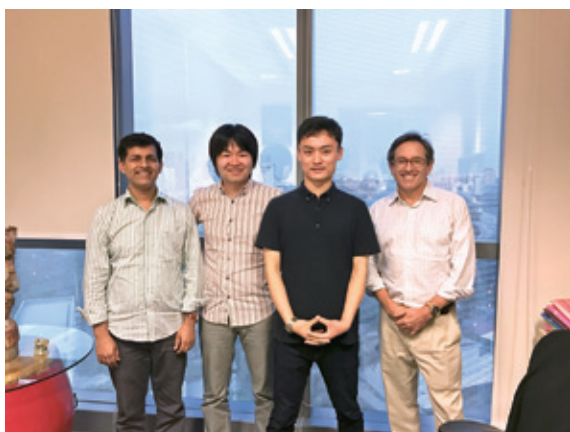


図1 バーシャップ先生のオフィスにて、左からラジェッシュ、二回目の渡航に同行した吉種光助教、著者、バーシャップ先生。



図2 夜のマーライオン。プロジェクションマッピングを行っており、夜でも観光客でにぎわっていた。

## 学会・シンポジウム開催報告

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

学会名：第89回日本生化学会大会  
会場：東北大学川内キャンパス  
開催日時：2016年9月25日(日) 16:00-18:30  
シンポジウムタイトル：温度生物学の新展開  
オーガナイザー：岡部 弘基・梅田 眞郷

### プログラム

- 岡部弘基・シベニ・船津 高志 (東京大学大学院 薬学系研究科)  
「細胞内温度の計測と操作による温度生物学」
- 小瀬 真吾・今本 尚子 (理化学研究所 今本細胞核機能研究室)  
「核-細胞質間タンパク質運搬体分子Hikeshi:  
熱ストレス時に活性化する分子シャペロンHSP70輸送機構とその生理機能」
- 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)  
「温度感受性TRPチャンネルによる温度受容の生理学的意義」
- 柴崎 貢志 (群馬大学大学院 医学系研究科)  
「脳内温度情報を電気信号に変換する分子基盤: TRPV4による脳機能調節」
- 中村 和弘 (名古屋大学大学院 医学系研究科)  
「体温と代謝を調節する中枢神経回路機構」
- 梅田 眞郷、水藤 拓人、従二 直人、長尾 耕治郎 (京都大学大学院 工学研究科)  
「腸内細菌を介する行動性体温調節の分子機構」

本新学術領域「温度生物学」の支援を受け、日本生化学会との連携シンポジウムとして、第89回日本生化学会大会シンポジウム「温度生物学の新展開」を開催した。

温度は、細胞内生化学反応を司るだけでなく、代謝リズムといった主要生理機能に大きく影響を与えている。これまで温度と細胞機能との関わりは、ヒートショック応答や膜上の温度感受性TRPチャンネル、ミトコンドリアを始めとするエネルギー代謝機構等に注目した温度センシング機構を中心に探究されてきた。さらに近年、細胞内部の局所的な温度が時空間的に変動するとユニークな発見を契機として、温度を基軸とした生物学の新たな領域が開拓されようとしている。この細胞の局所的な温度変動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示されている。本シンポジウムでは、細胞内における温度変動の計測研究とそれと協調した温度センシングと応答の機構解明を目指す最新の温度生物学研究を紹介し、最も根本的な物理因子の温度がいかに生命現象を司るかを議論した。

本シンポジウムでは、本学術領域のA01班「温度センシング」およびA02班「温度応答システム」の計画班員が最近の成果を中心に報告し、会場の多数の聴衆と活発な議論が交わされた。生化学会の主要テーマである様々な酵素反応、代謝応答、細胞内情報伝達、さらには個体の恒常性維持における温度の関与について、新たな視点からの考察を提供することが出来、好評のうちに会を終了することが出来た。





## 学会・シンポジウム開催報告

岡崎統合バイオサイエンスセンター (生理学研究所) バイオセンシング研究領域 細胞生理研究部門 助教  
齋藤 茂

学会名: The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan

会場: 沖縄コンベンションセンター

開催日時: 2016年11月18日 (金) 13:00-15:00

シンポジウムタイトル: Learning from sensory molecules: Impact on physiology and evolution

オーガナイザー: 齋藤 茂・小柳 光正

### プログラム

Shozo Yokoyama (Emory University)

Evolution of dim-light and color vision pigments in vertebrates

Mitsumasa Koyanagi (Osaka City University)

Potential of bistable pigments for optical control of cell signaling

Sviatoslav N Bagriantsev (Yale University)

Neuronal mechanism of the sense of touch: insights from tactile specialist birds

\*Shigeru Saito, Claire T. Saito, Toshio Ohta, Makoto Tominaga

(Okazaki Institute for Integrative Biosciences (NIPS))

Evolutionary changes in thermoTRP channels contributed to species diversity in thermal nociception in vertebrates

Shinichi Miyagawa (Wakayama Medical University)

Molecular mechanisms underlying temperature-dependent sex determination in *Alligator mississippiensis*

Masato Nikaido (Tokyo Institute of Technology)

Evolution of V1R pheromone receptor genes in vertebrates: its diversity and generality

\*Hiroo Imai, Nami Suzuki-Hashido, Emiko Nishi, Takashi Hayakawa, Hirohisa Hirai, Laurentia Purba, Kanthi Widayati, Bambang Suryobroto (Kyoto University)

Functional evolution of primate taste receptors



\*は発表者。発表者のみの所属を表記した。

2016年11月に沖縄で開催された第22回国際動物学会議および第87回日本動物学会大会の合同大会にて、大阪市立大学の小柳光正博士と共同でシンポジウムを開催しました。シンポジウムのテーマを温度だけでなく感覚受容全般に広げ、生理学や進化学の分野で活躍する7人の演者が最新の研究成果を紹介しました。感覚受容は動物が外部環境の情報を収集し、環境要因の変動に応じて生体恒常性を保つために欠かせないシステムであり、動物が多様な環境に適応する進化過程において感覚受容機構も変化してきたと考えられます。講演を通して、多様な動物種における特徴的な感覚受容機構や、その進化的な変化を生み出した分子基盤に関する知見を共有し、動物の環境適応機構についての理解を深めることを目指して企画しました。

祖先タンパク質復元を用いた視覚センサー オプシンの機

能進化の分子基盤、眼外光受容に関連したオプシンの生理機能、カモの嘴における鋭敏な機械刺激受容の分子機構、比較ゲノム解析による新規の嗅覚受容体の探索、霊長類における味覚受容体の種間差と食性の関連性、また、温度受容体であるTRPチャネルの多様性や温度適応に関連した進化的な変化、ワニの温度依存型性決定機構におけるTRPチャネルの役割を解明した研究成果が紹介されました。なるべく多くの講演を設けるという大会運営方針に基づき、2時間で7つの講演というタイトなスケジュールであったことや、非常に幅広い分野で構成される学会であることから、参加者が集まるか心配でしたが、多くの立ち見も出るほどの大盛況となり、感覚受容研究のポテンシャルを再認識する機会となりました。海外講演者を招聘するための費用を本新学術領域に支援していただき感謝申し上げます。

## 学会・シンポジウム開催報告

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54回日本生物物理学会年会

会場：つくば国際会議場

開催日時：2016年11月26日（土） 9:00-11:30

シンポジウムタイトル：温度生物学の挑戦

オーガナイザー：岡部 弘基・原田 慶恵

### プログラム

小野 崇人・猪股 直生（東北大学大学院 工学研究科）

「細胞生物学のためのオンチップ高感度熱量センサ」

鈴木 団（早稲田大学・JSTさきがけ）

「蛍光センサーを利用した一細胞計測からわかること」

中野 雅裕・新井 由之・小寺 一平・岡部 弘基・亀井 保博・永井 健治（大阪大学産業技術研究所ほか）

「様々な生物種の温度測定に利用でき且つ速い温度変化を測定可能な蛍光性温度プローブ蛋白質」

井藤 彰（九州大学 工学研究院）

「機能性磁性ナノ粒子を用いたガン温熱療法」

内田 邦敏・Zakharian Eleonora・富永 真琴・山崎 純（福岡歯科大学ほか）

「人工再構成系を用いた温度感受性TRPチャネルの機能解析」

野村 真（京都府立医科大学）

「外温性および内温性動物の脳の発生と進化」

原田慶恵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「温度生物学の挑戦」をオーガナイズいたしました。

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重要な因子です。最近、古典的生化学における緩慢な温度変化とは異なる、細胞内局所の温度変動の存在が報告されました。この現象は温度と生命の関連を探る温度生物学において注目を集めています。本シンポジウムでは、細胞内局所温度に関する計測・操作技術の開発、分子機構や生理的意義といった種々の領域・階層の研究者に発表していただきました。

シンポジウムでは超高感度熱センサや遺伝的導入可能な新規蛍光性温度センサー、筋収縮など生体における発熱計測、磁性ナノ粒子の発熱によるガン細胞の殺傷、温度感受性TRPチャネル-膜複合体の人工再構成といった最新の技術が発表されたほか、温度と発生・進化の興味深い関連が報告されました。早朝の開催であったにも関わらず、会場には多くの方に参加いただき、また生物物理学会らしく、細胞内温度計測結果と理論値の乖離などに熱い議論がくり広げられました。

細胞内温度変動という興味深い現象が温度生物学の発展

に大きく寄与するには、今後も多くの研究者の参加とそれによる進展が必要となっていますが、本シンポジウムはその良い契機となったと期待しています。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ます。





## 学会・シンポジウム開催報告

岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理研究部門 教授  
富永 真琴

学会名：第1回Biothermology Workshop 「生命システムの熱科学」

会場：岡崎カンファレンスセンター

開催日時：2016年12月10日（土）－11日（日）

オーガナイザー：Biothermology Workshopコアメンバー

新学術領域研究「温度生物学」の岡部弘基班員、中野雅裕班員を含む13名のコアメンバー（第1回研究代表は慶応大学広井賀子博士）がオーガナイザーとなって、基礎生物学研究所共同利用研究会として開催されました。新学術領域研究「温度生物学」は後援しました。私たちの「Thermal biology」とは異なる「Biothermology」という名前からも分かるように、「熱科学」の研究会であり、物理学の研究者の参加が目立ちました。私自身、普段あまり馴染みのない研究発表に大きく鼓舞されました。2日にわたるWorkshopは、「生物を切り口とした熱科学」を考えるためにSession 1「熱産生とその利用」、Session 2「温度情報1」、Session 3「生命における熱の理論と検証」、Session 4「測定技術」、Session 5「温度情報2」、Session 6「熱への適応：原核生物から真核生物まで」に非常にうまく分けられ、23名の口演と12のポスタープレゼンテーションから成っていました。そして、新学術領域「温度生物学」から梅田真郷班員、岡部弘基班員、久

原 篤班員、中野雅裕班員、野村 真班員の口演発表が組まれていました。口演の中に4つの植物に関する口演、2つの原核生物に関する口演があったのが印象的でした。また、今後求められる測定新技術は何かを議論するために、Session 4「測定技術」に6名の口演があったのも素晴らしい企画です。加えて、進化的視点（Session 6）を取り上げることで、生命システムに共通する温度管理機構を議論しました。よく考えられたSession構成で、個人的には、Session 3「生命における熱の理論と検証」における熱力学に関する口演がとても勉強になりました。私たち「温度生物学」とは少し視点を異にしながら、「生物を切り口とした熱科学」の考え方は同じであることから、このWorkshopの研究者に加わってもらうことで、私たちの「温度生物学」研究がさらに発展するであろうことを感じました。第2回のWorkshopには、より多くの「温度生物学」班員が参加してほしいものです。



## 学会・シンポジウム開催報告

群馬大学大学院 医学系研究科 分子細胞生物学 准教授  
柴崎 貢志

学会名：第94回日本生理学会大会

会場：アクトシティ浜松

開催日時：2017年3月29日（水）16:50-18:50

シンポジウムタイトル：温度生物学の視点から探る生理機能  
Physiological Functions in Thermal Biology

オーガナイザー：柴崎 貢志・岡部 弘基

### プログラム

柴崎 貢志 (群馬大学大学院 医学系研究科)

「脳内温度による神経活動の向上; 温度センサーTRPV4の重要性」

藤原 祐一郎 (大阪大学大学院 医学系研究科)

「電位依存性プロトンチャネルの温度感受性ゲーティング」

岡部 弘基 (東京大学大学院 薬学研究科)

「細胞内局所発熱による細胞機能発現」

Sandra Derouiche (自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター)

「Functional interaction between thermosensitive TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1 contributes to stimulated saliva and tear secretion.」

本新学術領域「温度生物学」の支援を受け、第94回日本生理学会大会シンポジウム「温度生物学の視点から探る生理機能」を開催しました。本シンポジウムの冒頭には、「温度生物学」が世界初の研究組織として誕生し、日本発信の優れた学術組織としての期待を背負っていること、また今秋に第2期の公募班員の募集があることを宣伝しました。

温度は生理機能を調節する重要な因子であり、細胞や個体の発生・生存適応・代謝応答・恒常性維持などに関与している。本シンポジウムでは、このような温度生物学の視点で生理機能の解析を行っている研究に焦点をあてた。その中でも特に、温度とイオンチャネル機能、温度測定に関連している研究者をお招き、講演を依頼しました。

柴崎は温度感受性TRPチャネルの一つであるTRPV4が海馬神経細胞において脳内温度により恒常的に活性化しており、このチャネル活性化により神経活動・脳機能が円滑化していること、てんかん焦点における発熱とTRPV4活性化異常に関する知見を紹介しました。藤原は電位依存性婦プロトンチャネルHv1の活性化に温度依存性が存在すること、その分子・構造基盤を報告しました。岡部は細胞内温度分布の計測手法開発と、細胞内局所発熱とRNA顆粒生成の関連性を示しました。DerouicheはTRPV4がカルシウム活性化型クロライドチャネルであるTMEM16Aと物理的に結合しており、唾液腺、涙腺におけるTRPV4活性化→Ca<sup>2+</sup>流入→TMEM16A活性化→Cl<sup>-</sup>流出が水の細胞外へ

の流れを作るドライビングフォースとなり、この機構により円滑な唾液、涙の放出惹起が起ることを報告しました。

温度と生理機能の密接な結びつきとその分子基盤が様々な視点から詳細に紹介され、講演終了後は様々な質疑が交わされました。本新学術領域の支援を受けたことにより、大きな会場での開催となったが聴衆はたくさんで、有意義なディスカッションが交わされました。そして、多くの学会員の方々が「温度生物学」という新分野に興味と期待をもっておられると実感しました。



## アウトリーチ活動報告

北陸先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 教授  
高木 昌宏

活動名：金沢泉丘高校・スーパーサイエンスハイスクール研究発表会

会場：石川県立 金沢泉丘高等学校

開催日時：2017年2月6日（月） 13:00－15:00

「金沢泉丘高校・スーパーサイエンスハイスクール研究発表会」に参加し、未来を担う「科学者の卵」達と、温度生物学に関わる研究に関して交流を行ったので、報告させていただきます。

スーパーサイエンスハイスクール事業とは、文部科学省が、高等学校に於ける先進的な理数教育を実施するとともに、高大接続の在り方について大学との共同研究や、国際性を育むための取組を支援する事業です。

金沢泉丘高校では、「科学に対する興味・関心の喚起」、「創造性・独創性・課題探究力の育成」、「国際的に活躍できる語学力の育成」を目標に、課題設定、問題解決、成果発表まで、生徒の自主性を尊重しつつ、高大連携による質・量のアップ、小中高、教育センター等との連携による成果の普及、さらには近隣の外国人英語教員のサポートによる語学力育成にも配慮した、綿密な計画が立てられていました。

今年度修了生達の、最終報告会に参加し、生徒たちともディスカッションをさせて頂いた。

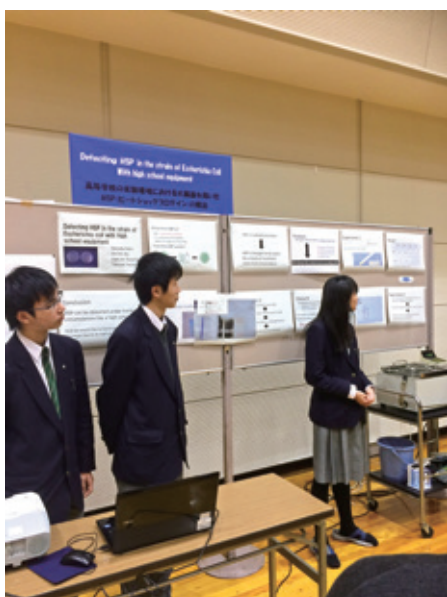
発表は、全部で9課題の報告があり、その内で3課題は、温度生物学とも関連する内容であった。以下に報告するヒートショックタンパク質以外では、「土壌と植物の生長との関係」、「野菜の鮮度測定法の開発及び鮮度保持法の研究」など、興味深い内容でした。さらに、今回の最終報告会は、発表、質疑ともすべて英語で行われており、生徒たちも、高校生とは思えないほど優れた語学力・英会話力を発揮していました。

最も我々の「新学術領域・温度生物学」に関連した発表として「高等学校の実験環境における大腸菌を用いたHSP（ヒートショックプロテイン）の検出」などがありました。

限られた設備の中でしたが、微生物培養、破碎、タンパク質抽出・検出実験の経験は、彼等にとって貴重だったに違いありません。

「ヒートショックプロテインを利用して、劣悪な環境でも生育する植物を育種できる。」

と語る生徒の澄んだ瞳に、私も忘れていた何かを、思い出した気分でした。



### 高等学校の実験環境における大腸菌を用いたHSP（ヒートショックプロテイン）の検出 Detecting HSP in the strain of colon bacillus with high school equipment

KATO Haruka, ITO Hiroto, TERASHITA Gakuto, YOSHII Takaaki

#### Abstract

Our goal is to prove that detection of HSP is possible under a limited circumstances such as in a high school lab. We chose several methods of preceding studies, followed them and carried out the experiments to detect HSP. We succeeded in gaining similar results to those of the preceding studies.



# トピックス

## 侵害熱センサー・TRPV2が有する特殊な生理機能；メカノセンサーとして神経回路形成を促進

群馬大学大学院 医学系研究科 分子細胞生物学 准教授  
柴崎 貢志



### はじめに

神経発生過程においては、最終細胞分裂を終えた未熟な神経細胞は標的細胞に向かって神経突起を伸長させてゆき、複雑な神経回路網を形成する。この軸索伸長や軸索ガイダンスに関わる分子は既に多数同定されており、軸索を誘引する因子や反発する因子などが複合的にシグナルを与えることで標的細胞までへの長い道りを正しく伸長・投射することが可能である(参考文献1)。ヒトにおいては最も長い軸索では1メートル以上の長さを有する。我々の体には成長に応じてあらゆる細胞に対して伸展張力が働き、これを軸索が感じ取り、自分の体のサイズに合わせて神経回路の長さをチューニングしている。このような体の成長依存的に発生する物理的な伸展張力というのは胎生期から既に生じ、大人になってその成長が止まるまでの間、様々な力で細胞に影響を及ぼすものと考えられている。この概念が正しいことは、培養神経細胞を物理的な伸展張力を発生させ続けながら観察すると、正常時と比較し、10倍のスピードで軸索伸長が起こることで証明されている(参考文献2)。しかしながら、長い間、この受動的軸索伸長に関わる分子は同定されてこなかった。これはメカノセンサーの分子実態が不明であったためであろう。

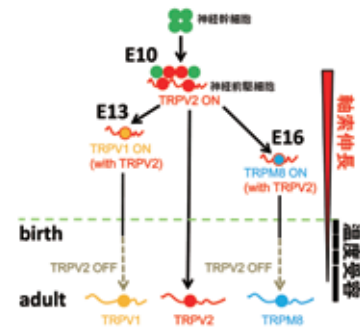
### 侵害熱センサーとして知られていたTRPV2は、発生期にはメカノセンサーとして機能し、軸索伸長を促進する

筆者は、神経発生のごく初期過程(マウスの胎生10日齢)において、感覚神経・運動神経の双方に局限して温度センサー・TRPV2チャンネルが発現開始することを見いだした。感覚神経での発現に注目すると、成体ではTRPV2はA $\delta$ 線維を有する有髄神経のみにその発現が局限しており、その他の温度センサーであるTRPV1(43 $^{\circ}$ C以上で活性化)やTRPM8(27 $^{\circ}$ C以下で活性化)を発現するC線維を有する無髄神経とはその発現が重ならない(図1)。しかしながら、胎生期においては、ほとんど全ての感覚神経にTRPV2が発現し、そのTRPV2陽性細胞にTRPV1やTRPM8が発現するようになった。その後、TRPV2発現が消失することで、上述した成体に特有の発現パターンを取るようになった(図1)。この観察結果から、胎生期の未熟な神経において全ての感覚神経でなんらかの理由でTRPV2を必要としていることが浮かび上がってきた。

TRPV2は成体における侵害熱センサーである(52 $^{\circ}$ C以上の熱で活性化)と報告されてきた(参考文献3)が、子宮内の胎子が52 $^{\circ}$ C以上の熱刺激に暴露されることは生理条件下では考えられないことから、他に内在性のリガンドが存在し、このチャンネル分子を活性化していることが予想された。さらには、そのTRPV2活性化が発生期の神経分化の調節に役立っているに違いないと考えた。心筋ではTRPV2が低浸透圧刺激により活性化することが報告されていたため(参考文献4)、著者はTRPV2が低浸透圧刺激により生じた細胞容積

図1. 胎児期と成体で異なるTRPV2の発現様式

図は丸が細胞体、ムニャムニャした線が軸索を表している。TRPV1(43 $^{\circ}$ C以上)、TRPV2(52 $^{\circ}$ C以上)、TRPM8(27 $^{\circ}$ C以下で活性化)は温度感受性TRPチャンネルに分類される。これらのチャンネルは成体(adult)において感覚神経に強い発現があり、TRPV1とTRPM8は全く別々のC線維に、TRPV2はA $\delta$ 線維に発現し(図の一番下adultの部分参照)、外界の温度受容、痛み受容に寄与している。胎生期マウスを用いて、感覚神経細胞におけるこれらTRPチャンネルの発現時期を調べたところ、神経前駆細胞の出現にあわせて胎生10日目(E10)にTRPV2発現が開始し、それに引き続き、TRPV1(E13から)、TRPM8(E16から)が発現を開始し、TRPV2と共存していた。この各チャンネル同士が共存する発現様式は、adultとは全く異なっていた。参考文献5より改変して転載。



の変化(=膜伸展刺激)により活性化するメカノセンサーなのではないかと予想した。

ここで重要なポイントだったのは、どのようにして膜伸展刺激がTRPV2活性化を促すのか(=TRPV2がメカノセンサーであるのか)を証明することであった。その証明を行うため、細胞はやわらかいシリコンチャンバー(図2Aの白い物体)上に培養し、培養2日目にモータードライブ方式の伸展刺激付加装置にシリコンチャンバーを装着し(図2A)、細胞を引っ張りながらCa<sup>2+</sup>イメージング実験を行った(図2)。図2Bは、HEK293細胞に野生型TRPV2(WT-V2)を

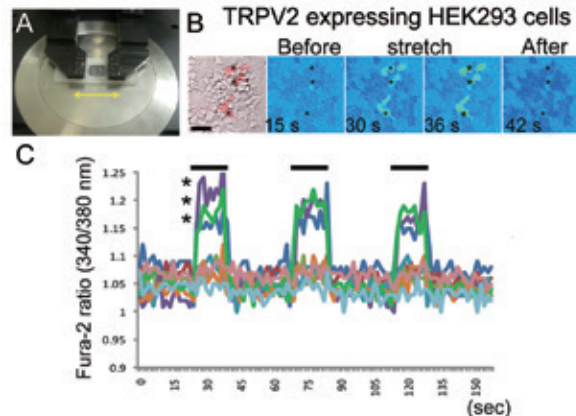


図2. 細胞への伸展刺激時におけるCa<sup>2+</sup>イメージング実験  
A: シリコンチャンバーをモータードライブ方式の伸展刺激発生装置に取り付けた様子。矢印の方向にチャンバーごと細胞を伸展させる。B: 野生型TRPV2(WT-V2)を強制発現させたHEK293細胞のCa<sup>2+</sup>イメージングの様子。C: 図BのCa<sup>2+</sup>イメージング結果を定量化し、グラフ化した。図中の黒線(3本)で+2.8%の伸展刺激を付加している。参考文献5より改変して転載。



強制発現した例である。強制発現細胞は同時にDs-Redを発現するシステムのため、赤く見える細胞のみがTRPV2を発現している。この細胞に+2.8%の伸展刺激を付加すると、TRPV2発現細胞のみで細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を認めた。図2Cに、その定量結果を示した。アスタリスク(\*)のついた図2Bの細胞では、3回の+2.8%の伸展刺激で、3回の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇を認めるが、周りのTRPV2非発現細胞では、その応答が観察されなかった。つまり、52°C以上の侵害熱センサーとして長い間研究が進められてきたTRPV2は細胞膜にかかる伸展刺激を感知出来るメカノセンサーでもあることが実験的に証明された。さらに、このTRPV2のメカノセンサー特性が発生期の運動神経・感覚神経に備わっていることが、上記の実験システムとチャネルポアを欠損させたTRPV2ドミナントネガティブ変異体(DN-V2)の強制発現により実証された(参考文献5)。さらに、TRPV2は細胞膜にかかる機械刺激により活性化し、細胞外から細胞内へとCa<sup>2+</sup>流入を促すことで軸索伸長を促進していることを突き止めた(図3)。世界で初めてメカノセンサー分子の活性化による軸索伸長の促進を観察したのだ(参考文献5)。

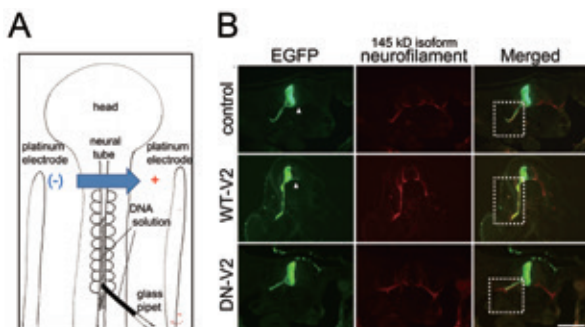


図3. 胎仔個体においてTRPV2活性化は軸索伸長を促進する  
A: HH10-14ステージ(運動神経はまだ誕生していない)のニワトリ胚神経管への発現ベクターの電圧ポアレーション。B: EGFPのみ(control)、WT-V2、チャネルポアを欠損したTRPV2ドミナントネガティブ変異体(DN-V2)を神経管の左側に遺伝子導入して24時間後に固定・組織切片の作製・免疫染色を行った結果。抗neurofilament抗体でも染色し、運動神経軸索を可視化している。矢頭は交連線維を示す。参考文献5より改変して転載。

### メカノセンサーTRPV2活性化の分子機構と軸索伸長を促す分子基盤

上述した著者の過去の研究により、52°C以上の侵害熱センサー・TRPV2は、胎児期の神経細胞においてはメカノセンサーとして機能し、軸索伸長を促すことが明らかになった(参考文献5)が、どのような分子機構でTRPV2が侵害熱センサー、あるいはメカノセンサーとしてチャネル活性化を引き起こすのかは謎であった。過去のメカノセンサー分子の解析結果から、メカノセンサーチャネル分子は細胞骨格/接着斑/メカノセンサーチャネル複合体を形成しており、機械刺激により生じた力により細胞骨格に変動が起り、これがメカノセンサーチャネルを活性化する可能性が強く示唆されている(参考文献6)。また、TRPV2はアクチン結合タンパク質AKAP79/150と結合することが報告されており(参考文献7)、TRPV2と細胞骨格の間に物理的な結合が存在する可能性が強く示唆される。そこで我々は成体マウスDRGタンパク質を用いた免疫沈降法によりTRPV2とアクチンの関係性を調べた。その結果、両者の間に物理

的な結合が存在することが証明された(参考文献8、9)。次に、機械刺激に伴うTRPV2活性化へのアクチン骨格の影響を調べた。この実験に先立ち、細胞膜上に存在するSurfaceTRPV2(=機能型)とそれ以外の細胞質TRPV2を識別可能なコンストラクトを持つアデノウイルスを作製し、神経細胞内でSurfaceTRPV2の集積を解析した。その結果、SurfaceTRPV2は伸長中の神経突起の先端部に存在する成長円錐で高濃度に(細胞体に対して約4倍)濃縮して存在していることを突き止めた(参考文献8)。このため、胎生12日目のマウスDRGから感覚神経細胞を単離し、その成長円錐にホールセルパッチクランプを施し、機械刺激に伴うTRPV2活性化電流応答を記録した。成長円錐を5μmの力(我々の皮膚では感知出来ない程微弱な力)でガラスキャピラリーを用いて突くと外向き整流性の機械刺激依存性電流応答が観察された(図4A)。この電流応答はチャネルポア領域を欠損させたTRPV2ドミナントネガティブ変異体(DN-TRPV2)では全く観察されなくなったため、これがTRPV2活性化電流であることが明らかになった(図4A)。機械刺激依存性電流の出現にアクチン骨格が関与するのかわかるために神経細胞をアクチン重合阻害剤のサイトカラシンD(CytD)で30分間前処置しておき、その成長円錐から機械刺激に伴うTRPV2活性化電流応答を記録するとその電流応答はほとんど観察することが出来なかった(図4A)。これらの結果から、機械刺激→細胞骨格の変動→TRPV2活性化というカスケードにより、メカノセンサー・TRPV2活性化が惹起することが明らかになった。

発生過程のDRG神経細胞ではTRPV2は成長円錐に高濃度に濃縮して存在していることを明らかにしたが、成長円錐の自発運動や外部からの機械刺激に依存してTRPV2集積自体がダイナミックに変動する可能性はないだろうか?この疑問を解決するためにセットアップを組み(図4C)、TRPV2-EGFPを発現させた神経細胞を100フレーム/secにて高速イメージングした。予想通り、機械刺激負荷が加わった局所へ

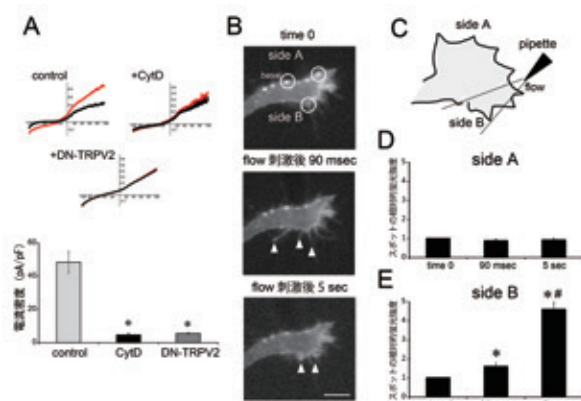


図4. メカノセンサーTRPV2の活性化機構と機械刺激に伴うダイナミックなクラスタリング  
A: 胎生12日目マウスから調製した培養DRG感覚神経の成長円錐にホールセルパッチクランプを施し、ガラスキャピラリーで5μmの機械刺激を付加した際の電流応答(上図; IVカーブと下図; -60 mV保持電位における電流密度)。Control; 無処理の細胞、CytD; サイトカラシンD処理、DN-TRPV2; TRPV2ドミナントネガティブ変異体を発現させた細胞。B-E: 図Cの模式図に示すように、成長円錐の一部分のみに機械刺激を付加し、100フレーム/secの高速イメージングによりTRPV2-EGFPの局在変化を解析した。D, E: sideAとsideBの円で囲んだROI中の蛍光強度変化を定量解析した。参考文献8より改変して転載。

と瞬時 (~30 msec以内) にTRPV2が集積してくることが明らかになった (図4B-E)。これらの結果は、TRPV2が機械刺激場所へと瞬時に集積を起こすことで局所の微弱な機械刺激をより大きな電気信号へと増幅していることを示唆している。

では、機械刺激に伴うTRPV2集積とTRPV2活性化に伴い、なぜ軸索伸長が促進するのであろうか? 様々な生理学実験・リアルタイムイメージング実験を行ったところ、TRPV2活性化に伴うカルシウム流入がアクチン骨格の再編成を引き起こし、それに伴い成長円錐の運動性が著しく加速し、その結果として軸索伸長が惹起することが明らかになった (図5)。

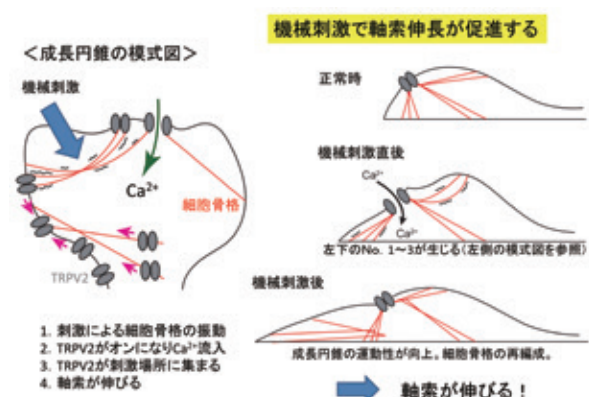


図5. 今回明らかにした研究概要 (TRPV2活性化機構と軸索伸長の分子基盤)

TRPV2 (図中の灰色の丸) は細胞膜上でアクチン (図中の赤線) と結合していることを見いだした。細胞膜上に機械刺激が付加するとまずアクチン (細胞骨格) に変動が生じ、この変動がTRPV2に伝わることでTRPV2活性化が起ることを明らかにした。また、TRPV2活性化に伴うCa<sup>2+</sup>流入が、細胞内に存在するTRPV2局在を変化させ、機械刺激付加が生じている場所へとTRPV2を瞬時に集積させることを突き止めた。TRPV2活性化→Ca<sup>2+</sup>流入→TRPV2の集積 (機械刺激の増幅) →細胞骨格の再編成→成長円錐運動の促進というカスケードを通じて、軸索伸長が惹起する細胞内メカニズムが存在することを突き止めた。

### おわりに

筆者はマウスの胎生中期にほぼ全てのDRG神経細胞にTRPV2チャンネルが発現開始することを見いだした。そして、これらTRPV2陽性神経細胞においては、伸長中の軸索が自分自身の細胞膜にかかる物理的な伸展張力を感知し、物理エネルギーを電気信号に変換することで、さらに軸索を伸長させることを明らかにした。つまり、メカノセンサーが関与する全く新たな軸索伸長の分子機構が存在することを見いだした (参考文献5、8、9、10)。

本新学術領域「温度生物学」の研究から、発生期にどのような1メートル以上もある感覚神経軸索を張り巡らせているのかが分子・細胞レベルで説明可能になった。また、機械刺激付加に伴うTRPV2活性化の分子メカニズムが明らかになった。この知見を応用し、TRPV2活性化剤を開発することで、損傷軸索再生を促す有効な治療法開発へと結びつく可能性がある。従来は侵害熱センサーとして知られていたTRPV2が、実はメカノセンサーとして機能するDual Functionを持っており、神経回路形成や損傷軸索の再生過程に関与していることが明らかになった。温度センサー分子が有する全ての生理学的性質を様々な角度から明らかにしてい

くことも、温度生物学領域の主要テーマの一つである。今後は、温度センサーのマルチ機能という視点からさらに研究を進展させていき、世界に先駆けた温度生物学的成果としたいと考えている。

本研究には富永領域代表から様々なサポートやご助言を頂いた。また、博士研究員の杉尾君、研究補佐員の木暮さん、阿部さんの実験サポートにより、素晴らしい研究成果を産み出すことが出来た。この場を借り、厚く御礼申し上げる。

### 参考文献

1. Killeen M. T. et al. Slit and Wnt receptors allow axons to choose the axis of migration. *Dev. Biol.* 323: 143-151 (2008).
2. Suter D. M. et al. The emerging role of forces in axonal elongation. *Prog. Neurobiol.* 94: 91-101 (2011).
3. Caterina M. J. et al. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398: 436-441 (1999).
4. Muraki K. et al. TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ. Res.* 93: 829-838 (2003).
5. Shibasaki K. et al. TRPV2 enhances axon outgrowth through its activation by membrane stretch in developing sensory and motor neurons. *J. Neurosci.* 30: 4601-4612 (2010).
6. Hayakawa et al. Actin stress fibers transmit and focus force to activate mechanosensitive channels. *J Cell Sci* 121: 496-503 (2008).
7. Zhang X et al. Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron* 59: 450-461 (2008).
8. Sugio S et al. TRPV2 activation by focal mechanical stimulation requires interaction with the actin cytoskeleton and enhances growth cone motility. *FASEB J.* 31: 1368-1381 (2017).
9. Shibasaki K. et al. Physiological significance of TRPV2 as a mechanosensor, thermosensor and lipid sensor. *J. Physiol. Sci.* 66: 359-365 (2016).
10. 柴崎貢志: メカノセンサーによる受動的軸索伸長の制御, ブレインサイエンス・レビュー2013 (ブレインサイエンス振興財団/編), pp103-122, クバプロ (2013)



## プロリン水酸化抑制を介したTRPA1の冷感受性獲得機構

京都大学 医学部附属病院 薬剤部 准教授/副薬剤部長  
中川 貴之



### はじめに

Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) は、ワサビの辛味成分allyl isothiocyanateやシナモン芳香成分cinnamaldehydeなどをはじめとする刺激性物質、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) など様々な刺激によって開口するカチオンチャネルです。主に小型の感覚神経 (無髄C線維) に発現し、侵害受容器として機能していることが知られています。その特徴として酸化感受性が非常に高く、TRPA1細胞内N末端側のアンキリンリピート部位に存在するシステイン残基やリジン残基への酸化的修飾により、ROSに敏感に反応するだけでなく、高酸素によっても開口するため、酸素センサーとしても機能しています (参考文献1)。一方、TRPA1は発見当初、17°C以下の冷刺激で開口する冷侵害受容器であると報告され (参考文献2)、TRPA1遺伝子欠損 (KO) マウスを用いた研究等によってもそのことは確認されました (参考文献3)。しかし、その後、TRPA1の冷刺激感受性について否定的な報告が相次ぎ、今なお議論が分かれています (参考文献4)。この点に関して、TRPA1の温度感受性には種差があり、マウスやラットなどのTRPA1は冷刺激に反応するものの、ヒトTRPA1 (hTRPA1) は冷刺激には反応しないことが報告され、決着が付いたように思われました (参考文献5)。しかし、冷痛覚過敏が起こる家族性遺伝性疼痛症候群の場合にはhTRPA1の点変異に原因があることや (参考文献6)、hTRPA1を人工脂質膜に挿入すると冷感受性を示すことも報告され (参考文献7)、TRPA1、特にhTRPA1の冷感受性に関しては完全には解明されていませんでした。

### オキサリプラチン誘発冷過敏応答とTRPA1

タキサン系、ビンカルカロイド系抗がん剤や白金製剤などのある種の抗がん剤により、副作用として末梢神経障害が高率に誘発されることが知られています。一般的に手足のしびれや痛み、錯感覚、感覚鈍磨などの異常感覚で始まり、進行すると運動神経障害や自律神経障害による症状も認められます。末梢神経障害が出現すると、患者の生活の質が低下するだけでなく、重篤な場合には抗がん剤の減量や投与中止が余儀なくされ、がん化学療法の治療成績にも影響を及ぼすことがあります。中でも、白金製剤オキサリプラチンによる末梢神経障害は特徴的で、投与した患者ほぼ全例で、投与中あるいは投与直後から数時間、遅くとも数日以内に四肢・口周囲のしびれ、感覚異常等の症状を引き起こし、興味深いことに寒冷被曝により誘発、増強されることが知られています。私達はこの点に着目し、TRPA1との関連を検討しました。

まず、オキサリプラチンをマウスに単回投与すると、わずか2時間後に冷刺激に対する過敏応答が出現しました。一方、シスプラチンやパクリタキセルといった他の抗がん剤ではこのような症状は認められなかったことなどから、この急性冷過敏応答がオキサリプラチンに特徴的な急性末梢神経障害を表現した行動ではないかと考えています。さらに、

TRPA1阻害薬やKOで抑制されること、さらに、TRPA1選択的刺激時に発生する疼痛様行動がオキサリプラチンにより増強されることから、TRPA1が関与することが確認できました。同様の結果は、初代培養マウス後根神経節神経を用いたCa<sup>2+</sup>イメージング実験でも確認しています。これらのことから、オキサリプラチンによって、TRPA1の感受性が選択的に亢進されるものと考えられました (参考文献8)。

### オキサリプラチンによるTRPA1過敏化機構

オキサリプラチンは生体内で、その抗がん作用を担う白金含有代謝物と脱離基のoxalateに分解されます。以前から、オキサリプラチン特有の急性末梢神経障害にはoxalateが関与しているのではないかと考えられてきました。私達も、オキサリプラチンと同様、oxalateが急性冷過敏応答を惹起し、この応答にはTRPA1が関与することも確認しました (参考文献8)。

ここで、TRPA1の活性化機構について再度考えてみたいと思います。上述した通り、ROSや高酸素によりTRPA1 N末端のシステイン残基やリジン残基が酸化的修飾を受けることにより活性化されます。一方、TRPA1は低酸素によっても活性化されますが、この分子機構として、細胞内酸素感受性酵素であるプロリン水酸化酵素 (PHD) が関与することが報告されています。すなわち、TRPA1は通常条件下では、TRPA1 N末端アンキリンリピート部位に存在するプロリン残基がPHDにより水酸化されており、抑制状態にあります。低酸素下ではPHDが不活性化し、このプロリン水酸化が抑制された結果、TRPA1は開口することが報告されています (参考文献1)。また、私たちは、比較的緩徐な低酸素負荷により、プロリン水酸化が抑制された結果、hTRPA1のROSに対する感受性が高まることも報告しています (参考文献9)。一方、oxalateは1-カルボキシ-2-オキソ構造を持ちますが、この構造はPHDの補因子 $\alpha$ -ケトグルタル酸、PHD阻害作用を示すオキサロ酢酸に共通しており、オキサリプラチンやoxalateがPHDを抑制するのではないかと考えました。PHDは、低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor : HIF) に存在するプロリン残基を水酸化することによって、HIFのユビキチン化とその後のプロテアソームによる分解を促進することが知られています。私たちはこの性質を利用して、オキサリプラチンおよびoxalateがPHD阻害作用を示すことを明らかにしました。

次に、hTRPA1を発現させた細胞を用いCa<sup>2+</sup>イメージング実験を行いました。比較的低濃度の10  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を処置しても、通常hTRPA1は活性化しませんが、オキサリプラチンやoxalateの細胞膜透過性アナログdimethyl oxalate (DMO) を2時間前処置しておくことにより、10  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>でもhTRPA1はCa<sup>2+</sup>応答を示し、ROSに対する感受性が亢進することを示しました。このhTRPA1のROS感受性亢進は、野生型PHD2あるいは酵素活性を示さない変異型PHD2の過剰発現により消失し、また、hTRPA1の394番目のプロ

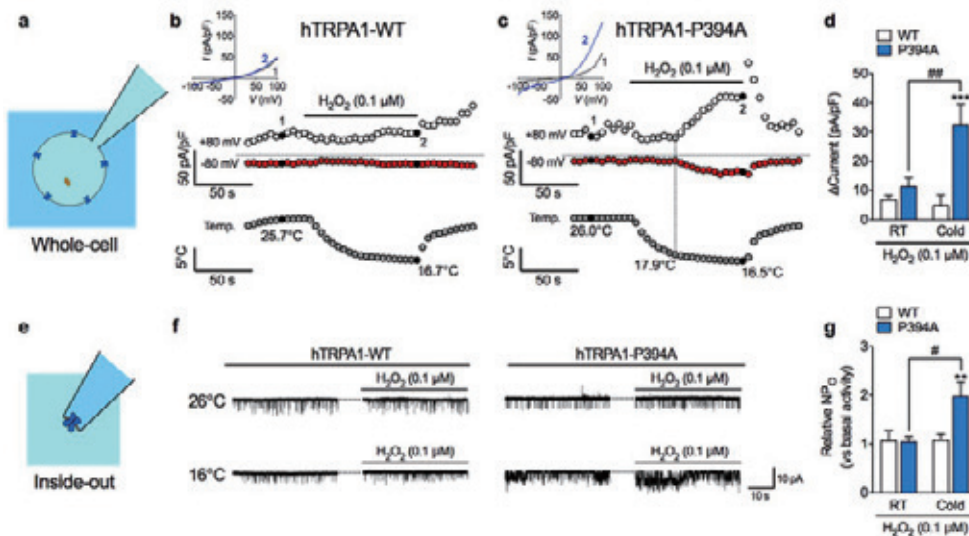


図1. hTRPA1-P394A変異体のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下での冷刺激感受性 (パッチクランプ法)  
野生型hTRPA1あるいはhTRPA1-P394A変異体を発現させたHEK293細胞に対し、0.1 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の存在下あるいは非存在下で冷刺激 (26°C → 16°C) を加え、whole-cell (上段: a-d) およびinside-out (下段: e-g) パッチクランプにて測定した。dはwhole-cellパッチクランプでの電流密度の変化値。gはinside-outパッチクランプでのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処置による開口確率 (NPO) の変化。参考文献10より改変して転載。

リン残基 (Pro<sup>394</sup>) をアラニンに置換したhTRPA1-P394A変異体においても消失しました。これらの結果から、オキサリプラチンあるいはoxalateが、PHDを抑制することで、TRPA1 Pro<sup>394</sup>の水酸化が抑制され、その結果、ROSに対する感受性が亢進したものと考えています (参考文献10)。

**プロリン水酸化抑制を介したTRPA1の冷感受性獲得機構**

オキサリプラチンによる急性末梢神経障害は冷刺激により誘発されるのが特徴です。一方、hTRPA1は冷感受性を示さないことも報告されていますが、私たちは、プロリン水酸化が抑制された状態のhTRPA1は冷感受性を示すのではないかと考えました。そこで、hTRPA1を発現させた細胞を用いて、冷刺激 (25°C → 16°C) による活動変化をwhole-cellおよびinside-outパッチクランプ法により観察しましたが、報告通り (参考文献4、5)、hTRPA1は冷刺激に対して全く応答しませんでした。一方、PHD阻害薬dimethylallylglycine (DMOG) の前処置、あるいはhTRPA1-P394A変異体を用いて、冷刺激による活動変化を観察したところ、極めて低濃度の0.1 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>存在下で、冷

刺激によりhTRPA1が活性化することを見出しました (図1)。すなわち、hTRPA1が冷刺激に応答するには、プロリン水酸化抑制に加え、ROSが存在することも必要であることが明らかになったのです。

一方、Ca<sup>2+</sup>イメージ実験では、DMOG処置あるいはPro<sup>394</sup>変異により、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>非存在下でもhTRPA1が冷刺激に応答することを確認しましたが、ミトコンドリア指向性ROS除去薬のmitoTEMPOにより、冷刺激感受性は抑制されました (図2)。以前から、冷刺激によりミトコンドリアからROSが産生されることが報告されていましたが、私たちの実験条件でも、同様にROS産生を確認しています。これらの結果から、hTRPA1は、Pro<sup>394</sup>のプロリン水酸化が抑制された状態では、冷刺激によるROS産生を介して間接的に活性化しうることが明らかとなりました (図3、参考文献10)。

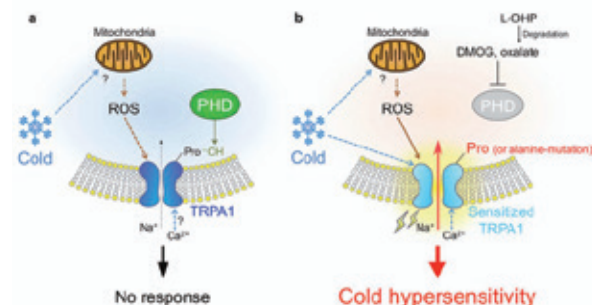


図3. プロリン水酸化抑制を介したTRPA1の冷感受性獲得機構  
参考文献10より改変して転載。

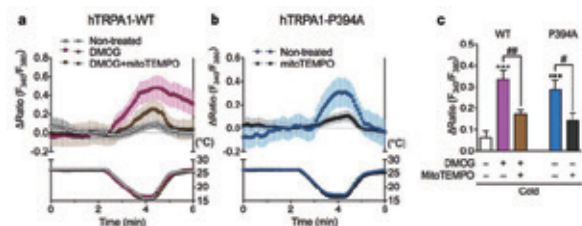


図2. プロリン水酸化抑制によるhTRPA1のROS依存的な冷感受性 (Ca<sup>2+</sup>イメージング)

a) PHD阻害薬DMOG (100 μM) を2時間前処置した野生型hTRPA1、b) hTRPA1-P394A変異体を発現させたHEK293細胞に、冷刺激 (26°C → 16°C) を加え、fura-2によるCa<sup>2+</sup>イメージングを行った。上段: [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を示す蛍光強度比、下段: 温度変化。DMOG処置後のhTRPA1あるいはhTRPA1-P394A変異体では、冷刺激によりCa<sup>2+</sup>応答が認められたが、ミトコンドリア指向性ROS除去薬mitoTEMPO (10 μM) 前処置後により有意に抑制された。参考文献10より改変して転載。

**おわりに**

今回私たちは、長年議論が分かれていたhTRPA1の冷感受性について、オキサリプラチンという一風変わった副作用を示す抗がん剤をツールとして用いることから研究をスタートし、PHD抑制下での冷刺激によるROS産生を介した間接的なTRPA1活性化を示すことで、一定の結論を得ることがで



きました。これらの知見は、チャネル分子が直接温度変化を感知するのではなく、「温度変化によって生じた細胞内での変化をイオンチャネルが捉える」という間接的な温度感受のメカニズムを提唱したものであると考えています。また、本研究は、抗がん剤の末梢神経障害という臨床問題となっている副作用のメカニズムの一端を明らかにしたものであります。この分子機構は、以前に私たちが報告した正座後のしびれで認められる低酸素によるTRPA1過敏化と同じであり(参考文献9)、冷え性や手足の血流低下を伴う糖尿病や末梢閉塞動脈疾患などの患者で見られる「手足が冷えて痛い、しびれる」という感覚にも関連しているのではないかと考えています。

#### 参考文献

1. Takahashi N et al. TRPA1 underlies a sensing mechanism for O<sub>2</sub>. *Nat. Chem. Biol.* 7: 701–711 (2011).
2. Story GM et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112: 819–829 (2003).
3. Kwan KY et al. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50: 277–289 (2006).
4. Jordt S et al. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427: 260–265 (2004).
5. Chen J et al. Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nat. Commun.* 4: 2501 (2013).
6. Kremeyer B et al. A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron* 66: 671–680 (2010).
7. Moparthi L et al. Human TRPA1 is intrinsically cold- and chemosensitive with and without its N-terminal ankyrin repeat domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 16901–16906 (2014).
8. Zhao M et al. Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol. Pain* 8: 55 (2012).
9. So K et al. Hypoxia-induced sensitization of TRPA1 in painful dysesthesia evoked by transient hindlimb ischemia/reperfusion in mice. *Sci. Rep.* 6: 23261 (2016).
10. Miyake T et al. Cold sensitivity of TRPA1 is unveiled by the prolyl hydroxylation blockade-induced sensitization to ROS. *Nat. Commun.* 7: 12840 (2016).

# 温度生物学 用語集 作成のお知らせ

温度生物学が関連する生物現象は、生物学全般の多岐にわたります。より多くの研究者、学生の皆さんに温度生物学を知っていただくため、この度「温度生物学 用語集」を作成・公開することに致しました。

温度生物学 用語集は下記の3つのチャプターから構成されます。

## 分子・細胞レベルでの温度生物学

- ・温度感受性TRPチャンネル
- ・熱ショックタンパク質
- ・ミトコンドリアでの熱産生
- ・温度と膜流動性 など

## 組織・個体レベルでの温度生物学

- ・自律性体温調節機構
- ・温度の快・不快情動
- ・概日時計とエネルギー代謝
- ・褐色脂肪 など

## 温度生物学に関わる研究手法

- ・ポリマー性温度センサー
- ・蛍光寿命イメージング
- ・局所温度制御デバイス
- ・パッチクランプ法 など

研究の発展に合わせて、随時更新いたします。

詳細は温度生物学ホームページ (<http://www.nips.ac.jp/thermalbio/>) をご覧ください。

(用語集・例)

### 温度感受性TRP (transient receptor potential) チャンネル

*trp* (transient receptor potential) 遺伝子は、1989年にショウジョウバエの光受容応答の異常を示す変異体の原因遺伝子として同定され、*trp*遺伝子がコードするタンパク質はイオンチャンネル活性を有することが後に報告された。TRPチャンネルは、内因性物質、化学物質のみならず機械刺激などの物理刺激によっても活性化される非選択的陽イオンチャンネルである。1997年にTRPV1<sup>(補足1)</sup>が43℃以上の熱によって活性化される温度センサーであることが報告された。それ以降、様々な温度を感知するTRPチャンネルが次々と報告され、現在では11のTRPチャンネルに温度感受性があると考えられている。これらのチャンネルを総称して温度感受性TRPチャンネルと呼び、低温から高温まで生理的に感じる温度域をほぼ網羅している(図1)。

温度感受性TRPチャンネルの多くは感覚神経や皮膚に発現し、環境温度の感知に関わると考えられている。また、温度感受性TRPチャンネルは大きな温度変化に暴露されない組織にも発現しており、その生理的役割が注目されている。一方、温度感受性TRPチャンネルが温度によって活性化されるメカニズムの解明が精力的に行われているものの未だ明らかにされておらず、本領域研究の大きなテーマの一つである。

(補足1) TRPV1チャンネル:

D. Julius博士、領域代表の富永らのグループは、トウガラシの辛味成分でありバニリル基を有するカプサイシン (Capsaicin) により活性化されるイオンチャンネルを発見クローニング法にて探索を試みた結果、TRPファミリーと相同性を有する分子VR1 (Vanilloid receptor 1、後にTRPV1) の同定に成功した。カプサイシンは灼熱感を伴う辛味成分であることから、同グループはTRPV1発現細胞に温熱を適用し43℃以上の高温によっても活性化される温度センサーであることを発見した。

#### 参考文献

- ・Caterina MJ et al. *Nature* 389: 816-827 (1997)
- ・温度感受性TRPチャンネルと疾患 富永真琴 医学のあゆみ 245: 831-837, (2013)

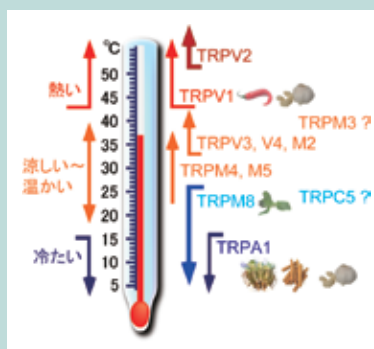


図1 温度感受性TRPチャンネル

## 今後の活動予定

**2017年9月4日(月) 「温度生物学」国際シンポジウム**

会場：京都大学医学部創立百周年記念施設 芝蘭会館

**2017年9月5日(火)～6日(水) 「温度生物学」第4回 領域会議**

会場：京都大学医学部創立百周年記念施設 芝蘭会館

## 編集後記

京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻 助教  
長尾 耕治郎

第3号のニュースレターに掲載された先生方の研究成果を拝見し、温度という物理量の生物における重要性を改めて実感しています。また、明らかにすべき点がまだまだ多く残されており、温度生物学という学問の発展性の高さも併せて感じています。このため、オリジナリティがあり自身の代名詞となるような研究テーマを探し求めている私のような若手研究者には本領域の研究はとても魅力的であり、私自身が本領域の中で進めている研究の中からライフワークとして挑戦できるような疑問や課題が見つかるのではと楽しみにしています。

話が変わりますが、ニュースレターのテーマカラーを毎号変更しています。第1号の青色から始まり、第2号の水色、そして第3号では緑色を選択しました。色見本を見ながら梅田研究室内で議論し、各号のテーマカラーを選択しています。シリーズ性も考慮しながら、最終号を発展性のある温度生物学らしい色で迎えられるように構想していますので、今後のテーマカラーにご期待ください。

最後に、ご多忙の中にも関わらず原稿をお送り頂いた先生方、デザイン画を提供頂いた中洲幸氏、紙面の構成に尽力頂いた梅田研究室 原・山口両氏に感謝申し上げます。

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3号（2017年6月発行）

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

過去のニュースレターをホームページで公開しています。