

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.4



# Contents 目次

領域代表挨拶	01
「温度生物学」の創成を目指して 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、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	
計画班の研究概要	04
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	
公募班の研究成果	11
A01: 西山 賢一、小野 崇人、井上 飛鳥、大倉 正道、藤原 祐一郎、 中野 雅裕、井藤 彰、佐藤 陽子、江藤 圭、神谷 厚範 A02: 武田 憲彦、酒井 寿郎、田中 光一、神吉 智丈、 塩見 邦博、中川 貴之、藤田 潤、小川 渉、浅野 知一郎、 野村 真、高橋 将文、中村 隼明	
第4回 領域会議：概要	33
会期：2017年9月5日(火)～6日(水) 会場：京都大学 芝蘭会館 稲盛ホール・山内ホール	
第4回 領域会議：若手の声	34
猪股 直生 (東北大学大学院 工学研究科) 柳 昂志 (東京大学大学院 薬学系研究科)	
2017年「温度生物学」公開国際シンポジウム	36
開催日時：2017年9月4日(月) 会場：京都大学芝蘭会館 稲盛ホール 開催報告：中村 和弘 (名古屋大学大学院 医学系研究科)	
本領域の活動	38
国際共同研究加速基金活動報告 人羅 菜津子 (北海道大学大学院 薬学研究院)	
学会・シンポジウム開催報告 土居 雅夫 (京都大学大学院 薬学研究科) 岡部 弘基 (東京大学大学院 薬学系研究科)	39
アウトリーチ活動報告 長尾 耕治郎 (京都大学大学院 工学研究科)	41
トピックス	42
「Hikeshi欠損でみられるヒト細胞のストレス感受性」 今本 尚子 (理化学研究所)	
「細胞内温度を測定するプローブ」 中野 雅裕 (大阪大学 産業科学研究所)	
温度生物学ハンドブック (用語集) 公開のお知らせ	47
今後の活動予定	48
編集後記	

## 領域代表挨拶

「温度生物学」の創成を目指して」



岡崎統合バイオサイエンスセンター  
富永 真琴

平成30年（2018年）の新春のお祝いを申し上げます。

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）」も3年目が終わろうとしており、今年4月には新たな公募班員を迎えます。広範なバックグラウンドの研究者が集まり、領域内連携も進み、優れた成果が出つつあります。折り返し点での2年半の時点で行われた中間評価では、よい審査結果を得ることができ、この新学術領域研究の意義をあらためて実感したところです。これからは、研究領域内での有機的な結びつきをより一層強め、「温度センシング」と「温度応答システム」の両者を結合しうる見通しを研究領域内外に示して「温度生物学」の創成にむけてまとめ上げていくことが期待されています。

私毎で恐縮ですが、この新学術領域研究「温度生物学」のことを欧米を含む諸外国で話すたびに大きな反響があります。それは、2017年4月にイギリスの科学雑誌IMPACTで紹介されたことと呼応します。いかにして世界に向けて発信していくかが大きな課題となるでしょう。本ニュースレターは4号になりますが、英語でのニュースレター発信も念頭に入れて取り組んで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
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

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 渉	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 医歯薬保健学研究科
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	広島大学大学院 生物圏科学研究科

## 班友

深田 吉孝	東京大学大学院 理学系研究科
-------	----------------

# 計画班の研究成果

## 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

温度感受性TRPチャンネルに焦点をあてて、温度感知機構の解明、TRPチャンネルが関わる温度依存性の生理機能の解析を行っている。マウス唾液腺・涙腺でTRPV4/anoctamin1複合体が温度依存的に機能し、TRPV4欠損マウスでは唾液分泌・涙分泌が減少することが明らかとなった。マウスは体温上昇時に体温を低下させるために唾液を体毛につけるので、体温上昇時には唾液を大量に分泌する必要があり、このメカニズムは理にかなっている。

#### 論文

1. Derouiche S et al. TRPV4 heats up ANO1-dependent exocrine gland fluid secretion. *FASEB J.* in press.
2. Takayama Y et al. 4-isopropylcyclohexanol has potential analgesic effects through the inhibition of anoctamin 1, TRPV1 and TRPA1 channel activities. *Sci. Rep.* 7: 43132 (2017).
3. Takayama Y et al. Modulation of water efflux through functional interaction between TRPV4 and TMEM16A/anoctamin 1. *FASEB J.* 28: 2238-2248 (2014).

## 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 先端科学技術研究科 マテリアルサイエンス系 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：  
局所麻酔薬と膜相分離構造との相互作用に関する研究

#### 研究概要

局所麻酔薬 (LA) は、膜チャンネルに作用すると考えられているが、生体膜との相互作用を介した間接的メカニズムも提唱されている。我々は、細胞模倣膜を用いた研究により、LAは、ラフトを模倣した相分離構造 (ラフト模倣相) と高い親和性を有し、相境界に働く線張力を低下させることで、膜中分子の混和を促進し、相分離ドメインの熱安定性を低下させる事を明らかにした。細胞の場合もLAは、ラフトの安定性を低下させ、チャンネル機能に影響している可能性がある。

#### 論文

1. Sugahara K et al. Thermal stability of phase-separated domains in multicomponent lipid membranes with local anesthetics. *Membranes* 7: 33 (2017).
2. Shimokawa N et al. Formation of modulated phase and domain rigidification in fatty acids-containing lipid membranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 19: 13252-13263 (2017).
3. Sharma N et al. Glycosyl chains and 25-hydroxycholesterol contribute to the intracellular transport of amyloid beta (A $\beta$ -42) in Jurkat T cells. *FEBS Open Bio.* 7: 865-876 (2017).

## 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 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：  
温度情報伝達の多様性解析

## 研究概要

動物の温度応答の多様性を捉えるために、線虫*C. エレガンス*の低温耐性・馴化を指標に解析を進めている。これまでに、頭部の光感覚ニューロンが3量体Gタンパク質を介して温度を受容し、低温耐性を制御することが見つかった(論文3,2)。さらに、予想外にも、精子が頭部の温度受容ニューロンをフィードバック制御していることも見つかった(論文1)。また、世界各地の多型株を用いた解析から、低温馴化の多様性の原因遺伝子の存在領域を絞り込んだため解析を進めている。

## 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A01-1

## 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



## 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：  
人工再構成系を用いた温度感受性TRPチャンネルの機能解析

## 研究概要

細胞が温度を情報として検知し伝達するためには、温度情報を電気信号に変換する必要があります。私たちは、温度情報を電気信号に変換するメカニズム、すなわち温度によってイオンチャンネルが開くメカニズムの解明を目的として、人工再構成系を用いたTRPチャンネルの機能解析を行っています。これまでに、TRPM3の温度依存的活性化にPIP<sub>2</sub>などの分子が必要なこと、また、TRPM5は温度依存的な活性化のみならず不活性化がみられることを明らかにしました。

## 論文

1. Uchida K et al. Involvement of thermosensitive TRP channels in energy metabolism. *J. Physiol. Sci.* 67: 549-560 (2017).
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A01-2

### 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

CRISPR/Cas9を使ってHikeshiノックアウトヒト細胞を作成し、Hikeshiのストレス感受性を調べた。その結果、子宮頸がんHeLa細胞ではHikeshiをノックアウトするとアポトーシス活性が上昇してストレス感受性になるが、正常2倍体細胞であるhTERT-RPE1細胞（不死化網膜色素上皮細胞）はHikeshiをノックアウトするとアポトーシス活性が低下してストレス耐性になることがわかった。Hikeshiをノックアウトすると、ストレスでp53の発現が亢進することが一つの原因であると考えられる。

#### 論文

1. Rahman KMZ et al. Hikeshi modulates the proteotoxic stress response in human cells: implication for the importance of the nuclear function of HSP70s. *Genes Cells*. 22: 968-976 (2017).
2. Kimura M et al. Extensive cargo identification reveals distinct biological roles of the 12 Importin pathways. *eLife* 10.7554/eLife 21184 (2017).
3. 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).

## 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 生体認識化学分野 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

個々の細胞が如何にして細胞内の温度を感知し、細胞内の物理化学的環境や代謝レベルを変化させ、環境温の変動に適応しているのか依然不明である。脂肪酸不飽和化酵素は、細胞内の温度変化に鋭敏に応答して発現が変動し、細胞膜流動性の調節を始め、脂質・エネルギー代謝制御、性行動や体温調節行動に関与するユニークな分子である。本課題では、同酵素の発現制御機構と生物機能の解明を通して、細胞内温度センシングとエネルギー代謝制御機構を明らかにすべく研究を進めている。

#### 論文

1. Murakami A et al. An N-terminal di-proline motif is essential for fatty acid-dependent degradation of  $\Delta 9$ -desaturase in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 292: 19976 (2017).
2. Okuma H et al. Tubular aggregate myopathy caused by a novel mutation in the cytoplasmic domain of STIM1. *Neurol. Genet.* 2: e50 (2016).
3. Ogawa R et al. Development of a novel tetravalent synthetic peptide that binds to phosphatidic acid. *PLoS ONE* 10: e0131668 (2015).



## 計画研究 研究項目A01-4

## 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



## 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

我々はこれまでに、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、定量性や精度に優れた細胞内温度計測法と、局所加熱法の開発に取り組む。さらに、開発した方法を用いて、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. Han Y et al. The application of Fluorescence-Conjugated Pyrrole/Imidazole Polyamides in the Characterization of Protein-DNA Complex Formation. *Biomaterials 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. 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).

## 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、細胞内温度計測法の開発と応用に加えて、レーザー光や発熱材料を用いた細胞内局所を加熱する方法も開発する。細胞内温度計測と加熱法を用いることで、細胞内の温度の変動を定量的に解明するとともに、局所加熱に対する細胞の応答を調べることで、細胞内温度変動と細胞機能の関連を明らかにする。さらに、細胞内温度変動や温度応答の分子機構を詳細に検討することで、細胞内における温度シグナリングの存在とその意義を解明する。

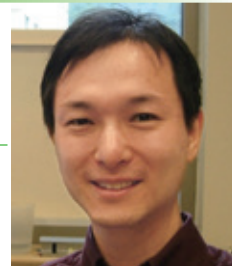
## 論文

1. Hattori K et al. ASK1 signalling regulates brown and beige adipocyte function. *Nat. Commun.* 7: 11158 (2016).
2. Okabe K et al. Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Commun.* 3: 705 (2012).
3. 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

人間を含めた恒温動物の体温調節はエネルギーを消費して行われるため、体内の栄養状態や代謝と密接に関連します。私達はラット・マウスの個体レベルの解析によって、体温と代謝調節を統合する中枢神経回路メカニズムの解明を目指しています。これまでに、末梢の飢餓状態を感知して熱産生を抑制するとともに摂食を促進する神経細胞群を発見し、また、体温維持のエネルギーコストを最小限にする本能行動を駆動する温度感覚伝達経路を特定しました。

### 論文

1. Yahiro T et al. The lateral parabrachial nucleus, but not the thalamus, mediates thermosensory pathways for behavioural thermoregulation. *Sci. Rep.* 7: 5031 (2017).
2. Nakamura Y et al. Medullary reticular neurons mediate neuropeptide Y-induced metabolic inhibition and mastication. *Cell Metab.* 25: 322-334 (2017).
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A02-1

## 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

我々は肝臓-褐色脂肪連関に着目して研究を進め(論文2、3)、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てきた。本領域がスタートした後も、糖尿病治療薬であるSGLT2阻害薬投与による肝臓の糖代謝変化が、神経ネットワークを介して褐色脂肪の熱産生低下を引き起こしていることを代表の中村和弘教授らとの共同研究で見出した(論文1)。現在、肝臓のインスリンシグナルの減弱が褐色脂肪の熱産生に及ぼす影響を見出しており、今後、①新規肝臓-褐色脂肪連関の詳細解明、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したい。

### 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).
2. Tsukita S et al. Hepatic glucokinase modulates obesity predisposition by regulating BAT thermogenesis via neural signals. *Cell Metab.* 16: 825-832 (2012).
3. Uno K et al. Neuronal pathway from the liver modulates energy expenditure and systemic insulin sensitivity *Science* 312:1656-1659 (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時間変化を生み出す分子機構の解明を目指している。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とらえる方法を樹立し、さらには、脳内中枢時計からの体温制御機構においてHikeshiや中枢時計に発現するGPCRを標的とした探索研究を進めることができた。

## 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. Chao HW and Doi M et al. Circadian clock regulates hepatic polyploidy by modulating Mkp1-Erk1/2 signalling pathway. *Nat. Commun.* 8: 2238 (2017).
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A02-3

## 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



## 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

温度による行動制御の基盤となる快・不快情動生成機構を明らかにするために、暑熱・寒冷環境曝露時の脳内神経伝達物質遊離量変化をマイクロダイアリス法により検討し、分界条床核においてノルアドレナリン遊離が亢進することを明らかにしている。さらに、環境温度選択行動に関わる神経情報伝達機構解析のための行動試験系を構築し、現在、環境温度選択行動と体温との関連や、概日リズムと環境温度選択行動との関連を解析している。また、本領域において開発される温度感受性蛍光プローブを活用して脳内温度計測を行うため、ファイバーフォトメトリーによる脳内蛍光計測系の構築も行っている。

## 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A02-3

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

低温誘導性タンパク質 (CIP) の軽度低温での発現誘導には温センサー・TRPV4 (34℃以上で活性化) が必要であることを見いだした。また、このCIP発現誘導はTRPV4のチャネル活性とは独立した事象であることも明らかにした (藤田班との連携研究成果)。これらの点より、温度変化に伴うTRPV4構造変化をトリガーとした細胞内シグナリング系が存在する可能性が示唆された。さらにTRPV1が網膜メラノプシン陽性細胞の興奮性を調節することも見いだした (国際共同研究加速基金による成果)。

論文

1. Jo AW et al. Signaling in mouse retinal ganglion neurons is dynamically modulated through parallel nonretrograde activation of cannabinoid and vanilloid pathways. *J. Physiol.* 595: 6499-6516 (2017).
2. Fujita T et al. TRPV4-dependent induction of a novel mammalian cold-inducible protein SRSF5 as well as CIRP and RBM3. *Sci. Rep.* 7: 2295 (2017).
3. Sugio S et al. TRPV2 activation requires interaction with the actin cytoskeleton and enhances growth cone motility. *FASEB J.* 31: 1014-1019 (2017).



温度生物学  
THERMAL BIOL

公募研究 研究項目A01

## 西山 賢一【にしやま けんいち】

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 寒冷発育制御研究分野 教授



### 研究課題名

タンパク質膜挿入に必須の糖脂質酵素MPlaseの低温センシングによる発現誘導機構

### 研究概要

①MPlase生合成の律速段階を触媒する酵素CdsAの低温下での発現誘導機構の解析：

MPlaseの発現量が、培養温度の低下に伴い5~10倍にまで上昇することが判明した。MPlase生合成の律速段階を触媒する酵素CdsAのmRNA転写量が温度の低下に伴い5倍以上上昇していた。CdsAのmRNA量を低温シフト後に経時的にモニターしたところ、低温シフト5分後に一過的に10倍程度に増加した後、15分後以降には約5倍程度のレベルで安定した。*cdsA*遺伝子上流の*dxr*遺伝子内部には、低温ショック応答に関わるCspAの認識部位が2箇所確認された(図1)。*cdsA*遺伝子のプロモーター解析の結果、低温下での発現誘導を受けるもの(*Pcold*)と受けないもの(*PispU*)がある(図1)ことを見出した。大腸菌が低温を感知すると*Pcold*が作動し、そこから転写されるmRNAはCspAの結合により安定化される。その後CspAレベルが低下するためmRNAレベルは低下するものの、*Pcold*は作動し続けるため安定的に高いレベルが保たれることが明らかとなった。

*cdsA*遺伝子の低温下での発現誘導には、翻訳レベルでの制御も関わっていることが判明した。*cdsA*遺伝子の開始コドン上流にステム・ループ構造を形成する配列を同定した(図2)。*cdsA*遺伝子を構成的に発現するプロモーターに連結したとき、このステム・ループ構造を形成できないサブクローン(CdsA8.1)では、低温下での発現誘導ができなくなっていることを発見した。

②低温下でのMPlase発現量増加がTAT (Twin-Arginine Translocation) 膜透過反応に及ぼす影響の解析：

MPlaseはタンパク質膜挿入反応だけでなくTAT (Twin-Arginine Translocation) 膜透過反応にも関与することを明らかにした。さらに、低温下でのTAT膜透過にはMPlaseの発現量上昇が必須であることを明らかにした。

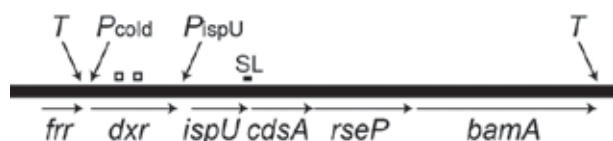


図1 染色体上での*cdsA*遺伝子近傍の遺伝子構造。ターミネーター(T)と*cdsA*遺伝子上流の2個のプロモーター(*Pcold*と*PispU*)、CspAの認識配列CCAAT(□)、と*cdsA*遺伝子の開始コドン近傍のステムループ構造(SL、図2参照)の部位を示す。

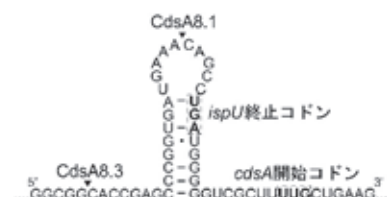
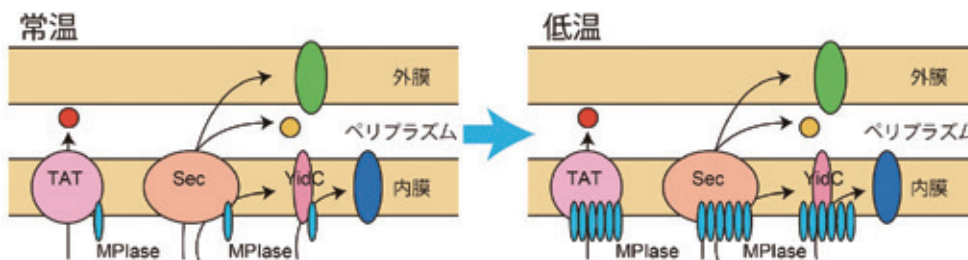


図2 *cdsA*遺伝子の開始コドン近傍のステム・ループ構造。CdsA8.1、CdsA8.3はPtetに連結した*cdsA*遺伝子の開始部位を示す。



### 研究成果

1. Nishikawa K et al. Membrane insertion of  $F_0$  c subunit of  $F_0F_1$  ATPase depends on glycolipozyme MPlase and is stimulated by YidC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 487: 477-482 (2017).
2. Nishiyama K et al. Novel translocation intermediate allows re-evaluation of roles of ATP, proton motive force and SecE at the late stage of preprotein translocation. *Genes Cells* 12: 1353-1364 (2016).
3. Nishiyama K et al. MPlase is a glycolipozyme essential for membrane protein integration. *Nat. Commun.* 3: 1260 (2012).

公募研究 研究項目A01

小野 崇人【おの たかひと】

東北大学大学院 工学研究科 機械機能創成専攻 小野・猪股研究室 教授



研究課題名

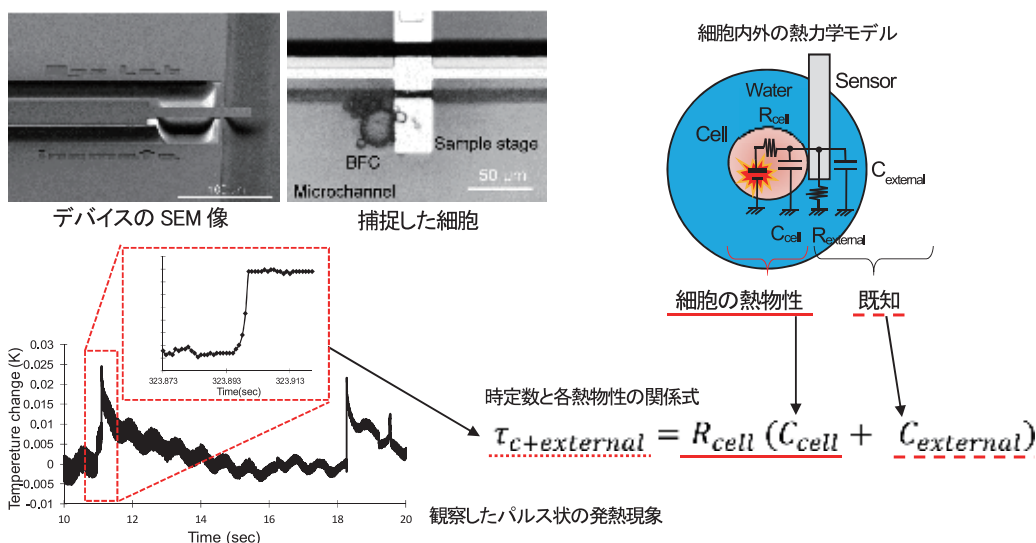
熱量センサによる細胞の熱力学計測

研究概要

本研究では、共振型高感度熱センサシステムによる単一褐色脂肪細胞の動的熱計測を行うとともに、細胞の熱力学モデルを構築し、両者の結果をもとに細胞の熱物性を明らかにすることを目的とする。

高感度かつ高速応答で物理量を計測することのできる共振型熱センサを軸にした熱センシングデバイスを用いて、単一褐色脂肪細胞の動的熱計測を行った。微細加工技術を用いて作製されたこのデバイスは、両持ち梁型の機械共振子を用いることで、 $0.079\text{mK}/\sqrt{\text{Hz}}$ 、 $1.9\text{W}/\sqrt{\text{Hz}}$ の熱分解能を達成した。薬液刺激をしない状態で褐色脂肪細胞の発熱を観察すると、周期的に鋭いパルス状の発熱を示した。このパルス状発熱より細胞の動的熱特性の解明を試みた。実験結果より得られた立ち上がり時間は6.8ミリ秒であり、これより熱容量と熱抵抗を算出することを試みた。細胞の、簡素化した熱力学モデルを発熱量、細胞の熱容量と熱抵抗、細胞外（センサや周囲の溶媒）の熱容量と熱抵抗のパラメータを用いて提案すると、下図のようになる。このうち、細胞外の熱容量と熱抵抗は既知値として算出可能な値であり、(時定数) = (合成熱容量) \* (合成熱抵抗) より細胞の熱物性を算出した。本モデルによる解析の結果、細胞の熱伝導率を $0.1\text{W}/\text{mK}$ とした場合、その比熱は $4.9\text{kJ}/\text{mK}$ となる。有限要素法を用いて、温度上昇の立ち上がり時定数を元にした熱物性の検証も行っており、熱伝導率は $0.05\sim 0.5\text{W}/\text{mK}$ 、比熱は $1\sim 110\text{ J}/\text{kgK}$ の範囲になるという結果も得ている。熱力学モデルにより導かれた比熱の値もこの範囲内に収まっている。また、導出された比熱の値は水 $4.2\text{ kJ}/\text{mK}$ に比べて若干大きなものであるが、熱伝導率は非常に小さいことが示唆される。また細胞の熱物性をより正確に求めるには、細胞の発熱量の定量化をはじめ、さらに多くの実験が必要となる。

以上、高感度熱計測システムを開発し、細胞の発熱現象を動的に計測することに成功した。さらに、熱力学モデルを提案し、動的熱計測の結果と組み合わせることで、細胞の熱伝導率と比熱の同定が可能であることが示唆された。



研究成果

- Inomata N et al. Highly sensitive thermometer using a vacuum packed Si resonator in a microfluidic chip for the thermal measurement of single cells. *Lab on a Chip*. 16: 3597-3603 (2016).

公募研究 研究項目A01

# 井上 飛鳥 [いのうえ あすか]

東北大学大学院 薬学研究科 分子細胞生化学分野 准教授



研究課題名

## 脂質が制御するTRPチャンネルによる温度感知システムの解明

研究概要

(1)TRPチャンネルの活性に影響を及ぼす脂質の探索

シグナル蓄積型のTRPチャンネル活性化検出法であるTGF $\alpha$ 切断アッセイを用いて、TRPチャンネルの活性化に対する脂質の影響を調べた。その結果、TRPチャンネルを活性化する脂質や阻害する脂質を見出した(既報のTRPチャンネルリガンドを含む)。例えば、TRPV1チャンネルは脂肪酸にエタノールアミンが結合したアナンダミド類縁体などにより活性化された(図)。

(2)リゾリン脂質感受性を示すTRPV1とTRPA1のマスト細胞脱顆への関与

ラット腹腔マスト細胞の脱顆粒応答は、リゾリン脂質のリゾホスファチジルセリンやリゾホスファチジルスレオニンにより強力に促進される。以前我々はこれらリゾリン脂質がHEK293細胞に発現させたTRPV1とTRPA1を活性化することを見出していたことから、マスト細胞の脱顆粒応答へのTRPチャンネルの寄与を検証した。阻害剤を用いた実験からはTRPV1とTRPA1の関与は否定された。ラット腹腔マスト細胞に対するエレクトロポレーションによるsiRNAの導入と遺伝子発現抑制の実験系を構築し、上記以外のTRPチャンネルの寄与を検討したところ、TRPM7チャンネルの発現抑制によりリゾリン脂質による脱顆粒応答が抑制された。

(3)急性肝炎モデルによる低温ショック時のリゾリン脂質変動

コンカナバリンA誘発性急性肝炎モデルにおける血中リゾリン脂質変動をLC-MS/MSを用いて測定した。本モデルは低温ショックが誘導されるとともに、リゾホスファチジルセリンの投与により発症が予防されることを以前見出している。脂質解析の結果、急性肝炎発症時にリゾホスファチジルセリンが特異的に10倍以上濃度上昇することを見出した。リゾホスファチジルセリンは上述の通り、一部のTRPチャンネルの活性化を誘導することから、TRPチャンネルが肝炎の抑制に寄与することを想定し、アゴニスト・アンタゴニストを用いた薬理実験を行なったが、TRPV1やTRPA1の寄与を認めることはできなかった。

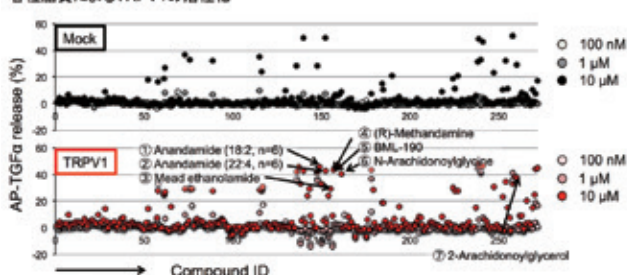
(4)温度変化によるTRPチャンネルの膜タンパク質制御

HEK293細胞において、TRPチャンネルシグナルとGPCRシグナルは共に膜タンパク質TGF $\alpha$ のエクトドメイン切断を誘導する。エクトドメイン切断機構の差異を調べたところ、GPCRシグナルは膜型メタロプロテアーゼADAM17を選択的に活性化する一方、TRPチャンネルシグナルはADAM17とADAM10の両方を活性化した。ADAM10は温度依存的なTRPV1やTRPA1の活性化によるエクトドメイン切断を誘導したのに対し、ADAM17はその変化は限定的であった。

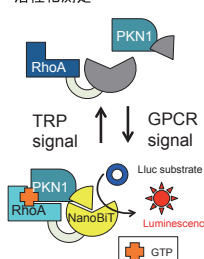
(5)TRPチャンネルによる低分子量Gタンパク質制御

TRPチャンネルによるカチオン流入がシグナル伝達に及ぼす影響に着目し、最近構築した低分子量Gタンパク質バイオセンサーを用いてその活性状態を調べた。その結果、TRPV1やTRPM8によりRhoAが不活性化され、GPCRシグナルとは逆の方向に活性化状態が変化することがわかった(図)。

各種脂質によるTRPV1の活性化



RhoAバイオセンサーによる活性化測定



研究成果

1. Inoue A et al. TGF $\alpha$  shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nat. Methods* 9: 1021-1029 (2012).

公募研究 研究項目A01

## 大倉 正道【おおくら まさみち】

埼玉大学大学院 理工学研究科 准教授

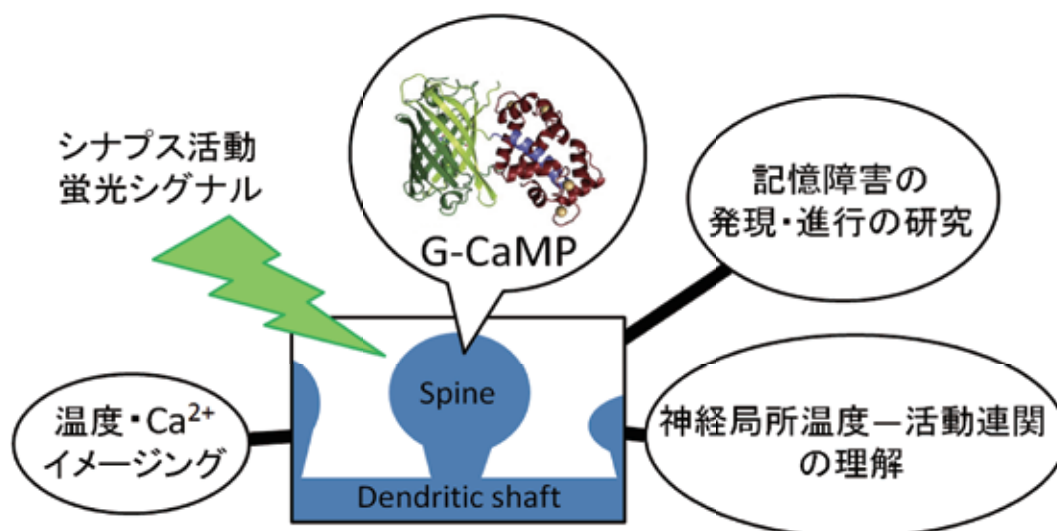


### 研究課題名

高感度カルシウムプローブを用いた神経局所温度—活動連関の研究

### 研究概要

海馬錐体細胞において、グルタミン酸作動性の興奮性シナプス入力部位である個々の樹状突起棘（スパイン）は記憶に重要な役割を果たしている。統合失調症等の一部の神経疾患では海馬でのスパインの萎縮やスパイン数の減少等に伴って進行性の記憶障害が生じるが、その1つの原因としてミトコンドリアの障害によるATPの産生低下、ひいてはシナプスでの熱産生の低下が関与する可能性がある。しかしATP産生や熱産生の低下がどのようにスパインの活動不全を起こすのかは未だに明らかにされていない。本研究は、統合失調症様の症状を誘発させる薬物の投与や遺伝子の操作によって個々のスパインの温度、Ca<sup>2+</sup>活動、ATP産生がどのように変化するのかを明らかにし、記憶障害の発現・進行に関わる神経局所温度—活動連関を解明することを目的としている。28年度はまずシナプスの温度、Ca<sup>2+</sup>活動、ATP産生の経時変化をイメージングで測定することを可能にする蛍光プローブの作製を行った。シナプス内のCa<sup>2+</sup>活動を高精度に評価できるように蛍光Ca<sup>2+</sup>プローブの明るさの改善を進めた結果、従来より格段に高輝度なCa<sup>2+</sup>プローブであるG-CaMP7.09を開発することに成功した。開発したCa<sup>2+</sup>プローブは、シナプス病態の経時的な進行を明らかにすべく既存の温度プローブ、ATPプローブとともに神経標本に適用し、長時間培養下での蛍光イメージングを行うための実験条件を検討した。



### 研究成果

1. Shiba Y et al. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 538: 388-391 (2016).
2. Muto A et al. Real-time visualization of neuronal activity during perception. *Curr. Biol.* 23: 307-311 (2013).
3. Ohkura M et al. Genetically encoded green fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicators with improved detectability for neuronal Ca<sup>2+</sup> signals. *PLoS ONE* 7: e51286 (2012).



公募研究 研究項目A01

藤原 祐一郎 [ふじわら ゆういちろう]

大阪大学大学院 医学系研究科 生理学講座 (統合生理学) 准教授



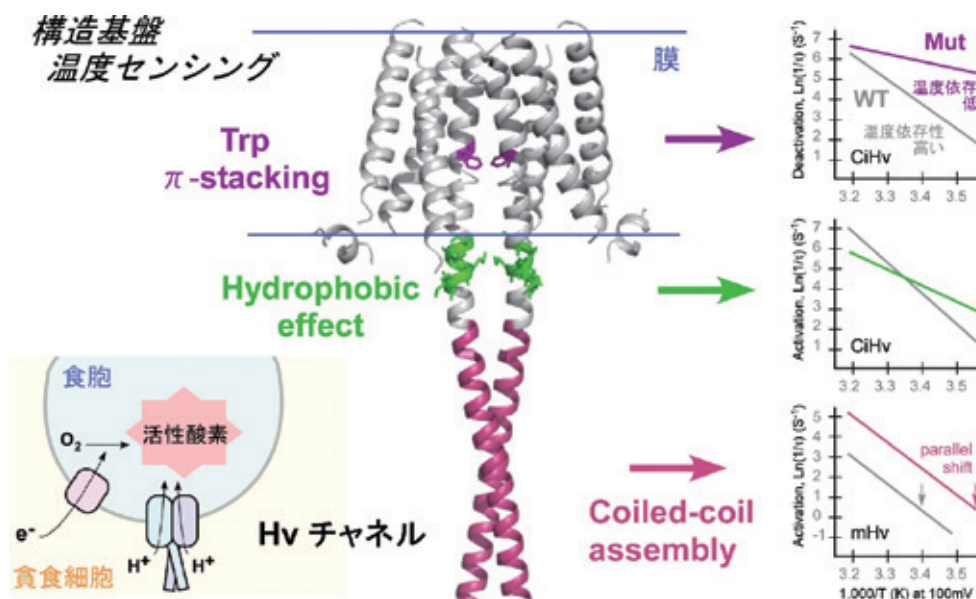
研究課題名

電位依存性チャネルタンパク質の温度センシング機構の解明

研究概要

好中球やマクロファージなどの貪食細胞に発現する電位依存性H<sup>+</sup>チャネル (Hvチャネル) は、病原菌を退治する際の活性酸素の産生を担うチャネルとして知られている。Hvチャネルの特徴として、体温に近い温度域から急激に活性化キネティクスが上昇し電流が増大することが知られており、発熱と免疫システムの関係の背後に体温を感知するHvチャネルの存在が示唆されている。我々の先行研究により細胞内会合構造の熱安定性が温度閾値設定に寄与している事が明らかになっているが、(サーミスタがシャープに応答するために必要な) チャネル活性の高い温度依存性を決定する分子構造基盤は未解明であった。

発現系を用いた詳細な温度-活性解析から、Hvチャネルが開く過程と閉じる過程では温度依存性の性質が異なることを明らかにした。高い温度依存性を呈する開閉キネティクスの構造基盤を探るため、我々の解いた結晶構造を基にHvチャネルの2量体構造モデルを作成し分子動力学的計算を行った。膜貫通領域に2量体間で相互作用する残基 (Trpのπ-π結合) が観察された。併せて行った電気生理学的解析から、その相互作用によりチャネルが閉じる過程を抑制して活性化エネルギーを上昇させ、温度依存性を増強することを明らかにして報告した。さらに、チャネルが開く過程で動く膜貫通電位センサーヘリックスの両端で膜との疎水効果が生じる可能性に着目して電気生理学的解析を行った。疎水効果が高ければ高いほどチャネルが開く過程の温度依存性を増強している結果が得られた。電位依存性チャネル開閉過程の動的構造変化と、それに伴い生じる温度依存性の関係性を検討した。



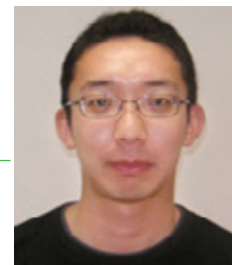
研究成果

1. Okuda H et al. Direct interaction between the voltage-sensors produces cooperative sustained deactivation in voltage-gated H<sup>+</sup> channel dimers. *J. Biol. Chem.* 14: 932-944 (2016).
2. Fujiwara Y et al. Temperature sensitive gating of voltage-gated proton channel. *Curr. Top. Membr. "Thermal Sensors"* 74: 259-292 (2014).

公募研究 研究項目A01

中野 雅裕 [なかの まさひろ]

大阪大学 産業科学研究所 生体分子機能科学研究分野 助教

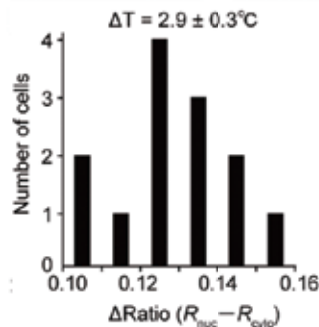
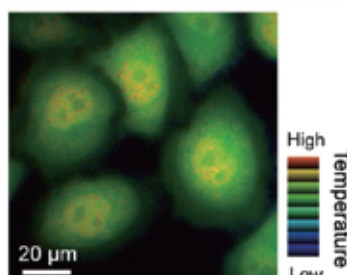
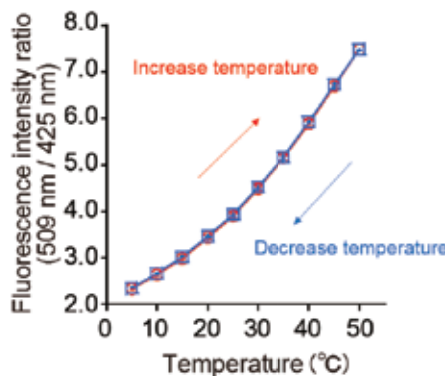
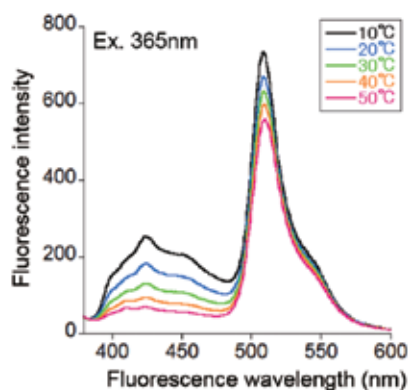


研究課題名

蛍光性温度プローブタンパク質の開発と生物への応用

研究概要

現状の細胞内温度計測プローブにはまだ問題や課題がある。1) 計測温度域がせまい、2) 細胞への導入方法が困難、3) 細胞内局在が難しい点などが挙げられ、実際全てを達成しているプローブは無い。理想的には「幅広い温度域で高感度な遺伝的コードによる細胞内局在を制御できる蛍光タンパク質」の開発が必要であると考え。今後「温度生物学」の対象は、変温動物を含む生きた個体へと広がりつつ、一方で細胞内のオルガネラ機能と温度の関係にも広がっていくと予想される。そこで、この「理想的」な温度プローブの開発を目的とした。はじめに、我々はこれまで開発されている様々な蛍光タンパク質の蛍光強度・スペクトルの温度感受性を測定した。そして、温度感受性が大きい蛍光タンパク質Siriusと小さい蛍光タンパク質mT-Sapphireを組み合わせることにより、蛍光性温度プローブgTEMPを開発した。gTEMPは2つの蛍光タンパク質の蛍光強度の比で温度をイメージングするため、細胞の形やプローブの発現量に依存しない定量的な温度のイメージングが可能である。gTEMPを用いて、プロトン濃度勾配の脱共役剤を添加した時のミトコンドリア内の温度上昇や、細胞内温度が不均一である事を示すデータが得られた。また5℃から50℃までレシオ値が変化することを確かめており、培養細胞だけでなく植物やメダカなど変温動物にも適用可能性が広がった。



研究成果

1. Nakano M et al. Genetically encoded ratiometric fluorescent thermometer with wide range and rapid response. *PLoS ONE* 12: e0172344 (2017).
2. Nakano M et al. Thermometers for monitoring cellular temperature. *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 30: 2-9 (2017).

公募研究 研究項目A01

井藤 彰 [いとう あきら]

九州大学大学院 工学研究院 化学工学部門 准教授



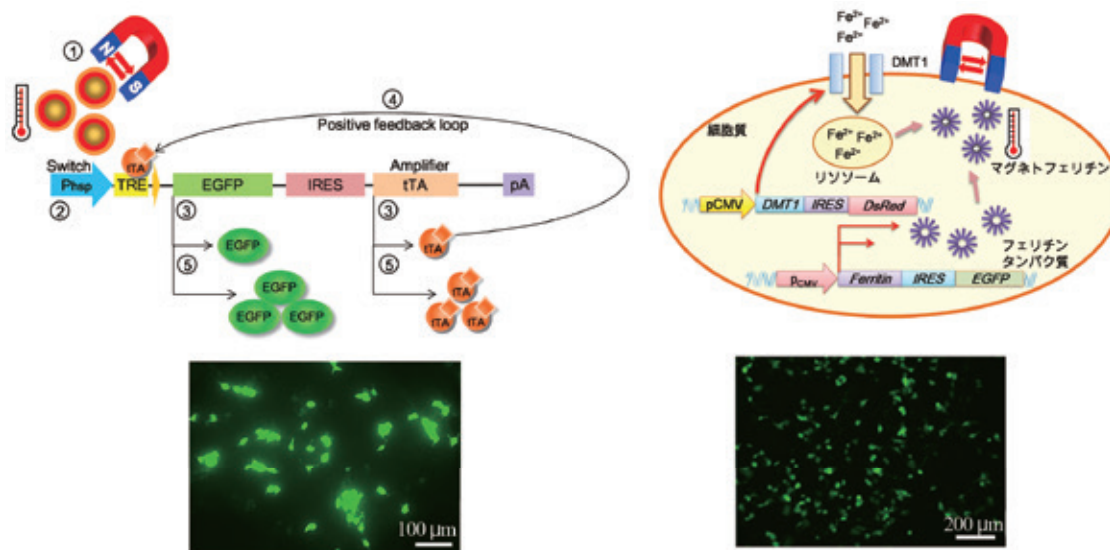
研究課題名

磁性ナノテクノロジーによる細胞内局所加温技術の創出

研究概要

磁性ナノ粒子は磁石に引き寄せられる性質のみならず、MRIにおける造影効果や、交流磁場中で発熱する性質をもつ。本研究では、酸化鉄の10 nmのマグネタイト表面を正電荷脂質膜で修飾することで、細胞表面に静電的相互作用で結合するマグネタイトカチオンリポソームを作製し、単一細胞が加温可能な技術を開発した。方法論として、合成生物学的アプローチを導入して、レポーター遺伝子の発現を指標に細胞の熱ストレスを解析するシステムを構築した。HSP70B'プロモーターとTet-Offシステムの融合により構築した熱誘導型人工プロモーターは、熱ショックがかかるとポジティブフィードバックシステムにより、EGFPが高発現し続けることで、温熱ストレスを被った履歴のある細胞が可視的に判別できる。ウォーターバスによる加温で、この遺伝子発現システムの発現プロファイルを解析したところ、HSP70B'プロモーターは41°Cで駆動され、目的遺伝子が持続的に高発現することが分かった。また、この細胞に機能性磁性ナノ粒子を取り込ませて、交流磁場を照射すると、培地の温度上昇は見られないが、目的遺伝子が発現した。このことは、細胞内局所における磁性ナノ粒子の発熱によって、HSP70B'プロモーターが駆動したと考えられる。

さらに、磁性ナノ粒子を合成生物学的アプローチで細胞内に生産させる方法を開発した。鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンの遺伝子をHeLa細胞に導入して磁性ナノ粒子を細胞内で形成させることによって、遺伝子的に細胞を磁気標識することに成功した。フェリチン遺伝子の発現により磁気標識された細胞は、磁気分離が可能となり、また、MRIの造影効果が得られた。さらに、HSP70B'プロモーターとTet-Offシステムの融合により構築した熱誘導型人工プロモーターを導入したHepG2細胞にフェリチン遺伝子を導入して磁場を照射すると、レポーター遺伝子であるEGFPが発現することから、フェリチン導入細胞が交流磁場で発熱することを見いだした。この際に培地の温度上昇が見られなかったことから、細胞局所でのマグネタイトフェリチンの発熱がHSP70B'プロモーターを駆動させたと考えられる。今後、EGFPを治療遺伝子などの目的遺伝子に交換することで、磁場誘導型の遺伝子治療といった医療への応用が可能であると考えられる。



研究成果

1. Ito A et al. Magnetically triggered transgene expression in synthetic bioengineered cells through local heating of magnetite nanoparticles. manuscript in preparation.
2. Yamaguchi M et al. Heat-inducible gene expression system by applying alternating magnetic field to magnetic nanoparticles. *ACS Synth. Biol.* 3: 273-279 (2014).

公募研究 研究項目A01

佐藤 陽子【さとう ようこ】

東亜大学 医療学部 医療工学科 教授



研究課題名

哺乳類精巣で正常精子形成に体温より低い温度が必要な理由を探る

研究概要

哺乳類において腹腔内に精巣が留まる停留精巣では、多くの動物で陰囊と比較し精巣温度の上昇によるストレスのため、精子形成異常を示すと考えられているが、その詳細な仕組みは不明である。一方、ゾウは停留精巣であるにもかかわらず、正常な精子形成を示す特異的な動物である。

ゾウの精細胞及び体細胞への熱ストレスの影響を検討するため、ゾウの精巣組織断片の培養系下で人為的な熱ストレス存在下での熱ストレス関連因子の検討を行い、ゾウ精巣では、他の哺乳動物とは異なる仕組みにより精細胞が保護されている可能性と熱ストレスによる増殖と分化誘導の可能性を、また、ダメージを受けた精細胞を除去する仕組みは他の哺乳動物と同じだが、細胞死の割合が少ないことを示した。HSP90Aはゾウ精巣組織培養下での人為的な熱ストレスにより一番はじめに誘導される物質であり、HSP90Aの阻害物質添加下で人為的な熱ストレスを与えると、ゾウ精巣で熱ストレスによる増殖と分化誘導、及びHSP60とATP5Aの上昇が阻害され、ゾウ精巣ではHSP90Aの下流にHSP60やATP5Aの発現の調節機構があり、熱ストレスによる分化や増殖を調節していることが示唆された。一方、熱ストレス下でのHSF1の発現は、HSP90A阻害物質添加下では早く誘導され、TDAG51の発現誘導や細胞死の誘導も早まる事が明らかとなった。HSF1はHSP90A存在下では不活性化されていることから、HSP90Aの阻害剤によるHSF1の発現誘導、TDAG51の発現を経た細胞死の誘導は、熱ストレス下では、ゾウがHSP90Aの発現により、細胞死の誘導を間接的に抑制している可能性を示唆している。人為的な熱ストレスを与えなくても、ゾウの精巣ではHSP90Aが精細胞において強く発現しているため、HSP90Aはゾウの精細胞の増殖、分化、細胞死を鍵分子として調節し、停留精巣での正常精子形成に寄与していることが示唆された。

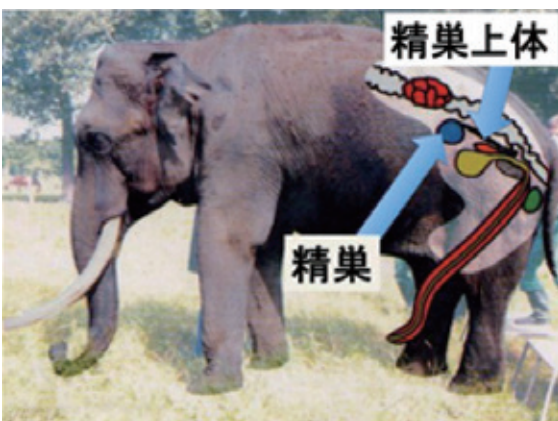


図1. ゾウの精巣の位置 (Hildebrandt et al. 2000)

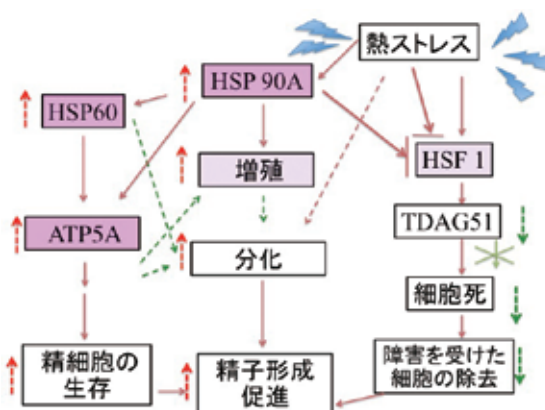


図2. ゾウ精巣における熱ストレス関連因子の発現

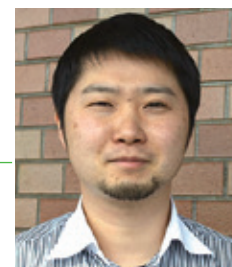
研究成果

1. Sato Y et al. Molecular mechanism of spermatogenesis in Asian elephant (*Elephas maximus*) cryptorchid testes. manuscript in preparation.
2. Sato Y et al. Establishment of adult mouse Sertoli cell lines by using starvation method. *Reproduction* 145: 505-516 (2013).
3. Sato Y et al. Glycoconjugates recognized by peanut agglutinin lectin in the inner acellular layer of the lamina propria of seminiferous tubules in human testes showing impaired spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 27: 659-668 (2012).

公募研究 研究項目A01

江藤 圭 [えとう けい]

自然科学研究機構 生理学研究所 生体恒常性発達研究部門 助教



研究課題名

一次体性感覚野における温度センシング機構とその経験依存的可塑的变化

研究概要

感覚の一つである温度感覚は、外界環境の温度を認識する感覚であり、暑さ・寒さなどの温度変化を認識し、それに対処するための重要な機能である。温情報と冷情報などの温度情報は末梢の温度受容器で検出され、末梢神経を介して一次体性感覚野(S1)へと伝達される。S1領域は温刺激によって活性化することは人、サル、げっ歯類を用いた研究により明らかにされており、また、冷感覚についても、近年報告された研究により、S1には冷刺激に反応する細胞が存在することが明らかになった。このことからS1は温度センシング機構に重要な役割を担うと考えられている。S1は興奮性神経細胞と抑制性神経細胞から構成されている。興奮性神経細胞は末梢からの入力を統合し、他の脳領域へと情報を出し、抑制性神経細胞はS1神経細胞の活動を制御する。しかし、S1興奮性・抑制性神経細胞が単一細胞レベルで温・冷情報をどのように処理しているか、温度情報に対応した細胞集団が存在するのか、温度感受性神経回路が入力依存性可塑的变化するか不明である。そこで本課題では2光子顕微鏡を用いた*in vivo*イメージングにより細胞種特異的に単一細胞レベルで温度に対する細胞応答を観察した。抑制性神経細胞に蛍光蛋白質Venusを発現したマウスのS1神経細胞に赤色カルシウム蛍光指示タンパク質jRGECO1aを発現させ、興奮・抑制性神経細胞を区別した。ペルチエ素を用い、マウスの後足に温・冷刺激を行い、温度刺激誘発応答をS1神経細胞から記録した。その結果、興奮性神経細胞・抑制性神経細胞は温刺激に対しても冷刺激に対しても応答した。また、温・冷選択的に応答する神経細胞が存在するものの、大部分の興奮性・抑制性神経細胞は温・冷刺激の両方に応答した(下図)。この結果から、S1では同一神経細胞により温・冷情報が処理され、S1神経細胞は温度の変化量に反応する特性を有している可能性が示唆された。

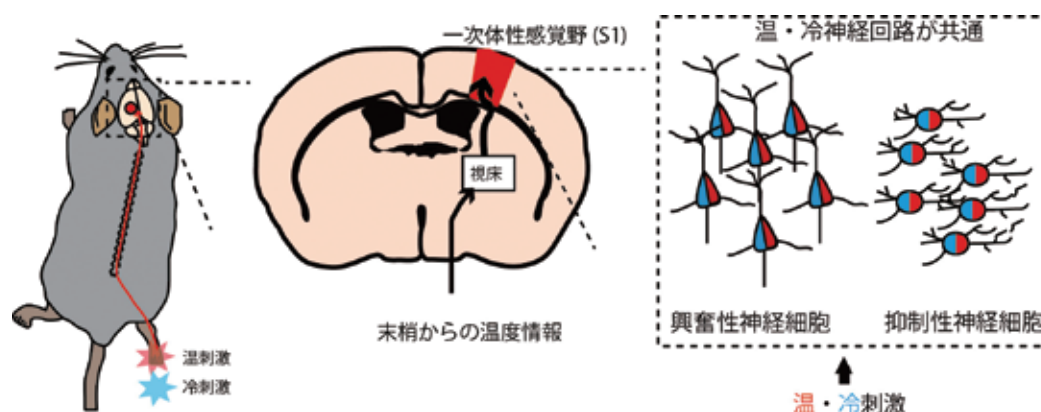


図 S1 における温度センシング

研究成果

1. Eto K et al. The roles of cortical astrocytes in chronic pain and other brain pathologies. *Neurosci. Res.* pii: S0168-0102: 30488-1 (2017).
2. Eto K et al. Enhanced GABAergic activity in the mouse primary somatosensory cortex is insufficient to alleviate chronic pain behavior with reduced expression of neuronal potassium-chloride cotransporter. *J. Neurosci.* 32: 16552-16559 (2012).
3. Eto K et al. Inter-regional contribution of enhanced activity of the primary somatosensory cortex to the anterior cingulate cortex accelerates chronic pain behavior. *J. Neurosci.* 31: 7631-7636 (2011).

公募研究 研究項目A01

神谷 厚範 [かみや あつのり]

国立研究開発法人国立循環器病研究センター 研究所 循環動態制御部 循環モデル解析研究 室長

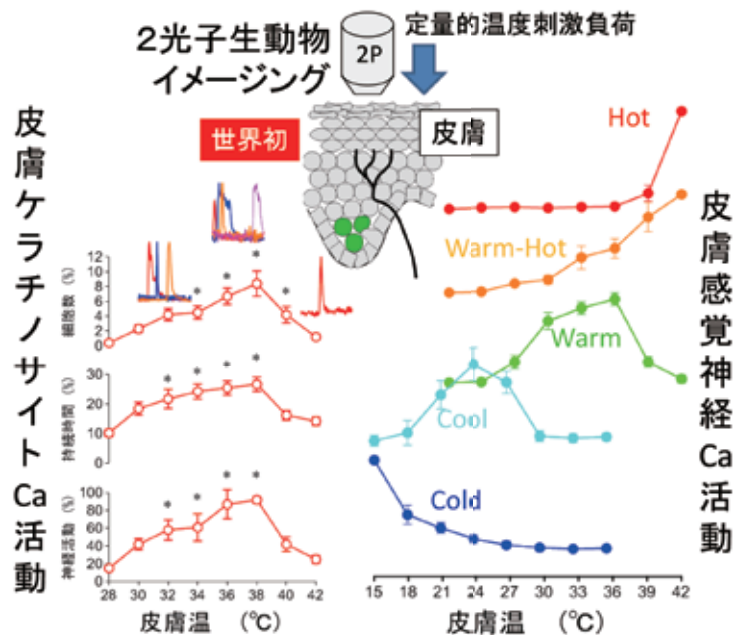


研究課題名

生動物の求心性神経2光子イメージングによる皮膚温度センシング機構のシステム同定

研究概要

恒温動物（哺乳類等）の体温調節にとって、外部環境と接する身体表面皮膚の温度（皮膚温）や、身体深部の温度（深部温）を感知する温度センシングは、極めて重要である。しかし、神経を含めた組織内の細胞が、実際にどのように温度を感知するのか、温度センシングの細胞レベルの実像は明らかではない。本研究では、まず、感覚神経と皮膚ケラチノサイトに共通する電位依存性Naチャンネルのプロモーターを利用したドライバーラット、高輝度Ca<sup>2+</sup>プローブ発現レポーターラット（Floxed-GCaMP6f）を開発し、全身の感覚神経と皮膚ケラチノサイトのCa<sup>2+</sup>活動が緑に光るラットを作製した。また、制御工学による閉ループ制御技術を利用して、半導体等局所皮膚温度計測-制御部PC-発熱冷却モジュール（ペルチェ素子等）の、定量的な動物局所温度刺激負荷装置（0~50℃、白色雑音様や階段状）を開発した（当該装置では、A01公募班の生理学研究所 江藤 圭助教と、大脳感覚野の温度センシング研究において領域内連携した）。次に、この感覚神経/皮膚ケラチノサイトCa<sup>2+</sup>活動可視化ラットを用いて、皮膚に、定量的温度刺激を負荷し、皮膚表皮の温度センシングの実像を世界ではじめて可視化解析した。その結果、皮膚感覚神経については、温度感知応答帯域の異なる5種類の神経終末Ca<sup>2+</sup>活動があり、一方皮膚表皮ケラチノサイトCa<sup>2+</sup>活動は、warm温度を感知し応答すること、全体の数%の細胞しか活動しないことが分かった。さらに、ATP受容体遮断薬の実験から特定温度帯域において、皮膚ケラチノサイトが温度感知-ATP分泌-2次的に感覚神経を刺激することが示唆された。以上の結果は、従来の共培養実験による神経細胞-ケラチノサイト細胞の協調的活動（論文1）を支持すると共に、生きた動物における皮膚温度センシングの理解を深めた。



研究成果

1. Mandadi S et al. TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Pflügers Archiv* 458: 1093-1102 (2009).

公募研究 研究項目A02

武田 憲彦【たけだ のりひこ】

東京大学大学院 医学系研究科 循環器内科 特任講師



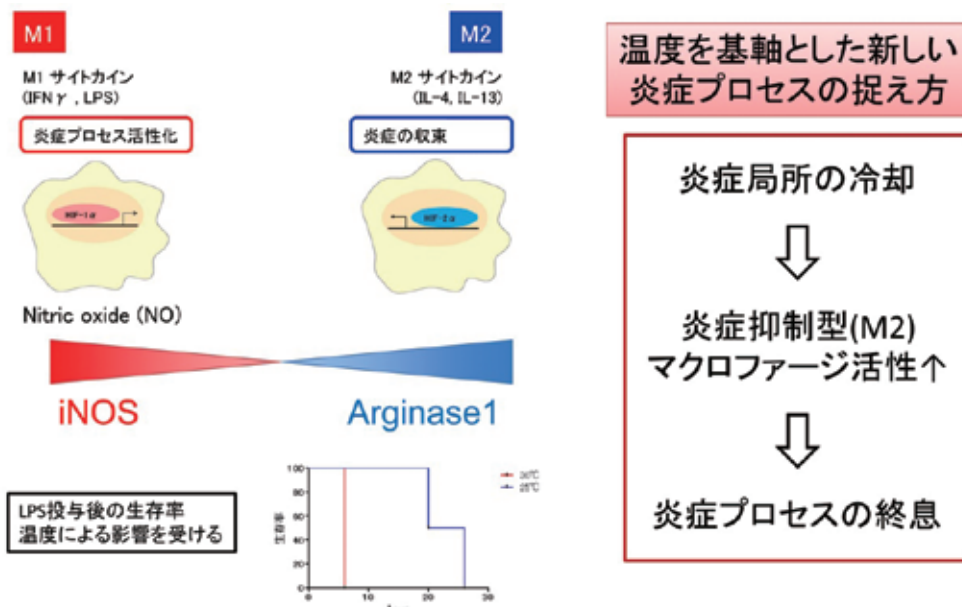
研究課題名

温度が炎症細胞の代謝、機能に与える影響の解析

研究概要

急性炎症の四徴として、古くから発赤、疼痛、腫脹および熱感が知られている。炎症に伴う発熱、熱感Nitric oxide (NO)をはじめとする炎症メディエーター放出と血管拡張により引き起こされることから、これまで熱感は炎症の結果であると捉えられてきた。しかしながら最近、組織における温度変化(温度シグナル)がむしろ炎症プロセス活性のon/off制御に関わっているとの知見が集まって来ている。我々も敗血症性ショックモデルであるLipopolysaccharide (LPS) 投与の検討から、環境温度が敗血症の重症度およびNO産生に大きく影響することを確認している。

これまで我々は炎症プロセスにおいて中心的役割を果たす組織マクロファージの機能解析を行ってきた。組織マクロファージには炎症惹起型(M1)に加えて、炎症抑制型(M2)が存在することが報告されている。我々は低酸素誘導型転写因子(Hypoxia inducible factor- $\alpha$ , HIF- $\alpha$ )の機能解析を通じて炎症プロセスの活性制御機構の解析を行い、マクロファージNO産生制御機構を明らかにしてきた(論文1)。興味深いことにHIF-1 $\alpha$ を介する解糖系代謝様式のリプログラミングはマクロファージのみならず、線維芽細胞の活性化においても必須であることが判った(論文2,3)。現在我々は環境温度が炎症抑制型(M2)マクロファージの機能を調節することで、積極的に炎症プロセスを終息させているとの仮説を構築している。本研究を通じて、温度シグナルが炎症プロセスを制御する分子実態を解明したいと考えている。



研究成果

- Goodwin J et al. Targeting HIF-1 $\alpha$ /PDK1 Axis by Dichloroacetate (DCA) Suppresses Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* in press.
- Semba H et al. HIF-1 $\alpha$ -PDK1 axis induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. *Nat. Commun.* 7: 11635 (2016).
- Takeda N et al. Differential activation and antagonistic function of HIF- $\alpha$  isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev.* 24: 491-501 (2010).

公募研究 研究項目A02

酒井 寿郎 [さかい じゅろう]

東京大学 先端科学技術研究センター 代謝医学分野 教授



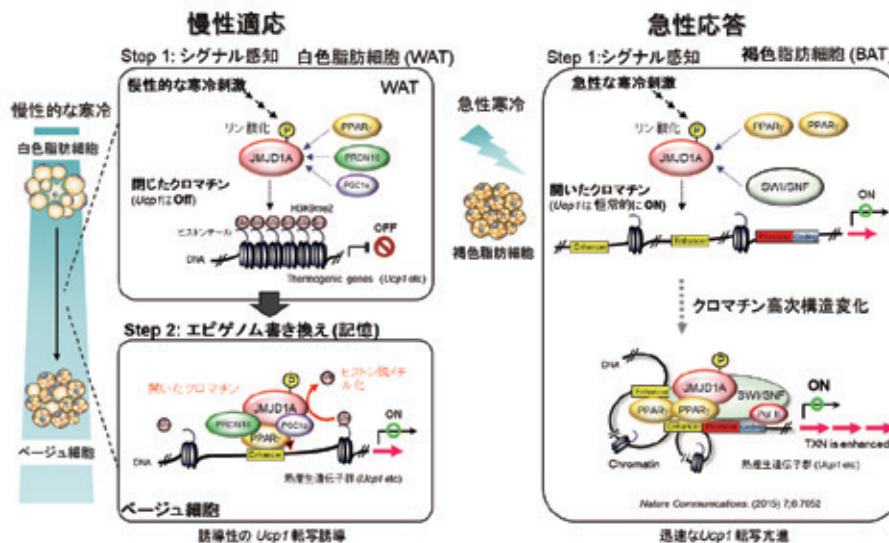
研究課題名

寒冷感知センサーとして働くエピゲノム酵素によるベージュ脂肪細胞の解明

研究概要

ベージュ細胞は活発に糖や脂肪を燃焼させて過栄養によって生じる代謝異常を改善する効果があることから、ベージュ細胞は質の良い脂肪細胞として生活習慣病の新規治療法に期待されている。しかし、寒冷刺激で交感神経から分泌されたノルエピネフリンが  $\beta$ -アドレナリン受容体 ( $\beta$ AR) を介してどのようにベージュ化を誘導するのか、とりわけ「質の変化」をともなうベージュ化にはエピゲノムの書き換えが予想されるが詳細は不明である。

エピゲノム酵素JMJD1AはヒストンH3の9番目のリジンのジメチル (H3K9me2と略す) を脱メチル化し転写活性化する。Jmjd1a欠損マウスは寒冷環境下で低体温となる (*Genes Cells* 2009, *Nature* 2009)。申請者らはこの分子メカニズムとして、以下を解明した。個体が寒冷刺激を受け、交感神経が活性化し、褐色脂肪細胞 (BAT) に  $\beta$  アドレナリン受容体 ( $\beta$ AR) シグナルが入ると、プロテインキナーゼA (PKA) によってヒストン脱メチル化酵素JMJD1AのS265がリン酸化され核内受容体PPAR  $\gamma$  と結合することで、熱産生遺伝子の発現を急激に促進する (図2) (*Nat Commun* 2015, *Nature Reviews* 2016)。一方、WATでは熱産生をしないので、熱産生遺伝子のクロマチンは閉じており、急性期には遺伝子は活性化されない。しかし、寒冷が持続すると、Ucp1などの熱産生遺伝子にリクルートされたリン酸化JMJD1Aが、抑制ヒストン修飾H3K9me2を消去することで、閉じたクロマチンを開き、熱産生に関する遺伝子の転写を活性化する。すなわち、JMJD1Aリン酸化による  $\beta$ AR刺激のシグナル感知 (Step 1) とエピゲノム書き換え (Step 2) による二段階機構でベージュ化を誘導する (投稿中)。



研究成果

- Inagaki T et al. Transcriptional and epigenetic control of brown and beige adipose cell fate and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17: 480-495 (2016).
- Matsumura Y et al. H3K4/H3K9me3 Bivalent Chromatin Domains Targeted by Lineage-Specific DNA Methylation Pauses Adipocyte Differentiation. *Mol. Cell* 60: 584-596 (2015).
- Abe Y et al. JMJD1A is a signal-sensing scaffold that regulates acute chromatin dynamics via SWI/SNF association for thermogenesis. *Nat. Commun.* 6: 7052 (2015).



公募研究 研究項目A02

田中 光一【たなか こういち】

東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子神経科学分野 教授



研究課題名

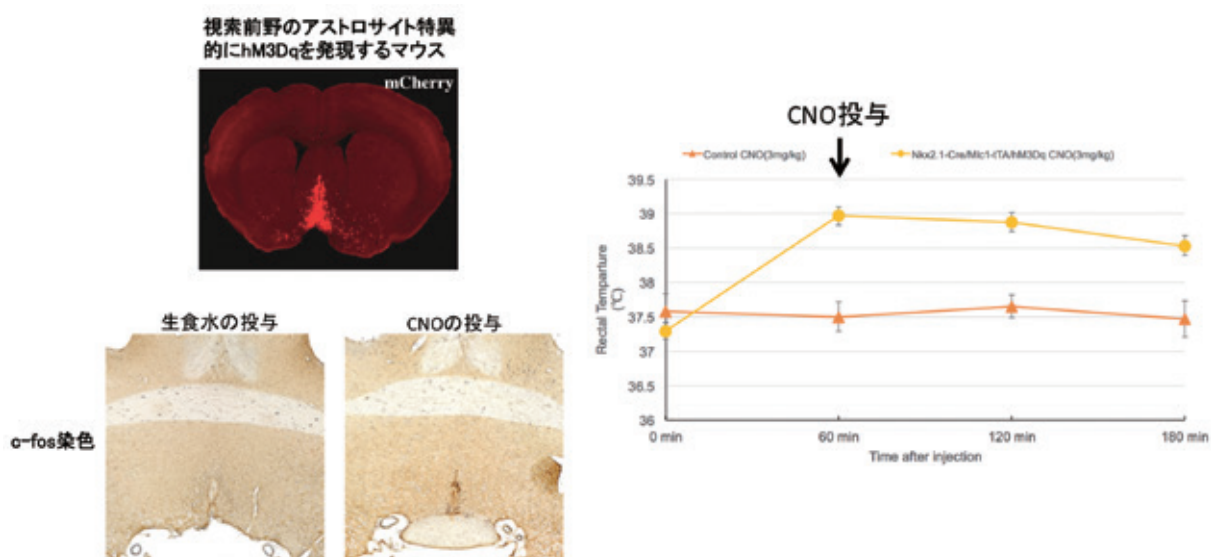
アストロサイトによる体温調節機序の解明

研究概要

アストロサイトのCa<sup>2+</sup>シグナル活性化によって体温変化が引き起こされることが報告されている。しかしながら脳内のどのアストロサイトが体温調節に関与するか、更には具体的にどの神経細胞がアストロサイトによる制御を受けているのかは不明であった。

我々は、脳内の特定領域のアストロサイトのCa<sup>2+</sup>シグナルを活性化できるマウスを開発し、このマウスを用いて、アストロサイトを介した体温調節における責任領域の特定を試みた。その結果、視索前野のアストロサイトのCa<sup>2+</sup>シグナルを活性化すると約1.5度の体温上昇が引き起こされることを明らかにした。さらには、c-fos抗体を用いた免疫組織化学により、アストロサイトの活性化によって興奮する視索前野内の神経細胞群を同定した(図)。この神経細胞群は、Gad67陽性のGABA作動性ニューロンであり、その活性化により体温を上昇させるinterneuronである可能性が高い。現在、PhosphoTRAP法を用い、この神経細胞のマーカー遺伝子を検索している。

視索前野は外気温に対する体温応答を制御する中枢として知られるが、その詳細な局所回路については未だに不明な点が多い。我々の同定した神経細胞は、2016年Cellで報告されたwarm-sensitive neuronと逆の働きをする cold-sensitive neuronの可能性があり、その同定を試みている。



研究成果

1. Sugiyama K et al. Calpain-dependent degradation of nucleoporins contributes to motor neuron death in a mouse model of chronic excitotoxicity. *J. Neurosci.* 37: 8830-8844 (2017).
2. Miyazaki T et al. Glutamate transporter GLAST controls synaptic wrapping by Bergmann glia and ensures proper wiring of Purkinje cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114: 7438-7443 (2017).
3. Aida T et al. Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics* 17: 979 (2016).

公募研究 研究項目A02

神吉 智丈 [かんき ともたけ]

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 機能制御学分野 教授



研究課題名

ミトコンドリア分解からみた体温調節機構の解析

研究概要

白色脂肪細胞の本来の役割は脂肪の貯蔵であるが、動物を低温で飼育すると白色脂肪細胞は、褐色脂肪細胞のようにミトコンドリアを多く含み熱産生を行う褐色脂肪“様”細胞（以下、ベージュ細胞）に分化転換していく。このベージュ細胞は、高温環境になると不要になり、白色脂肪細胞に戻っていく（図1）。こうした環境温度に応じた白色脂肪細胞の変化の過程でミトコンドリア量が大きく増減するが、その減少を担うのがオートファジーによるミトコンドリア分解（マイトファジー）と考えられる。しかしながら、実際に脂肪細胞でマイトファジーを観察した例はほとんど無く、その詳細は不明である。

mito-mCherry-EGFPが発現したトランスジェニックマウスでは、mito-mCherry-EGFPがミトコンドリアに局在するが、マイトファジーによりミトコンドリアがリソソームに運び込まれるとEGFPは早期に分解され、mCherryだけがリソソームに残り赤色蛍光のドットとして観察される。このマウスを低温飼育から高温飼育に移行し、ベージュ細胞化した鼠径部脂肪組織を観察すると、低温飼育時にはマイトファジーが抑制され、高温飼育移行後はマイトファジーが強く亢進していることを明らかにした（図2）。また、こうした環境温度変化に応答したマイトファジーには、マイトファジー因子として広く研究されているParkinが関与しないことを、Parkinノックアウトマウスの解析から明らかにした。さらに、このマウスの鼠径部白色脂肪組織から単離した白色脂肪細胞前駆細胞をベージュ細胞へと分化誘導し、その後、分化誘導を中断することで白色脂肪細胞化させると、その過程でも非常に強いマイトファジーの誘導によりミトコンドリア分解が起こることを明らかにした。このように、白色脂肪細胞は環境温度に応答しミトコンドリア量を大幅に増減させるが、その過程でマイトファジーが非常に重要な役割を持つことを、マウスの脂肪組織レベルで明らかにすることができた。

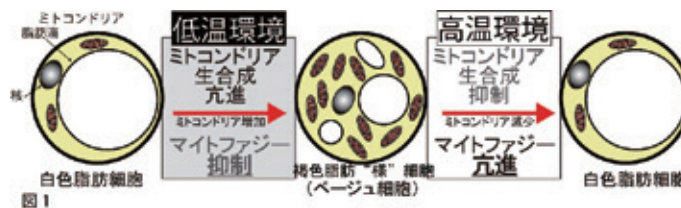


図1

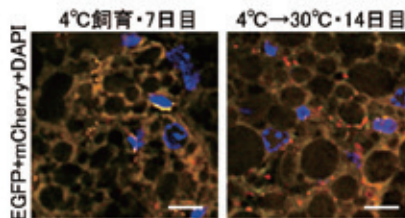


図2：マウス鼠径部白色脂肪組織  
mito-mCherry-EGFP はミトコンドリアに局在するが、マイトファジーによりリソソームに運ばれると、EGFP は分解されるが mCherry は比較的安定なためしばらく分解を免れる。このため、マイトファジーが誘導されると mCherry のみの蛍光を持つリソソーム（ドット状態）が観察される。4℃では mCherry のドットをほとんど認めないためマイトファジーは抑制されており、30℃ではドットが非常に多くマイトファジーが亢進していることがわかる。

研究成果

1. Yamashita SI et al. Drp1-independent mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation in mitophagy. *J. Cell Biol.* 215: 649-665 (2016).
2. Hirota Y et al. Mitophagy is primarily due to alternative autophagy and requires MAPK1 and MAPK14 signaling pathways. *Autophagy.* 11: 332-343 (2015).

公募研究 研究項目A02

塩見 邦博【しおみ くにひろ】

信州大学 学術研究院 繊維学系 准教授



研究課題名

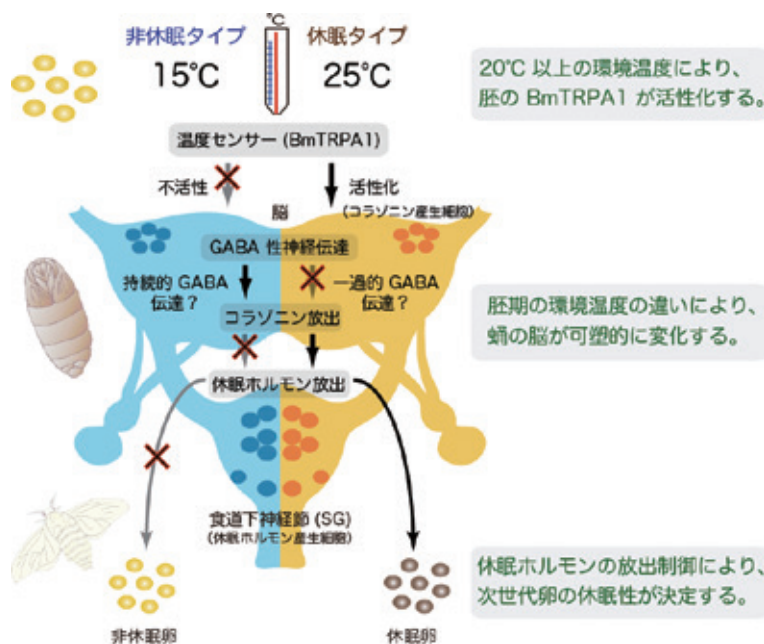
カイコの休眠誘導における環境温度応答システム

研究概要

カイコ (*Bombyx mori*) は、産下2~3日の胚発生の初期に細胞分裂を停止し、卵(胚)のステージで休眠する。二化性のカイコでは、母蛾の胚期の温度や光(日長)により母性効果として次世代卵の休眠性が決定する。例えば、卵を25℃・全暗に保護すれば次世代卵は休眠し、一方、15℃・全暗では非休眠卵となり、約1週間で幼虫が孵化する。

休眠卵を産下するタイプでは、母蛾の胚期に温度センサーのBmTRPA1が活性化し、これにより蛹期に休眠ホルモン(DH)の血液中への放出が促進される。血液中のDHは、卵巣のDH受容体に作用することにより休眠卵を誘導する。一方、非休眠卵を産下するタイプでは、BmTRPA1の活性化が起こらず、DHの放出は抑制されている。また、DHの放出は脳の特定の領域からの神経支配により制御されていることが1950年代から示唆されてきた。しかしながら、温度情報の受容から休眠誘導に繋がるこの脳可塑性の分子機構は不明のままであった。

今回、DH放出の上位で脳内神経ペプチドであるコラゾニン(Crz)が働き、DHの放出促進に関与していることを明らかにした。また、Crzの分泌はGABA性神経伝達により抑制されることも明らかにした。さらに、細胞性のGABAトランスポーターの発現量の違いにより、胚期の温度条件に依存して蛹期のGABA性神経伝達の強弱が調整されている可能性を示した。これらの結果をもとに、これまでに知られていない新奇の脳可塑性の分子機構による季節適応の誘導の仕組みを立証しようとしている。



研究成果

1. Shiohimi K et al. Disruption of diapause induction by TALEN-based gene mutagenesis in relation to a unique neuropeptide signaling pathway in *Bombyx*. *Sci. Rep.* 5: 15566 (2015).
2. Sato A et al. Embryonic thermosensitive TRPA1 determines transgenerational diapause phenotype of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: E1249-E1255 (2014).
3. Uehara H et al. An FXPRLamide neuropeptide induces seasonal reproductive polyphenism underlying a life-history tradeoff in the tussock moth. *PLoS ONE* 6: e24213 (2011).

公募研究 研究項目A02

中川 貴之【なかがわ たかゆき】

京都大学 医学部附属病院 薬剤部 准教授



研究課題名

末梢循環障害に伴う末梢温低下による不快な異常感覚におけるTRPA1の役割の解析

研究概要

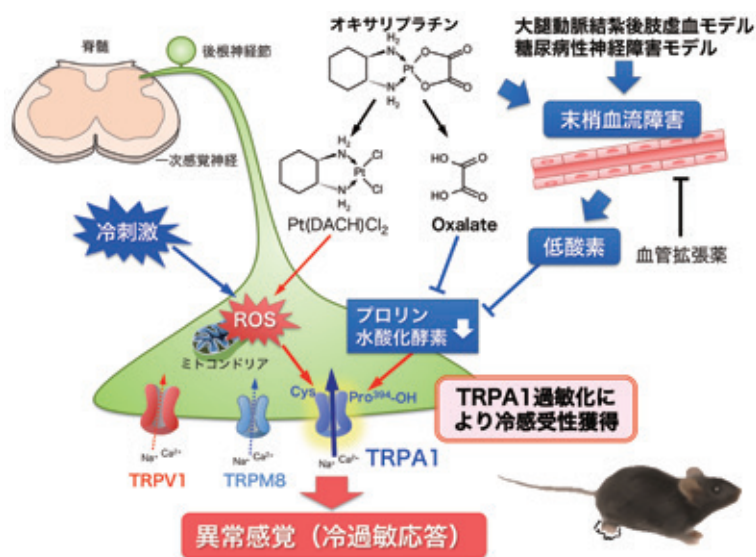
冷え性の患者や、末梢閉塞性動脈疾患、糖尿病などの患者において、末梢循環障害により末梢温が低下すると、四肢末端の冷え、痛み、しびれなどの不快な異常感覚が生じるが、その原因は明らかでない。本研究では特に主に感覚神経に発現し、種によって温度感受性の異なるTRPA1に着目し検討を行った。

①白金系抗がん剤オキサリプラチンによる異常感覚の分子機構：

大腸がんなどに用いられるオキサリプラチンは、特有の副作用として冷刺激により四肢末端のしびれ・異常感覚を誘発する。その分子機構を解析した結果、高濃度のオキサリプラチンは、確かに活性酸素種（ROS）を産生し、N末端システイン残基を酸化修飾することによりTRPA1を活性化させるが、低濃度のオキサリプラチンでは、その代謝物oxalateが酸素感受性プロリン水酸化酵素（PHD）を抑制し、TRPA1 N末端394番目のプロリン残基の水酸化を抑制することで、ROSに対する感受性を増大させ、正常時には冷刺激に対して応答を示さないTRPA1においてもミトコンドリアから産生された微量のROSを感受することが可能になり、間接的な冷感受性を獲得することを明らかにした。

②末梢循環障害モデルにおける冷過敏応答とTRPA1：

大腿動脈結紮による後肢虚血モデル、ストレプトゾトシンによる糖尿病性神経障害モデルあるいはオキサリプラチンの長期反復投与モデル（週2回×8週間）において、いずれも後肢の末梢血流量低下と冷過敏応答が相関して生じることを確認した。またこの際、低酸素負荷によりTRPA1が過敏化しており、これらモデルでの冷過敏応答に関与していること、さらに血管拡張薬の投与により、TRPA1の過敏化および冷過敏応答が抑制されることを明らかにした。



研究成果

1. Miyake T et al. Distinct mechanism of cysteine oxidation-dependent activation and cold sensitization of human transient receptor potential ankyrin 1 channel by high and low oxaliplatin. *Front. Physiol.* 8: 878 (2017).
2. Miyake T et al. Cold sensitivity of TRPA1 is unveiled by the prolyl hydroxylation blockade-induced sensitization to ROS. *Nat. Commun.* 7: 12840 (2016).
3. 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).

公募研究 研究項目A02

藤田 潤【ふじた じゅん】

京都大学大学院 医学研究科 放射線遺伝学 客員研究員



研究課題名

哺乳類低温ショック蛋白質の発現制御機構と機能に関する研究

研究概要

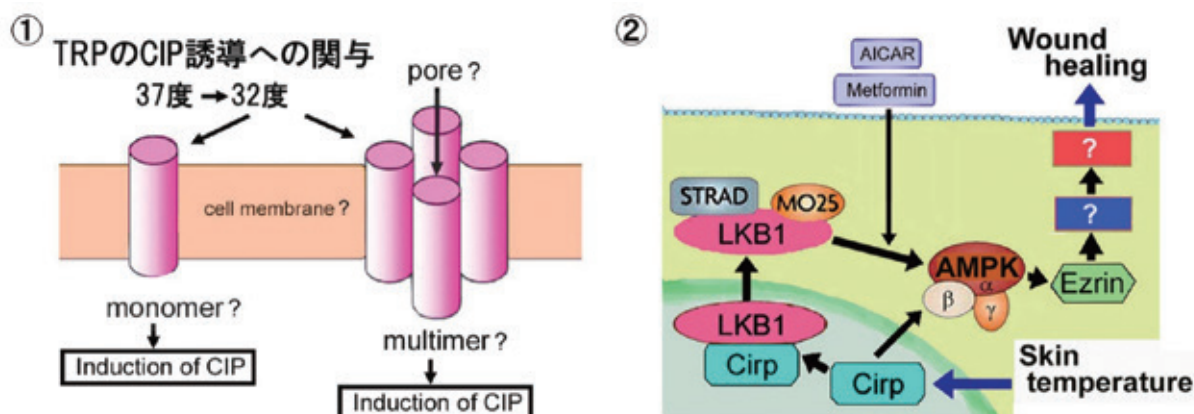
①軽度低温による発現誘導へのTRPイオンチャンネルの関与：

マウス精巢から我々が発見したCold-inducible RNA-binding protein (Cirp) 及びRbm3 は、37度に比し32度で発現が亢進し、細胞増殖促進（細胞によっては抑制）作用を示す。昨年度、スプライシング因子SRSF5が新たなcold-inducible protein (CIP) であること、及び軽度低温でのCIP発現誘導にはTRPV4が必要であることを見出した。そこで、TRPV4-KOマウスから細胞株を樹立したところ、32度で野生型マウスからの細胞と同様にCIPの発現誘導を認めた。この発現誘導はTRPV3チャンネルのアンタゴニストS408271、TRPM8チャンネルのアンタゴニストAMTB、及びそれぞれに対するsiRNAで阻害された。TRPV3チャンネルのアゴニスト2-APBによりCIP発現が37度で誘導されたが、camphorは効果なかった。TRPM8チャンネルのアゴニストWS-12も効果がなかった。

CIPの軽度低温による発現誘導には、TRPV4だけではなくTRPV3とTRPM8も関与しており、この活性はイオンチャンネル活性とは独立であることが示唆された。TRPの細胞膜への局在が必要であるのか、多量体をなして機能するのか、さらなる解析が必要である（図①）。

②皮膚における低温ショック蛋白質Cirpの機能解析：

Cirp-KOマウスの背部に皮膚創傷を作成したところ、野生型マウスよりも治癒が有意に遅かった。これはCirpがAMPKを介してEzrinを活性化させるためと考えられた（図②）。



研究成果

1. Fujita T et al. Involvement of TRPV3 and TRPM8 ion channel proteins in induction of mammalian cold-inducible proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495: 935-940 (2018).
2. Fujita T et al. TRPV4-dependent induction of a novel mammalian cold-inducible protein SRSF5 as well as CIRP and RBM3. *Sci. Rep.* 7: 2295 (2017).

公募研究 研究項目A02

小川 渉【おがわ わたる】

神戸大学大学院 医学系研究科 内科学講座 糖尿病内分泌内科学部門 教授



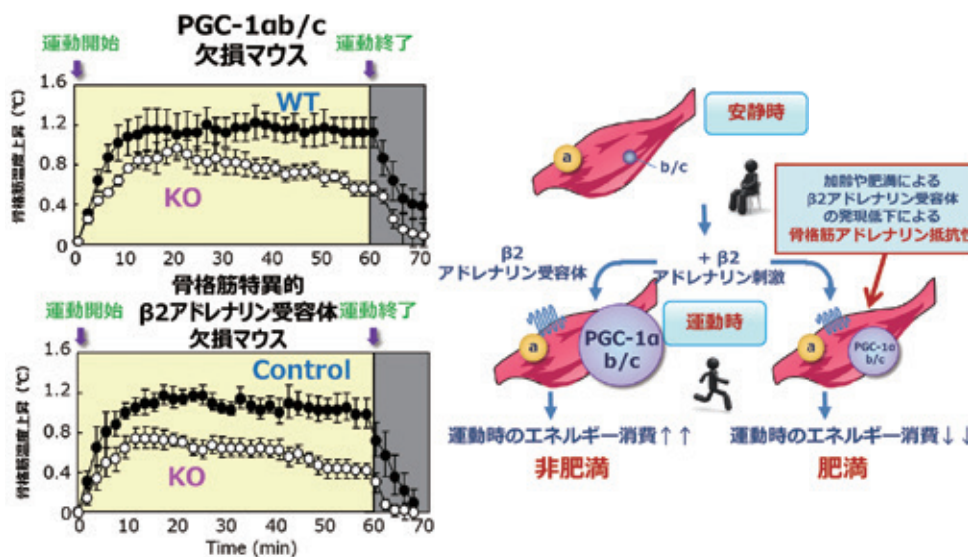
研究課題名

運動による積極的熱産生増大システムの温度生物学的意義とその制御機構の解明

研究概要

PGC-1 $\alpha$ はミトコンドリア生合成や糖脂質代謝を始め、様々な生命現象の制御に重要な機能を担う転写コアクチベーターである。申請者らは運動時に骨格筋でその発現が安静時の数10数倍から100倍以上に増加するPGC-1 $\alpha$ の新規アイソフォーム (PGC-1 $\alpha$ b/c) を同定した。このアイソフォームを特異的に欠損するマウス (PGC-1 $\alpha$ b/cKOマウス) は肥満と耐糖能障害を示し、運動時のエネルギー消費の増強が减弱していた (図1)。PGC-1 $\alpha$ はproton leakを増大させる作用を持つことから、運動時のPGC-1 $\alpha$ 新規アイソフォームの発現増加は、proton leakを増大させて熱産生を増加させる機能を持ち、その欠損マウスは骨格筋の熱産生増大機構の障害のため、運動してもエネルギー消費が増強せず、肥満を生じると考えた。

運動中のマウスの骨格筋温をリアルタイムで測定できる系を確立し、運動時の骨格筋温を測定したところ、PGC-1 $\alpha$ b/cKOマウスでは対照と同一の運動負荷を行っても、運動時の骨格筋温の上昇が抑制されていることが明らかとなった。さらに、運動によるPGC-1 $\alpha$ の発現増加には、 $\beta$ 2アドレナリンシグナルが重要な役割を担うことを見出し、骨格筋特異的 $\beta$ 2アドレナリン受容体欠損 (SM-adrb2KO) マウスを作成し、解析を行ったところ、PGC-1 $\alpha$ b/cKOマウスと同様、運動時の骨格筋温の上昇が抑制され、運動によるエネルギー消費が减弱し、肥満を呈することも明らかとなった。さらに、加齢マウスや肥満マウスでは、 $\beta$ 2アドレナリンシグナルが减弱し (アドレナリン抵抗性)、運動時のPGC-1 $\alpha$ b/cの発現増強や骨格筋の熱産生が障害されることも明らかとなった。すなわち、「 $\beta$ 2アドレナリン受容体/PGC1 $\alpha$ 経路の活性化により、運動時に骨格筋で積極的に熱産生を増大させるシステムは肥満や老化による代謝障害の発症病理に関わる」ことが明らかとなった。



研究成果

1. Nishimoto Y et al. Cell death-inducing DNA fragmentation factor A-like effector A and fat-specific protein 27  $\beta$  coordinately control lipid droplet size in brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* 292: 10824-10834 (2017).
2. Nomura K et al. Exercise-induced variants of PGC-1 $\alpha$  control body mass and energy expenditure. manuscript in preparation.

## 公募研究 研究項目A02

## 浅野 知一郎【あさの ともいちろう】

広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 (医) 医化学教室 教授



## 研究課題名

温度変化による生体機能の変化に寄与するPin1の役割

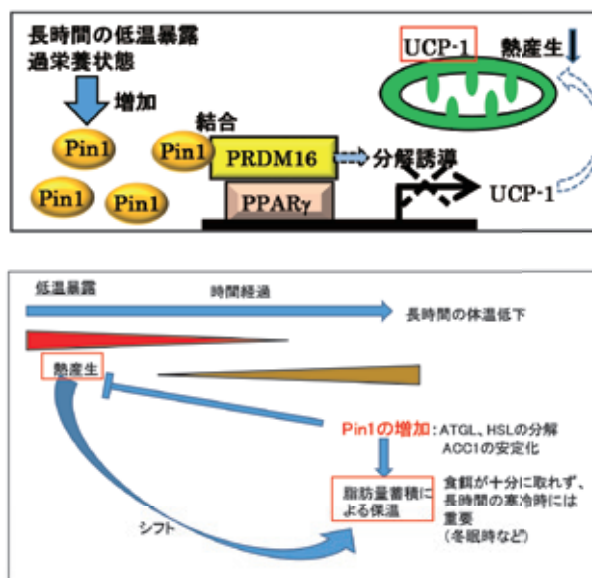
## 研究概要

① Pin1はPRDM16に結合し、分解を誘導することで、熱産生のnegative regulatorとして作用する：

我々は、高脂肪食負荷によってマウスの脂肪組織におけるPin1の発現量が顕著に増加すること、一方、Pin1 KOマウスが高脂肪食負荷で肥満しないことから、Pin1が基礎代謝の調節に影響していると考えた。その結果、Pin1は、脂肪細胞内の転写共役因子PRDM16に結合し、これを分解に導くことで、UCP1の発現量を抑制することが明らかとなった(上図)。すなわち、高脂肪の食事摂取や過栄養状態では、UCP1が減少し、脂肪細胞からの熱産生が低下することで、ますます肥満しやすくなることが判明した。本結果は、肥満を中心としたメタボリックシンドロームの発症機序を説明できるものである。

② 長時間の寒冷刺激はPin1発現量を増加させることで、熱産生抑制から脂肪蓄積の保持へと働く：

マウスを4℃に長時間(24時間)、暴露すると、Pin1の発現量が顕著に上昇することが判明した。Pin1は熱産生のnegative regulatorであることを考慮すると、この結果は予想外であったが、その意義が明らかになりつつある。すなわち、低温に対する急性(短時間)の反応としては熱産生が生じる。しかし、低温暴露が長時間に及んでくると、エネルギーを消費する熱産生から、皮下脂肪を蓄えて低温に耐えるように対応を変化させる(下図)。この転換にPin1の増加が寄与している。実際、増加したPin1は中性脂肪分解酵素であるHSLとATGLに結合して分解を顕著に促進する一方、脂肪合成に関与するACC1に対しては安定化させて発現量を顕著に増加させることが判明した。食料を十分に摂取できない長時間の低温環境下で熱産生を持続させれば、より早く凍死することになるが、これを回避する意義があり、冬眠時の代謝に関連していると考えられる。



## 研究成果

1. Nakatsu Y et al. The prolyl isomerase Pin1 increases  $\beta$ -cell proliferation and enhances insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 292: 11886-11895 (2017).
2. Nakatsu Y et al. Physiological and pathogenic roles of prolyl isomerase Pin1 in metabolic regulations via multiple signal transduction pathway modulations. *Int. J. Mol. Sci.* 17: E1495 (2016).
3. Nakatsu Y et al. Prolyl isomerase Pin1 negatively regulates AMPK by associating with the CBS domain in the  $\gamma$ -subunit *J. Biol. Chem.* 290: 24255-24266 (2015).

公募研究 研究項目A02

野村 真【のむら ただし】

京都府立医科大学大学院 医学研究科 神経発生生物学 准教授

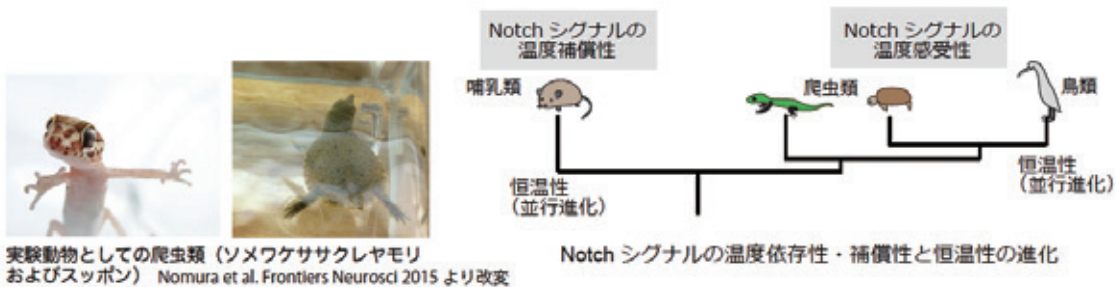


研究課題名

温度依存的・非依存的な胚発生速度を規定する分子機構の解明

研究概要

本研究計画では、1) 脊椎動物では研究報告のほとんど無い温度依存的・非依存的な発生速度調節機構が実際に存在するのか、2) こうした調節機能が存在する場合どのような細胞内シグナル機構に依存しているのか、の2つの課題を検証することを目指した。こうした目標達成のため、羊膜類(哺乳類、爬虫類、鳥類)の胚を30°Cおよび37°Cの環境下で培養し、大脳皮質原基の神経前駆細胞の増殖・分化率を測定した。その結果、爬虫類(カメ)胚の大脳では温度変化に関わらず神経前駆細胞の増殖・分化率は一定に保たれていたが、鳥類(ニワトリ)胚では発生至適温度よりも低温(30°C)において、神経分化率の著しい低下が認められた。さらに、温度依存的な神経分化率の基盤となる分子機構を解明するため、神経前駆細胞の分化運命決定に必須の役割を果たすNotchシグナルの活性を神経幹細胞培養系で測定した。その結果、鳥類の神経前駆細胞におけるNotchシグナル活性が30°C環境下において有意に上昇することを発見した。さらに、このNotchシグナルの活性上昇はDynamin阻害剤であるDynasoreにより抑制されることから、低温におけるNotchシグナル活性の上昇はDynamin依存性のエンドサイトーシス経路に依存している可能性が示された。興味深いことに、カメ胚の神経前駆細胞におけるNotchシグナルもニワトリと同様の温度依存的な活性上昇を示すが、この活性変化はエンドサイトーシス非依存的な経路に依存していることが推測された。さらに、哺乳類(マウス、ラット)胚の神経前駆細胞は細胞外の温度が変化してもNotchシグナル活性を一定に補償する機構が存在することを示唆するデータを得た。これらの結果より、1) 脊椎動物の胚には温度依存的・非依存的な胚発生速度調節機構が実際に存在すること、またこれらの調節機構には種特異性があること、2) Notchシグナルが温度依存的な胚発生速度を制御する分子機構として機能していることが明らかとなった。今後、Notchシグナルの温度依存性・補償性の制御機構と恒温性の進化との関連について解析を進める予定である。



実験動物としての爬虫類(ソメワケササクレヤモリおよびスッポン) Nomura et al. *Frontiers Neurosci* 2015 より改変

研究成果

1. Nomura T et al. Future vocation of neural stem cells: lineage commitment in brain development and evolution. *Neurochem. Res.* 43: 153-156 (2017).
2. Nomura T et al. Avian brains: insights from development, behaviors and evolution. *Dev. Growth Differ.* 59: 244-257 (2017).
3. Yamashita W et al. In vitro and ex ovo culture of reptilian and avian neural progenitor cells. *Methods Mol. Biol.* 1650: 259-265 (2017).



公募研究 研究項目A02

## 高橋 将文 [たかはし まさふみ]

自治医科大学 分子病態治療研究センター 炎症・免疫研究部 教授



研究課題名

温度変化によって誘導されるインフラマソームを介した炎症惹起機構の解明

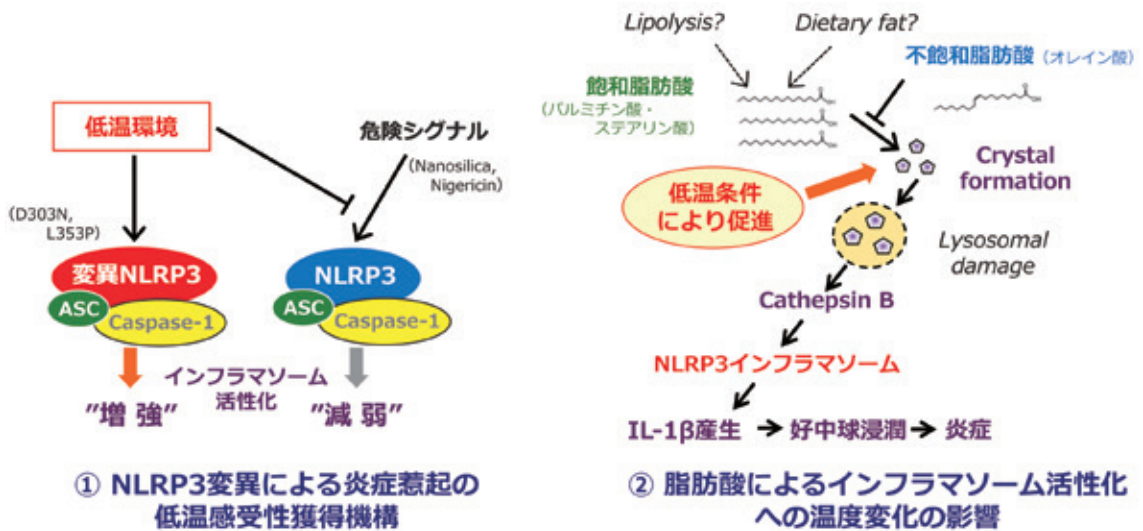
研究概要

① NLRP3変異による炎症惹起の低温感受性獲得機構：

インフラマソームの構成分子であるNLRP3の恒常活性型変異は、発熱や炎症を繰り返すクリオピリン周期熱症候群 (CAPS) を引き起こす。そのNLRP3変異であるL353PおよびD303Nを薬剤誘導性に発現するマクロファージ細胞株を作製し、温度変化による影響を検討した。どちらの変異NLRP3発現細胞でも、低温環境によりインフラマソーム活性化が起こり、IL-1β産生や細胞死が誘導されて炎症反応の増強が認められた。一方、通常の危険シグナルであるNanosilicaやNigericinによるインフラマソーム活性化は、低温環境により減弱された。さらに、変異NLRP3発現細胞における低温環境によるインフラマソーム活性化は、EGTA やBAPTA-AMにより抑制されたことからカルシウム依存性が示唆されたが、TRPA1やTRPV4の阻害薬では抑制されなかった。

② 脂肪酸によるインフラマソーム活性化への温度変化の影響：

飽和脂肪酸 (パルミチン酸・ステアリン酸) によりマクロファージ細胞質内に結晶形成が起こり、リソソーム傷害を介したインフラマソームの活性化が引き起こされることを見出した。この結晶形成およびインフラマソーム活性化は、不飽和脂肪酸 (オレイン酸) によって阻害されたことから、飽和・不飽和脂肪酸の不均衡がこの反応を制御していることが示された。また、低温環境では、この脂肪酸不均衡による結晶形成がさらに促進され、インフラマソーム活性化によるIL-1β産生も増強されることが明らかになった。



研究成果

1. Kawashima A et al. ARIH2 ubiquitinates NLRP3 and negatively regulates NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *J. Immunol.* 199; 3614-3622 (2017).
2. Karasawa T et al. Saturated fatty acids undergo intracellular crystallization and activate the NLRP3 inflammasome in macrophages. manuscript in preparation.

公募研究 研究項目A02

中村 隼明 [なかむら よしあき]

広島大学大学院 生物圏科学研究科 家畜種遺伝学研究室 助教



研究課題名

鳥類精子形成の耐高温戦略の解明

研究概要

本研究の目的は、精子形成の温度感受性を鳥類とほ乳類の間で比較検討し、脊椎動物が恒温性を獲得する際に講じた精子形成の耐高温戦略を解明することである。

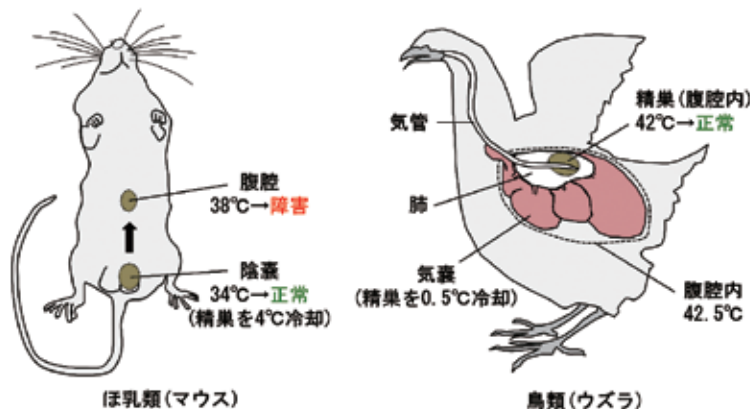
①ほ乳類精子形成の温度感受性：

ほ乳類の精巣は陰嚢内に存在し、腹腔内よりも低い温度（低温環境）で正常な精子形成が起こるが、腹腔内（高温環境）に留まると精子形成は著しく障害されることが知られている。第一に、非侵襲的に温度測定可能なマイクロチップをマウス陰嚢および腹腔内に外科的手術により留置し、生理条件下における陰嚢温を測定した。その結果、陰嚢（34℃）は、腹腔内（38℃）より約4℃低いことを再発見した。続いて、精子幹細胞から成熟精子までの分化をサポートする精巣器官培養法を用いて、マウス精子形成に与える温度のみの影響を検討した結果、温度の影響のみで精子形成が抑制されることを発見した。また、非常に興味深いことに、これまでは一つと考えられてきたほ乳類精子形成の温度閾値が、複数存在することが明らかになった。現在、高温環境下でほ乳類精子形成が抑制するメカニズムの解明に取り組んでいる。

②鳥類精子形成の温度感受性：

鳥類の精巣は腹腔内に位置しており、定説では精子形成は高温環境下で行われるとされている。しかし、先行研究では生理条件下での精巣温が測定されていないなど課題が残されており、この定説は再検討の余地があった。そこで、上記のマイクロチップをニホンズラ精巣および腹腔内に外科的手術により留置し、生理条件下における精巣温を測定した。その結果、精巣（42.0℃）は、腹腔内（42.5℃）と比較して約0.5℃低いことを明らかにした。続いて、鳥類独自の呼吸器官である気嚢が精巣温を冷却する可能性を検討するために、気嚢のガス交換を外科手術によって阻害した。その結果、気嚢は精巣を約0.5℃冷却する効果を持つが、精子形成に影響を及ぼさないことを見出した。以上より、鳥類の精子形成は、高温環境で進行しており、ほ乳類でみられる温度感受性を持たないことが示唆された。現在、温度感受性について詳細に解析するために、鳥類精巣の器官培養法の開発に取り組んでいる。

ほ乳類および鳥類における精子形成の温度感受性



研究成果

1. Nakamura Y. Poultry genetic resource conservation using primordial germ cells. *J. Reprod. Dev.* 62: 431-437 (2016).

## 第4回 領域会議：概要

会期：2017年9月5日（火）－6日（水）

会場：京都大学 芝蘭会館 稲盛ホール・山内ホール

### 計画班員および公募班による研究発表

#### 第1日目 9月5日（火）

##### A01班による発表

9:35～16:10

A01計画1 富永 真琴

A01計画1 高木 昌宏

A01計画1 久原 篤

A01公募4 大倉 正道

A01公募10 神谷 厚範

A01計画2 今本 尚子

A01計画3 梅田 眞郷

A01公募8 佐藤 陽子

A01計画4 原田 慶恵

岡部 弘基

A01公募2 小野 崇人

A01公募6 中野 雅裕

16:10～18:10 ポスター発表

18:10～18:30 全体討論

#### 第2日目 9月6日（水）

##### A02班による発表

8:50～11:55

A02計画5 中村 和弘

A02計画5 山田 哲也

A02公募4 田中 光一

A02公募10 浅野 知一郎

A02計画6 土居 雅夫

A02計画7 柴崎 貢志

A02公募12 高橋 将文

11:55～13:20 総括班会議

13:20～15:00

A02計画7 南 雅文

A02公募2 武田 憲彦

A02公募8 藤田 潤

A02公募6 塩見 邦博

15:00～15:15 領域代表挨拶

学術専門官・評価者講評



## 第4回 領域会議：若手の声

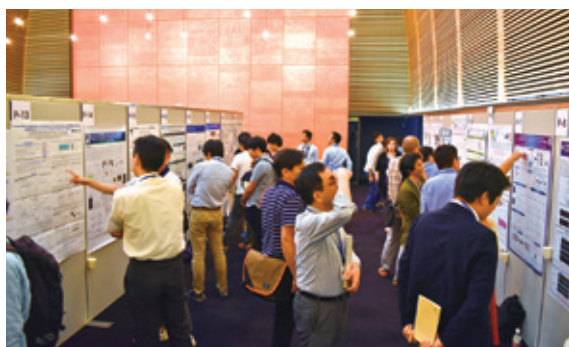
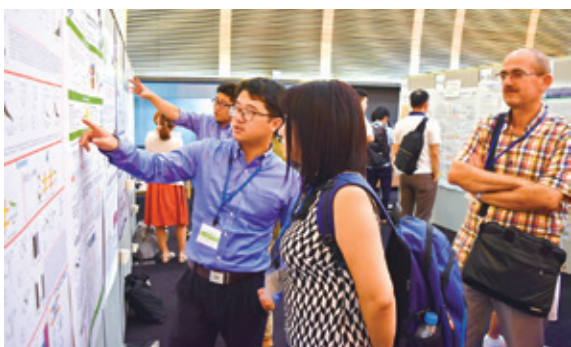


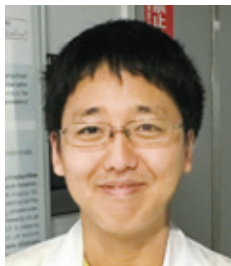
### 猪股 直生

東北大学大学院 工学研究科 小野・猪股/戸田研究室 助教

私は公募班の研究連携者として、第2回から新学術領域研究「温度生物学」領域会議に参加しております。私の専門は特に機械であり、微小電気機械システム (microelectrical mechanical system: MEMS) によるセンシングデバイス・システムの開発を通して単一細胞の熱計測を目指しております。スマートフォンや小型ゲーム機、自動車搭載の各種センサに代表される、センサ素子の基本単位が $\mu\text{m}$ の極小型物理量センサで、特に熱計測にフォーカスしたセンサシステムの開発を行っております。計測対象が小さいと、熱容量の関係で、熱センサ自体も小型にしないと発熱量は計測できません。例を挙げると、雨粒1つの温度は人間用の体温計では測れません。体温計の熱容量が雨粒に対して大きいため、雨粒と体温計を接触させると、雨粒の温度が体温計の温度と同じになってしまうためです。大きさが数十 $\mu\text{m}$ の細胞の熱を計測したいのであれば、相応の小さいセンサを使用しなければなりません。我々の開発するセンサは物理的に熱を計測する(機械振動子の共振周波数変化や、センサ素子の電気抵抗値変化等)ものであり、細胞の熱計測で一般的に使用される光学的、化学的な手法とは異なり、細胞外部の温度を、高分解能で動的に検出することが可能です。このような熱計測デバイスを使用して褐色脂肪細胞の熱計測を行っております。私が計測対象としている褐色脂肪細胞の発熱に関しては少々知識を持ってはおりますが、正直なところ生物学的な分野はほとん

どが異分野です。イオンチャンネルをはじめとした細胞の構成要素から、細胞本体、神経、そして動物の感情までも含む、温度と生物に関わりのある課題を幅広く扱っている本領域では、内容の多くが異分野という状況でした。そのため、お恥ずかしい話ですが、当初は内容を理解しきれなかったことも多くありましたし、現在も勉強中です。一方で、私の分野や手法も、生物学専門の方々にとって新鮮だったのではないかと思います。領域会議において、普段学会でも交わる機会のない分野の方々との議論を通し、生物と熱計測の関係でどのようなエンジニアリングが求められているか、それに対して今さらに将来、エンジニアリングとしてどのような技術を提供でき得るか、など斬新な視点から非常に興味深いご意見をいただいております。これらのお話は領域会議内のみならず、さらにその先の将来を見据えた課題や要望も見えてくるものだと思っております。また、温度生物学ハンドブックをご作成いただいておりますが、これが非常に役立っております。専門用語や各研究者の方々の研究内容、領域会議では追いきれなかった内容等をわかりやすく、かつシンプルにまとめられており、重宝しております。多様な研究テーマの中で、いかに我々の技術が役に立てるか、今後も深い議論を通して交流や理解、貢献が深められるよう尽力いたします。どうぞよろしくお願い致します。





## 柳 昂志

東京大学大学院 薬学系研究科 生体分析化学教室 修士1年

私は普段、計画研究原田・岡部班の岡部弘基先生の下で日々研究に取り組んでおります。今回の国際シンポジウム・領域会議では大変貴重な経験をさせていただきましたので、感想を述べさせていただきますと思います。

私のテーマは「細胞内温度に対する微小管の寄与の検討」です。これまでの温度生物学の研究により細胞内という微小な空間にも不均一な温度分布が存在していることが分かってきました。この温度のばらつきが細胞内の様々な生理的反応の結果を反映していること、また温度分布自体がストレス顆粒(SG)などの生理的現象を引き起こすことも徐々に明らかになってきております。そこで私はこの不均一な場を形成する一因として微小管の存在に着目し現在研究に邁進しているところです。

さて、研究室で実験と解析を繰り返す日々を送っていると、どうしても行き詰るときがあります。研究は孤独な戦いだと思い込み、結果が芳しくないと意気消沈してしまいます。そんな中で連れていかれた今回の国際シンポジウム・領域会議で私は「温度生物学」という領域にどれだけ多くの方がチャレンジしているのかを目の当たりにすることができました。自分と同じように細胞内温度を研究している方だけでなく、線虫などを用いて全身の温度シグナリングを研究している方のお話も聞くことができました。領域自体は多岐にわたりますが、「温度」をキーワードに果敢に研究に取り組む戦友の存在に気

づかされ、大いに勇気づけられました。ポスターセッションでは沢山の先生方に私のポスターを訪れていただき、貴重な意見や新しいアイデアを頂くこともできました。この国際シンポジウム・領域会議は自分が「温度生物学」を研究する一員であることを強く実感し、これから研究に取り組む活力を得た大変素晴らしい会でした。会を主宰してくださった方々や活発に議論してくださった先生方、修士一年生とおそらく最年少であろう私を連れて行ってくださった岡部先生に深く感謝します。

今後も、原田・岡部班の一員としてより一層、加速度的に研究を遂行していく所存です。



# 2017年「温度生物学」公開国際シンポジウム

## Thermal Biology 2017 International Symposium

Date: September 4<sup>th</sup>, 2017

Venue: Inamori Hall at Kyoto University Shiran-Kaikan, Kyoto, Japan

### Timetable

9:00-9:05 Opening Remarks by Makoto Tominaga

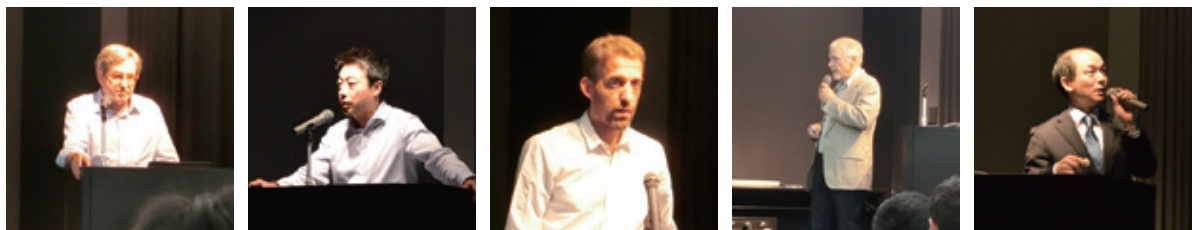
#### A01 (Molecular and Cellular Thermal Biology)

- 9:05-9:45 **Makoto Tominaga** (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, Japan)  
 “Thermal Biology and Thermosensitive TRP Channels”
- 9:45-10:25 **Yifan Cheng** (UCSF, USA)  
 “Structure of TRPV1 Ion Channel by Single Particle Cryo-EM”
- 10:40-11:20 **Shin’ichi Ishiwata** (Waseda University, Japan)  
 “Thermodynamic Studies on Cellular Functions: Heat-Pulse Effects and Imaging of Temperature Distribution”
- 11:20-12:00 **Franz Narberhaus** (Ruhr University Bochum, Germany)  
 “The Temperature-Responsive RNA Structurome of a Bacterial Pathogen”



#### A02 (Systems Thermal Biology)

- 13:20-14:00 **David M. Virshup** (Duke-NUS Medical School, Singapore)  
 “Temperature Compensation of Circadian Rhythms”
- 14:00-14:40 **Shingo Kajimura** (UCSF, USA)  
 “The Color of Fat: Brown, Beige, and White”
- 14:40-15:20 **David Engblom** (Linköping University, Sweden)  
 “Molecular Neural Mechanisms of Fever and Aversive Responses Associated with Infection”
- 15:35-16:15 **Shaun F. Morrison** (OHSU, USA)  
 “Brain Pathways Controlling Brown Adipose Tissue Thermogenesis”
- 16:15-16:55 **Kazuhiro Nakamura** (Nagoya University, Japan)  
 “Central Neural Mechanisms to Defend Life from Environmental Stressors”
- 16:55-17:00 Concluding Remarks by Makoto Tominaga



名古屋大学大学院 医学系研究科・統合生理学

## 中村 和弘

「温度生物学」領域発足後、初の国際シンポジウムを京都で開催しました。生命科学において研究対象となっている現象のほぼすべてが温度によって影響を受けることを考えると、どのような生命科学研究でも「温度生物学」だということができるかもしれません。そういう意味で、温度生物学が影響を与えうる研究は多岐にわたります。しかし、「温度」を中心（あるいは中心近く）に据えて生命現象やメカニズムを探究する研究は、世界広しといえども、実はまだそれほど多くはありません。今回、このシンポジウムで講演をして頂くスピーカーを世界中から選考するにあたり、私達の「温度生物学」が国際的に見てもいかにユニークな研究領域であるかを強く実感しました。

今回講演を行った9名のスピーカーのうち、6名を海外からお招きしました。いずれも「温度」を中心とした生命現象に真正面から向き合い、そのメカニズムの解明に取り組む研究者であり、先駆的な発見をした研究者ばかりでした。温度生物学者でなくても非常に贅沢なシンポジウムであったと思います。午前中のテーマは分子・細胞の温度生物学で、まず、富永真琴領域代表が温度センサー分子であるTRP channelが寄与する細胞レベルの現象とそのメカニズムについての最新知見を解説しました。引き続き、米国のDr. Yifan Chengが昨年のノーベル化学賞の対象となったクライオ電子顕微鏡技術を用いて明らかにしたTRPV1 channel蛋白質の立体構造を示しました。早稲田大学の石渡信一教授は、本領域の主要な研究課題である細胞内温度分布の可視化とその細胞機能についてお話されました。ドイツのDr. Franz NarberhausはRNA structureとよばれる構造が温度によって変化し、温度依存的な遺伝子発現制御の「温度計」として機能することを明快に示しました。

午後はシステム・個体レベルの温度生物学の講演が行われました。シンガポールのDr. David Virshupは、昨年のノーベル生理学・医学賞の対象となった概日リズムの分野で古くから知られる温度補償性とよばれる現象を分子レベルで説明するモデルを提唱しました。米国の梶村真吾博士は肥満研究分野で注目の熱産生器官である褐色脂肪の細胞分化と熱産生メカニズムについての新知見を講演しました。スウェーデンのDr. David Engblomは、長らく論争があった、感染時に発熱の引き金となるプロスタグランジンE<sub>2</sub>を産生する脳内の細胞について、血管内皮細胞であるとの決定的な実験結果を示しました。米国のDr. Shaun Morrisonは生体の温熱恒常性、つまり体温を一定に保つ機能をつかさどる脳の神経回路を解説し、筆者はそうした神経回路が体温調節だけでなく、感染、心理ストレス、飢餓など、さまざまな環境ストレスから恒常性と生命を守る機能を有することとその回路メカニズムを講演しました。

いずれも温度生物学の本質をとらえた研究であるだけでなく、生命科学の広い分野にインパクトを与える研究でした。そのことを裏付けるように、本国際シンポジウムには、領域内外から200名近くの参加者があり、レベルの高いディスカッションが活発に繰り広げられました。冒頭に書いたように、ユニークでありながら非常に重要な生命科学研究を推進する「温度生物学」が日本から世界へ広がっていく契機として、このような国際シンポジウムが役立てばよいと思います。次の「温度生物学」国際シンポジウムは、2019年3月28-31日に神戸で開催されるアジア-オセアニア生理学会大会 (FAOPS Congress 2019) のwhole-dayシンポジウムとして開催します。また多くの皆さんの御参加をお待ちしております。



## 本領域の活動

### 国際共同研究加速基金

北海道大学大学院 薬学研究院 薬理学研究室 助教  
人羅 菜津子

渡 航 先 : Kay Tye lab, Massachusetts Institute of Technology, The Picower Institute for Learning and Memory, Boston

渡航期間 : 2016年9月14日~2017年3月10日

国際共同研究加速基金のご支援を受けて、米国マサチューセッツ工科大学 (MIT) を訪問してきました。訪問先の研究室のボスであるKay Tye 博士は、30代前半でPIになってから今年で6年目という新進気鋭の若手PIです。ファイバーフォトメトリ法や *in vivo* 電気生理学、光遺伝学的手法など最先端の手法を駆使して快不快情動の神経回路メカニズムに関する研究を展開しており、NIH Pioneer Award や Society for Neuroscience Young Investigator Award などの賞を受賞しています。今回の訪問では、ファイバーフォトメトリ法という *in vivo* 蛍光検出方法を習得してきました。この手法は、脳内に埋め込んだ光ファイバーを介して遺伝子コード型蛍光カルシウムプローブ (genetically encoded  $Ca^{2+}$  indicator : GECl) の蛍光強度変化をモニタリングすることで、*in vivo* 神経活動計測を可能にする手法です。私たちの研究室では温度に起因する快不快情動がネズミの行動を変化させる機構の解明をおこなっていますが、この手法を用いることにより、行動中の神経活動をリアルタイムでモニタリングすることが可能になります。さらに、ファイバーフォトメトリ法を温度感受性蛍光プローブと組み合わせることで、*in vivo* 脳内温度計測法の確立にも取り組んでいきたいと考えています。

滞在中は、実験技術の習得だけでなく、ボスやラボメンバーとの交流を通して研究に対する多様な取り組み方や考えを見聞きすることができました。ラボは、ポスドクと院生が15人ほど、テクニシャンやローテーションの学部生も含めると30人ほどの大所帯でした。このようなビッグラボを運営しながら競争の激しい研究分野の第一線で活躍し、プライベートでは二児の母でもあるという Tye 博士はまさにスーパーウーマンでした。出張も多く、忙しい月はラボにいるのが数日のみということもありました。それでも、ラボにいられる時は30分刻みで予定を組み、多くの時間をラボメ

ンバーとのミーティングに費やしていました。その姿勢からは、一人ひとりの意見を尊重して一人前の科学者に育てたいという想い、そして、皆の意見を取り入れてラボとしてもますます成長したいという想いが伝わってきました。

それに応えるように、ラボメンバーは皆、生き生きとパワフルに研究をしていました。印象的だったことは、個々の研究スタイルの多様性です。子どもをオフィスに連れてきてデスクの傍で遊ばせながらデータ解析をする人や、ダンスの競技会に出るために夕方になると練習に出かけ、その代わりに練習後には戻ってきて夜中まで実験をする人、朝から晩まで週末もラボに来て研究に没頭している人。互いにそれぞれの研究スタイルに理解があり、自分のスタイルに自信とやりがいを持っているようでした。また、研究者ならではの視点を活かして新しいことにチャレンジしている人もいました。ある学生は、家族や研究者ではない友人に研究の面白さを知ってほしいという思いから、脳や神経細胞の美しい写真を100ページ近くにわたって解説付きでまとめ、製薬企業などからのサポートも取りつけて出版していました。別のポスドクは、海外から実験機器を購入する際、安価に扱っている会社がなかったから自分で会社を作って輸入したと話してくれました。当然ながら、他のこともやっているからといって研究がおろそかになることはなく、皆、話を聞くまで全くそんな気配を感じさせないほどパワフルに研究をしていました。彼らのオリジナリティーと行動力には驚かされましたが、確かに、研究者にとって大事な素養だと納得しました。

今回の訪問を通して、研究分野を牽引する研究者たちが日々どんな環境で、どんな人たちと一緒に、どんなことを考えながら研究を進めているのかを彼らのグループの中に入って見聞きし実感できたことは貴重な体験でした。この経験を活かして、ますます研究に邁進していきたいと思えます。



MITのキャンパス



Tye 先生のオフィスにて。右が著者



## 学会・シンポジウム開催報告

京都大学大学院 薬学研究科 システムバイオロジー分野 准教授  
**土居 雅夫**

学 会 名：第24回日本時間生物学会学術大会

会 場：京都大学吉田キャンパス

開催日時：2017年10月29日（日）8:30-10:30

シンポジウムタイトル：温度情報と時刻情報のモレキュラーインターフェイス

オーガナイザー：濱田 文香（シンシナティー小児病院）・富永 真琴（生理学研究所）

プログラム委員：土居 雅夫（京都大学）

### プログラム

濱田 文香（シンシナティー小児病院）

「ショウジョウバエ温度選択リズムの制御機構」

梅田 眞郷（京都大学大学院 工学研究科）

「ショウジョウバエにおける体温調節とエネルギー代謝制御」

吉井 大志（岡山大学大学院 自然科学研究科）

「キイロショウジョウバエ概日時計の温度同調性」

吉村 崇（名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所）

「脊椎動物の環境周期への適応機構」

金 尚宏・深田 吉孝（東京大学大学院 理学系研究科）

「概日振動体の温度補償性メカニズム」

土居 雅夫・村井 伊織・嶋谷 寛之・岡村 均（京都大学大学院 薬学研究科）

「体温の日内変動パターンを規定する G 蛋白質共役受容体の解析」

本新学術領域「温度生物学」の支援を受け、日本時間生物学会との共催シンポジウム「温度情報と時刻情報のモレキュラーインターフェイス」を開催した。

生物は時々刻々と変化する温度変化の波にいる。環境や体温の温度変化は概日リズムの位相・振幅に影響を及ぼし、体内時計が発信する時計情報は温度感覚の応答性を左右する。このような概日リズムと温度情報の相互支配的な制御関係はこれまで主に現象レベルの記載が進んできたが、最近では分子機序レベルでの理解が急速な勢いで進みつつある。

このような中、本シンポジウムでは、濱田・梅田・吉井らによるショウジョウバエを用いた最新の知見と、吉村によるメダカをモデルとした研究、金・土居らによるマウス・ヒトでの成果が報告された。大会場の座席がほとんど埋まるほどの熱気の中、演者から発表される新知見に会場が固唾をのむ瞬間がいくどもあった。温度情報と時刻情報のモレキュラーインターフェイスは驚くほどユニークで、

そこには種を超えた共通性も見えてきた。このような、「温度生物学」と「時間生物学」の新しい接点に時間生物学会の会員の方々も興味をもち、有意義なディスカッションが交わされた。

ご講演の先生ならびに共催シンポジウムに賛同して頂いた日本時間生物学会に深謝する。



## 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  
岡部 弘基

学会名：第55回日本生物物理学会年会

会場：熊本大学 黒髪北地区

開催日時：2017年9月20日（水）13:55-16:25

シンポジウムタイトル：温度と生物の接点

The Intersection between Temperature and Life

オーガナイザー：岡部 弘基（東京大学）・原田 慶恵（大阪大学）

### プログラム

森 泰生（京都大学大学院 工学研究科）

「細胞における温度動態：観察と意義」

深田 吉孝（東京大学大学院 理学系研究科）

「マウス体内時計の温度応答」

佐藤 悠<sup>1</sup>、木村 浩之<sup>2</sup>（<sup>1</sup>静岡大・創造院、<sup>2</sup>静岡大・グリーン研）

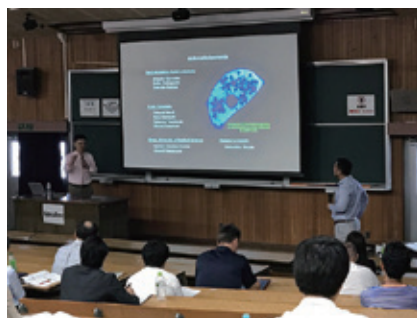
「16S rRNA 遺伝子のGC 含量と原核生物の生育温度との関係」

岡部 弘基<sup>1,2</sup>、船津 高志<sup>1</sup>（<sup>1</sup>東京大学大学院薬学系研究科、<sup>2</sup>JST さきがけ）

「細胞内微小空間における温度と分子の相互作用」

唐澤 悟<sup>1,2,3</sup>、荒木 健<sup>3</sup>、臼井 一晃<sup>3</sup>、村山 周平<sup>4</sup>、青木 伊知男<sup>4</sup>（<sup>1</sup>昭和薬大、<sup>2</sup>JSTさきがけ、<sup>3</sup>九大院薬、<sup>4</sup>量子研）

「温度応答性超分子を用いたがん集積システムの開発」



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「温度と生物の接点」を企画・実行いたしましたので、報告申し上げます。

環境としての温度は、代謝やリズムといった主要生理機能に大きく影響を及ぼす一方で、細胞内では局所温度が大きく変動し、細胞内反応への直接的に関与することも明らかになりつつあります。しかし、このような温度と生命現象の接点となる根源的原理は、温度という物理因子の普遍性とは裏腹に、いまだに謎に包まれています。そこで本シンポジウムでは、温度が深く関与する種々の生命現象の原理の解明により温度感知・応答の分子機構を探る挑戦的な研究を紹介し、温度生物学の将来展望を議論することを試みました。

シンポジウムには、細胞内局所温度計測・操作技術の開発と応用、生物の温度適応の分子機構や温度感受性生理現象といった種々の領域・階層の研究者にお越しいただきました。また、講演では、種々の生命現象における温度センシングや温度レスポンスに関する興味深い現象とそのメカニズムが紹介されたほか、温度シグナリングの分子機構やそれを利用した応用研究が発表されました。非常に多彩な講演会とな

り、温度と生物の接点の奥深さが改めて浮き彫りになりました。個人的には、いずれのご発表も細胞内、生体内で温度を計測する意義を十二分に伝えており、温度生物学の魅力を生体物理学研究者に発信する良い機会となったのではないかと感じました。

また温度と生命現象の接点となる根源的原理の解明は始まったばかりですが、本シンポジウムからその研究対象が生命現象に遍く備わっていることも明らかになりました。これらの知見を今後の温度生物学の推進と発展に供すると決意するとともに、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。



## アウトリーチ活動報告

京都大学大学院 工学研究科 合成・生物化学専攻  
長尾 耕治郎

活動名：新潟中央高等学校 研究室見学会

会場：京都大学大学院工学研究科 合成・生物化学専攻 梅田研究室

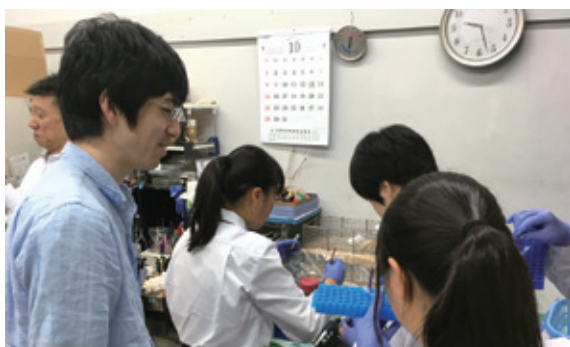
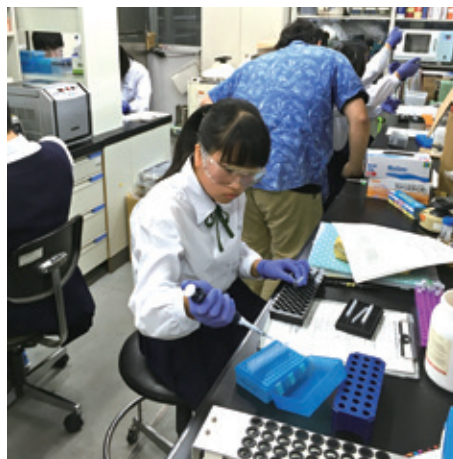
開催日時：2017年10月13日（金）9:00－13:00

梅田班では温度生物学領域のアウトリーチ活動の一環として、新潟中央高等学校の学生を対象にした研究室見学会を開催しました。今回の研究室見学会では高校の生物の授業でも履修するpolymerase chain reaction (PCR) を用いて、飼育環境温度を変化させたショウジョウバエに存在する共生細菌の種類 (*Lactbacillus*属や*Acetobacter*属など) とその量を解析しました。まず、環境温度と生物の関係や共生細菌についての説明を行った後、大学院生と共に実験を体験してもらいました。見慣れない実験器具やショウジョウバエに最初は戸惑っているようでしたが、大学院生の丁寧な指導のためか、緊張感を持ちながらも実験を楽しんでいるようでした。さらに、実験が成功したこともあり、解

析結果が得られた際には達成感のある表情をしていました。また、ショウジョウバエの共生細菌叢が環境温度により大きく変動することに驚いているようでした。このような環境温度変化に起因する共生細菌叢の変動が宿主の生理機能に与える影響を明らかにすることは私たちの課題ですが、高校生達にも実験レポートの中で自由に考察してもらいました。このように、高校の教育過程では体験することのない“答えを誰も知らない課題”に触れることで、科学研究の醍醐味を感じてもらえたように思います。また、研究室見学会を実施した梅田班員にとっても、温度と生物の関係が研究者以外の方にも興味深い関係であることを実感することができ、温度生物学分野の魅力を再認識することができました。

### スケジュール

- 9:00 梅田教授 挨拶
- 9:05 共生細菌叢のPCRによる解析 (第一部)
- 10:00 梅田教授による講義 ~研究とは~
- 11:00 共生細菌叢のPCRによる解析 (第二部)
- 12:00 研究室学生との交流会



# トピックス

## Hikeshi欠損でみられるヒト細胞のストレス感受性



国立研究開発法人理化学研究所 今本細胞核機能研究室  
**今本 尚子**

### はじめに

真核生物では、転写や複製などの遺伝子機能の場（細胞核、以下、核）とタンパク質合成の場（細胞質）が核膜によって隔てられている。そのため、核と細胞質の間では絶え間ない情報分子の交換が核膜上の核膜孔複合体を通して行われている。このプロセスを担う核—細胞質間輸送は、遺伝子発現などの細胞核機能制御の要であり、細胞の恒常性維持や外界の刺激応答に必要不可欠である（参考文献1,2）。

私たちの研究グループは、細胞が熱ショックなどのストレスを受けると、これまで良く解析されているImportinファミリーが担う輸送が低下するが、Hikeshiと名付けた運搬体が担う輸送が駆動することを見つけた（Kose et al, Cell 2012）（図1）（参考文献3）。Hikeshiは分子シャペロンHsp70/Hsc70（70kDa heat-shock protein family）を核に輸送する。Hikeshi（火消し）の命名は、“細胞ストレス（火事）を鎮める作用がある”と言う、私たちがHeLa細胞で見つけた最初の機能に由来する。Hikeshi輸送の駆動機構や細胞機能の解析から、細胞が環境温度の変化をどのように感知し、どのように対処するのかといった問題を明らかにしたいと考えられている。

最近、Hikeshi欠損によるヒト細胞の熱ストレス感受性が、当初、私たちがHeLa細胞で考えていたように単純ではないことがわかってきた。Hikeshiが欠損すると、子宮頸がん細胞であるHeLa細胞はストレス感受性になるのに対して、正常2倍体細胞であるhTERT-RPE1細胞（不死化網膜色素上皮細胞）は、逆にストレス耐性になるのである（参考文献4）。本稿では、抗がん作用にも見えるこの現象を概説する。

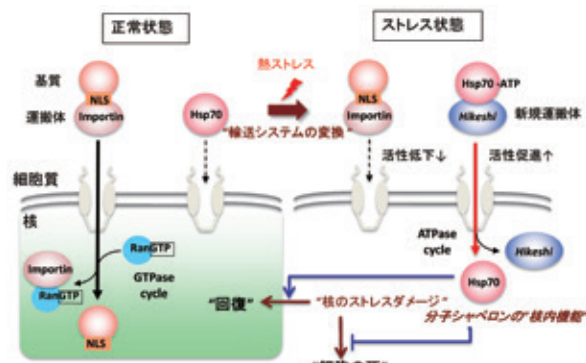


図1. 熱ストレスで駆動するHikeshi輸送  
 よく知られているImportin輸送は正常時に活発に働くが、細胞がストレスを受けるとImportin輸送は低下する。Importin輸送が低下するストレス時に、Hikeshiと名付けた運搬体が担う輸送が駆動する。

### Hikeshiは真核生物で進化的に保存された因子である

Hikeshi分子は、N末領域（NTD）にjelly-roll/ $\beta$ -sandwich型構造を、C末領域（CTD）にコイルドコイル様構造をとり、特徴的な非対称性ホモダイマーを形成して

いることが、その結晶構造から明らかになっている。Heat repeat構造からなるImportinファミリー分子とは全く違う構造である（参考文献5,6）。

系統解析で調べると、Hikeshiホモログは原核生物に存在しないが、真核生物の殆どに存在することがわかった。私たちは、ヒトやマウス以外に、分裂酵母や線虫のHikeshiホモログを調べた。その結果、どのHikeshiホモログも、分子シャペロンHsp70に結合することがわかった（参考文献7）。アラビドプシスのHikeshiホモログ（参考文献8）も、Hsp70に結合することが報告されている。このことから、Hikeshiホモログの生化学的性質は、進化的に保存されていると考えられる。一方で、Hikeshiの機能が障害を受けると、分裂酵母よりもマウスやヒトの高等真核生物は強い影響が見られることがわかってきた。その影響は、ストレスをかけたとき、ストレスをかけていないときの両方で見られる。ストレスをかけたときにヒト細胞で見られるHikeshi欠損の影響を以下に述べる。

### ヒト細胞におけるHikeshi欠損のストレス感受性

Hikeshiを同定した当初は、HeLa細胞を使ってその細胞機能を解析していた。HeLa細胞からHikeshiをsiRNAでノックダウンして熱ストレスをかけると、大部分の細胞が死滅することがわかった。一方、Hikeshiノックアウトマウスを解析する途上で、HikeshiノックアウトMEF（mouse embryonic fibroblast）細胞が熱ストレスをかけても野生株よりも生存率が上がることがわかった。Hikeshiノックアウトで見られたHeLa細胞とMEF細胞のストレス感受性の違いが、ヒトとマウスの違いではなく、癌細胞と正常細胞の違いである可能性を考えて、ゲノム編集技術CRISPR/Cas9を用いて、子宮頸がんHeLa細胞と正常細胞に近いhTERT-RPE1細胞（不死化網膜色素上皮細胞）のHikeshiをノックアウトして、それぞれの細胞のストレス感受性を調べた。両細胞とも、Hikeshiをノックアウトすると、ストレスで誘導されるHsp70の核局在が強く阻害される（図2A）。また、両細胞とも、正常時における細胞増殖はHikeshiノックアウトで影響を受けない。しかし、それぞれの細胞に熱ストレスをかけると、HikeshiノックアウトHeLa細胞は、熱ストレス後に野生株に比べてストレス感受性になって生存率が下がる。一方、HikeshiノックアウトhTERT-RPE1細胞は、熱ストレスをかけると、野生株より生存率が上がってストレス耐性になる。ユビキチン・プロテアソーム阻害剤であるMG132を添加したときも、Hikeshiをノックアウトすると、HeLa細胞は死にやすく、hTERT-RPE1細胞の生存率は上がる。つまり、HeLa細胞とhTERT-RPE1細胞で見られるHikeshi欠損の影響は、熱ストレスだけでなく、タンパク質毒性ストレスに普遍的であることがわかる。

次に、アポトーシス活性を調べた。細胞にMG132を添加して、細胞にタンパク質毒性ストレスをかけると、Hikeshi

をノックアウトしたHeLa細胞は、野生株に比べてアポトーシス活性が上昇するのに対して、HikeshiノックアウトhTERT-RPE1細胞は、野生株に比べて逆にアポトーシス活性が低下することがわかった (図2B)。熱ストレスをかけたときも、スタウロスポリンで処理したときも、HikeshiノックアウトHeLa細胞は野生株に比べてアポトーシス活性が上昇し、HikeshiノックアウトhTERT-RPE1細胞は野生株に比べてアポトーシス活性が低下する。このことから、タンパク質毒性ストレスをかけると、Hikeshiを欠損したHeLa細胞とhTERT-RPE1細胞のアポトーシス活性が逆転することがわかる。

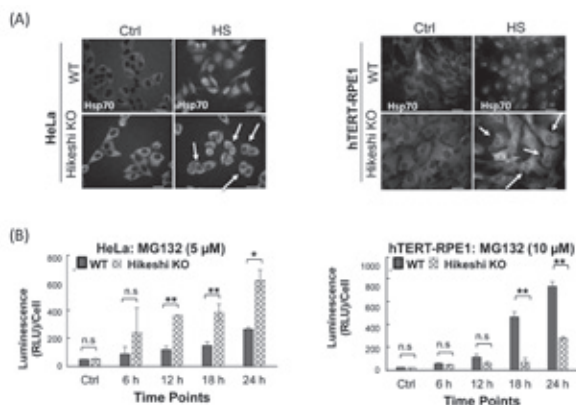
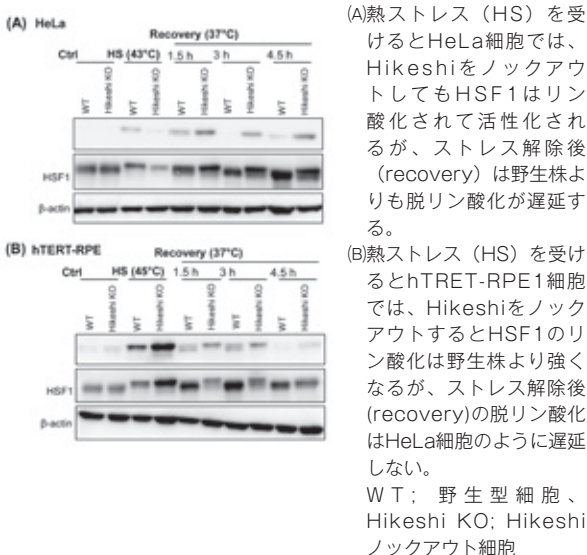


図2. HikeshiノックアウトHeLa細胞とhTERT-RPE1細胞  
(A)Hikeshiをノックアウトすると、熱ストレス (HS) で誘導されるHsp70の核局在が阻害される (矢印)。  
(B)MG132存在下におけるアポトーシス活性。Hikeshiをノックアウトすると、HeLa細胞ではアポトーシス活性が上昇するのに対して、hTERT-RPE1細胞ではアポトーシスが抑制される。  
WT; 野生型細胞、Hikeshi KO; Hikeshiノックアウト細胞

ヒト細胞におけるHikeshi欠損で見られるシグナルタンパク質の変化

Hikeshiをノックアウトすると変化する2つのタンパク質に着目した。最初に着目したのは転写因子Heat Shock Factor 1 (HSF1) である。一般に、どの細胞でも熱ストレスで転写因子HSF1が活性化する。活性化したHSF1は、熱ショックタンパク質を誘導して、熱ストレスで変性したタンパク質を修復することが知られている。HeLa細胞では、熱

図3. Hikeshi欠損で影響される転写因子HSF1の活性制御



(A)熱ストレス (HS) を受けるとHeLa細胞では、HikeshiをノックアウトしてもHSF1はリン酸化されて活性化されるが、ストレス解除後 (recovery) は野生株よりも脱リン酸化が遅延する。  
(B)熱ストレス (HS) を受けるとhTERT-RPE1細胞では、HikeshiをノックアウトするとHSF1のリン酸化は野生株より強くなるが、ストレス解除後 (recovery) の脱リン酸化はHeLa細胞のように遅延しない。  
WT; 野生型細胞、Hikeshi KO; Hikeshiノックアウト細胞

ストレスをかけると野生株と同様に、HikeshiをノックアウトしてもHSF1は活性化される (図3)。しかし、熱ストレスを解除すると、野生株では速やかに不活性化されるHSF1が、HikeshiノックアウトHeLa細胞ではすぐには不活性化されない。一方、hTERT-RPE1細胞では、Hikeshiをノックアウトしても、HeLa細胞のようにHSF1不活性化の遅延は見られない。このことから、hTERT-RPE1細胞では、Hikeshiをノックアウトしても、HeLa細胞のように“ストレス状態”が続かないのかもしれない。

もう一つ、Hikeshiノックアウト細胞にストレスをかけると、癌抑制遺伝子p53の発現が亢進することに気づいた (図4)。これは、HeLa細胞とhTERT-RPE1細胞の両方で見られる。ただし、hTERT-RPE1細胞では、p53の発現亢進に伴ってp21の発現亢進が強く見られた。それに対して、HeLa細胞では、p21の発現亢進は見られなかった。熱ストレスでも、p53の発現亢進がHeLa細胞とhTERT-RPE1細胞の両方で見られ、p21の発現亢進がhTERT-RPE1細胞だけで見られる。この、p53-p21の発現亢進が、Hikeshi欠損でヒト細胞のストレス感受性・耐性が見られる重要な原因の一つであろうと考えている。transactivation活性のないp53がHeLa細胞のアポトーシスを誘導することが報告されている (参考文献9)。一方で、hTERT-RPE1細胞では、抗アポトーシス活性をもつp21がp53の作用で誘導されるため、それがストレス耐性になる一因ではないかと考えている。

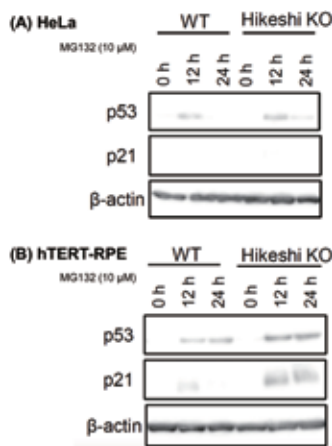


図4. Hikeshi欠損細胞をストレスに曝すとp53の発現が亢進する。  
(A)MG132を添加してタンパク質毒性ストレスをかけると、HikeshiノックアウトHeLa細胞はp53の発現が亢進する。  
(B)MG132を添加してタンパク質毒性ストレスをかけると、hTERT-RPE1細胞はp53とp21の発現が亢進する。  
WT; 野生型細胞、Hikeshi KO; Hikeshiノックアウト細胞

おわりに

Hikeshiが欠損すると、分子シャペロンHsp70が核に局在できなくなる。分子シャペロンHsp70の分子機能は、これまで盛んに解析されてきたが、明らかにされてきたのは細胞質における機能であって核内機能ではない。Hsp70の、核の中の働きは殆どわかっていない。

HeLa細胞は、Hikeshiが欠損するとストレスから回復せずに死滅するが、このとき、SV40T抗原の核局在化シグナル (Importinが運ぶ) を付加したHsp70を細胞に導入して、Hsp70を人為的に核に送り込むと細胞の死が完全ではないが回避される (参考文献3)。また、HeLa細胞で見られたストレス後のHSF1の不活性化遅延も、Hsp70を人為的に核に導入することで回避される (参考文献4)。つまり、核内Hsp70は、HSF1を不活性化することで、ストレス状態を鎮める作用があることがわかる。Hikeshiが欠損したときにタンパク質毒性ストレスでp53が発現亢進するのも、核内Hsp70の喪失によるものではないかと考えている。Hikeshi

欠損でHeLa細胞とhTERT-RPE1細胞のストレス感受性が逆になるメカニズムや、どの範囲の細胞がHikeshi欠損の影響を受けるのかを明らかにすることは今後の重要な課題である。また、ヒトやマウスでは、Hikeshiの機能が喪失すると、ストレスをかけなくても重篤な影響が現れる。例えば、ヒト遺伝子疾患の誘発 (参考文献10) やHikeshiノックアウトマウスが致死になることである。こうした影響も、Hsp70の核内局在が関与するのではないかと考えている。Hikeshiを利用することで、これまで全く知られていなかったHsp70の核内機能が明らかになると考える。

#### 参考文献

1. Kimura M & Imamoto N. Biological significance of the importin- $\beta$  family-dependent nucleocytoplasmic transport pathways. *Traffic* 15: 727-748 (2014).
2. Kimura M et al. Extensive cargo identification reveals distinct biological roles of the 12 importin pathways. *eLife* 6: e21184s (2017).
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).
4. Rahman KMZ et al. Hikeshi modulates the proteotoxic stress response in human cells: implication for the importance of the nuclear function of HSP70s. *Genes Cells* 22: 968-976(2017).
5. 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).
6. Christie M et al. Structure biology and regulation of protein import into the nucleus. *J. Mol. Biol.* 428: 2060-2090 (2016).
7. Oda Y et al. The Schizosaccharomyces pombe Hikeshi/Opi10 protein has similar biochemical functions to its human homolog but acts in different physiological contexts. *FEBS Lett.* 588: 1899-1905 (2014).
8. Koizumi S et al. Functional analysis of the Hikeshi-like protein and its interaction with HSP70 in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450: 396-400 (2014).
9. Haupt Y et al. Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.* 9: 2170-2183 (1995)
10. 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).

## 細胞内温度を測定するプローブ

大阪大学 産業科学研究所 生体分子機能科学研究分野 助教  
**中野 雅裕**



### はじめに

近年、物理的な視点による生物学の重要性が議論されています。生体内の重要なあらゆる反応に関わる「細胞内温度」に関してもここ数年でデータが出始め、活発な議論がなされています。これは細胞内温度計測技術が開発されている証拠でもあります。例えば岡部らは温度感受性蛍光ポリマーを用いて、1細胞内の温度が不均一であることを報告しました(参考文献1)。また清中らは温度によって構造変化するタンパク質と緑色蛍光タンパク質GFPを組み合わせたtsGFPを開発し、褐色脂肪細胞のミトコンドリアからの熱産生を可視化しました(参考文献2)。また、谷本・広井らは蛍光性量子ドットの蛍光スペクトルが温度によって変化する性質を利用して、神経細胞の中心部分が神経突起部分よりも温度が高いことを報告しました(参考文献3)。さらに学術誌Nature Methodsの誌面上で細胞内温度分布の不均一性が本当に存在するのか、理論的な計算も交えて議論が行われています(参考文献4-6)。今回、我々は細胞内温度を測定するプローブとして、遺伝子にコードされた蛍光性温度プローブタンパク質gTEMPを開発しましたので、その結果についてご紹介します。

### 蛍光性温度プローブgTEMPの開発

遺伝子にコードされた蛍光性温度プローブとしては前述したtsGFPが開発されていました。また、GFPの変異体であるEGFPを温度プローブとして用いた報告があります(参考文献7)。しかし、tsGFPは35℃以下の温度域での感度が高くなく、変温動物や植物などの温度測定には向いていませんでした。また、2励起波長、1蛍光波長の光で温度を測定するため、速い温度変化を測定することが難しいという問題点がありました。はじめに、我々は蛍光タンパク質そのものの温度依存性を測定しました。すると、蛍光タンパク質ごとに蛍光強度の温度依存性が異なることが分かりました(図1)。そこで、測定した蛍光タンパク質の中で

最も温度依存性が大きい蛍光タンパク質Siriusと小さい蛍光タンパク質mT-Sapphireの精製タンパク質溶液を等モルで混ぜ、5℃から50℃まで溶液の温度を変えて蛍光スペクトルを測定し、2つの蛍光強度比(レシオ)を計算したところ、レシオ値が温度によって変化することが分かりました。

(図2)さらにSiriusとmT-Sapphireは共に波長370 nm程度の光で励起でき、且つ蛍光波長のピークが80 nm以上離れており、1励起波長、2蛍光波長の光で温度を測定できるため、速い温度変化を測定できることが分かりました。また、溶液の温度を上げた時と下げた時ではレシオ値がほとんど変化しなかったことから、このタンパク質溶液にはヒステリシスが無く繰り返し測定できること、カリウムイオン、カルシウムイオン、マグネシウムイオンの濃度に対してレシオ値は影響を受けないことも確かめました。そして、我々はこのSiriusとmT-Sapphireを組み合わせた温度測定系をgTEMP (genetically encoded ratiometric fluorescent TEMPerature indicator) と名付けました(参考文献8)。

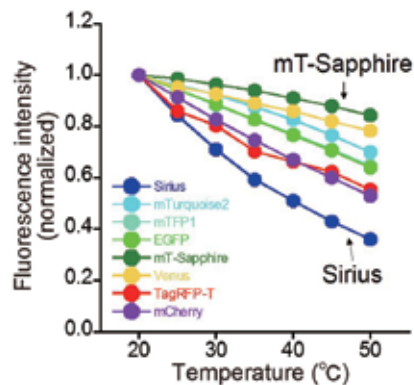


図1. 蛍光タンパク質の蛍光強度の温度依存性  
 20℃での各蛍光タンパク質の蛍光強度をそれぞれ1とした。この中ではSiriusの蛍光強度の温度依存性が最も大きく、mT-Sapphireが最も小さかった。参考文献8より改変して転載。

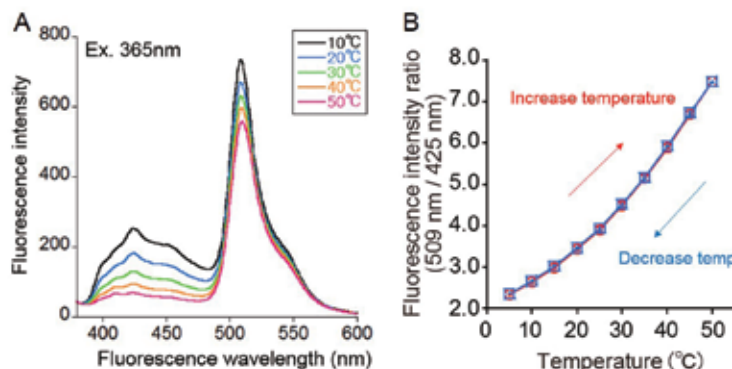


図2. gTEMPの蛍光スペクトルとレシオ値の温度依存性

A: gTEMPの蛍光スペクトルの温度依存性。B: mT-SapphireとSiriusの蛍光ピーク波長(509 nmと425 nm)のレシオ値の温度依存性。温度を上げ下げしてもレシオ値に影響は見られなかった。参考文献8より改変して転載。

### gTEMPを用いた温度測定

次にgTEMPを培養細胞に発現させ、細胞内でのgTEMPの有用性を確かめました。細胞を培養している培地の温度を35°Cから40°Cに徐々に上昇させたところ、gTEMPのレシオ値が温度によって変化することが確認できました。また、赤外レーザー(波長1,462 nm)を細胞に照射したときの細胞内温度変化を約50ミリ秒の時間分解能でイメージングすることにも成功しました。さらに、これまでの細胞内温度測定の研究で報告されている細胞の核が細胞質に比べて温度が高い(図3)ことや、ミトコンドリア内膜のプロトン濃度勾配の脱共役剤を添加した時のミトコンドリア内の温度上昇もgTEMPを用いて観測できました。脱共役剤添加によるミトコンドリアの温度上昇は6~9°Cと従来観測されている値よりも高い温度変化を観測しました。これはこの反応時の熱産生の場所であると考えられているミトコンドリア内膜にgTEMPを発現させているため、本来の熱産生を可視化できたと考えています。最後にメダカの初期胚の発生過程の温度観察にも挑戦しました。受精卵にgTEMPのmRNAをインジェクションし、その1日後から約15時間にわたる温度のタイムラプス観察(5分間隔)に成功し、gTEMPを用いたin vivo温度イメージングが可能であることを確かめました。

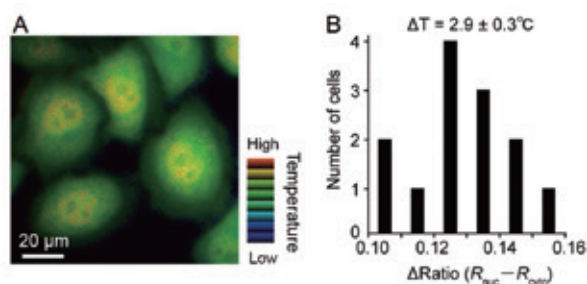


図3. gTEMPを用いたHeLa細胞の温度分布の可視化  
A: gTEMPを発現したHeLa細胞のレシオ分布。培地の温度は37°C。(注:核小体にはgTEMPは発現していない。) B: 核と細胞質のレシオ値の差のヒストグラム。レシオ値の差を温度に換算すると、 $2.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$ となった。参考文献8より改変して転載。

### おわりに

gTEMPは2つの蛍光タンパク質の蛍光強度の比(レシオ)で温度をイメージングするため、細胞の形やプローブの発現量に依存しない定量的な温度のイメージングが可能です。また5°Cから50°Cまでレシオ値が変化することを確かめており、様々な生物に適用可能です。しかしながら、本プローブにもまだ問題点があります。1点目は紫外領域(約370 nm)の波長の光でプローブを励起するため、細胞毒性や自家蛍光の影響がより長波長の励起光を使ったときに比べて大きい点です。2点目は温度に対する変化率が前述したポリマー系の温度プローブなどに比べて低いため、より細かい温度変化を捉えることが難しい点です。今後、これらの問題点を解決することで、より正確に細胞内温度状態や温度変化を捉えるプローブを作製できると考えています。最近、Krisztらはヒトやマウス由来の褐色脂肪細胞に、蛍光性の温度プローブを導入し、生細胞の応答を光学顕微鏡で観察しました。その結果、実際に褐色脂肪細胞が熱を生み出す瞬間を1細胞レベルの解像度で観察することに成功しました(参考文献9)。興味深いことに顕微鏡の観察視野内の細胞には刺激をほぼ同時に加えているにも関わらず、熱産生のタイミン

グに大きな時間差があるなど細胞ごとに挙動が異なっていました。蛍光性温度プローブの技術によって、細胞の代謝活性を測定できたことに加えて、熱産生は細胞によってバラつき(細胞個性)があることが初めて明らかになりました。この例のように、温度プローブを作製・利用することによって、これまであまり考えられてこなかった生物にとっての温度の概念を新たに発見・構築していくことが期待されます。

### 参考文献

1. Okabe K et al. Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Commun.* 3: 705 (2012).
2. Kiyonaka S et al. Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells. *Nat. Methods.* 10: 1232-1238 (2013).
3. Tanimoto R et al. Detection of temperature difference in neuronal cells. *Sci. Rep.* 6: 22071 (2016).
4. Baffou G et al. A critique of methods for temperature imaging in single cells. *Nat. Methods.* 11: 899-901, (2014).
5. Kiyonaka S et al. Validating subcellular thermal changes revealed by fluorescent thermosensors. *Nat. Methods.* 12: 801-2 (2015).
6. Suzuki M et al. The 105 gap issue between calculation and measurement in single-cell thermometry. *Nat. Methods.* 12: 802-803 (2015).
7. Kamei Y et al. Infrared laser-mediated gene induction in targeted single cells in vivo. *Nat. Methods.* 6(1):79-81 (2009).
8. Nakano M et al. Genetically encoded ratiometric fluorescent thermometer with wide range and rapid response. *PLoS ONE* 12(2): e0172344 (2017).
9. Kriszt R et al. Optical visualisation of thermogenesis in stimulated single-cell brown adipocytes. *Sci. Rep.* 7: 1383 (2017).



## 温度生物学ハンドブック (用語集) 公開のお知らせ

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」を公開しております。

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 (概論)
- ・ TRPV1
- ・ TRPV2
- ・ TRPV3
- ・ TRPV4
- ・ TRPM2
- ・ TRPM3
- ・ TRPM4, M5
- ・ TRPM8
- ・ TRPA1
- ・ 膜相分離
- ・ 熱ショックタンパク質 (概論)
- ・ 熱ショックタンパク質 Hikeshi
- ・ 脂肪酸不飽和化酵素
- ・ 電位依存性プロトンチャンネル
- ・ タンパク質膜挿入反応
- ・ 低温ショック蛋白質
- ・ PGC1- $\alpha$
- ・ 内因性脂質による TRPチャンネルの制御
- ・ ミトコンドリアオートファジー
- ・ Sarcosine
- ・ プロリン異性化酵素Pin1
- ・ 脱共役タンパク質

### 組織・個体レベルでの温度生物学

- ・ 自律性体温調節
- ・ 発熱
- ・ 行動性体温調節
- ・ 条件づけ場所嗜好性試験
- ・ 即時型場所嗜好性試験
- ・ 線虫における温度感知機構
- ・ 概日時計による体温の制御
- ・ 温度による概日時計の制御
- ・ 褐色脂肪組織
- ・ ベージュ脂肪細胞
- ・ 摂食と体温調節
- ・ インフラマソーム
- ・ マクロファージ
- ・ アストロサイトによる体温調節
- ・ 一次体性感覚野
- ・ 温度と痛み・しびれの関係
- ・ 皮膚での温度感知機構
- ・ 胚発生と温度依存性
- ・ 冬眠と休眠
- ・ 精子形成における温度依存性
- ・ 鳥類における 精巢の温度感受性
- ・ 昆虫の休眠と温度

### 温度生物学に関わる研究手法

- ・ 蛍光性分子温度計
- ・ 蛍光寿命イメージング顕微鏡を用いた細胞内温度測定
- ・ 蛍光性ポリマー温度センサー
- ・ 遺伝的導入が可能な 蛍光性温度センサー
- ・ 臓器局所での温度計測・温度操作
- ・ 微細加工技術による 高感度熱センサーの開発
- ・ レーザー照射による 細胞内局所加熱
- ・ 磁性ナノ粒子による 細胞内局所加温法
- ・  $\text{Ca}^{2+}$ プローブ
- ・ 人工脂質二重膜

研究の進展にあわせて随時更新いたします。温度生物学分野の理解にお役立てください。

温度生物学ハンドブック (用語集)

URL: <http://www.nips.ac.jp/thermalbio/handbook.html>

## 今後の活動予定

### **2018年1月19日(金)、20日(土) 第3回若手の会**

会場：邦和セミナープラザ

### **2018年2月10日(土)、11日(日) 第5回領域会議・公開シンポジウム**

会場：東京大学本郷キャンパス

### **2018年3月28日(水)~30日(金) 第95回日本生理学会大会にてシンポジウム**

「温度感覚の新たな情報処理メカニズム：知覚、情動、そして行動

Novel mechanisms for thermosensory processing: perception, emotion and behavior」

オーガナイザー：中村 和弘、江藤 圭

会場：サンポートホール高松、高松シンボルタワー

### **2018年5月16日(水)~18日(金) 第65回日本実験動物学会にてシンポジウム**

「温度生物学」

オーガナイザー：富永 真琴、中村 和弘

会場：富山県民会館

### **2018年9月24日(月)~26日(水) 第91回日本生化学会大会にてシンポジウム**

「モデル生物から理解する感覚受容の新規メカニズム」

オーガナイザー：富永 真琴、曾我部 隆彰

会場：国立京都国際会館

### **2019年3月28日(木)~31日(日) FAOPS2019(神戸) whole-day symposium**

「Thermal Biology: a New World of Life Science」

オーガナイザー：富永 真琴、中村 和弘、土居 雅夫

会場：神戸国際会議場



## 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

第4号のニュースレターでは、公募班の先生方の研究成果を中心に紙面を構成し、充実した内容とすることが出来ました。特に、公募班の先生方の参画により、新たな温度プローブや温度計測装置の開発、温度と免疫・神経機能、胚発生、精子形成、エピゲノム解析、カイコやバクテリアにおける温度応答システム等々、温度生物学のカバーする分野の広がりを実感して頂けるのではないかと思います。先日、本学の産学連携本部と起業コンサルタントの方とお話する機会がありましたが、ニュースレターをお見せしたところ宝の山だと仰って喜んで持ち帰って行かれました。先生方にコンタクトがあった場合には、よろしく願いいたします。

昨年は、パリ協定からのアメリカの脱退などもあり、地球温暖化対策の先行きも不透明になって参りました。先日、私が担当している「温度生物学概論」という大学の教養科目で、「地球温暖化と生物多様性」についてのレポートを書いてもらいました。150名程の受講生の多くは、現在進行する生物多様性の減少に危機感を抱き、対処する方策や各個人で出来ることを前向きに語っていました。一方、予想外だったことは、少なからずの学生が現状をクールに捉えていることでした。彼らの言い分を要約すると、「先生が言われるように人間も多くの生物種の一つであり、他の生物と生命活動を共にしている。現在の人間活動も生物活動の一環であり、その活動により他の生物が影響を受けたとしても、新しい環境に適応した生物が出現し、人類も変化するはずである。従って、現在の人間活動を規制すべきではない」との論旨になります。この講義は、理系の学生ばかりでなく、文学・経済・法学など多くの文系学生も受講しています。講義に頷いているようでも、学生は色々なことを考えているのだと言うのが私の実感ですし、また楽しみでもあります。私は、生物種としての未来を想像し、行動することも人間活動の一環だと思いますが、温度生物学領域の先生方のお考えはいかがでしょうか？

最後になりましたが、ご多用中にも拘らず原稿を作成して頂きました研究班員の方々、表紙デザイン画を提供して頂いた中洲幸氏、誌面のデザインと構成、原稿の依頼、内容のチェックを含め細部にわたり尽力して頂いた当研究室スタッフの原・長尾・山口氏に深く感謝申し上げます。

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4号（2018年1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。