

令和元年9月2日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07470

研究課題名(和文) 古代温度センサーの復元と、ゲノム編集を用いた温度感覚の進化機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the evolutionary mechanism for thermosensory system by reconstruction of ancestral thermal sensors and genome editing

研究代表者

齋藤 茂 (Shigeru, Saito)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・助教

研究者番号：50422069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：異なる温度条件の環境に適応した動物種の間では温度の感じ方「温度感覚」が異なると考えられる。本研究では近縁なツメガエル種の比較解析を通して、温度受容システムが生息地の温度環境に応じて変化してきたのかを検討した。暖かい環境と涼しい環境に生息する種の間で高温の受容に関わる温度センサーを比較したところ、その活性が暖かい環境に生息する種では著しく低下していた。温度センサーの応答特性の変化によって生息する環境に応じた温度感覚の変化が生じたと考えられる。また、温度センサーが行動応答に与える影響を検討するために、温度センサー遺伝子を破壊したツメガエル系統を作出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境の温度条件は時に生存をも左右する要因であり、生物は進化の過程で形態的および生理的な変化を遂げて多様な温度環境に適応してきた。異なる環境に適応した種の間で温度耐性を調べる研究はこれまで盛んに行われてきたが、温度感覚と環境適応との関連性に着目した分子レベルの研究はほとんど進んでいなかった。本研究では、温度感覚のセンサー分子としてはたらくタンパク質を対象にして、異なる温度環境に適応したツメガエル種の間で比較解析を行った。その結果、各種が生息する温度環境に関連して温度センサーの特性が変化してきたことが示され、温度感覚の進化的な変化が環境適応において重要な役割を担ってきたことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：During the adaptation to different thermal niches, thermosensory system must have shifted in order to fit with thermal condition of habitats. In the present study, comparative analysis was performed among closely related clawed frog species that were adapted to different thermal niches. Thermal responses of heat sensors were compared between warm-adapted and cool-adapted species (two species in each group). The results revealed that the activity of a heat sensor from warm-adapted species was lower than that of cool-adapted species, suggesting that alteration of thermal property in heat sensors likely contributed to the adaptation process to different thermal niches. In addition, in order to investigate the role of thermal sensors in behavioral responses, clawed frog strains in which genes for thermal receptors were disrupted were constructed.

研究分野：進化生理学

キーワード：温度センサー 温度適応 ツメガエル 温度感受性TRPチャネル 祖先タンパク質 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

動物が多様な温度環境に適応する進化の過程では、新規の温度条件に耐えるための生理機構の発達とともに、温度感覚もまた変化してきたと考えられる。例えば、冷涼環境に生息する種がより高い温度条件の生息地に適応する過程では、それまでは「あつい」と感じていた温度を「快適」と感じるようになる必要がある。温度受容の初期過程で働く温度センサー分子は、動物と外部環境を直接的に結び付ける機能分子であり、その特性の変化は温度感覚の進化的な変化に繋がると想定される。しかし、温度センサーの進化的な変化と環境適応との関連性を調べた研究はほとんど行われてこなかった。

ネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) は西アフリカの低地に生息しており熱帯の暖かい環境に適応している。一方で、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) はアフリカの中央から南部の高地を中心に生息し、前者より涼しい環境に適応している。研究代表者らはこれら2種の比較解析を行い、行動、感覚神経、および温度センサー分子において2種の間で種間差が生じていることを見出し、温度受容システムが生息環境に応じて変化してきたことを見出した。一方で、2種のみでの比較であったために、温度センサーの詳細な進化過程は未解明であった。また、ツメガエルにおいて研究対象の温度センサーが個体の行動応答に実際に貢献しているのかも検討が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 複数の近縁なツメガエル種を比較して温度センサーの機能的な進化過程を実証的に解明し、温度センサーの温度応答特性と環境適応との関連性をより詳細に検討すること、(2) 温度センサーがツメガエルの行動応答に実際に貢献しているのかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 高温の受容に関わる温度センサーである TRPV1 および TRPA1 に着目して、異なる温度環境に適応した4種の近縁なツメガエルの間で比較解析を行った。そのため、先行研究で比較した2種に加えて、*Xenopus borealis* と *Xenopus muelleri* を解析に加えた。*X. borealis* と *X. laevis* は涼しい環境に、*X. muelleri* と *X. tropicalis* は暖かい環境に適応していると考えられる。これらの4種の高温センサーを電気生理学的な手法を用いて比較することにより、生息する温度ニッチに対応した種間差が生じているかを検討した。
- (2) 温度センサーの機能的な進化過程を実証的に推定するために、分子進化的および分子生物学的な手法により、祖先の温度センサーを再構築して機能解析を行った。
- (3) TRPV1 および TRPA1 が個体の行動応答を変化し得るのかを検討するために、ゲノム編集技術によりそれぞれの遺伝子が破壊されたネッタイツメガエルを作出して、行動解析を行った。

4. 研究成果

TRPV1 を *Xenopus borealis* と *Xenopus muelleri* から、また、外群として *Xenopus* 属と近縁な *Hymenochirus* 属の種から新たに単離した。研究代表者らの先行研究により、*X. tropicalis* の TRPV1 は繰り返しの熱刺激に対して反応が徐々に大きくなる感作型であるのに対して、*X. laevis* の TRPV1 は一回目の熱刺激によってほぼ最大の反応を示し、2回目以降は徐々に小さくなる脱感作型であることが分かっている。新規に単離した3種のツメガエルの TRPV1 の機能解析を行ったところ、脱感作型の応答特性を持つことが分かった (図1)。次に、機能的な進化過程を実証的に検討するために、TRPV1 の祖先型の塩基配列を分子進化的な手法で推定し、人工遺伝子合成により再構築し、祖先 TRPV1 の機能解析を行った。3種類の祖先 TRPV1 の機能を調べたところ、どれも脱感作型の温度応答特性を示したことから、TRPV1 の繰り返し熱刺激に対する応答特性は *Xenopus* 属の共通祖先では脱感作型であったが、暖かい環境に生息するネッタイツメガエルにいたる進化系統で特異的に感作型に変化したことが明らかとなった (図1)。一方で前述の通り、暖かい環境に生息する *X. muelleri* の TRPV1 は涼しい環境に生息する *X. laevis* や *X. borealis* の TRPV1 と類似した脱感作型であった。その

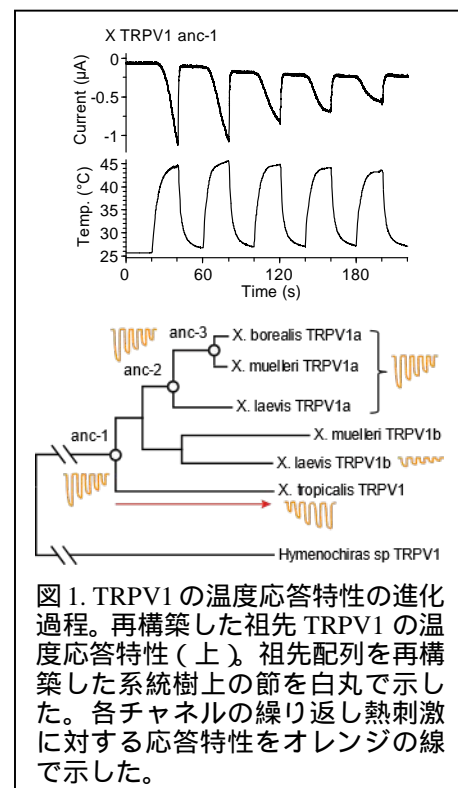


図1. TRPV1 の温度応答特性の進化過程。再構築した祖先 TRPV1 の温度応答特性 (上)。祖先配列を再構築した系統樹上の節を白丸で示した。各チャネルの繰り返し熱刺激に対する応答特性をオレンジの線で示した。

ため、*X. tropicalis* の系統で生じた TRPV1 の機能変化が温度適応と関連しているのかどうかを明確に結論付けることはできなかった。

次に、TRPA1 についても *Xenopus* 属の 4 種間で比較した。TRPA1 の温度感受性（活性化温度閾値）を比較したところ、*X. tropicalis* の TRPA1 は他の 3 種に比べて有意に高かった。一方で、暖かい環境に生息する *X. muelleri* の TRPA1 の活性化温度閾値は 4 種の中で最も低く、温度感受性については生息環境の温度条件と一致するような種差は見いだせなかった。ところが、温度刺激に対する活性は *X. borealis* と *X. laevis* の TRPA1 では *X. muelleri* と *X. tropicalis* のものに比べて有意に高くなっていった。すなわち、涼しい環境に生息する種の TRPA1 ほうが暖かい環境に生息する種のものより高温刺激に対してより大きな応答を示すことが明らかとなり、生息する環境の温度条件に合わせた機能変化が TRPA1 に生じていることが示された（図 2）。

それでは、高温センサーの機能特性の変化は実際に行動応答を変化させるのだろうか？そのような疑問を解決するために、ネッタイツメガエルを用いて TRPV1 や TRPA1 の遺伝子破壊システムを作出し、行動解析を行うことを目指した。CRISPR/Cas9 システムを用いて、TRPV1 または TRPA1 のコード領域の塩基配列に挿入または欠失を生じさせて、機能的な蛋白質を生成できないシステムを作出した。TRPA1 の遺伝子破壊個体に対してアゴニストであるシンナムアルデヒドを作用させたところ、野生型に比べて明瞭に行動応答が減弱していたことから、TRPA1 が実際に機能していないことが確認できた。温度刺激に対する応答については予備的な実験を行っているものの、まだ十分な成果が得られていない状況である。また、TRPV1 についても遺伝子破壊システムの作出が完了したところであり、今後、行動解析を進めていく予定である。ネッタイツメガエルの遺伝子破壊システムの作出については飼育条件が最適でなかったために研究開始当初の予想よりも時間を要してしまい、温度応答行動の行動解析を研究期間内に完了することができなかった。今後、行動解析を進め、TRPV1 および TRPA1 が温度応答行動に与える影響を検討していく予定である。

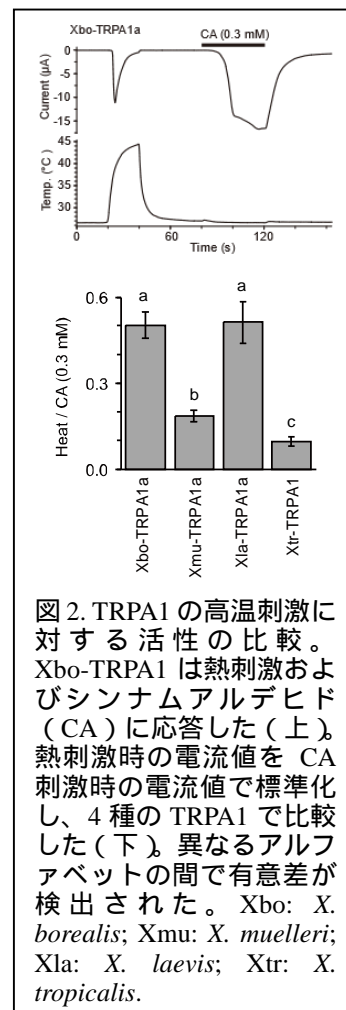


図 2. TRPA1 の高温刺激に対する活性の比較。Xbo-TRPA1 は熱刺激およびシンナムアルデヒド (CA) に応答した (上)。熱刺激時の電流値を CA 刺激時の電流値で標準化し、4 種の TRPA1 で比較した (下)。異なるアルファベットの間で有意差が検出された。Xbo: *X. borealis*; Xmu: *X. muelleri*; Xla: *X. laevis*; Xtr: *X. tropicalis*.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Shigeru Saito, Claire T. Saito, Masafumi Nozawa, and Makoto Tominaga

「Elucidating the functional evolution of heat sensors among *Xenopus* species adapted to different thermal niches by ancestral sequence reconstruction」

Molecular Ecology 掲載の予定 査読有り (2019 年 6 月 13 日に受理された)

齋藤 茂、富永真琴「温度センサーTRP チャネルの生息環境に応じた機能進化とその構造基盤」

生物物理 Vol.59(1):005-008 (2019) 査読有り DOI: <https://doi.org/10.2142/biophys.59.005>

Shigeru Saito and Makoto Tominaga.

「Evolutionary tuning of TRPA1 and TRPV1 thermal and chemical sensitivity in vertebrates」

Temperature 4:141-152 (2017) 査読有り

DOI: 10.1080/23328940.2017.1315478. eCollection 2017

Shigeru Saito, Masashi Ohkita, Claire T. Saito, Kenji Takahashi, Makoto Tominaga and Toshio Ohta
「Evolution of Heat Sensors Drove Shifts in Thermosensation between *Xenopus* Species Adapted to Different Thermal Niches」

The Journal of Biological Chemistry. 291:11446-11459 (2016) 査読有り

DOI: 10.1074/jbc.M115.702498. Epub 2016 Mar 28.

〔学会発表〕(計 10 件)

齋藤 茂 「温度感覚の種間多様性とその分子基盤の解明」
日本動物学会 第 88 回富山大会 (2017 年) 奨励賞 受賞講演

齋藤 茂、齋藤くれあ、太田利男、富永真琴 「生息環境に応じた温度感覚の進化：分子から生態までの統合的理解を目指して」
日本進化学会 第 19 回大会 (2017 年) シンポジウムにて口頭発表

Shigeru Saito, Claire T. Saito, Toshio Ohta, and Makoto Tominaga
「Evolutionary changes in thermoTRP channels contributed to species diversity in thermal nociception in vertebrates」,
Joint meeting for the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan (2016 年) シンポジウムにて口頭発表

齋藤 茂、齋藤くれあ、太田利男、富永真琴
「祖先配列の再構築によるツメガエル高温センサーの機能進化過程の推定」
日本進化学会第 18 回大会 (2016 年) 口頭発表

Shigeru Saito, Claire T. Saito, Toshio Ohta, Makoto Tominaga
「Evolutionary trajectory of a heat sensor TRPV1 in clawed frogs inferred from multispecies comparison and ancestral protein reconstruction」
SMBE 2016 – Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (2016 年)
ポスター発表

〔その他〕

ホームページ等

(ア) NIPS Research 「棲む環境に応じて温度感覚は進化する」
http://www.nips.ac.jp/nips_research/2016/06/post_133.html

(イ) 齋藤 茂 「温度受容システムの進化的な変化と環境適応」
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)」
Newsletter No.5: 48-50 (2018),
http://www.nips.ac.jp/thermalbio/newsletter/newsletter_No5a.pdf

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。