

機関番号：82648

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20770191

研究課題名(和文) 恒温動物の体温調節機構の進化：温度感覚と非震え熱産生機構に関する遺伝子の比較解析

研究課題名(英文) Evolution of the body temperature regulation mechanisms in homeothermic animals: Comparative analysis of the genes related to thermoperception and nonshivering thermogenesis

研究代表者

齋藤 茂 (SAITO SHIGERU)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特別協力研究員

研究者番号：50422069

研究成果の概要(和文)：1) 寒冷環境で有胎盤哺乳類が体温を維持する機構である非震え熱産生に関わる脱共役タンパク質 1(UCP1)および $\beta$ アドレナリン受容体の進化過程を調べた。これらの遺伝子の進化的な起源は、有胎盤哺乳類の出現よりずっと早い時期であること、また、変温動物であるニツメガエルでは UCP1 が発現する組織が有胎盤哺乳類とは異なることを明らかにした。2) 哺乳類では温かい温度の受容体である TRPV3 はニツメガエルでは冷たい温度の受容体であることが分かり、温度感受性が脊椎動物の進化過程で変化したことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：1) Placental mammals maintain body temperature by nonshivering thermogenesis in cold environments, and uncoupling protein 1 (UCP1) and  $\beta$ 3 adrenoceptor play crucial roles. Investigating the evolutionary process of these two genes revealed that the evolutionary origins were much earlier than the emergence of placental mammals. In addition, the tissue distribution of UCP1 in western clawed frog (ectotherm) was different from that of placental mammals. 2) TRPV3, which serves as a warm temperature receptor in mammals, was cloned from western clawed frog and its property was examined. TRPV3 of western clawed frog perceives cold temperature, suggesting that temperature sensitivities of TRPV3 have changed in the course of vertebrate evolution.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子進化、進化生理、細胞生理

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：温度受容体 TRPV3、ニツメガエル *Xenopus tropicalis*、非震え熱産生、脱共役タンパク質 1、 $\beta$ 3 アドレナリン受容体、哺乳類、機能進化、適応進化

## 1. 研究開始当初の背景

現生の恒温動物は幅広い温度条件下で厳密に体温を調節し、地球上の様々な地域に適応している。体温調節機構の改良や、新たな体温調節機構の獲得は多様な温度環境への適

応に貢献してきたと予想される。しかし、体温調節機構がどのような遺伝的变化により進化してきたかはあまり分かっていなかった。

寒冷環境下で体温を維持する機構である非震え熱産生は哺乳類において研究が進み、

重要な働きをする遺伝子が同定されてきた。研究代表者は、非震え熱産生の産熱に中心的な役割を果たす脱共役タンパク質 1 (UCP1) 遺伝子が脊椎動物の祖先種に既に生じていたが、その後、有胎盤哺乳類の祖先において適応進化により多くのアミノ酸の変化が生じたことを明らかにした。しかし、非震え熱産生に関わる他の遺伝子の進化過程はほとんど明らかになっていなかった。また、体温調節には体温や外界の温度を感知することが必要であるが、温度受容体遺伝子については、哺乳類以外の脊椎動物の情報は少なく、これらの遺伝子の進化過程もあまり分かっていなかった。

近年、脊椎動物のゲノム配列が決定され、多くの種から着目する遺伝子を収集し分子進化学的手法により遺伝子の進化過程を推定することができるようになった。一方、遺伝子の機能の進化を解明するためには配列情報の比較のみでは難しく複数の生物種の遺伝子の機能解析を行い比較する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、非震え熱産生と温度感覚の2つの異なる機構に着目し、中心的な役割を担う複数の遺伝子の分子進化および機能の進化を調べ、恒温動物における体温調節機構の進化過程を解明することである。

(1) 非震え熱産生機構において寒冷刺激のシグナル伝達に関わる  $\beta 3$  アドレナリン受容体遺伝子が獲得された時期および分子進化を明らかにする。

(2) UCP1 は非震え熱産生の発熱器官である褐色脂肪にのみ発現し、寒冷条件において発現量が上昇する。一方、変温動物のコイ(魚類)では肝臓、腎臓、腸、および、脳で転写され、寒冷条件下で脳において発現量が上昇することが知られている。

脊椎動物における UCP1 の機能的な変化を解明するために本研究では両生類であるニシツメガエルに着目し、UCP1 の組織分布および低温条件下における発現量の変化を明らかにする。

(3) 哺乳類において TRPV3 は体温付近の暖かい温度受容体であり、体温調節にも重要な役割を持つと考えられる。しかし、TRPV3 が脊椎動物の進化過程のどの時期に温度感受性を獲得したのか、また、種間で受容する温度域が異なるのかどうかは分かっていなかった。そこで、TRPV3 の機能の進化過程を調べるために両生類であるニシツメガエルの TRPV3 の機能解析を行い、哺乳類の TRPV3 と比較する。

## 3. 研究の方法

(1)  $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$  アドレナリン受容体遺伝子を様々な脊椎動物のゲノム配列データベースから収集し、分子系統樹を作成した。遺伝子重複の時期を決定し、遺伝子が生成された時期を推定した。また、系統樹の各枝の進化速度を推定した。

(2) ニシツメガエルの各組織から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により、mRNA が転写される組織を調べた。更に、ニシツメガエルにとって適温条件下(27°C)、または低温条件下(20°C)で飼育した個体における UCP1 の mRNA 量の変化を半定量的 RT-PCR 法により決定した。

(3) ニシツメガエルから TRPV3 遺伝子を単離して、発現ベクターにクローニングした。TRPV3 のチャネル特性を調べるために、アフリカツメガエル卵母細胞にニシツメガエル TRPV3 を強制発現させて、2 電極膜電位固定法にてイオン電流の測定を行い、各種の刺激に対する応答を調べた。また、ニシツメガエル TRPV3 の mRNA が転写される組織を RT-PCR 法により決定した。

## 4. 研究成果

(1)  $\beta 3$  アドレナリン受容体遺伝子は脊椎動物の祖先種には既に存在し、哺乳類の出現よりずっと古い時期に生じたことが示された。また、アミノ酸置換の進化速度が哺乳類の祖先種において加速したことからこの時期に機能的な制約が変化した可能性が示された。これまでの研究で、UCP1 遺伝子でも同様の結果が得られており、非震え熱産生機構が獲得される際に既存の遺伝子が利用され重要な役割を担うようになったことが明らかとなった。

(2) ニシツメガエルの UCP1 は腎臓、胃腸、生殖巣、脂肪および、脳で転写されることを明らかにした。また、UCP1 の mRNA 量が脳において低温条件下で上昇することが分かった。一方、脂肪では低温条件下で発現量は変化しなかった。

つまり、変温動物であるニシツメガエルとコイでは UCP1 の発現する組織の種類、および、低温条件下での発現量が変化する組織が類似していた。有袋類において、脂肪組織の一部に UCP1 が発現し、寒冷条件により発現量が上昇することが報告されている。

これらのことを考え合わせると、UCP1 遺伝子は脊椎動物の祖先種に出現し、元々は複数の組織において発熱以外の何らかの機能を持っていたが、哺乳類の祖先種で褐色脂肪特異的な発現を獲得し、その後、アミノ酸配列を大きく変化させ非震え熱産生に重要な役

割を果たすようになったと考えられる。

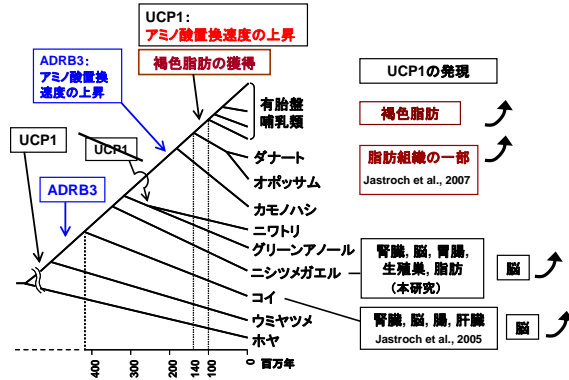


図1 有胎盤哺乳類の非震え熱産生に関わるUCP1 および $\beta 3$  アドレナリン受容体(ADRB3) 遺伝子の進化過程。進化的なイベントが生じた時期を系統樹上に矢印で示した。本研究や既知の研究より報告された UCP1 遺伝子の発現組織および寒冷条件下での発現量の変動を系統樹の右側に示した。有袋類(オポッサム、ダナート)では脂肪組織の一部にUCP1 が発現し、寒冷条件により発現量が上昇することが報告されている。一方、コイ、ニシツメガエルでは UCP1 は低温条件において脳で発現量が上昇する。

(3)ニシツメガエル TRPV3 のアミノ酸配列を他の脊椎動物のものと比較したところ、中央領域の保存性は比較的高かったが、一方、両端の領域はニシツメガエル TRPV3 は著しく異なっていることが分かった。

化学物質に対する感受性を検討するために、哺乳類の TRPV3 を活性化させるカンフル、ユーカリプトール、および、2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) をニシツメガエル TRPV3 に作用させた。その結果、2-APB でのみ活性化され、化学物質に対する感受性が哺乳類とニシツメガエルの TRPV3 では異なることが分かった。

次に、哺乳類の TRPV3 は 33 度以上の暖かい温度で活性化されることが報告されているため温度刺激に対する応答を検討した。その結果、ニシツメガエル TRPV3 は暖かい温度では活性化されなかったが、一方、16~18°C 以下の冷たい温度で活性化されることが分かった。18~20°C 以下の温度域はニシツメガエルにとって有害であること、また、皮膚に発現していることから TRPV3 はニシツメガエルでは侵害性の低温の受容体であると考えられる。

これらの結果は、TRPV3 は陸上脊椎動物の祖先種で既に温度受容体としての機能を獲得していたが、活性化温度域がニシツメガエルと哺乳類の系統でそれぞれの生物の特性に適合するように進化してきたことを示している。

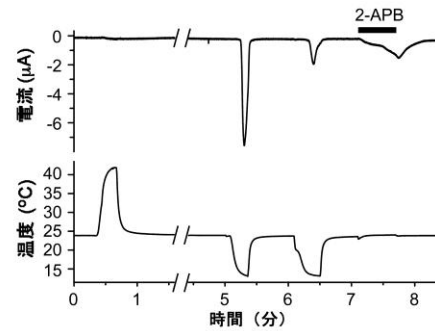


図2 ニシツメガエル TRPV3 の温度変化に対する電流応答。上は、ニシツメガエル TRPV3 を強制発現させたアフリカツメガエル卵母細胞に生じたイオン電流、下は作用させた温度を示している。ニシツメガエルの TRPV3 は温度を高温側に変化させても反応しないが、低温側に変化させたときに反応した。

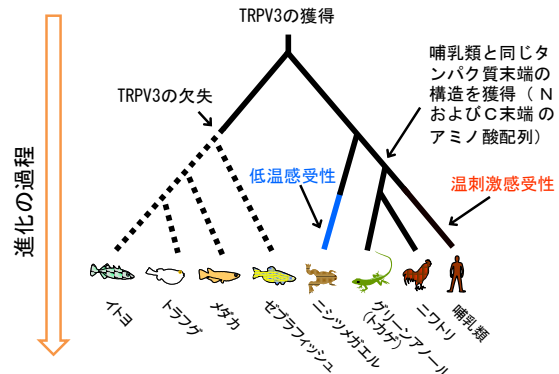


図3 温度センサーTRPV3 は脊椎動物の祖先には備わっていた。しかし、その後魚類では失われ、一方、陸上脊椎動物では維持されてきた。進化の過程で TRPV3 の温度感受性が哺乳類とニシツメガエルの生理的な特性に適合するように変化した。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Shigeru Saito, Naomi Fukuta, Ryuzo Shingai, and Makoto Tominaga, 「Evolution of Vertebrate Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Channels: Opposite Temperature Sensitivity between Mammals and Western Clawed Frogs」, PLoS Genetics 査読有, Vol 7, 2011, e1002041

- ② 稲葉(伊東)靖子、齋藤茂、「熱産生における脱共役タンパク質の役割と適応進化」、化学と生物、査読無、2008、46巻、841-849

[学会発表] (計 14 件)

- ① 齋藤 茂、「温度受容体 Transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3) イオンチャネルの機能 進化：哺乳類とニシツメガエル (*Xenopus tropicalis*) における逆向きの温度感受性」、日本遺伝学会第 82 回大会、2010 年 9 月 22 日、北海道大学、札幌市、北海道
- ② Shigeru Saito, 「Evolution of the temperature sensor TRPV3 channel: shift in the temperature sensitivity between mammals and western clawed frog」, SBE 2010 - Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution, 2010 年 7 月 5 日, Lyon Convention Center, Lyon, France
- ③ Shigeru Saito, 「Evolution of the Uncoupling Protein 1」, The 3rd International Symposium on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation 2009, 2009 年 7 月 26 日, 島根県立産業交流会館、松江市、島根県
- ④ 齋藤 茂、「哺乳類の非震え熱産生機構に関する遺伝子の起源と進化：脊椎動物の  $\beta$  アドレナリン受容体遺伝子の比較」、日本遺伝学会第 80 回大会、2008 年 9 月 4 日、名古屋大学、名古屋
- ⑤ Shigeru Saito, 「Adaptive evolution of the sensory receptor TRPV genes in amphibians」, 2008 Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution, 2008 年 6 月 5 日, Palau de Congressos de Barcelona, バルセロナ、スペイン

[図書] (計 1 件)

- ① 齋藤 茂、新貝鉦蔵、「温度と生命システムの相関学、第 4 章 動物における温度センサーの進化」、東海大学出版会、2009、72-87

[その他]

ホームページ等

[http://www.geocities.jp/saito\\_research/Research\\_Home.html](http://www.geocities.jp/saito_research/Research_Home.html)

<http://www.nips.ac.jp/contents/release/entry/2011/04/-trp.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 茂 (SAITO SHIGERU)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・特別協力研究員

研究者番号：50422069