

平成23年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

研究テーマ名称	温度感受性の進化生物学
応募事業区分	「公募型共同研究」
申請代表者氏名	先導科学研究科・生命共生体進化学専攻 教授 颯田葉子

○ 研究状況報告

本年度は研究会を一回開催した。昨年10月28日に葉山で行った。班員のほとんど全員が参加して進捗よく状況の報告および、情報交換をおこなった。

日時:10月28日(金)午後2:00~5:00

場所:総合研究大学院大学 葉山キャンパス 共通棟101,102 セミナー室

14:00 ~ 14:05	颯田葉子	開会あいさつ
14:05 ~ 14:25	猿倉信彦	「新波長領域での光計測」
14:25 ~ 14:45	富永真琴	「温度感受性 TRP チャネルの進化」
14:45 ~ 15:05	渡辺正勝	「微生物の温度走性の展望」
15:05 ~ 15:30	休憩	
15:30 ~ 15:50	清本正人	「館山のウニ類について」
15:50 ~ 16:10	松永 茂	「夏場に繁殖するウニ胚の温度勾配容器内での走性の観測」
16:10 ~ 16:30	五條堀 淳	「アメリカムラサキウニ全ゲノム塩基配列を用いた TRP 遺伝子族の探索」
16:30 ~ 17:00	全体討議	

本研究では、無脊椎動物、特に棘皮動物を用いて、行動学・生理学、分子生物学、分子進化学の各視点にたち、温度感受性という生物現象をミクロとマクロの両面から明らかにすることを目指している。平成23年度は、ウニの幼生を用いた温度走性実験を行い、温度走性を確認した。また、ウニのゲノムを用いた分子進化学的解析から広く生物(脊椎動物、昆虫)の温度感受性に関わっている TRP (Transient Receptor Protein)の相同遺伝子の候補分子を複数同定した。さらに、分子生物学的手法により、ヒトデのゲノムから、TRP 相同遺伝子の部分的配列を入手した。

今後は、ウニ幼生での温度走性実験の定量化や、ウニ・ヒトデゲノムからの、温度感受性責任遺伝子の単離、また、単離した遺伝子を用いた生理学的な実験により、感受温度領域を決定したり、あるいは行動阻害実験を行う計画である。さらに、温度に依存する行動が報告されているボルボックスやクラミドモナスを用いた、行動実験やゲノムからの温度感受性候補遺伝子の単離を試みて、「温度感受性の進化」の一端を明らかにすることを試みる。

平成23年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

○ 当該事業年度において達成された研究成果

- 1) 行動・生理実験: 新たに設計した温度走性実験装置を用い、高温域 28 度、低温域 17 度の温度勾配のあるチャンバー内でウニの幼生の温度走性実験を行ったところ、中・高温域(28〜30 度)に集まる行動を観察した。この温度依存性が膜イオンチャネルの阻害剤で阻害されるかどうかをみるために、広く膜イオンチャネルの機能を阻害する Ruthenium Red(濃度は 20 μ M 以下)の投与実験では高温側への偏りは阻害されなかった。薬物の細胞内への浸透性等に問題があるのかもしれない。
- 2) 分子生物学実験: ウニゲノムから昨年同定した TRPA 相同遺伝子の配列をもとに、ヒトゲノムでの TRPA 遺伝子の単離を試みており、ヒトゲノムから、TRP 相同遺伝子の部分配列の単離に成功した。
- 3) 分子進化学解析: ムラサキウニゲノムとヒトゲノムを用いた相補的 BLST サーチにより、ムラサキウニゲノムから TRP 遺伝子族のメンバーを網羅的に同定することを試みた。その結果、23 の TRP 相同と思われる配列を同定した。この中に構造から、TRPA と推定される、遺伝子は4つあった。しかし、これらの遺伝子は、アミノ酸の置換数をみても、平均1個以上のアミノ酸置換を蓄積している距離にあり、相同性検索の有効性に疑問が生じた。そこで、新たなアルゴリズムでの相同遺伝子の同定法を試みている。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付)

本研究と関連したこれまでの業績

Ohkita M, Saito S, Imagawa T, Takahashi K, Tominaga M, and Ohta T. Molecular cloning and functional characterization of *Xenopus tropicalis* frog transient receptor potential vanilloid 1 reveal its functional evolution for heat, acid, and capsaicin sensitivities in terrestrial vertebrates. *J Biol Chem* 287: 2388–2397 (2012).

Furukawa R, Matsumoto M, Kaneko H. Characterization of a scavenger receptor cysteine-rich-domain-containing protein of the starfish, *Asterina pectinifera*: ApSRCR1 acts as an opsonin in the larval and adult innate immune systems. *Dev Comp Immunol* 36:51–61 (2012).

Saito S, Fukuta N, Shingai R, Tominaga M. Evolution of Vertebrate Transient Receptor Potential Vanilloid 3 Channels: Opposite Temperature Sensitivity between Mammals and Western Clawed Frogs. *PLoS Genet* 7 : e1002041 (2011).

Matsunaga S, Uchida H, Iseki, M, Watanabe M, Murakami A. Flagellar motions in phototactic steering in a brown algal swarmer. *Photochem. Photobiol* 86: 374–381 (2010).

Ueki N, Matsunaga S, Inouye I, Hallmann A. How 5000 independent rowers coordinate their strokes in order to row into the sunlight: Phototaxis in the multicellular green alga *Volvox*. *BMC Biol* 8: 103–123 (2010).

(様式3)

平成24年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

研究テーマ名称	温度感受性の進化生物学
応募事業区分	「公募型共同研究」
申請代表者氏名	颯田 葉子

- 研究状況報告
- 本年度は研究会を二回開催した。2012年7月27日、および2013年1月28日に葉山で行った。班員のほとんど全員が参加して進ちょく状況の報告および、情報交換をおこなった。

<第1回班会議>

日時:7月27日(金)午後1時45分～5時30分

場所:総合研究大学院大学 葉山キャンパス 学融合センター 2階会議室

- 13:45～14:00 颯田 葉子 開会あいさつ
- 14:00～14:30 富永 真琴 「脊椎動物の温度感受性TRPチャネルの進化」
- 14:30～15:00 団 まりな 「棘皮動物幼生の温度走性について」
- 15:00～15:30 渡邊 正勝 「微細藻類運動で見る温度感受性」
- 15:30～15:50 休憩
- 15:50～16:20 金子 洋之 「イトマキヒトデ胚のTRP1遺伝子の単離と構造解析」
- 16:20～16:50 五條堀 淳 「無脊椎動物の配列情報を使ったTRP遺伝子の探索」
- 16:50～17:30 全体討議

<第2回班会議>

日時:1月28日(金)午後1:30～5:50

場所:総合研究大学院大学 葉山キャンパス 学融合センター

- 13:30 ～ 13:40 開会あいさつ
- 13:40 ～ 14:20 中里智治 「赤外領域における光学素子開発に向けた半導体材料探索」
(猿倉)
- 14:20 ～ 15:00 渡辺正勝 「微細藻類の温度センシング行動と繊毛・鞭毛運動」
- 15:00 ～ 15:40 団まりな 「ヒトデ幼生の温度走性」
- 15:40 ～ 15:50 休憩
- 15:50 ～ 16:30 金子洋之 「イトマキヒトデ発生における TRP1遺伝子ノックダウンの影響」
- 16:30 ～ 17:10 五條堀淳 「TRP 遺伝子族の配列進化」
- 17:10 ～ 17:50 全体討議

(様式 3)

平成 24 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

- 本研究では、無脊椎動物、特に棘皮動物を用いて、行動学・生理学、分子生物学、分子進化学の各視点にたち、温度感受性という生物現象をミクロとマクロの両面から明らかにすることを目指している。平成24年度は、ウニとヒトデの幼生を用いた温度走性実験を行い、温度走性を確認した。また、ヒトデの cDNA から、TRP (Transient Receptor Protein) A に相同な配列の単離に成功した。さらに、モルフォリノオリゴを用いて、イトマキヒトデの発生段階で TRP1 遺伝子のノックダウンの影響を調べた。他に、ウニ、ヤボルボックスのゲノムを用いた分子進化学的解析から広く生物(脊椎動物、昆虫)の温度感受性に関わっている TRP の相同遺伝子の候補分子を複数同定した。

- 当該事業年度において達成された研究成果
 当該期間の支援により棘皮動物の温度感受性についていくつかの知見が得られた。得られた研究成果は以下である。
 - 1) 行動観察実験:
 - ① ヒトデおよびウニの幼生の温度走性実験:スライドガラスで仕切った温度勾配を付けたチャンバーのなかで行った。チャンバーの片側にヒーターを設置し、チャンバーの中に温度勾配を作った。この温度分布は、温度計により確認した。幼生の温度走性は、実体顕微鏡を通して、CCD カメラで記録した。その結果、ヒトデおよびウニの幼生では、高温への正の温度走性が観察された。
 - ② モルフォリノオリゴを用いたイトマキヒトデ TRP1ノックダウンでは、ノックダウンをおこした個体の成長に遅延がみられた。

 - 2) 生理学的実験
 - ① ヒトデ TRP1 cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞で発現させ、イオンチャンネル電流を記録する。
 - ② この方法でヒトデ TRP1 の生理学的特性を調べると以下のことが明らかになった。
 - i ヒトデ TRPA1 は脊椎動物や昆虫の TRPA1 アゴニスト(アリルイソチオシアネート、シナモンアルデハイド等)により活性化される。
 - ii ヒトデ TRPA1 は低温刺激では活性化されないが、高温刺激により活性化される。
 - iii 熱刺激による活性は脱感作する。
 - iv ヒトデ TRPA1 の活性化温度閾値は約 36°Cである。
 - v 哺乳類 TRPA1 の選択的阻害剤(はヒトデ TRPA1 を阻害しない)。
 - ③ ヒトデ TRP1は温度閾値や、アゴニストに対する反応から、TRPA 相同遺伝子と考えられる。ただし、哺乳類 TRPA1 の選択的阻害剤の効果がない。このことに関しては、ニシアフリカツメガエルの TRPA も同様に選択的阻害剤の効果を示さないことから、

(様式 3)

平成 24 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

選択的阻害剤の効果は生物特異性が高い可能性が考えられる。

3) 分子進化学的解析:ウニ、ボルボックス、クラミドモナスのゲノム中に脊椎動物の温度受容体遺伝子 TRP の相同遺伝子が存在するかを調べた。その結果、それぞれのゲノムには、TRP 遺伝子群の各 family に対応する相同遺伝子が複数存在することが明らかになった。また系統解析から、TRPA family には、大きく分けられる。ふたつのクレードの内1つは、脊椎動物と無脊椎動物からなる TRPA1 クレードでと、無脊椎動物だけからなるクレードである。この二つのクレードの分岐は、脊椎動物と無脊椎動物の分岐より古い。

今後は、ウニ、ヒトデの幼生での温度走性をチャンバーの温度を変えて、他の生物の TRPA でみられるのと同様に高温に対する忌避行動に関与するのかどうかを調べる。またイトマキヒトデの TRP1 遺伝子ノックダウン個体についての、温度走性を詳細に調べる。他に、ボルボックスでは分子進化学的手法で TRPA の相同配列を同定し、その発現を分子生物学的手法でブロックすることによる、温度走性の変化を調べる。

今後は、以下の様な展開につなげたい。

- ① ウニ幼生の cDNA から TRPA 相同遺伝子を単離し、電気生理学的実験で、機能特性を明らかにする。
- ② ヒトデ幼生の TRPA1 遺伝子ノックダウン個体の行動(温度走性)を調べる。
- ③ ボルボックスやクラミドモナスの温度感受性にかかわる分子の単離
- ④ 以上の知見に基づき、進化の初期段階での温度感受性受容体の機能変化について議論する。

- 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付)
- Saito S, Nakatsuka K, Takahashi K, Fukuta N, Imagawa T, Ohta T, Tominaga M. Analysis of Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) in frogs and lizards illuminates both nociceptive heat and chemical sensitivities and coexpression with TRP Vanilloid 1 (TRPV1) in ancestral vertebrates. *J. Biol. Chem.* 287 (36): 30743–30754, 2012.

Furukawa R, Funabashi H, Matsumoto M, Kaneko H. Starfish ApDOCK protein essentially functions in larval defense system operated by mesenchyme cells. *Immunol Cell Biol.* 2012 Nov;90(10):955–65. doi: 10.1038/icb.2012.37.

Furukawa R, Matsumoto M, Kaneko H.Characterization of a scavenger receptor cysteine-rich-domain-containing protein of the starfish, *Asterina pectinifera*: ApSRGR1 acts as an opsonin in the larval and adult innate immune systems. *Dev Comp Immunol.* 2012 Jan;36(1):51–61. doi: 10.1016/j.dci.2011.06.005.