

(様式 3)

平成 25 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 | 温度感受システムの進化生理学 —無脊椎動物をターゲットとして— |
| 応募事業区分  | 「戦略的共同研究 I」                     |
| 申請代表者氏名 | 颯田 葉子                           |

○ 研究状況報告

本年度は研究会を一回、公開セミナーを 2013 年 12 月 9 日、および 2014 年 3 月 10 日にそれぞれ 1 回ずつ葉山で行った。班員のほとんど全員が参加して進捗状況の報告および、情報交換をおこなった。

<第 1 回班会議>

日時：2013 年 12 月 9 日 (月) 午後 1:00~5:50

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 クリエイティブルーム

|               |                            |                                   |
|---------------|----------------------------|-----------------------------------|
| 13:00 ~ 13:10 | 颯田葉子                       | 開会あいさつ                            |
| 13:10 ~ 13:50 | 渡辺正勝<br>(光産業創成大学院大学)       | 「微細藻類温度センサー分子の同定への登攀ルート」          |
| 13:50 ~ 14:30 | 団まりな<br>(階層生物学研究ラボ)        | 「ヒトデ幼生の温度走性」                      |
| 14:30 ~ 15:10 | 金子洋之<br>(慶応義塾大学)           | 「棘皮動物ヒトデの個体発生における ApTRP1 の時空間的発現」 |
| 15:10 ~ 15:40 | 休憩                         |                                   |
| 15:40 ~ 16:20 | 斎藤 茂<br>(岡崎統合バイオサイエンスセンター) | 「TRPA1 チャネルの機能的多様性および進化過程」        |
| 16:20 ~ 17:00 | 五條堀淳                       | 「無脊椎動物の TRP 候補遺伝子の検証」             |
| 17:00 ~ 17:50 | 全体討議                       |                                   |

<公開セミナー>

日時：2014 年 3 月 10 日 (月) 午後 1:30~17:20

場所：総合研究大学院大学 葉山キャンパス 共通棟 1 階セミナー室 101・102

|               |                  |                                   |
|---------------|------------------|-----------------------------------|
| 13:30 ~ 13:40 | 颯田葉子             | 開会あいさつ                            |
| 13:40 ~ 14:30 | 濱中 玄<br>井口泰泉     | 「ヒトデ幼生の温度走性」                      |
| 14:30 ~ 15:20 | (基礎生物学専攻)        | 「温度感受性と性決定」                       |
| 15:20 ~ 15:40 | 休憩               |                                   |
| 15:40 ~ 16:30 | 寺北昭久<br>(大阪市立大学) | 「光受容タンパク質の多様性と機能：分子特性の解析から分かったこと」 |
| 16:30 ~ 17:20 | 富永真琴<br>(生理科学専攻) | 「様々な生物の温度受容体とその生理学的意義」            |

(様式 3)

## 平成 25 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

## ○ 当該事業年度において達成された研究成果・今後の展望等

## ① ウニ、およびヒトデの幼生の温度走性の行動実験について。

イトマキヒトデ幼生の様々な発生段階における温度走性を解析した。その結果、受精 48 時間の初期ビピンナリア幼生以降の発生段階では、どの幼生も高温域へ走化性を示したが、原腸胚期から初期ビピンナリア幼生期では、走性を示さなかった。このことは、ビピンナリア幼生期から発達し始める神経細胞のネットワーク形成とリンクしている可能性が示唆された。興味深いことに、受精膜から孵化直後の胞胚では、神経細胞がまだ出現していないにも関わらず、高温域へと走性を示した。このことから、胞胚ではビピンナリア幼生とは異なるメカニズムで温度を感知している可能性が示唆された。

また、薬剤 (allylthiocyanate) を用いたヒトデ TRPA-1 タンパク質の機能解析実験では、薬剤処理によりヒトデ幼生は高温域への走化性を示さなかった。今後は、TRPA-1 タンパク質がどのように温度走性に関与しているのか、他の薬剤や翻訳阻害実験を通して解析する。

## ② ヒトデ幼生温度感受性の分子生物学的解析について

モルフォリノオリゴを用いたイトマキヒトデ卵に対する熱感受性遺伝子 (*ApTRP1*) ノックダウン実験から、*ApTRP1* は胚発生の進行速度や幼生過程での外胚葉成長に関与することを示唆できていた。今年度、このような表現型をより深く理解し、他のグループが進めている熱感受性行動の研究データと繋げるために、イトマキヒトデ個体発生における *ApTRP1* 遺伝子の発現様式を解析した。2 種のアンチセンスプローブ (それぞれ 5'、3' 側から約 2300 塩基、約 2500 塩基) を用いた *in situ hybridization* 法下で、そのシグナルは弱いながらも、*ApTRP1* 遺伝子は原腸胚期には胚体全体、幼生期では主に外胚葉に発現していた。これらの結果は、*ApTRP1* 遺伝子が神経細胞のような特定の細胞に発現するという予想とは異なったが、ノックダウン実験の表現型のみならず、初期原腸胚でも熱感受性を示すという行動データと相関している。今後、*ApTRP1* の遺伝子発現がタンパク質翻訳として完遂しているか確認する予定である。

## ③ 温度感受性受容体の電気生理学的解析について

本年度は、イトマキヒトデの TRPA1 チャンネルの機能を電気生理学的な実験法により解析した。イトマキヒトデ TRPA1 は刺激性化学物質および高温の刺激により活性化され、脊椎動物や昆虫の TRPA1 と類似した特性を持つことが分かった。イトマキヒトデを含む棘皮動物門は昆虫および脊椎動物とは系統的に離れていることから、TRPA1 の機能が動物の初期の進化過程で獲得され、その後も幅広い動物種間で維持されてきたと考えられる。

## ④ 温度感受性受容体の分子進化学的解析について

これまでに無脊椎動物のゲノムに含まれる TRP 遺伝子の数を推定する事を目的とし、アメリカムラサキウニ (*S. purpuratus*) とヒトデ (*P. miniata*) の全ゲノム塩基配列情報を対象とし、アミノ酸配列のモチーフ検索を用いて探索を行っていた。今年度は更に対象をボルボックス (*V. carteri*) とクラミドモナス (*C. reinhardtii*) に対象をひろげ、同様のモチーフ検索で、これらのゲノムに含まれる TRP 遺伝子の数の推定を行った。また脊椎動物の TRP 遺伝子も含めた遺伝子系統樹の推定を行い、それぞれの 4 種の全ゲノムから推定された TRP 遺伝子がどの TRP サブファミリーに属するかを調べた。その結果、脊椎動物における温度感受性を担う TRP 遺伝子とそうでない TRP 遺伝子の分化は脊椎動物の分岐後におこった可能性が示され、無脊椎動物でも同様に系統特異的に温度感受

(様式 3)

平成 25 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

性を担う TRP 遺伝子の分化があったものと推測された。

⑤ ボルボックス・クラミドモナスの温度依存性走光性について

ボルボックス・クラミドモナスの温度について、ウニ・ヒトデの幼生の走性実験に用いたものと同じ装置を使って、温度走性があるかどうかを調べるため、ウニ・ヒトデの幼生の温度走性実験を主に行っていた団まりな氏と共同研究を実施する予定であったが実験を担当する渡邊正勝氏が急逝されたため、本実験は遂行されなかった。

○ 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)

関連する論文を記載します。

Shigeru Saito, Nagako Banzawa, Naomi Fukuta, Claire T. Saito, Kenji Takahashi, Toshiaki Imagawa, Toshio Ohta, and Makoto Tominaga  
「Heat and noxious chemical sensor, chicken TRPA1, as a target of bird repellents and identification of its structural determinants by multispecies functional comparison」  
Molecular Biology and Evolution (2014) 31(3):708-722

Erkin Kurganov, Yiming Zhou, Shigeru Saito, and Makoto Tominaga,  
「Heat and AITC Activate Green Anole TRPA1 in a Membrane-Delimited Manner」,  
Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, , 2014 年 1 月 3 日に先行出版

Kazumasa Nakatsuka, Rupali Gupta, Shigeru Saito, Nagako Banzawa, Kenji Takahashi, Makoto Tominaga, and Toshio Ohta,  
「Identification of Molecular Determinants for a Potent Mammalian TRPA1 Antagonist by Utilizing Species Differences」,  
Journal of Molecular Neuroscience (2013)51:754-762