脊椎動物の温度感受性 transient receptor potential (TRP) チャネルの多様性と機能進化

齋藤 茂*

動物は環境温度を正確に感知して行動や生理的な応答により順応している。そのため温度感覚は適応進化においても重要な役割を担ってきたと考えられる。温度受容体は transient receptor potential (TRP) 遺伝子ファミリーに含まれる温度感受性チャネルである。進化過程で温度感受性 TRP チャネルに生じた変化は温度感覚に直接的な影響を与えるため、これらの遺伝子の進化過程を調べることは適応的な役割を解明する上で欠かせない。筆者らは、温度感受性 TRP チャネル遺伝子を複数の脊椎動物種のゲノム配列データから収集し、分子系統解析を行い遺伝子レパートリーの多様性およびその進化過程を明らかにしてきた。また、機能の進化過程を推定するために、哺乳類から系統的に離れた両生類であるニシツメガエルから TRPV3 をクローニングし電気生理学的手法による機能解析を行った。ニシツメガエル TRPV3 は温度感受性が哺乳類のものとは大きく異なり、進化過程でその機能を柔軟に変化させてきたことを明らかにした。本稿では、脊椎動物の温度感受性 TRP チャネルの遺伝子と機能の進化について最近の知見を紹介する。

1. はじめに

動物が曝される環境温度は一日の中でも変化し、また季節によっても大きく異なる。同じ時間であっても日光が当たる場所と日陰のように環境温度が大きく異なる場合もある。動物は環境温度の変化を体表を通して感知し行動や生理的な応答により順応している。脊椎動物では温度などの刺激は体中に分布する感覚神経により受容され脊髄を通して脳に情報が伝えられる。感覚神経の細胞体は脊髄近傍の後根神経節や三叉神経節に存在し、この神経に発現する温度感受性チャネルが温度受容体として働いている^{1, 4, 27, 37)}。このチャネルの分子実体は長い間分かっていなかったが、1997年にラットで最初の温度受容体が同定され、transient receptor potential (TRP) と呼ばれる遺伝子ファミリーに属するイオンチャネルであることが明らかとなった³⁾。TRP チャネルはキイロショウジョウバエで光受容に異常がある変異株の原因遺伝子として最初に同定され、この変異株の光刺激に対する光受容器電位が一過的であったことが名前の由来である。後に多くの遺伝子を含む遺伝子ファミリーを形成することが明らかとなった。最初の温度感受性 TRP チャネルが同定されて以来、アミノ酸配列の類似性などを基に複数の温度感受性 TRP チャネルが単離され、現在、ヒトやげっ歯類では9種類が同定されている^{1, 4, 27, 37)}。それぞ

れの温度感受性 TRP チャネルは異なる活性化温度域を持っており、これらの組み合わせにより哺乳類は幅広い温度を正確に感知することができる。温度感受性 TRP チャネルは温度だけでなく、他の物理的な刺激や様々な化学物質によっても活性化され多様な感覚刺激の受容体としても機能している^{1, 4, 27, 37)}。複数の温度受容体が同じ遺伝子ファミリーに含まれることは、温度受容体が遺伝子重複によりその数を増やし、活性化温度域を変化させることにより多様な温度受容体を生み出してきたことを意味している。また、昆虫であるショウジョウバエにおいても複数の TRP チャネルが温度受容体として機能している^{19, 30, 34, 39)}。しかし、ショウジョウバエは哺乳類とは異なる種類の TRP チャネル遺伝子を温度受容体として用いていることが分子系統解析により示されており¹³⁾、温度受容体は進化過程で種類や機能を柔軟に変化させてきたことが分かっている。温度受容体レパートリーの動物種間の差異は、全部とは言わないまでも一部は、それぞれの動物種の環境適応の結果であるだろう。筆者は、温度感受性 TRP チャネルがどのような進化過程を辿ってきたのか、また、進化過程で生じた変化が環境に適応する際にどういった役割を担ってきたのかに興味を持って研究を進めている。温度感受性 TRP チャネルの研究は当初、ショウジョウバエやマウス、ラットなどのモデル生物における生理的な役割についての研究が中心であったが、ここ数年の間に遺伝子の種間の多様性や機能の進化に着目した研究が報告されてきている。本稿では温度感受性 TRP チャネルを進化学的な観点で研究して得られた最近の知見について、筆者の研究も織り交ぜて解説する。

2. 温度感受性 TRP チャネルの機能と生理的な役割

温度感受性 TRP チャネルの機能の進化を研究するためには種間で機能を比較する必要がある。詳細な解析が進んでいるげっ歯類やヒトなどの哺乳類は比較の基準として有用であるので、これらの動物種で明らかになっている温度感受性 TRP チャネルの機能と生理的な役割について概説する。

TRP チャネルは4量体として機能し、1つのサブユニットに存在する6つの膜貫通ドメインのうちの5番目と6番目の間にイオンが透過するポアが形成されると考えられている。TRP チャネル遺伝子ファミリーはアミノ酸配列やドメイン構造の違いにより7つのサブファミリーに分けられている⁴²⁾。7種類のサブファミリーはそれぞれ TRPC (canonical), TRPN (no mechanoreceptor potential-C),

*Shigeru SAITO, 岡崎統合バイオサイエンスセンター (生理学研究所) 生命環境研究領域 細胞生理研究部門 (〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山5-1)

Received 31 August 2011, Accepted 6 October 2011

TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPA (ankyrin) と呼ばれている。げっ歯類, ヒトで同定されている9種類の温度感受性 TRP チャンネルは, 3つの異なるサブファミリーに属しており, 4種類が TRPV (TRPV1~TRPV4), 4種類が TRPM (TRPM2, 4, 5, 8), 1種類が TRPA (TRPA1) に含まれている。これらの内, TRPM2, M4, M5以外は後根神経節, 三叉神経節, または, 皮膚に発現し温度感覚に関わっている^{1, 4, 27, 37)}。TRPM2は脳, 脾臓, 免疫細胞など, TRPM4は心臓, 肝臓など, TRPM5は舌, 脾臓などに発現する。TRPM2, M4, M5は体温近傍の温かい温度で活性化され, TRPM2と TRPM5は脾臓でのインシュリン分泌に関わっている⁴⁰⁾。温度感覚に関わる温度感受性 TRP チャンネルはそれぞれ異なる活性化温度閾値を持っており, ヒトやげっ歯類では TRPV1は43℃以上, TRPV2は52℃以上, TRPV3は33~39℃以上, TRPV4は27~42℃, TRPM8は22~27℃以下, TRPA1は17℃以下で活性化される。このような異なる活性化温度域を持つ温度受容体のセットにより幅広い温度域において正確に温度を感知することができる。温度刺激は表皮下に分布する感覚神経により主に受容されるが, 温度感受性 TRP チャンネルには TRPV3や TRPV4のように皮膚で発現するものがあり皮膚自身が温度を受容してその情報を感覚神経に伝える機構も提唱されている^{4, 18, 22, 27)}。

温度感受性 TRP チャンネルは温度以外の刺激によっても活性化される。例えば, TRPV1は唐辛子の辛み成分であるカプサイシンによって³⁾, 低温受容体の TRPM8はミントの成分であるメントールによっても活性化される^{23, 28)}。このような特性によりカプサイシンやメントールのような化学物質によって「熱い」, または「冷たい」といった感覚が生じる。温かい温度の受容体である TRPV4は低浸透圧によっても活性化される^{20, 36)}。浸透圧調節に重要な役割を担っており全身の様々な組織に発現することが報告されている²¹⁾。TRPV2は感覚神経だけでなく他にも多くの組織で発現しており, 機械刺激でも活性化され, 神経の伸展や小腸の活動に関与することが報告されている^{21, 40)}。

TRPA1に関しては低温で活性化されるかどうかについて議論がある。複数の研究グループが低温で活性化されると報告しているが^{14, 17, 35)}, 一方, 低温では活性化されずに温度感受性が無いという結果を報告した研究グループも複数存在している^{2, 11)}。TRPA1の温度感受性についての真偽ははっきりしないものの, TRPA1の化学物質に対する感受性については共通見解が得られている。TRPA1はワサビの辛み成分であるアリルイソチオシアネート (マスタードオイル), シナモンの成分であるシンナムアルデヒド, オレガノの成分であるカルバクロール, タバコの煙や自動車の排気ガスに含まれるアクロレインなどの多くの化学物質で活性化される^{1, 2, 11, 43)}。これらは刺激性の化学物質であり TRPA1は環境中の侵害性の化学物質の受容体としても機能している。

温度感受性 TRP チャンネルが数種類存在して異なる活性化温度域を有するという特徴は, 光受容体であるオプシンを脊椎動物が数種類保有して異なる波長の光を吸収することで色の識別を行っている点と類似している。進化学的な研究が進んでいるオプシンについては遺伝子重複や遺伝子欠失により動物種間でオプシン遺伝子のレパートリーが異なり色覚が動物種間で多様化していることが分かっている。

一方, 筆者が温度感受性 TRP チャンネルの研究を始めた時点 (2005年頃) では哺乳類以外の脊椎動物種の遺伝子についての情報は乏しく, 遺伝子のレパートリーに多様性があるのか, また, どの様に進化してきたのかはあまり分かっていなかった。

3. 温度感受性 TRP チャンネルの遺伝子レパートリーの多様性および進化過程

遺伝子ファミリーの進化過程を理解するためには比較している遺伝子が種分化により生じたものか, または, 遺伝子重複により生じたものかを区別する必要がある。遺伝子ファミリーを構成する遺伝子は, 祖先では元々1種類だった遺伝子が遺伝子重複を繰り返して種類を増やしてきたものであるため互いに塩基配列やアミノ酸配列に相同性がある。このような遺伝子はホモログ遺伝子と呼ばれる。ホモログ遺伝子のうち遺伝子重複により生じた遺伝子同士はパラログ遺伝子と呼ばれる。一方, 種分化に伴い分化した遺伝子はオーソログ遺伝子と呼ばれる。例えば, ヒトとマウスの共通祖先で祖先遺伝子から遺伝子重複により遺伝子Aと遺伝子Bが生じ, それぞれの遺伝子がヒトとマウスで維持された場合に, 遺伝子Aと遺伝子Bはパラログ遺伝子, また, マウスの遺伝子Aとヒトの遺伝子Aはオーソログ遺伝子である。

脊椎動物の祖先種の温度感受性 TRP チャンネルホモログの種類を推測するためには脊椎動物と最近に分岐した生物種の情報が有用である。脊椎動物に近縁な原索動物のホヤはゲノム配列が決定されており, ゲノム配列中からチャンネル遺伝子を網羅的に収集し進化過程を推定する研究が行われた²⁶⁾。ホヤには哺乳類 TRPA1のオーソログ遺伝子が存在するが, TRPV1~V4, TRPM2, M4, M5, M8のオーソログ遺伝子は存在しなかった。しかし, 哺乳類の TRPM2, M4, M8と系統的に近縁な遺伝子が1種類だけ存在した。つまり, 哺乳類が保有する殆どの温度感受性 TRP チャンネル遺伝子はホヤと脊椎動物が分岐した後に, 脊椎動物の祖先種で生じたと考えられる。そこで, 我々は温度感受性 TRP チャンネル遺伝子を比較するために, ゲノム配列データが決定されている脊椎動物種の温度感受性 TRP チャンネル遺伝子のホモログを網羅的に収集し分子系統解析を行った³²⁾。

図1に代表として TRPV サブファミリーの分子系統樹を示した。哺乳類は基本的には TRPV1~V6を保有しており TRPV5と TRPV6は温度感受性が無い。TRPV5と TRPV6は残りの TRPVから早い時期に分岐したために外群として用いている。この分子系統樹ではそれぞれのメンバーが統計的に高い値で支持されるクラスターを形成している。硬骨魚類の TRPV1/2遺伝子は陸上脊椎動物の TRPV1と姉妹群の関係にある。しかし, この枝の統計的な信頼性はあまり高くなく (ブートストラップ値は61%), 実際に異なる系統樹の推定法を用いると, 硬骨魚類 TRPV1/2は陸上脊椎動物の TRPV1と TRPV2の外側に位置する場合もある。この様に, 系統的な位置関係がはっきりしないために TRPV1/2と表記している。陸上脊椎動物の TRPV1と TRPV2を生み出した遺伝子重複は TRPV3や TRPV4を生み出した遺伝子重複より遅い時期に起こっている。TRPV1/2クラスターには硬骨魚類の TRPV1/2が含まれていることから, それより以前に分岐している TRPV3や

図1 TRPV サブファミリーの分子系統樹 アミノ酸置換数を JTT 法¹⁰⁾により推定し、最小進化法³¹⁾により分子系統樹を作成した。各枝の数値は統計的な信頼性(ブートストラップ値⁵⁾)を表している。遺伝子重複により生じた分岐を菱形で示した。文献³²⁾より改定。

TRPV4は陸上脊椎動物と硬骨魚類の共通祖先種には既に存在していた。ところが、TRPV3のクラスターには硬骨魚類のTRPV3は含まれていないので、硬骨魚類はTRPV3遺伝子を失ってしまったことが分かる。

TRPV4のクラスターにはニシツメガエル (*Xenopus tropicalis*) のTRPV4遺伝子が6種類含まれている(今後、TRPV4a~V4fと表記する)。1コピー (TRPV4a) は他の脊椎動物種のTRPV4とクラスターを形成しているが、一方、残りの5コピー (TRPV4b~V4f) は一つのクラスターを形成しTRPV4のクラスター内で最初に分岐している。一見、ニシツメガエル以外の脊椎動物種がTRPV4b~TRPV4fを失ったように見える。しかし、この系統樹はアミノ酸配列を用いて作成したもので、後述で詳しく述べるがTRPV4b~V4fには多数のアミノ酸置換が蓄積しているためにこれらの遺伝子の系統的な位置を正しく推定できていない可能性がある。塩基配列を用いて作成した系統樹ではTRPV4a~V4fが単一のクラスターを形成することから、TRPV4遺伝子のコピー数の増加はニシツメガエルの系統で特異的に生じたと考えられる。

また、これまで報告されていない遺伝子が特定の種で見つかった。例えば、カモノハシには3つの新規TRPV遺伝子が存在し、2つはTRPV5/6のクラスターに含まれ(便宜的にTRPV8, V9と命名)、1つはTRPV1~V4とクラスターを形成した(便宜的にTRPV7と命名)(図1)。TRPV7は他の主要な脊椎動物種のゲノム配列中には見つからなかったためにカモノハシ特異的であると考えられる。実際に機能を維持している遺伝子かどうかは現時点では不明であるが、TRPV1~V4に近縁であることから温度感受性があるかどうか興味を持たれる。

温度感受性TRPチャネルホモログの進化過程を推定するためにTRPMやTRPAサブファミリーでも分子系統解析を行ったところ、ヒトやげっ歯類が保有する温度感受性TRPチャネルホモログのほとんどは硬骨魚類と陸上脊椎動物の祖先種には既に備わっていたことが分かった(図2)。つまり、現生の脊椎動物の温度感受性TRPチャネルの基本的なレパートリーは脊椎動物の初期の時点で既に備わっていた。しかし、その後にはそれぞれの系統が独自の進化過程を経るに従い、時にはそれぞれの種の生態や生理的な特性に応じた遺伝子レパートリーの変化が生じたと考えられる。各脊椎動物種の温度感受性TRPチャネルホモログのレパートリーを図2にまとめた。一見して、脊椎動物種間で遺伝子のレパートリーの違いがあることが分かる。陸上脊椎動物ではTRPM4がニワトリで、TRPM5がニシツメガエルで失われているが、基本的にはヒトとげっ歯類が保有する温度感受性TRPチャネル遺伝子ホモログを保持している。一方、硬骨魚類には3種類の温度感受性TRPチャネル遺伝子ホモログが存在しない。このような温度感受性TRPチャネル遺伝子のレパートリーの違いが水生と陸生という特徴と関連するかどうかを考察するためには、硬骨魚類の複数の温度感受性TRPチャネルの機能解析が行われる必要がある。一方、ニシツメガエルではTRPV4、TRPM8が遺伝子のコピー数を増加させている。特に、TRPV4は調べたすべての脊椎動物種では1コピーのみであるのに対して6コピーに増えている。ゲノム配列ではTRPV4b~V4fは他の遺伝子を挟むことなく直列に配置されており、これらの遺伝子がタンDEM重複により生じたことが分かる。一方、TRPV4a

図2 脊椎動物における温度感受性 TRP チャンネルホモログの進化過程と遺伝子レパートリー 遺伝子重複および遺伝子欠失が生じた時期を矢印で示した。陸上脊椎動物の TRPV1 と TRPV2 を生み出した遺伝子重複の時期は分子系統解析では明確に推定できなかったため、2つの可能性を点線の矢印で示した。各生物種において確認された各遺伝子のコピー数を数字で示した。0 は遺伝子が存在しないことを表している。図1と図2の系統樹に含まれるトラフグとゼブラフィッシュの TRPV1/2 遺伝子は表では便宜的に TRPV1 の行に示した。文献より改定³²⁾。

は残りの TRPV4 遺伝子とは離れた位置に存在している。TRPV4a のアミノ酸配列は他の脊椎動物のものとの相関性が高く、一方、TRPV4b～V4f は大きく異なっている (図1)。一般的に、タンパク質をコードする遺伝子は機能的な制約を強く受けているために、アミノ酸を変化させる非同義塩基置換は、アミノ酸を変化させない同義塩基置換より抑えられている。一方、タンパク質のアミノ酸配列が変化して機能が変わったような場合には非同義塩基置換の進化速度が高くなる場合がある。そこで、非同義塩基置換速度/同義塩基置換速度の比を推定したところ、ニシツメガエル TRPV4a を含む脊椎動物種の TRPV4 の間 (TRPV4b～V4f を除く) では 0.02～0.14 と 1 よりも有意に小さな値であった。一方、ニシツメガエルの TRPV4a と TRPV4b～V4f の間では 0.32～1.02 と大きな値になることが分かった (1 よりも有意に大きくは無かった)³²⁾。これらのことを考え合わせると、遺伝子重複により TRPV4a と TRPV4b～V4f の祖先遺伝子が生じ TRPV4a が元の機能を保ちつつ、TRPV4b～V4f の祖先遺伝子がアミノ酸置換を蓄積して異なる機能を持つようになり、その後、遺伝子重複を繰り返

返してコピー数を増加させたと考えることができる。しかし、非同義塩基置換速度/同義塩基置換速度の比が大きくなる現象は TRPV4b～V4f が機能的に重要ではなくなり、それらの機能的制約が緩むことによって説明できる。哺乳類 TRPV4 は温かい温度および低浸透圧によって活性化される²⁰⁾。両生類にとって浸透圧調節は重要であり、ニシツメガエルの TRPV4 遺伝子の増加および多様化は両生類の生理的な特徴に関わっているのかもしれない。

ニシツメガエル TRPV4 の場合のように、遺伝子の塩基やアミノ酸配列を分子進化的な手法で解析することにより温度感受性 TRP チャンルの進化について興味深い知見を得ることができる。ただし、分子進化的な解析だけでは確定的な結論を得ることは難しく、また、実際に着目する遺伝子がどのように機能を進化させてきたかを知ることはできない。機能の進化過程を推定するには着目する生物種の温度感受性 TRP チャンルを実験的に解析し他の生物種のものと比較する必要がある。近年、哺乳類以外の動物種の温度感受性 TRP チャンルの機能解析により機能の進化過程を調べる研究がいくつか報告されてきている。

4. 温度感受性 TRP チャンルの機能進化

温度受容体として最初に同定された TRPV1 については複数の脊椎動物種において機能解析がされている。ラットやヒトの TRPV1 は 43℃ 以上の高温、カプサイシン、酸刺激等により活性化され侵害刺激の受容に関わる^{3, 9, 38)}。TRPV1 はウサギ、ニワトリでも機能解析が行われ高温および酸刺激に対する感受性があることが分かった^{6, 12)}。侵害刺激の受容は生存に必須であることから TRPV1 の高温、酸刺激への感受性が進化の過程で保存されてきたと考えられる。ところが、カプサイシン感受性には種間差がある^{6, 12, 29)}。ニワトリとウサギの TRPV1 はマウス、ヒトおよびイヌの TRPV1 に比べカプサイシン感受性が著しく低い。ラット TRPV1 ミュータントを用いた解析によりカプサイシンは第1細胞内ループから第4番目の膜貫通ドメインに結合することが示された¹²⁾。また、ウサギ TRPV1 の4番目の膜貫通ドメインに生じた1つのアミノ酸置換によりカプサイシン感受性が低くなったことも分っている⁶⁾。

進化の過程で温度感受性 TRP チャンルが受容する温度域を変化させてきた例もいくつか報告されている。前述の通り、ニシツメガエルは TRPM8 遺伝子を2コピー保有し、また、コピー間でアミノ酸配列も大きく異なっている。Myersらはこれらの TRPM8 をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させて機能解析を用いて行った²⁵⁾。残念ながら、1コピーの TRPM8 は様々な刺激に対して応答を示さなかった。もう一方のコピーは哺乳類の TRPM8 のアゴニストであるメントールおよび低温刺激により活性化された。彼らは正確な活性化温度閾値は示していないが、ニシツメガエル TRPM8 は恒温動物である哺乳類やニワトリのオースログに比べ低い温度で活性化されることを報告し、変温動物であるニシツメガエルは体温が恒温動物よりも低いために TRPM8 の活性化温度域も低くなったのではないかと考察している。

我々の研究グループは TRPV3 の温度感受性が脊椎動物の進化過程で変化したことを見出した³³⁾。脊椎動物の温度感受性 TRP チャンルの比較解析をする過程で、ニシツメガ

エルの TRPV3 遺伝子自体はゲノム配列中に存在するものの、哺乳類の TRPV3 の N 末端および C 末端領域に相同な配列が見つからないことに気がついた³²⁾。そこで、ニシツメガエルの TRPV3 遺伝子の cDNA 配列を決定したところ、ニシツメガエル TRPV3 の N 末端領域は哺乳類 TRPV3 に比べ 20 残基短く、また、C 末端領域は 7 残基長くなっており、更にアミノ酸配列も著しく異なっていることが分かった。一方、ニシツメガエル以外の陸上脊椎動物の TRPV3 は全域に渡ってアミノ酸配列が比較的保存されていた。

イオンチャネル特性を調べるためにニシツメガエル TRPV3 をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させて電気生理学的な解析を行った。哺乳類 TRPV3 はクスノキの成分である樟脳 (カンフル)、ユーカリの成分であるユーカリプトール、人工合成の試薬である 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) により活性化される (図 3 B, D)^{1, 4, 37, 41)}。

ニシツメガエル TRPV3 を発現させた卵母細胞にこれらの化学物質を作用させたところ、2-APB により活性化されたが、カンフル、ユーカリプトールでは活性化されず (図 3 A, C)、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、温度感受性を検討した。哺乳類 TRPV3 は温かい温度で活性化されるため、ニシツメガエル TRPV3 を発現させた卵母細胞に高温刺激を加えところ活性化しなかった。一方、低温刺激を与えると明瞭な活性化が認められた (図 3 E)。活性化温度閾値は平均約 16°C であった (図 3 F)。マウスでは TRPV3 は皮膚に発現し体表の温度受容に関与している²⁴⁾。そこで、ニシツメガエル TRPV3 の mRNA の組織分布を調べたところ、同様に皮膚に存在し体表の温度受容に関与することが示唆された。

ニシツメガエルは熱帯に生息し、飼育時の至適温度は

図3 ニシツメガエル TRPV3 のチャネル特性 アフリカツメガエルの卵母細胞にニシツメガエル TRPV3 (A, C, E, F) またはマウス TRPV3 (B, D) を強制発現させ、2 電極膜電位固定法により各種の刺激に対するイオン電流を測定した。マウス TRPV3 はカンフル、ユーカリプトール、2-APB により活性化され (B, D)、ニシツメガエル TRPV3 は 2-APB でのみ活性化された (A, C)。ニシツメガエル TRPV3 は高温刺激では活性化されなかったが、低温刺激により活性化された (E)。(F) ニシツメガエル TRPV3 を発現させた卵母細胞に低温刺激を与えた際の電流と温度のプロット。この観察例では、約 17°C から急激に内向きのイオン電流が生じた。活性化温度閾値は平均 $16.35 \pm 0.51^\circ\text{C}$ ($n=14$) であった。文献より改定³³⁾。

図4 哺乳類とニシツメガエルのTRPV3の温度感受性 哺乳類ではTRPV3は体温(約36℃)に近い温度域で活性化される。一方、ニシツメガエルでは適温(22~28℃)より少し低い温度でTRPV3が活性化される。

22~28℃程度¹⁵⁾、20~18℃以下は生存に適さない温度である¹⁶⁾。これらのことを考慮すると、TRPV3は哺乳類とニシツメガエルにおいてそれぞれの動物の生理的な特性に適合するように進化の過程で温度感受性を逆向きに変化させてきたと考えられる(図4)。分子系統解析の結果、TRPV3遺伝子は硬骨魚類と陸上脊椎動物の共通祖先種には存在していたが、硬骨魚類では失われている(図1、2)³²⁾。そのため、TRPV3が脊椎動物の祖先種でどのような温度感受性を有していたのかを推定することは難しい。また、現在のところ、爬虫類や鳥類のTRPV3の温度感受性については報告されていないために温かい温度の感受性が進化過程のいつ頃に獲得されたのかは分っていない。今後、多様な脊椎動物種のTRPV3の機能解析が進むことにより温度感受性についての進化過程がより詳細に明らかになることを期待している。

この様に、温度感受性TRPチャネルの機能を異なる脊椎動物種間で比較すると、温度感受性がオーソログ間で必ずしも保存されておらず柔軟に変化し得ることが分かってきた。近年、Juliusらの研究グループは赤外線を受容に温度感受性TRPチャネルが関わっており、また、進化の過程でダイナミックに変化してきたことを報告した⁸⁾。一部の種類のヘビは口吻にピット器官と呼ばれる赤外線センサーを備えていて、恒温動物から放出される赤外線をこのピット器官で受容して獲物や捕食者の位置を察知することができる。Grachevaらはピット器官を持つヘビを用いて頭部の感覚神経である三叉神経と、胴体部の感覚神経である後根神経の網羅的な遺伝子発現解析を行い、TRPA1の発現量が後根神経節よりも三叉神経節で著しく多いことを見出した。異所性発現系の実験によりTRPA1は温かい温度およびアリルイソチオシアネートで活性化された。更に、三叉神経節においても温かい温度およびアリルイソチオシアネートで活性化される神経細胞が存在することが確認され、TRPA1が生体内でも温かい温度の受容体として機能することが示された。ピット器官の内部に存在するピット膜に赤外線が照射されて、温度が上昇すると、ピット膜近傍の神経に発現するTRPA1が活性化され神経を発火させると考えられる。興味深いことに、TRPA1は異なるヘビの種において活性化温度閾値が異なっていた。ピット器官を持たないテキサスラットスネイク(*Elaphe obsoleta lindheimeri*)ではTRPA1は36℃ほどの活性化温度閾値を持っており、その発現は三

叉神経節のみに限らず後根神経節にも認められる。テキサスラットスネイクではTRPA1は全身で高い温度の受容に関わっている。一方、ピット器官を持つニシダイヤガラヘビ(*Crotalus atrox*)ではTRPA1の活性化温度閾値は約28℃であり、ピット器官によって感知される温度閾値とはほぼ一致している。TRPA1は三叉神経にのみ発現しており、ピット器官での機能に特殊化したと考えられる。また、ピット器官がニシダイヤガラヘビほど発達していないアマゾンツリーボア(*Corallus hortulanus*)やボールニシキヘビ(*Python regius*)ではTRPA1の発現は三叉神経のみではあるが、活性化温度閾値は30~33℃程度であり、ピット器官の感受性がニシダイヤガラヘビほど敏感でないことと辻つまが合う。この様に、ヘビのピットという特殊な器官が獲得される進化過程では、全身の温度受容に関わっていたTRPA1が発現する組織を三叉神経節に局限し、更に温度感受性を低下させるような変化が生じたと考えられる。更に、Juliusらの研究グループはナミチスイコウモリ(*Desmodus rotundus*)のピット器官でも温度感受性TRPチャネルが働いていることを見出した⁷⁾。この場合はTRPV1が関わっている。ナミチスイコウモリではTRPV1は2種類の選択的スプライシングバリエーション(TRPV1-SとTRPV1-L)が存在する。後根神経節には両者が、一方、三叉神経節にはTRPV1-Sがより強く発現する。異所性発現系の実験においてTRPV1-Lの活性化温度閾値は約40℃であり、マウスなどのTRPV1と類似している。一方で、TRPV1-Sは約30℃と低くなっており、ピット器官での温度受容に役だっていると考えられる。この様に、爬虫類と哺乳類において異なる温度感受性TRPチャネルが異なる分子メカニズムにより新たな温度受容器官の獲得に貢献したことは興味深い。

5. 今後の展望

温度感受性TRPチャネルの発見により進化過程で生物がどのように温度環境に適応してきたかを遺伝子レベルで研究することができるようになった。一方で、温度感受性TRPチャネルは温度だけでなく、他の様々な感覚受容に関わり、また、多くの組織において発現している。この様な特徴により動物個体における生理的な役割を検討する際には様々な側面を検討する必要がある。また、進化過程における環境適応に果たした役割を検討する上で温度感受性TRPチャネルのどの機能が貢献したのか明らかにするには困難を伴う場合もあると考えられる。しかし、これらのことは温度感受性TRPチャネルが進化過程で発現する組織やその機能を柔軟に変化させて環境適応に重要な役割を担ってきたことを意味しており、研究対象として大きな魅力であると言える。この数年間で、バイオインフォマティクス、分子進化学的手法による比較解析と分子生物学、生理学的な実験手法の両者を用いることにより、温度感受性TRPチャネルが進化の過程でダイナミックに機能を変化させてきたことを示す研究が報告されてきている。近年、ゲノム配列データが様々な生物種間で決定・公開され、また、次世代シーケンサーにより研究者個人が着目している生物種のゲノム配列決定やトランスクリプトーム解析が可能になり、非モデル生物を用いた比較解析がより行い易くなっている。今後、様々な研究分野の手法を複合的に利用することによ

り様々な動物における温度感受性 TRP チャネルの進化過程および適応的な役割が総合的に解明されていくことが期待される。

謝 辞

本稿で紹介した研究を行うにあたり、指導や助言をくださった富永真琴教授（生理学研究所）と新貝鉦蔵教授（岩手大学）、および、ニシツメガエルを提供してくださった矢尾板芳郎教授（広島大学・ナショナルバイオリソースプロジェクト）に深く感謝いたします。また、実験を補助してくださった福田直美様（生理学研究所）と齋藤くれあ様（生理学研究所）に感謝いたします。

文 献

- 1) Bandell, M., Macpherson, L.J. & Patapoutian, A.: *Curr Opin Neurobiol*, 17, 490-7 (2007)
- 2) Bautista, D.M., Jordt, S.E., Nikai, T., Tsuruda, P.R., Read, A.J., Poblete, J., Yamoah, E.N., Basbaum, A.I. & Julius, D.: *Cell*, 124, 1269-82 (2006)
- 3) Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D. & Julius, D.: *Nature*, 389, 816-24 (1997)
- 4) Dhaka, A., Viswanath, V. & Patapoutian, A.: *Annu Rev Neurosci*, 29, 135-61 (2006)
- 5) Felsenstein, J.: *Evolution*, 39, 783-791 (1985)
- 6) Gavva, N.R., Klionsky, L., Qu, Y., Shi, L., Tamir, R., Edenson, S., Zhang, T.J., Viswanadhan, V.N., Toth, A., Pearce, L.V., Vanderah, T.W., Porreca, F., Blumberg, P.M., Lile, J., Sun, Y., Wild, K., Louis, J.C. & Treanor, J.J.: *J Biol Chem*, 279, 20283-95 (2004)
- 7) Gracheva, E.O., Cordero-Morales, J.F., Gonzalez-Carcacia, J.A., Ingolia, N.T., Manno, C., Aranguren, C.I., Weissman, J.S. & Julius, D.: *Nature*, 476, 88-91 (2011)
- 8) Gracheva, E.O., Ingolia, N.T., Kelly, Y.M., Cordero-Morales, J.F., Hollopeter, G., Chesler, A.T., Sanchez, E.E., Perez, J.C., Weissman, J.S. & Julius, D.: *Nature*, 464, 1006-11 (2010)
- 9) Hayes, P., Meadows, H.J., Gunthorpe, M.J., Harries, M.H., Duckworth, D.M., Cairns, W., Harrison, D.C., Clarke, C.E., Ellington, K., Prinjha, R.K., Barton, A.J., Medhurst, A.D., Smith, G.D., Topp, S., Murdock, P., Sanger, G.J., Terrett, J., Jenkins, O., Benham, C.D., Randall, A.D., Gloger, I.S. & Davis, J.B.: *Pain*, 88, 205-15 (2000)
- 10) Jones, D.T., Taylor, W.R. & Thornton, J.M.: *Comput Appl Biosci*, 8, 275-82 (1992)
- 11) Jordt, S.E., Bautista, D.M., Chuang, H.H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Hogestatt, E.D., Meng, I.D. & Julius, D.: *Nature*, 427, 260-5 (2004)
- 12) Jordt, S.E. & Julius, D.: *Cell*, 108, 421-30 (2002)
- 13) Kang, K., Pulver, S.R., Panzano, V.C., Chang, E.C., Griffith, L.C., Theobald, D.L. & Garrity, P.A.: *Nature*, 464, 597-600 (2010)
- 14) Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., Janssens, A., Kwan, K.Y., Vennekens, R., Nilius, B. & Voets, T.: *Proc Natl Acad Sci USA*, 106, 1273-8 (2009)

- 15) Kashiwagi, K., Kashiwagi, A., Kurabayashi, A., Hanada, H., Nakajima, K., Okada, M., Takase, M. & Yaoita, Y.: *Exp Anim*, 59, 395-405 (2010)
- 16) Khokha, M.K., Chung, C., Bustamante, E.L., Gaw, L.W., Trott, K.A., Yeh, J., Lim, N., Lin, J.C., Taverner, N., Amaya, E., Papalopulu, N., Smith, J.C., Zorn, A.M., Harland, R.M. & Grammer, T.C.: *Dev Dyn*, 225, 499-510 (2002)
- 17) Kwan, K.Y., Allchorne, A.J., Vollrath, M.A., Christensen, A.P., Zhang, D.S., Woolf, C.J. & Corey, D.P.: *Neuron*, 50, 277-89 (2006)
- 18) Lee, H. & Caterina, M.J.: *Pflugers Arch*, 451, 160-7 (2005)
- 19) Lee, Y., Lee, J., Bang, S., Hyun, S., Kang, J., Hong, S.T., Bae, E., Kaang, B.K. & Kim, J.: *Nat Genet*, 37, 305-10 (2005)
- 20) Liedtke, W., Choe, Y., Marti-Renom, M.A., Bell, A.M., Denis, C.S., Sali, A., Hudspeth, A.J., Friedman, J.M. & Heller, S.: *Cell*, 103, 525-35 (2000)
- 21) Liedtke, W.B.: *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*, pp.303-318, CRC Press (2007)
- 22) Mandadi, S., Sokabe, T., Shibasaki, K., Katanosaka, K., Mizuno, A., Moqrich, A., Patapoutian, A., Fukumi-Tominaga, T., Mizumura, K. & Tominaga, M.: *Pflugers Arch*, 458, 1093-102 (2009)
- 23) McKemy, D.D., Neuhauss, W.M. & Julius, D.: *Nature*, 416, 52-8 (2002)
- 24) Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S., Andahazy, M., Story, G.M. & Patapoutian, A.: *Science*, 307, 1468-72 (2005)
- 25) Myers, B.R., Sigal, Y.M. & Julius, D.: *PLoS One*, 4, e5741 (2009)
- 26) Okamura, Y., Nishino, A., Murata, Y., Nakajo, K., Iwasaki, H., Ohtsuka, Y., Tanaka-Kunishima, M., Takahashi, N., Hara, Y., Yoshida, T., Nishida, M., Okado, H., Watari, H., Meinertzhagen, I.A., Satoh, N., Takahashi, K., Satou, Y., Okada, Y. & Mori, Y.: *Physiol Genomics*, 22, 269-82 (2005)
- 27) Patapoutian, A., Peier, A.M., Story, G.M. & Viswanath, V.: *Nat Rev Neurosci*, 4, 529-539 (2003)
- 28) Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S. & Patapoutian, A.: *Cell*, 108, 705-15 (2002)
- 29) Phelps, P.T., Anthes, J.C. & Correll, C.C.: *Eur J Pharmacol*, 513, 57-66 (2005)
- 30) Rosenzweig, M., Brennan, K.M., Tayler, T.D., Phelps, P.O., Patapoutian, A. & Garrity, P.A.: *Genes Dev*, 19, 419-24 (2005)
- 31) Rzhetsky, A. & Nei, M.: *Molecular Biology and Evolution*, 9, 945-967 (1992)
- 32) Saito, S. & Shingai, R.: *Physiol Genomics*, 27, 219-30 (2006)
- 33) Saito, S., Fukuta, N., Shingai, R. & Tominaga, M.: *PLoS Genet*, 7, e1002041 (2011)
- 34) Sokabe, T., Tsujiuchi, S., Kadowaki, T. & Tominaga, M.: *J Neurosci*, 28, 9929-38 (2008)
- 35) Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher,

- J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S. & Patapoutian, A.: *Cell*, 112, 819-29 (2003)
- 36) Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G. & Plant, T.D.: *Nat Cell Biol*, 2, 695-702 (2000)
- 37) Tominaga, M.: *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 127, 128-32 (2006)
- 38) Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I. & Julius, D.: *Neuron*, 21, 531-43 (1998)
- 39) Tracey, W.D., Jr., Wilson, R.I., Laurent, G. & Benzer, S.: *Cell*, 113, 261-73 (2003)
- 40) Uchida, K. & Tominaga, M.: *Endocr J*, (2011)
- 41) Vogt-Eisele, A.K., Weber, K., Sherkheli, M.A., Vielhaber, G., Panten, J., Gisselmann, G. & Hatt, H.: *Br J Pharmacol*, 151, 530-40 (2007)
- 42) Vriens, J., Owsianik, G., Voets, T., Droogmans, G. & Nilius, B.: *Pflugers Arch*, 449, 213-26 (2004)
- 43) Xu, H., Delling, M., Jun, J.C. & Clapham, D.E.: *Nat Neurosci*, 9, 628-35 (2006)

Diversity and functional evolution of thermosensitive transient receptor potential (TRP) channels in vertebrates

Shigeru SAITO

Division of Cell Signaling, Department of Bioenvironmental Science, Okazaki Institute for Integrative Bioscience (National Institute for Physiological Sciences), Japan,

Abstract

Animals sense environmental temperatures and adapt via behavioral and physiological responses, therefore the thermo-perceptions are likely to play crucial roles in adaptive evolution. The temperature receptors are the thermosensitive channels that belong to transient receptor potential (TRP) superfamily in animals. Since evolutionary changes of temperature-sensitive TRP channels directly alter the thermo-perceptions, elucidation the evolutionary process of these genes is essential for understanding the adaptation to thermal environments. We collected the genes for temperature-sensitive TRP channels from the genome sequence databases of various vertebrates and conducted molecular phylogenetic analysis and estimated the evolutionary process. We showed that the most of the temperature-sensitive TRP channels were already existed in the ancestral vertebrates, while gene duplication and loss events occurred in the respective lineages resulted in the diversity of thermo-TRP repertoires among species. In addition, to estimate the functional evolution, we cloned TRPV3 from western clawed frog belonging to amphibians that are phylogenetically distantly related to mammals and examined the functional properties by electrophysiological approaches. The temperature sensitivity of western clawed frog TRPV3 differed considerably from that of mammalian TRPV3, suggesting that temperature-sensitive TRP channels can dynamically change their functions through evolutionary process.

Keywords: transient receptor potential channel, temperature receptor, diversity, gene repertoire, functional evolution, vertebrates, western clawed frog