

**爬虫類における温度センサー遺伝子の構造、
進化及び発現動態の解析**

Structure, evolution and expression dynamics
of thermo TRP genes in reptiles

2012.3

岩手大学大学院 連合農学研究科

長井 和哉

目次

第1章 諸論.....	5
1.1. 本研究の背景.....	5
1.2. 本研究の目的.....	7
第2章 爬虫類TRP ホモログの探索と構造解析.....	12
2.1. 背景と目的.....	12
2.2. 材料.....	13
2.3. 方法.....	13
2.3.1 RNA抽出.....	13
2.3.2 RTPCR.....	14
2.3.3 PCR法による増幅.....	16
2.3.4 PCR増幅産物の精製とクローニング.....	16
2.3.5 コロニーPCR.....	17
2.3.6 プラスミド抽出.....	17
2.3.7 塩基配列の決定.....	18
2.3.8 塩基配列およびアミノ酸配列の解析 (アラインメント).....	18
2.3.9 3'RACE (rapid amplification of cDNAends)および5'RACE.....	19
2.4. 結果.....	21
2.5. 考察.....	29

第3章 脊椎動物における thermo TRP の系統解析.....	31
3.1. 背景と目的.....	31
3.2. 材料.....	31
3.3. 方法.....	31
3.3.1. RNA 抽出, RT-PCR, PCR 法, sequence.....	31
3.3.2. 系統解析.....	32
3.4. 結果.....	32
3.5. 考察.....	36
第4章 TRP 遺伝子の発現動態の解析.....	39
4.1. 背景と目的.....	39
4.2. 材料.....	40
4.3. 方法.....	41
4.4. 結果.....	42
4.4.1. (1) 発現解析.....	42
4.4.2. (2) 冬眠時における発現動態の解析.....	48
4.5. 考察.....	49
4.5.1. (1) 発現解析.....	49
4.5.2. (2) 冬眠時における発現動態の解析.....	51
第5章 総合討論.....	53
要旨.....	56

謝辭.....	59
參考文獻.....	60

第1章

諸論

1.1 本研究の背景

生物は寒冷地から熱帯地域まで様々な環境下で生存しており、多様な温度環境に適応している。それらの動物は日光浴や水浴びといった行動や、発汗、発熱といった生理学的反応によりその環境下の温度に対応している。このような異なる温度環境への適応のために温度感受機構も進化の過程で変化してきたことが予想される。脊椎動物の進化系統では哺乳類、鳥類において恒温性が獲得され、これらの動物が寒冷地に分布を広げる際や、または氷河期など地球が寒冷な時期を生きぬく際に大きく貢献したと考えられる。そのため、温度感受機構を多様な生物間で比較することは温度環境に対する適応メカニズムの解明に寄与すると期待される。恒温性の獲得は温度センサーの機能の進化にも大きく影響し、恒温動物と変温動物の間で温度感受機構に何らかの変化を生じさせた可能性がある。中でも、恒温動物は体温を厳密に維持する必要があるために体温付近の温度センサーが恒温性の獲得に関連してどの様に進化してきたかは興味深い。

このような温度に対する反応は温度感受機構により齎されるものであり、近年、この温度感受機構に関連する温度センサー遺伝子がいくつかの種で同定されている。温度センサー遺伝子は、thermo transient receptor potential (TRP) 遺伝子と呼ばれ、TRPV (vanilloid), TRPM (melastin), TRPA (ankyrin)の3つのサブファミリーに分類される

(Patapoutian et al., 2003; Vriens et al., 2004; Voets et al., 2005;). 培養細胞(Caterina et al., 1997; Liedtke et al., 2000; McKemy et al., 2002; Andersson et al., 2004; Smith et al., 2002; Story et al., 2003; Xu et al., 2002)やカエルの卵母細胞への遺伝子導入実験 (Caterina et al., 1997; 1999; David et al., 2002;) の解析から, 哺乳類のTRPV1は42°C以上で活性化することが分かり, また, TRPV2 は52°C以上, TRPV3は 33°C以上, TRPV4 は27- 42°C, TRPM8 は25°C以下, TRPA1 は17°C以下で活性化することが分かった(Fig. 1). これら6つのthermo TRP は主に末梢神経細胞で発現しているため, TRPV1-4, TRPM8及び TRPA1は温度センサーとして働く遺伝子であると考えられている (Patapoutian et al., 2003; Huang et al., 2006; Damann et al., 2008). また, thermo TRP は温度以外の刺激に対しても活性化することが分かっている. 例えば, TRPV1はpHやトウガラシの辛み成分であるcapsaicinで活性化し(Caterina et al., 2000), TRPV2はgrowth factor (Shibasaki et al., 2010), TRPV3 はcarvacrol (Xu et al., 2006), TRPV4 は浸透圧 (Liedtke et al., 2000)や4 α PDD (Vriens et al., 2007), TRPM8 はmenthol (Andersson et al., 2004), TRPA1 はicilin (Story et al., 2003)で活性化される. そのため, これらの thermo TRP は温度センサーだけではなく種々の化学的刺激に対するセンサー遺伝子としても機能していると考えられている. TRP の基本構造は, いずれも6回膜貫通領域を有する(Fig. 2). N 末端, C 末端は細胞内に面しており, N-末端部位にはTRPV, A においてはankyrin repeat domainを有し, TRPM においてはTRPM ホモロジー領域を有し, C-末端領域には. 25アミノ酸残基からなるTRP ドメインを有するなどの特徴的な構造が存在する(Montell 2003).

脊椎動物の複数種のゲノム配列から thermo TRP の系統解析を行った研究により、変温動物である両生類は、恒温動物である鳥類・哺乳類が保有する温度センサー遺伝子をもつことが明らかになっている(Saito et al., 2006). また、このような系統解析により、鳥類は哺乳類よりも変温動物である爬虫類に近縁であることが示されており(Fig. 3), このことから恒温性は哺乳類と鳥類で独立に獲得されたと考えられる. そのため、恒温性の獲得に関連した温度センサー遺伝子のレパートリーおよび温度センサー遺伝子の機能の進化に関連した変化を調べるには、両生類の温度センサー遺伝子の情報だけでは不十分である. しかし、爬虫類の温度センサー遺伝子に関する研究はほとんど行われていない.

体温調節メカニズムの解明は医学的な観点からも重要な研究課題である. 恒温動物の温度センサー遺伝子のレパートリー及び各遺伝子の機能を比較することにより、体温調節に重要な役割を持つセンサー遺伝子を特定することが出来る.

さらに、体温調節は動物の冬眠とも密接な関わりがある. 冬眠時における種々の生理的な変化は哺乳類では主にリスで研究が進んでいるが、同じく冬眠動物である爬虫類においてはあまり研究例はない. 冬眠時における温度センサーの変化を調べることは爬虫類の冬眠時の生理的変化の解明に不可欠である.

1.2 本研究の目的

以上の背景から、本研究は爬虫類の TRP 遺伝子の同定、構造解析、系統解析及び発現動態の解析を行うことを目的とした. 発現に関しては、冬眠時での変化に注目した.

実験材料として、ミシシippアカミミガメ、シマヘビ、ニホンカナヘビの cDNA を用いた。これらを用いて、未だ爬虫類で報告例のない TRPV サブファミリーの探索を行い、爬虫類が保有する thermo TRP レポートリーを確認することを目的とした。次に、変温動物である爬虫類の系統進化上の位置付けを知るために、本研究で得られた爬虫類の TRP および既知の thermo TRPs のアミノ酸配列を用いた分子進化学的解析を行った。このような研究で、TRPV2、3、4 および TRPA1 を同定し、それらの全構造、あるいは部分構造を cDNA 塩基配列から決定することができ、変温動物である爬虫類が他の変温動物よりも恒温動物である鳥類に系統進化上近縁であることを明らかにできた。また、通常行動及び冬眠時の TRP の機能を知る目的で、発現の組織特異性、冬眠時の発現動態の解析を行った。この解析から、爬虫類における TRP の機能、特に冬眠時での機能を考察することを目的とした。

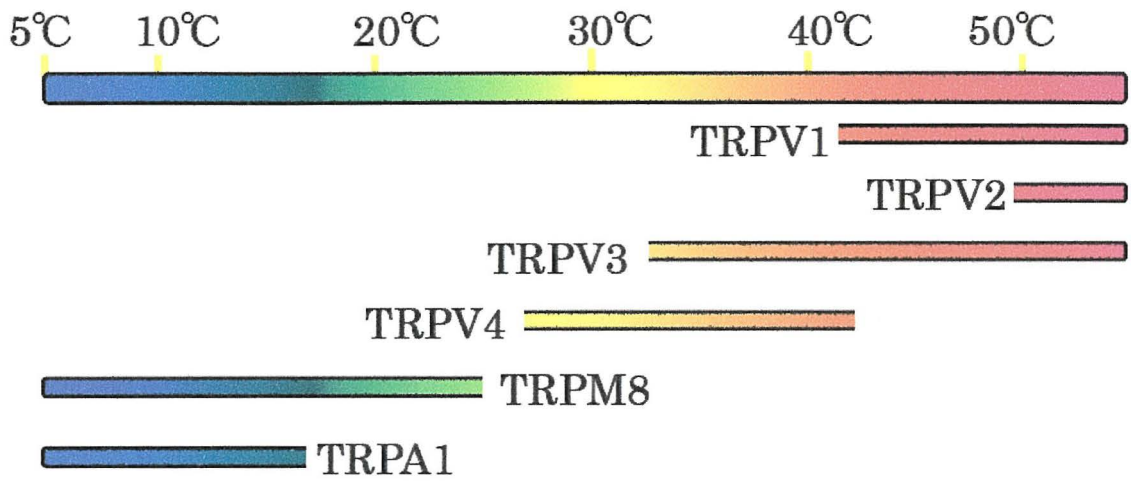


Fig. 1. Temperature range that activates different members of the TRP family.

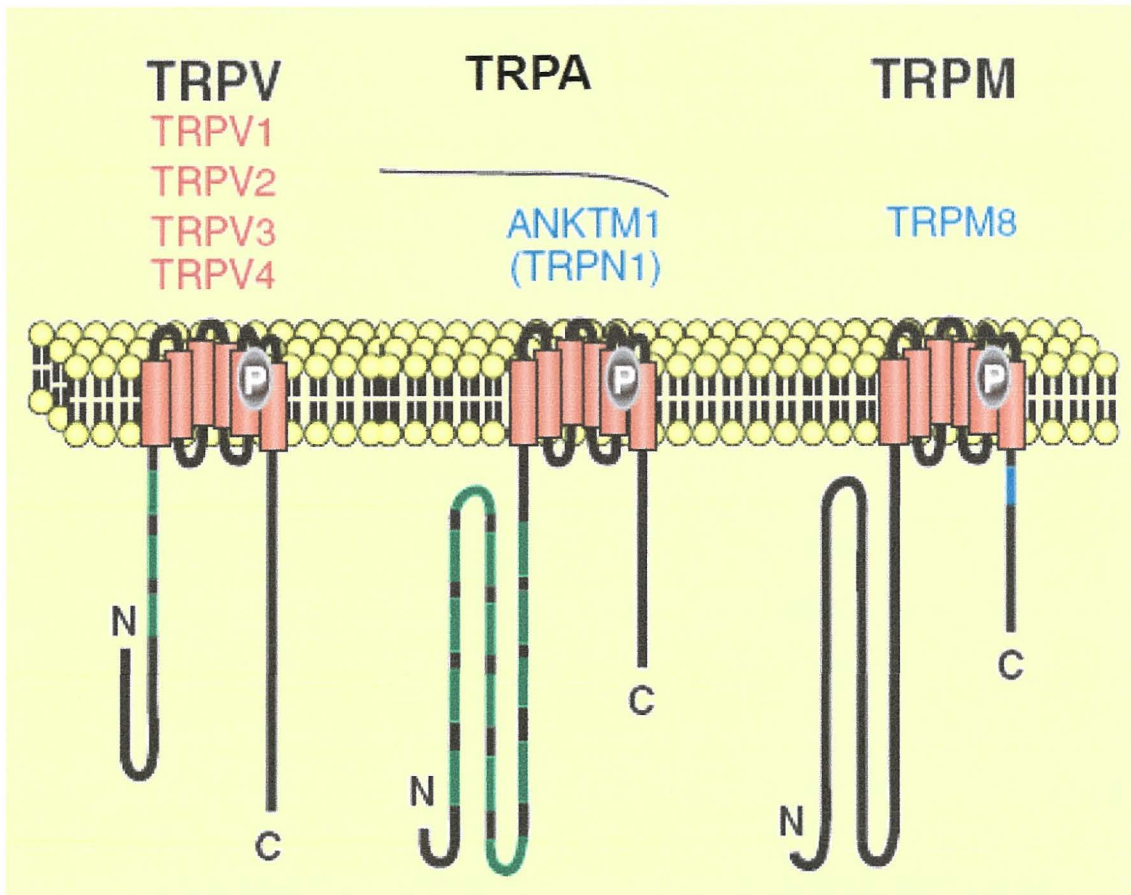


Fig. 2. Schematic structure of the TRPs.

(Modified from Montell, 2003.)

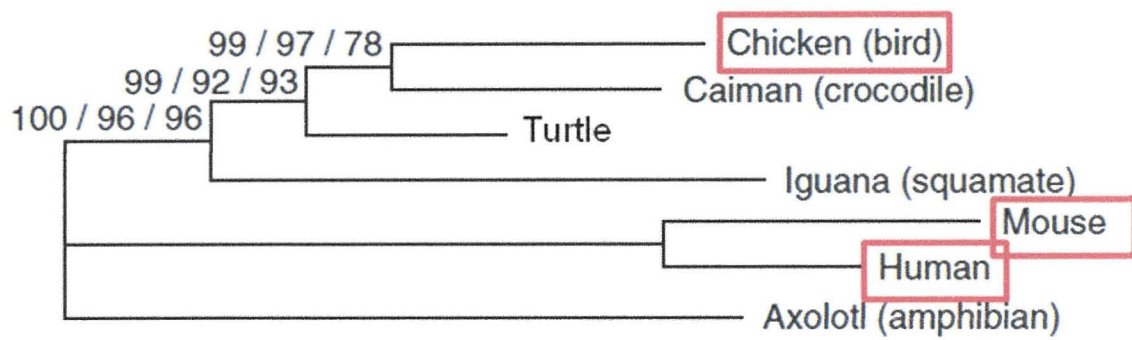


Fig. 3. Relationships of tetrapods inferred from mitochondrial DNA sequences.

Endothermic animals were boxed. (Iwabe et al., 2005)

第 2 章

爬虫類 TRP ホモログの探索と構造解析

2.1 背景と目的

脊椎動物の進化過程では哺乳類と鳥類において恒温性が獲得された。体温を一定に維持するためには体内外の温度を正確に感知する必要がある。そのため、恒温性の獲得は温度感覚のメカニズムにも大きな影響を与えたと予想され、恒温動物である鳥類と近縁な爬虫類の温度センサー遺伝子のレパートリーについて興味を持たれる。しかしながら、第 1 章で述べたように爬虫類の TRP については研究例がほとんどない。そこで、本章ではまず爬虫類の TRP 遺伝子を同定し、その塩基配列を決定することを目的とした。

これまでに thermo TRP は TRPV1, 2, 3, 4, TRPM8, TRPA1 の 6 種類であると報告されており、哺乳類・鳥類及び両生類においてはこれらすべての thermo TRP レパートリーを保有していることが分かっている。爬虫類では、このうち TRPV1, TRPM8, TRPA1 の 3 種類の cDNA の塩基配列が報告されている(Seebacher et al., 2007; Gracheva et al., 2010)。本章では、他の脊椎動物と同様に 6 種類の thermo TRP を保有しているかどうかを調べることを目的とし、爬虫類の thermo TRP のホモログを cDNA で探索することを試みた。また、本章で得られた配列は温度センサーとして機能し得る構造を持っているのか調べる必要があるため、その構造についても解析した。

2.2 材料

本研究で用いた爬虫類は、ミシシippアカミミガメ(*Trachemys scripta elegans*), シマヘビ(*Elaphe quadrivirgata*), ニホンカナヘビ(*Takydromus tachydromoides*)である(Fig. 4). ミシシippアカミミガメ(以下カメと表記する)は岩手大学農学部附属植物園内の北水の池で採取した。シマヘビは青森県弘前市で採取した。ニホンカナヘビは岩手県雫石町で採取した。捕獲した動物はケージに入れ、自由に餌をとれる環境下で、水を与え、実験室内で飼育した。

2.3 方法

2.3.1 RNA 抽出

RNA 抽出は Acid Guanidium-Phenol-Chloroform (AGPC)法を用いて行った(Chomczynski and Sacchi., 1987). 飼育していた動物を密封瓶に移し、ジエチルエーテルにより安楽死させた動物個体を素早く氷上に固定し、解剖を行い、脳、舌、心臓、肺、肝臓、筋肉組織、皮膚のそれぞれの組織に分け、予め 800 μ l の Denaturing solution (4 M Guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate (pH7.0), 1.5 % sodium N-lauroyl sarcosine)を入れた 2ml チューブに入れてハサミで細切した。13,200 \times g, 1分遠心分離した後、上清を別のチューブに移し、2 M 酢酸ナトリウム(pH 4.0)を 80 μ l, DEPC-H₂O

(diethylpyrocarbonateによりRNaseを失活させた滅菌水)で飽和したフェノールを800 μ l, CIA (Chloroform:Isoamylalcohol = 49:1)を160 μ l加え, 懸濁した後, 15分間氷上で静置した. 4°C, 16,100 \times gで20分間遠心し, 上清を新しいチューブに移し, イソプロパノールを160 μ l加え-20°Cで30分間静置した. 4°C, 16,100 \times gで20分間遠心し, その後上清を除き, 沈殿物を70%エタノールで洗った. 沈殿は88 μ lのDEPC-H₂Oで懸濁し, 以下のようにDNase I処理を行った. DEPC-H₂Oに溶かしたRNAに10 \times DNase I bufferを10 μ lとDNase Iを2 μ l加えて軽く混濁した後, 37°Cで30分静置した. 等量のPCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalcohol=25:24:1)を加え, よく混合し, 4°C, 16,100 \times gで20分間遠心し, 上清をエッペンドルフチューブに移した. 再びこの作業を繰り返した. 10 μ lの3M酢酸ナトリウム(pH 7.0)と250 μ lの100%エタノールを加え転倒を繰り返して混和し, -20°Cで30分静置した. 4°C, 16,100 \times gで20分遠心し, 沈殿を70%エタノールで洗い, 50 μ lのDEPC-H₂Oに溶かし, -80°Cに保存した.

2.3.2. RT-PCR

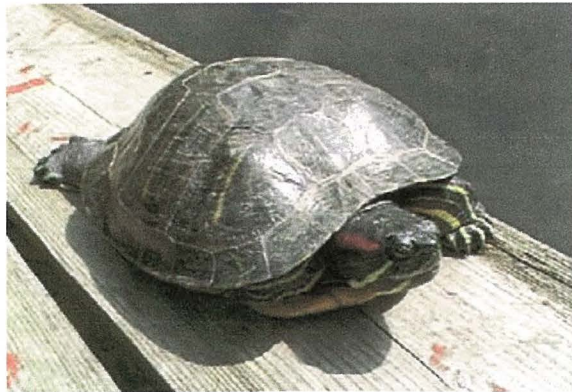
1 μ g RNAを70°Cで10分加熱後, 急冷した. これを用いて, 以下の反応液をチューブに入れ混和した. 熱変性させたRNA溶液に, 5 \times RT buffer (TOYOBO)を4 μ l, 10 mM dNTPsを2 μ l, 0.5mg/ml Oligo (dT)₁₅ primerを1 μ l, 100 units/ μ l ReverTraAce (TOYOBO)を1 μ l, 40 units/ μ l RNase inhibitor (TaKaRa)を0.5 μ lを加え, DEPC-H₂Oで全容を20 μ lとした. この反応液を30°Cで10分間, 42°Cで60分間反応させ, 最後に95°Cで5分加熱後, 4°Cで保冷した. 80 μ lのTEを加え, cDNA sampleとした.

カナヘビ

Takydromus tachydromoides



シマヘビ *Elaphe quadrivirgata*



ミシシippアカミミガメ *Trachemys scripta elegans*

Fig. 4. Animals used in this study

2.3.3. PCR 法による増

以下の反応液をチューブに入れ混和した。 cDNA sample を 1 μ l, 10 \times PCR buffer を 2 μ l, 2.5 mM dNTPs を 1.6 μ l, 10 μ M FD primer を 0.4 μ l, 10 μ M RV primer を 0.4 μ l , 0.5U/ μ l EX Taq DNA polymerase を 1 μ l, これに H₂O を加えて全容を 20 μ l とした。

Primer のデザインは、報告例のある他の種の配列をアラインメントし、保存性の高い領域に設計した。本章で用いた primer と温度条件は Table1 に示す。

PCR 産物は 2 %アガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロマイド染色により可視化した。

Table 1. Primer sets for PCR used in this study

Primer set	Target	Primer ^{a)}	Nucleotide sequence (5' to 3') ^{b)}	Product size (bp)
1	TRPV2	V2F	TCTTCCTCTTTGGCTTTGC	500
		V2R	TCCTCYACYCTGAAGCACCA	
2	TRPV3	V3F	ARGARAGYGAGCRCATCTGG	100
		V3R	AAGAGCTACGCCAAATCC	
3	TRPV4	V4F	CTTCTTCCAGCCCAAGGATG	299
		V4R	GTCTTGGCAGCCATCATGAG	
4	TRPA1	A1F	TAYTDGGDWWKTGCAAAGAA	380
		A1R	CAGCCTCTGACAYKATCTCCAT	
5	WAC ^{c)}	wacF	TGCATCACCTCTCTTCTGTAAAT	271
		wacR	CTGCGGATGATTGGTCTGA	
6	CTNNB1 ^{d)}	ctnF	GAGTTGGATATGGCCATGGA	279
		ctnR	GATGGRATYTGCA TKCCYTCATC	

^{a)} F: forward primer, R: reverse primer

^{b)} D: G or A or T, Y: C or T, V: G or A or C, W: A or T, K: G or T.

^{c)} WAC: WW domain containing adaptor with coiled-coil (Xu et al., 2002).

^{d)} CTNNB1: catenin (cadherin-associated protein) beta 1 (Kraus et al., 1994).

2.3.4. PCR 増幅産物の精製とクローニング

PCR産物をアガロースゲル電気泳動後、目的のバンドを含むゲルをカミソリの刃で切り出した。NucleoSpin® Extract II (MACHERY-NAGEL)を用いてゲルからのDNA抽出・精製を行った。これに *Stu* I で消化した pCR-Blunt ベクター(Invitrogen)に T を付加した T ベクターを 50 ng 加え、DNA ligation kit (TaKaRa)を用いて 16 °C で 1 時間ライゲーションを行った。コンピテントセル(Mach1™-T1R)(Invitrogen)にトランスフォーメーション後、カナマイシン(final: 50 µg/ml)を含む LB 寒天培地に播き、37°C で一晩培養した。

2.3.5. コロニーPCR

ベクターにインサートが入っているクローンを選別するためにコロニーダイレクト PCR を行った。コロニーを形成した大腸菌を一部取り、96°C、1 分間処理後、95°C、5 秒間、51°C、30 秒間、72°C、2 分間を 30 サイクル行った後、25°C で保温してアガロースゲル電気泳動を行った。使用した primer は以下に示す。

M13 FD primer 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'

M13 RV primer 5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'

2.3.6. プラスミド抽出

ベクターにインサートが入っていることを確認した大腸菌を 50 µg/ml のカナマイシンを含む 3 ml LB 培地に植菌し、37°C、200 rpm で一晩振とう培養した。大腸菌を遠心により回収後、E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit I (Omega Bio-tek)を用いてプラスミド抽出

を行った。

2.3.7. 塩基配列の決定

塩基配列の決定は BigDye Terminator v3.1 cycle Sequence Kit (Applied Biosystems) と M 13-FD, RV primer を用いて行った。反応液は以下のとおりである。プラスミド 300 ng, 1.6 pmol primer 1 μ l, BigDye 0.4 μ l, 5 \times sequencing buffer 1 μ l, これに H₂O を加えて 10 μ l に調節した。Sequence 反応は、96 $^{\circ}$ C, 1 分間処理した後, 96 $^{\circ}$ C, 5 秒間, 50 $^{\circ}$ C, 10 秒間, 60 $^{\circ}$ C, 4 分間を 25 サイクルで行い, 4 $^{\circ}$ C で保冷した。その後, 1 μ l 3 M 酢酸ナトリウム(pH5.2), 125 mM EDTA, 25 μ l 100 %エタノールを加え, 転倒混和後氷上で 30 分静置し, 4 $^{\circ}$ C, 16,100 g で 20 分間遠心した。上清を捨て, 沈殿を 70 %エタノールで洗い, 12 μ l の Formamide で懸濁し, 96 well プレートに移した。96 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱し, 急冷後, ABI 3500 Genetic Analyzer により塩基配列決定のためキャピラリー電気泳動を行った。

2.3.8. 塩基配列およびアミノ酸配列の解析 (アラインメント)

Sequence のアラインメントは CLUSTAL W(Thompson et al., 1994)を用いて行った。

2.3.9. 3'RACE (rapid amplification of cDNAends)及び 5'RACE

cDNA の全長の配列を得るために, 3'RACE 及び 5'RACE を以下の通りに行った。TRPV2, 3, 4 の cDNA の 3'末端は Gene Racer 3' adapter primer と以下の種特異的 primer を用いた PCR 法により得た。その後, クローニング, sequence により塩基配列を決定した。

Gene Racer 3' adapter primer

5'-GCTGTCAACGATACGATACGTAACG-3' (Invitrogen)

Gene Racer 3' Nested primer

5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3' (Invitrogen)

Turtle TRPV2 specific primer

5'-GAAATAGAGAAGTCCTGGCTGTGG-3'

Turtle TRPV2 specific primer-2

5'-CTGGTTACAGCAAGAGTGTCTGGAAGC-3'

Turtle TRPV3 specific primer

5'-TCCAAAAGGTGATCTTACAGGATGTG -3'

Turtle TRPV3 specific primer-2

5'-GTTGTATACATCGTGT'TTTTGCTGGG-3'

Grass lizard TRPV4 specific primer

5'-AGATTGAGAACCGCCACGAGATGCT-3'

Snake TRPV4 specific-primer

5'-GGACAGCAAGACCTTCAGCACCTTC-3'

カナヘビとシマヘビの TRPV4 の 5'末端の塩基配列の決定は次のように行った。Total RNA を T4 RNA ligase (New England Biolabs)を用いて GeneRacer RNA adapter 50 pmol (Invitrogen)と結合し, ReverTra Ace (TOYOBO)と random primer を用いて逆転写反応を行い(第 2 章材料と方法参照), Gene Racer 5' adapter primer と以下の種特異的 primer を用いた PCR 法により TRPV4 の cDNA の 5'末端を得た。その後, クローニング, sequence により塩基配列を決定した。

Gene Racer 5' adapter primer

5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3' (Invitrogen)

Gene Racer 3' Nested primer

5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3' (Invitrogen)

Grass lizard TRPV4 specific-primer

5'-GGCAGCTCACCGAAGTAGAAGTAG-3'

Snake TRPV4 specific-primer

5'-CATCCTTGGGCTGGAAGAA-3'

2.4. 結果

脊椎動物における thermo TRP のレパートリーは、哺乳類、鳥類及び両生類において 6 種類、魚類では TRPV1, 4 及び TRPA1 の 3 種類が報告されているが(Saito et al., 2006), 爬虫類においては不明であった。これまでに、爬虫類における thermo TRP ホモログは、ワニ、トカゲで TRPV1, ワニで TRPM8 の cDNA の一部の配列が、ヘビで TRPA1 の全長の報告がある。本研究では、カメ、ヘビ、トカゲの cDNA を用いて、RT-PCR により新たに thermo TRP である TRPV2, 3, 4 のホモログの探索を試みた。その結果、カメの皮膚の cDNA から TRPV2 を同定することができた。また、カメとヘビの皮膚の cDNA から TRPV3 を、カメ、ヘビ、トカゲの肝臓の cDNA から TRPV4 を新たに同定することができた。本研究で新たに発見された TRPV2, 3, 4 とすでに報告された TRPV1, TRPM8, TRPA1 の情報を合わせると、6 種類の thermo TRP レパートリーを保有していることが分かった。このことから、爬虫類も哺乳類、鳥類、両生類といった他の四足動物と同様の温度センサーレパートリーを保有していることが明らかとなった。脊椎動物が魚類から両生類へ進化する過程で獲得してきた TRPV2, 3, TRPM8 は爬虫類でも失うことなく保有していることが分かった。得られた配列は、DDBJ/GenBank/EMBL へ登録した。アクセッ

シオンナンバーは、カメの TRPV2: AB666086、カメの TRPV3: AB666087、シマヘビの TRPV3: AB666088、カナヘビの TRPV4: AB666089、シマヘビの TRPV4: AB666090 である。

次に、本章で得られた配列を用いて構造解析を行った。遺伝子特異的 primer を用いた RT-PCR 産物のクローニング, sequence の結果から、本章ではカメの TRPV2 は TM6 の一部から C-末端までの 126 アミノ酸残基, シマヘビの TRPV3 は 32 アミノ酸残基, カメの TRPV3 は TM5, 6, pore region を含む 218 アミノ酸残基, ヘビ, トカゲの TRPV4 は全長のアミノ酸配列 868 アミノ酸残基を決定することができた。また、カメの TRPA1 は 94 アミノ酸残基, シマヘビの TRPA1 は 69 アミノ酸残基を決定することができた。これらのアミノ酸配列と、すでに報告のある他種の配列をアライメントし、比較解析を行った。

カメの TRPV2 配列のアライメント解析の結果, TM6 直後からストップコドンまでの C 末端領域の長さは哺乳類と同じ長さであったのに対し, ニワトリのそれは他の種よりも 12 残基長いことが分かった(Fig. 5)。

カメの TRPV3 配列のアライメント解析の結果, 一部ではあるが他の種の各主要ドメイン配列との相同性が高いことから, 爬虫類の TRPV3 は TM5, 6, pore region を有しているものと思われる(Fig. 6)。C-末端領域の長さは, 爬虫類とニワトリで同じ長さであり, 哺乳類とは 5 アミノ酸残基短いことが分かった。

カナヘビとシマヘビで TRPV4 の全長のアミノ酸配列を決定することができた。(Fig. 7) シマヘビ, カナヘビ共に 868 アミノ酸残基であった。アライメントの結果, 他の種で見られる PRD, TM, PL, TRP, CaMBD といった主要構造を保持しているようであった(Fig.

8). 他の四足動物と非常によく似た配列であり, カナヘビ-シマヘビ間の配列相同性は 96%, ニワトリ間では 85%, ヒト間で 84%, マウス間で 83%, ラット間で 83%, カエル間で 79%であり, 爬虫類の TRPV4 は鳥類と相同性が高いことが分かった. 四足動物間における C-末端領域の比較解析の結果, ニワトリのみ 5 アミノ酸残基短く, カナヘビ, シマヘビなどの爬虫類と哺乳類, 両生類は同じ長さであった. N-末端領域の比較解析の結果, 爬虫類のみに見られる一か所の GAP があった. また, 2 か所の GAP がニワトリにあることが分かり, それぞれ 5 アミノ酸残基と 7 アミノ酸残基の計 12 アミノ酸残基, 爬虫類よりも短いことが分かった.

ごく一部であったが, カメ, シマヘビの TRPA1 配列をそれぞれ 94, 30 アミノ酸残基得ることが出来た. アライメントの結果, GAP の位置はショウジョウバエを除く他の種と一致しており, 配列についても相同性が高い傾向にあった (Fig. 9).

	10	20	30	40	50	60	70	80	
								
turtle_TRPV2	LIALMSETVTNVSGYSKSVWKLQRAIAILEIEKSWLWCPRRRQRSGCFLSVSLDD—KKDMRWCFRVEEINWANWEKELG								78
chicken_TRPV2	LIALMSETVTDISGYKSVWKLQRAIAILEIEKAWLWRGGKRRSGCLMSVGLN—KKDERWCFRVEEIKWTSNAKEVG								77
human_TRPV2	LIALMSETVNSVATDSWSIWKLOKATISVLEMENGYWCR—KKQRAGVMLTVGKPDGSPDERWCFRVEEVNWAWEQTLP								79
mouse TRPV2	LIALMSETVNSVATDSWSIWKLOKATISVLEMENGYWCRKRKRHRAGRLLKVGTKGDGIPDERWCFRVEEVNWAWEKTL								80
rat TRPV2	LIALMSETVNHVADNSWSIWKLOKATISVLEMENGYWCRKKHREGRLKVGTRGDGTPDERWCFRVEEVNWAWEKTL								80
frog_TRPV2	LIALMSETVSKISSESISWKLQRAATILDIERFIPRFIRKKLKIQQWLVGKSPDGNPDKRWCFRVEEMVWGSWEKDLA								80
	TM6		TRP						
		90	100	110	120	130	140		
								
turtle_TRPV2	VIKEDPGNSRDLEIESLVKRVDRMSRGQANAAPEEQLPLOPLASD*								126
chicken_TRPV2	VLKEEPGNTNDLEINPEETRSRKQVPOKQLRSVAVSEEQSLLOPELSATEMMPLKGQTRNL*								138
human_TRPV2	TLCEDPSGAGVPRT—LENPVLASPPKEDEGASEENYVPVQLQSN*								125
mouse TRPV2	TLSEDPSGAGITGY—KKNP—TSKPGKNSASEEDHLPLQVLQSH*								122
rat TRPV2	TLSEDPSGPGITGN—KKNP—TSKPGKNSASEEDHLPLQVLQSP*								122
frog_TRPV2	NINEEP—GDTEK GK—LSSS—KKTGKSALSEYTNLLIQKH—								117

Fig. 5. Comparison of amino acid sequences of TRPV2 from turtle with those of other animals. Partial amino acid sequence of TRPV2 from turtle, which was deduced from cDNA, was aligned with those of human, mouse, chicken, and frog. TM and TRP indicate transmembrane regions and TRP domain, respectively. Numbers shown on the right are amino acid positions for each sequence. Hyphens indicate deletions made for maximal matching.

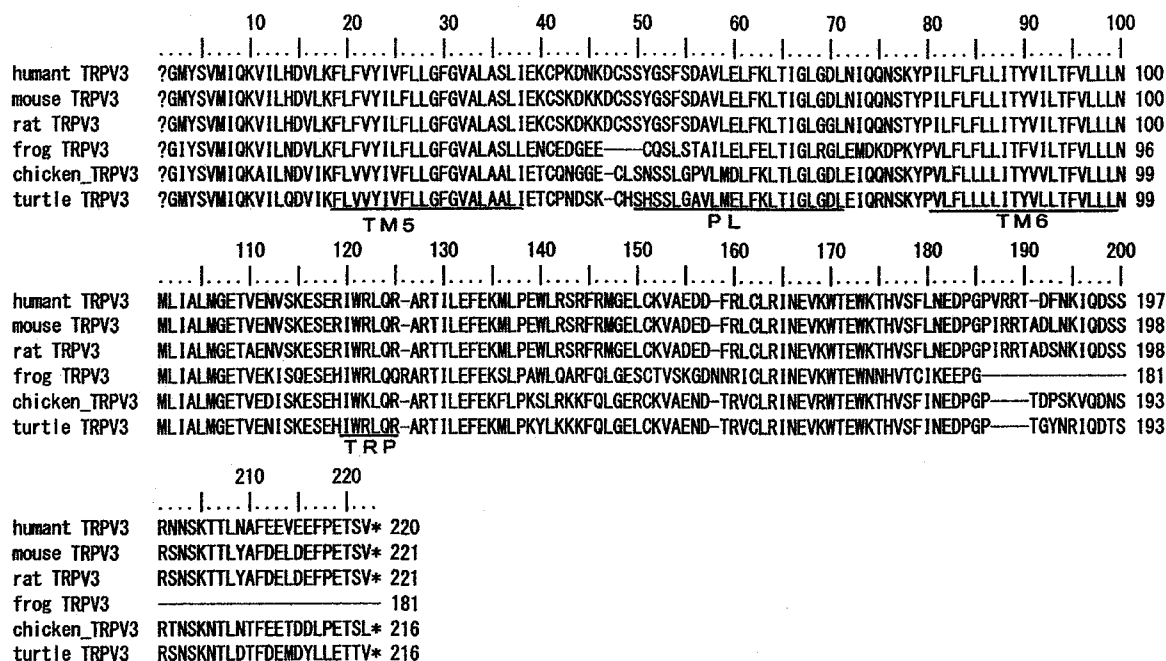


Fig. 6. Comparison of amino acid sequences of TRPV3 from turtle with those of other animals. Partial amino acid sequence of TRPV3 from turtle, which was deduced from cDNA, was aligned with those of human, mouse, chicken, and frog. TM, PL and TRP indicate transmembrane regions, pore region and TRP domain, respectively. Numbers shown on the right are amino acid positions for each sequence. Hyphens indicate deletions made for maximal matching.

lizard TRPV4	MANLEDAAHASPESESTESFSEE-LSPONDSPFLSSLANLFEENEDG--APAAEAARTPPGAGDGKQNLRMKRFHGAFRKGVNPNMDLLESTIYESSVVPGP 97
snake TRPV4	MANLEDAAHASPESESTESFSEE-LSPONDSPFLSSLANLFEENEDG--APAAEAARTPPGAGDGKQNLRMKRFHGAFRKGVNPNMDLLESTIYESSVVPGP 97
human TRPV4	MADSEEGPRAAGPEVAELPGDESGTGGGAFFLSSLANLFEEDGSLSPADASRPAGPGDGRNLRMKFQGAFRKGVNPNIDLESTIYESSVVPGP 100
mouse TRPV4	MADPDGCPRAAPGVAEPGDESGTGGGAFFLSSLANLFEEDGSLSPADASRPAGPGDGRNLRMKFQGAFRKGVNPNIDLESTIYESSVVPGP 100
chicken TRPV4	MADPED-----PRDAGDVLGDD-----SFPLSSLANLFEEDT--PSPAEPSPRGPPGAGDGKQNLRMKRFHGAFRKGVNPNIDLESTIYESSVVPAPK 86
frog TRPV4a	MADPSHLKRNASVDIDDSQDDGSGNHNDSFPLSSLANLFEENE--SAPNEGVRSPQVPGDNKQNLRIRFQGFPRKGI-SNPMDLLESTIYESS---APK 95
lizard TRPV4	KAPMDSLFYDGYTRHHPSDNKRKRK-ALEKPPSTKGPAPHPPIIKVFNRPILFDIVSRGSTADLDGLLPFLTHKKRLTDEEFREPSTGKTCPLKAL 196
snake TRPV4	KAPMDSLFYDGYTRHHPSDNKRKRK-ALEKPPSTKGPAPHPPIIKVFNRPILFDIVSRGSTADLDGLLPFLTHKKRLTDEEFREPSTGKTCPLKAL 196
human TRPV4	KAPMDSLFYDGYTRHHSSDNKRKRK-1IEKQPSPKAPAPQPPPIIKVFNRPILFDIVSRGSTADLDGLLPFLTHKKRLTDEEFREPSTGKTCPLKAL 199
mouse TRPV4	KAPMDSLFYDGYTRHHPSDNKRKRK-VVEKQPSPKAPAPQPPPIIKVFNRPILFDIVSRGSTADLDGLLPFLTHKKRLTDEEFREPSTGKTCPLKAL 199
chicken TRPV4	KAPMDSLFYDGYTRQHPSPENRKRKR-VVEKVPAGTKGAPAPNPPVILKVFNRPILEDIVSRGSTADLEGLLSFLTHKKRLTDEEFREPSTGKTCPLKAL 185
frog TRPV4a	KAPMDSLFYDGYTRHHPTENRKRKRKILKEKHLNSQAPSPDPPIVIRHPRHMLDIVSRGSTAELEGFLPFLTHKKRLTDEEFREPSTGKTCPLKAL 195
lizard TRPV4	LNLNNGKNDTIPFLDIAERTGSTRFINSFPRDYYRQGTALHIAIERRCKHYVELLVEKQADVHAQARGRFQPKDEGGYFFGELPLSLAACTNQP 296
snake TRPV4	LNLNNGKNDTIPFLDIAERTGSTRFINSFPRDYYRQGTALHIAIERRCKHYVELLVEKQADVHAQARGRFQPKDEGGYFFGELPLSLAACTNQP 296
human TRPV4	LNLNNGKNDTIPFLDIAERTGSTRFINSFPRDYYRQGTALHIAIERRCKHYVELLVEKQADVHAQARGRFQPKDEGGYFFGELPLSLAACTNQP 289
mouse TRPV4	LNLNNGKNDTIPFLDIAERTGSTRFINSFPRDYYRQGTALHIAIERRCKHYVELLVEKQADVHAQARGRFQPKDEGGYFFGELPLSLAACTNQP 299
chicken TRPV4	LNLNNGKNDTIPFLDIAERTGSTRFINSFPRDYYRQGTALHIAIERRCKHYVELLVEKQADVHAQARGRFQPKDEGGYFFGELPLSLAACTNQP 285
frog TRPV4a	LNLNNGKNDTIPFLDIAERTGSTRFINSFPRDYYRQGTALHIAIERRCKHYVELLVEKQADVHAQARGRFQPKDEGGYFFGELPLSLAACTNQP 295
lizard TRPV4	IVHYLTENAKHQADLRQDSRGNTVLHALVAIADNTRENTKFKVTKMYDILLKCAKLEFPDINLEALLNNDGLSPMLMAAKTKGIGVPHIIRREIKDEDA 396
snake TRPV4	IVQYLTEAARHQADLRQDSRGNTVLHALVAIADNTRENTKFKVTKMYDILLKCAKLEFPDINLEALLNNDGLSPMLMAAKTKGIGVPHIIRREIKDEDA 396
human zTRPV4	IVNYLTENPHKADMRQDSRGNTVLHALVAIADNTRENTKFKVTKMYDILLKCAKLEFPDINLEALLNNDGLSPMLMAAKTKGIGVPHIIRREIKDEDA 399
mouse TRPV4	IVNYLTENPHKADMRQDSRGNTVLHALVAIADNTRENTKFKVTKMYDILLKCAKLEFPDINLEALLNNDGLSPMLMAAKTKGIGVPHIIRREIKDEDA 399
chicken zTRPV4	IVHYLTENAKHQADLRQDSRGNTVLHALVAIADNTRENTKFKVTKMYDILLKCAKLEFPDINLEALLNNDGLSPMLMAAKTKGIGVPHIIRREIKDEDA 385
frog TRPV4a	IVHYLTENAKHQADLRQDSRGNTVLHALVAIADNTRENTKFKVTKMYDILLKCAKLEFPDINLEALLNNDGLSPMLMAAKTKGIGVPHIIRREIKDEDA 395
lizard TRPV4	RHLSRKFRDWAYGPVYSSLYDLSLSDTCGEEVSVLEILVYNSKIENRHEMLAVEPINELLRDRKWRKFGAVSFYISVVSYLCAMIIFTMVAAYRPLEGTP 496
snake TRPV4	RHLSRKFRDWAYGPVYSSLYDLSLSDTCGEEVSVLEILVYNSKIENRHEMLAVEPINELLRDRKWRKFGAVSFYISVVSYLCAMIIFTMVAAYRPLEGTP 496
human TRPV4	RHLSRKFRDWAYGPVYSSLYDLSLSDTCGEEVSVLEILVYNSKIENRHEMLAVEPINELLRDRKWRKFGAVSFYISVVSYLCAMIIFTMVAAYRPLEGTP 499
mouse TRPV4	RHLSRKFRDWAYGPVYSSLYDLSLSDTCGEEVSVLEILVYNSKIENRHEMLAVEPINELLRDRKWRKFGAVSFYISVVSYLCAMIIFTMVAAYRPLEGTP 499
chicken TRPV4	RHLSRKFRDWAYGPVYSSLYDLSLSDTCGEEVSVLEILVYNSKIENRHEMLAVEPINELLRDRKWRKFGAVSFYISVVSYLCAMIIFTMVAAYRPLEGTP 485
frog TRPV4a	RHLSRKFRDWAYGPVYSSLYDLSLSDTCGEEVSVLEILVYNSKIENRHEMLAVEPINELLRDRKWRKFGAVSFYISVVSYLCAMIIFTMVAAYRPLEGTP 495
lizard TRPV4	YPYTTITDYLRLAGEIVTLFTGVLFFFINIKDLFMKRCPCGVNSFFIDGSQLLYPIYSVLVVAALYLAGIEAYLAVMVFALVIGWNNALYFTRGLKLT 596
snake TRPV4	YPYTTITDYLRLAGEIVTLFTGVLFFFINIKDLFMKRCPCGVNSFFIDGSQLLYPIYSVLVVAALYLAGIEAYLAVMVFALVIGWNNALYFTRGLKLT 596
human TRPV4	YPYTTITDYLRLAGEIVTLFTGVLFFFINIKDLFMKRCPCGVNSFFIDGSQLLYPIYSVLVVAALYLAGIEAYLAVMVFALVIGWNNALYFTRGLKLT 599
mouse TRPV4	YPYTTITDYLRLAGEIVTLFTGVLFFFINIKDLFMKRCPCGVNSFFIDGSQLLYPIYSVLVVAALYLAGIEAYLAVMVFALVIGWNNALYFTRGLKLT 599
chicken TRPV4	YPYTTITDYLRLAGEIVTLFTGVLFFFINIKDLFMKRCPCGVNSFFIDGSQLLYPIYSVLVVAALYLAGIEAYLAVMVFALVIGWNNALYFTRGLKLT 585
frog TRPV4a	YPYTTITDYLRLAGEIVTLFTGVLFFFINIKDLFMKRCPCGVNSFFIDGSQLLYPIYSVLVVAALYLAGIEAYLAVMVFALVIGWNNALYFTRGLKLT 595
lizard TRPV4	GTYSIMIQLFKDLFRFLVYLLFMIGYASALVSLNPNCPSEACSEERSNCTAPAYPSCRDSKTFSNFDLDFKLTICMGDLEMESAKYFVGVFVILL 696
snake TRPV4	GTYSIMIQLFKDLFRFLVYLLFMIGYASALVSLNPNCPSEACSEERSNCTAPAYPSCRDSKTFSNFDLDFKLTICMGDLEMESAKYFVGVFVILL 696
human TRPV4	GTYSIMIQLFKDLFRFLVYLLFMIGYASALVSLNPNCPSEACSEERSNCTAPAYPSCRDSKTFSNFDLDFKLTICMGDLEMESAKYFVGVFVILL 699
mouse TRPV4	GTYSIMIQLFKDLFRFLVYLLFMIGYASALVSLNPNCPSEACSEERSNCTAPAYPSCRDSKTFSNFDLDFKLTICMGDLEMESAKYFVGVFVILL 699
chicken TRPV4	GTYSIMIQLFKDLFRFLVYLLFMIGYASALVSLNPNCPSEACSEERSNCTAPAYPSCRDSKTFSNFDLDFKLTICMGDLEMESAKYFVGVFVILL 685
frog TRPV4a	GTYSIMIQLFKDLFRFLVYLLFMIGYASALVSLNPNCPSEACSEERSNCTAPAYPSCRDSKTFSNFDLDFKLTICMGDLEMESAKYFVGVFVILL 695
lizard TRPV4	VTYIILTFVLLNMLIALMGETVGVQSKESKHIWKLQWATTILDIERFSPVFRKAFRSGEMVTGKSLDGTDRRRCFRVDEVNNSHWNLGLIINEDP 796
snake TRPV4	VTYIILTFVLLNMLIALMGETVGVQSKESKHIWKLQWATTILDIERFSPVFRKAFRSGEMVTGKSLDGTDRRRCFRVDEVNNSHWNLGLIINEDP 796
human TRPV4	VTYIILTFVLLNMLIALMGETVGVQSKESKHIWKLQWATTILDIERFSPVFRKAFRSGEMVTGKSLDGTDRRRCFRVDEVNNSHWNLGLIINEDP 799
mouse TRPV4	VTYIILTFVLLNMLIALMGETVGVQSKESKHIWKLQWATTILDIERFSPVFRKAFRSGEMVTGKSLDGTDRRRCFRVDEVNNSHWNLGLIINEDP 799
chicken TRPV4	VTYIILTFVLLNMLIALMGETVGVQSKESKHIWKLQWATTILDIERFSPVFRKAFRSGEMVTGKSLDGTDRRRCFRVDEVNNSHWNLGLIINEDP 785
frog TRPV4a	VTYIILTFVLLNMLIALMGETVGVQSKESKHIWKLQWATTILDIERFSPVFRKAFRSGEMVTGKSLDGTDRRRCFRVDEVNNSHWNLGLIINEDP 795
lizard TRPV4	GKNDTYQYGFESHVGRRLRRDRWSIVPRVVELNKN-LQDDEVVPLDSMRSAPANEKPSYQSWRKE DSHI* 868
snake TRPV4	GKNDTYQYGFESHVGRRLRRDRWSIVPRVVELNKN-SQPDEVVPLDSMCSAGANAHKPSYHSHWRKEDAQI* 868
human TRPV4	GKNETYQYGFESHVGRRLRRDRWSIVPRVVELNKN-SNPDEVVPLDSMGNPCDGHQOQYPRKWRDDAPL* 871
mouse TRPV4	GKSEYQYGFESHVGRRLRRDRWSIVPRVVELNKN-SSADEVVVPLDNLGNPCDGHQOQYAPKWRDDAPL* 871
chicken TRPV4	GKSDIYQYGFESHVGRRLRRDRWSIVPRVVELNKS-CPTEDVVVPLDNLGTAEARERRHG-----QIPSSPL* 852
frog TRPV4a	GRNDGYQYGFESHVGRRLRRDRWSIVPRVVELNKNAPQHSDDVVVPLGNIPQVQYTSQRQENAQWKRKDETHI* 868

Fig. 7. Comparison of amino acid sequences of TRPV4 from lizard and snake with those of other animals. Entire amino acid sequences of TRPV4 from lizard and snake, which were deduced from cDNA, were aligned with those of human, mouse, chicken, and frog. PRD, TM, PL, TRP, ARD and CaMBD indicate proline-rich domain, transmembrane regions, pore region or pore loop, TRP domain, ankyrin-repeat domain and calmodulin binding domains, respectively (Phelps et al., 2008; Everaerts et al., 2010). Numbers shown on the right are amino acid positions for each sequence. Hyphens indicate deletions made for maximal matching

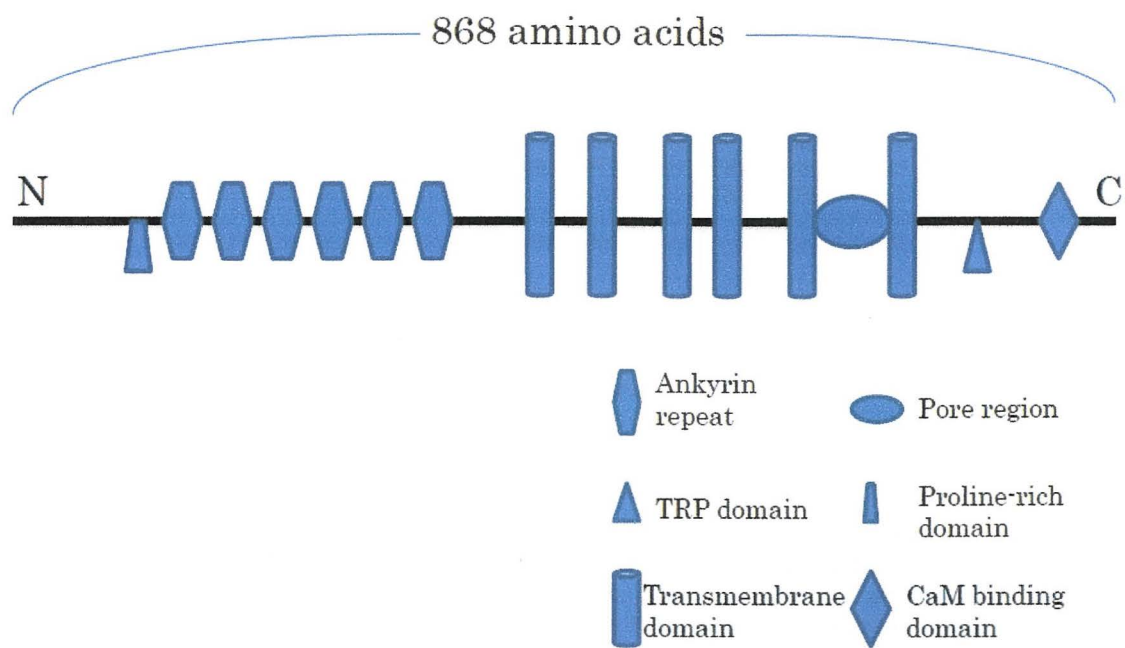


Fig. 8. Structure of the reptilian TRPV4.

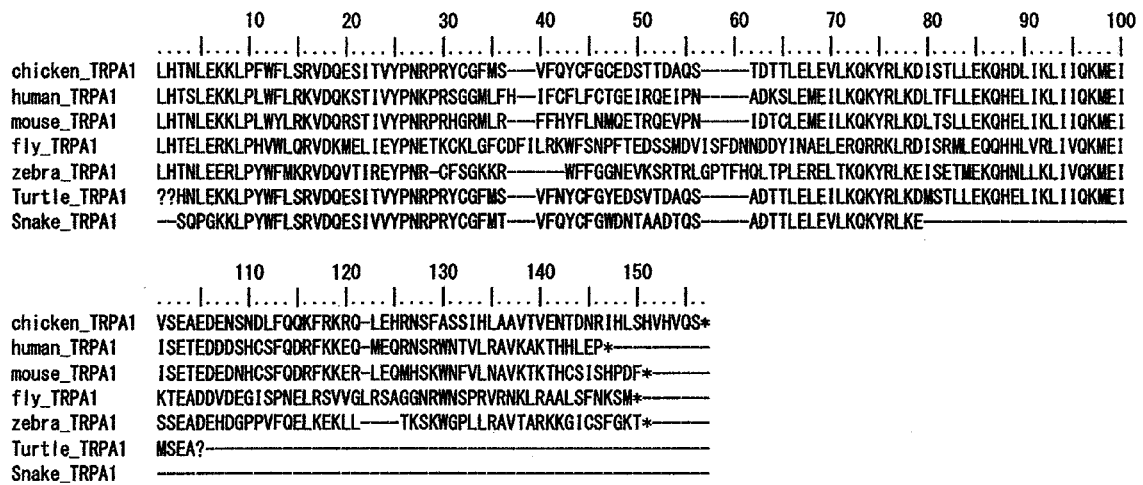


Fig. 9. Comparison of amino acid sequences of TRPA1 from turtle and snake with those of other animals. Partial amino acid sequence of TRPA1 from turtle and snake, which was deduced from cDNA, were aligned with those of human, mouse, chicken, zebrafish and fruit fly. Numbers shown on the right are amino acid positions for each sequence. Hyphens indicate deletions made for maximal matching.

2.5. 考察

本章の結果から、爬虫類の thermo TRP のレパートリーは 6 つであり、他の四足動物と同様の温度感受機構が備わっている可能性があることが示唆された。

哺乳類の培養細胞において、TRPV1 の C-末端領域を欠失すると、活性化温度域が低下することが分かっている (vlachova et al., 2003)。また、哺乳類では高温感受域である TRPV1 と低温感受域の TRPM8 の C-末端領域を入れ替えると温度感受域も入れ替わったという報告がある (Brauchi et al., 2006)。これらのことから、thermo TRPs の温度感受機能は C-末端領域が重要であることが示唆されているため、C-末端領域について重点的に解析した。アミノ酸配列を他種と比較した構造解析を行った結果、カメの TRPV2 の C-末端の長さは哺乳類の長さと同じで、近縁であると考えられている鳥類のニワトリより 12 アミノ酸残基短いことが明らかとなった。長さで考えると爬虫類の TRPV2 は鳥類ではなく哺乳類と同じであったため、哺乳類と同様の温度感受域であることが考えられる。TRPV3 においては、爬虫類の配列と鳥類の配列は C-末端領域の長さが一致したことから、C-末端領域の長さで考えると、爬虫類と鳥類の TRPV3 の温度感受域はほぼ一緒であると予想される。TRPV4 において、爬虫類の全アミノ酸配列を決定した結果、他の種に見られるような各主要ドメインを保持しており (Fig. 8)、他の種との配列相同性も非常に高いことから、爬虫類の TRPV4 は他の種で報告されている、温度の他に浸透圧や化学物質などの受容体としての機能を保持していると考えられる。また、鳥類であるニワトリと配列の相同性が一番高く、次いで哺乳類、両生類のカエルであった。また、C-末端領域の長さはニワトリ

のみ5アミノ酸残基短く、他の爬虫類、哺乳類、両生類共に一致していた。C-末端領域の長さの解析からは、爬虫類は哺乳類、両生類と同じ温度重要域であり、鳥類が異なる重要域を持つとも考えられる。TRPV4の感受温度は27-42℃と言われているが(Watanabe et al., 2002)、その温度感受機能についてはまだ不明瞭な点が多く、温度感受性のあるアミノ酸ドメイン等はよく分かっていない。爬虫類での活性化温度を調べることにより、今後の温度感受機能についての解明に役立つと考えられる。

さらに本章では、カメのTRPA1ホモログを皮膚のcDNAを用いたRT-PCRによって決定することが出来た。爬虫類ではニシキヘビやガラガラヘビによりTRPA1の存在がすでに知られてはいたが、今回得られたTRPA1のアミノ酸配列は短く、C-末端の長さ、配列ともに不明な点が多いものの、カメによるTRPA1の報告例はないため、本研究で新たに同定することが出来た。さらに多くのアミノ酸配列を決定し、C-末端領域や全長の構造解析をすることが、TRPA1のさらなる研究に必要不可欠である。

第3章

脊椎動物における thermo TRP の系統解析

3.1 背景と目的

第2章でカメの TRPV2, 3, 4, TRPA1 の一部, シマヘビの TRPV3, TRPA1 の一部と TRPV4 の全長, カナヘビの TRPV4 の全長のアミノ酸配列を同定することができた。アミノ酸配列による構造解析からは、それぞれが他の生物種と高い相同性を持っていることが分かった。しかしながら、爬虫類の thermo TRP はどの種のアミノ酸配列と近縁であるか、つまり、各遺伝子の配列は変温動物と恒温動物のどちらに似ているのかについては明らかとなっていないため、これを調べるために、第2章で得られた配列を系統解析する必要がある。そこで本章では第2章で得られた配列を他の脊椎動物の配列とともに系統解析することを試みた。

3.2 材料

材料については第2章参照

3.3. 方法

3.3.1. RNA 抽出, RT-PCR, PCR 法については第2章参照

3.3.2. 系統解析

系統解析は MEGA 4.0 ソフトウェア (Tamura et al., 2007) を用いて, minimum-evolution 法 (ME; Rzhetsky and Nei, 1987) で行った. データベースによる blast 解析は, ウェブサイト Ensembl Genome Browser (<http://asia.ensembl.org/index.html>) にて, ヒトの TRPVs 及び TRPA1 をクエリーとして実行した.

3.4 結果

本章では, 第 2 章で得られたカメの TRPV2, 3, シマヘビとカナヘビの TRPV4 の配列を利用して分子系統樹を作成し, 分子進化学的解析を行った. 系統樹は TPV1~4 の TM6 の終わりから C-末端のストップコドンまでの 167 アミノ酸残基を利用して作成した (Fig. 10). さらに, シマヘビとカナヘビの TRPV4 の 656 アミノ酸残基を用いて (カナヘビの 141-796 の位置に当たる), TPV1~4 の系統樹を作成した (Fig. 11). 両方の分子系統樹には, アウトグループとして, ヒトとマウスの TRPV5, 6 をそれぞれ用いた. Fig. 10, 11 の結果から, TRPV のサブファミリーはそれぞれ TRPV1, 2, 3, 4 の独立したクラスターを形成した. アウトグループの TRPV5, 6 はそれらから離れた樹形となった.

TRPV2 の系統解析の結果, カメとニワトリがクレードを形成し, ニワトリ, ターキー, ゼブラフィンチの鳥類と姉妹群を形成したため, カメの TRPV2 の配列は鳥類の配列と相

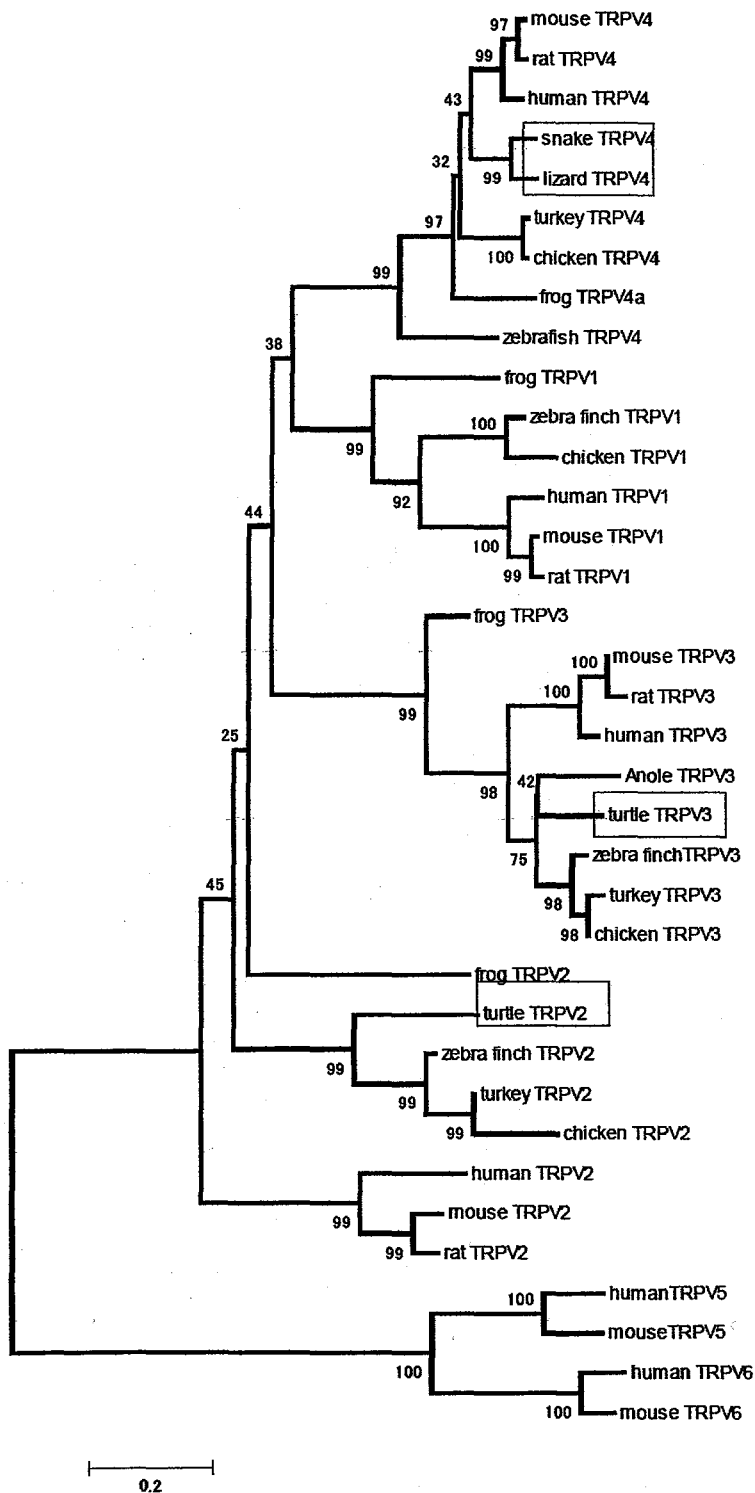


Fig. 10. Phylogenetic tree constructed with vertebrate TRPVs. The tree was constructed with amino acid sequence of TRPVs from various vertebrate, which contains the end of TM6 to stop codon (167 residues). Each sequence was aligned for the same region, and used for the tree construction by ME method (Rzhetsky et al., 1992). Bootstrap values were calculated from 1,000 replicates and indicated at the branches (>50%). Genes that the amino acid sequences were determined in this study are square.

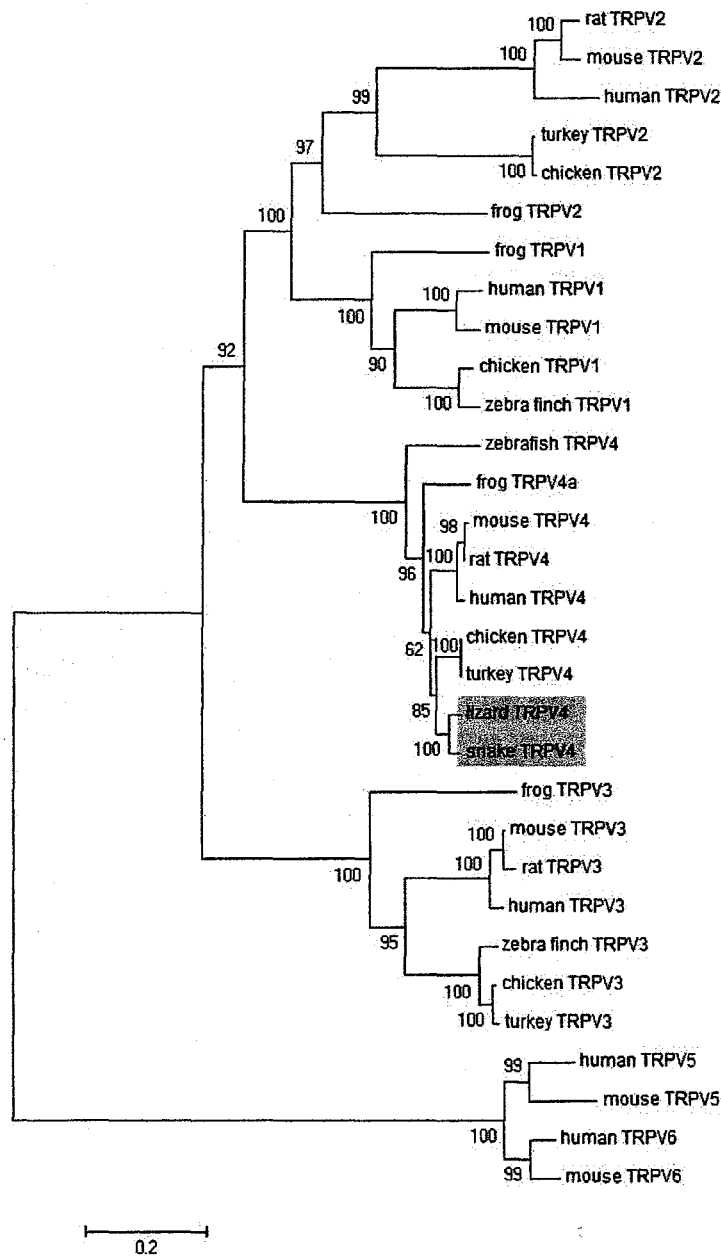


Fig. 11. Phylogenetic tree constructed with vertebrate TRPVs. The tree was constructed with amino acid sequence of TRPVs from various vertebrate, which contains conserved domains including the ankyrin repeat and transmembrane domains (656 residues, corresponding to position from 141 to 796 in lizard TRPV4). Each sequence was aligned for the same region, and used for the tree construction by ME method (Rzhetsky et al., 1992). Bootstrap values were calculated from 1,000 replicates and indicated at the branches (>50%). Genes that the amino acid sequences were determined in this study are shaded. Database accession numbers of the genes used for the tree construction are; human TRPV1: AJ277028, mouse TRPV1: AB180097, rat TRPV1: AF029310, chicken TRPV1: AY072909, zebra finch TRPV1: XP_002195940, frog TRPV1 pre: XM_002938256, human TRPV2: Af129112, mouse TRPV2: AB021665, rat TRPV2: AF129113, chicken TRPV2: XM_415848, turkey TRPV2 pre: ENSMGAT00000007327, zebra finch TRPV2: XP002195797, frog TRPV2 pre: ENSGALT00000012785, human TRPV3: AJ487035, mouse TRPV3: AF510316, rat TRPV3: AY325813, chicken TRPV3 pre: ENSGALT00000007425, turkey TRPV3 pre: ENSMGAT00000007547, zebra finch TRPV3: XP002195959, anole (green anole) TRPV3 pre: ENSACAT00000001754, frog TRPV3 pre: XM_002938252, human TRPV4: AF263523, mouse TRPV4: AF263521, rat TRPV4: AF263521, chicken TRPV4: AF261883, turkey TRPV4 pre: ENSMGAT00000007141, zebrafish TRPV4: DQ858167, frog TRPV4a pre: ENSXETT00000040300, human TRPV5: NM019841, mouse TRPV5: NM001007572, human TRPV6: NM018646, mouse TRPV6: NM022413.

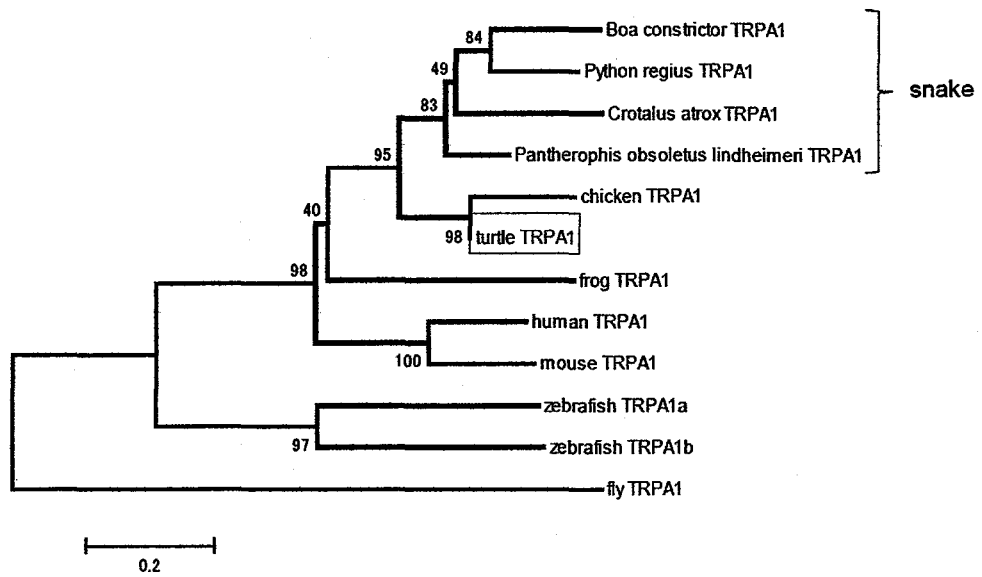


Fig. 12. Phylogenetic tree constructed with vertebrate TRPA1. The tree was constructed with 94 amino acid residue sequence of TRPA1 from various vertebrate. Each sequence was aligned for the same region, and used for the tree construction by ME method (Rzhetsky et al., 1992). Bootstrap values were calculated from 1,000 replicates and indicated at the branches (>50%). Genes that the amino acid sequences were determined in this study are square Database accession numbers of the genes used for the tree construction are: human TRPA1: y10601, chicken TRPA1 pre: XM_418294, mouse TRPA1: ay231177, zebrafish TRPA1: AY677196, fruit fly TRPA1: ay302598, Boa TRPA1: GU562969, Python TRPA1: GU562969, Crotalus atrox TRPA1: GU562967, Pantherophis obsoletus lindheimeri TRPA1: GU562966. Genes that the amino acid sequences were determined in this study are square.

同性が高いことが分かった(Fig. 10). 一方, 哺乳類の TRPV2 とは離れた樹形であることから, TRPV2 の C-末端領域の配列は哺乳類と鳥類・爬虫類の配列とそれほど相性は高くないことが分かった.

TRPV3 の系統解析の結果, カメとデータベース検索からダウンロードしたグリーンアノールが爬虫類同士でクレードを形成し, ニワトリ, ターキー, ゼブラフィンチの鳥類がクレードを形成し, それぞれ姉妹群を形成する樹形となった(Fig. 10). さらに鳥類・爬虫類グループと哺乳類が姉妹群を形成し, カエルが最も離れている樹形となった.

TRPV4 の全長を用いた系統解析の結果, カナヘビとシマヘビは爬虫類同士でグルーピングし, ニワトリ・ターキーの鳥類とクレードを形成した. また, 哺乳類とは姉妹群を形成した(Fig. 11). TRPV4 の C-末端領域で解析した系統樹でも Fig. 11 と同様にカナヘビ, シマヘビの爬虫類同士がグルーピングした(Fig. 10). 一方で, 爬虫類グループと哺乳類が姉妹群を形成したことから, C-末端領域においては, 爬虫類は鳥類ではなく哺乳類に似た配列であることが分かった.

TRPA1 の系統解析は 94 アミノ酸残基を用いて行った. その結果, 本研究で得られたカメの配列は同じ爬虫類のヘビとではなく, 鳥類であるニワトリとクレードを形成した. また, 用いたヘビ 4 種でクレードを形成し, カメーニワトリグループと姉妹群を形成した(Fig. 12).

3.5. 考察

本章では、第2章で得られたアミノ酸配列をもとに系統解析を行った。

TRPV2において、長さで考えると爬虫類のTRPV2は鳥類ではなく哺乳類と同じであったため、哺乳類と同様の温度感受域であると予想されるが、本章でのカメのTRPV2の系統解析からは、哺乳類ではなく鳥類であるニワトリと似ていたため、鳥類と同様の温度感受域であるとも予想される。また、変温動物である爬虫類のTRPV2は、同じ変温動物のカエルよりも長さでは恒温動物の哺乳類寄り、配列の相同性では恒温動物の鳥類寄りであり、爬虫類のTRPV2は恒温動物に似ていると考えられる。TRPV2の温度に対する働きについてはまだ未解明である点が多く、爬虫類のTRPV2が何度で活性化するかといった実際の温度に対する働きを調べることが、TRPV2の温度感受機能の解明に大いに役立つと考えられる。

TRPV3においては、爬虫類の配列と鳥類の配列はC-末端領域の長さが一致し、アミノ酸配列を用いた系統解析の結果から、爬虫類と鳥類の相同性も高かったことから、爬虫類と。アミノ酸配列、C-末端領域の長さの比較解析の結果から、変温動物である爬虫類のTRPV3の感受温度領域は恒温動物である鳥類のTRPV3の温度感受域とほぼ一緒であると予想される。

TRPV4において、Fig. 10, 11共にシマヘビ、カナヘビの爬虫類同士でクラスターを形成し、アミノ酸配列の類似性も非常に高いことから、シマヘビ、カナヘビは同じ温度感受機構を保持していると考えられる。爬虫類のTRPV4の主要構造を含んだ領域における系統解析の結果、変温動物である爬虫類は変温動物のゼブラフィッシュ、カエルよりも恒温動物の鳥類と最もよく似ていることが分かった。哺乳類においてTRPV4の感受温度は

27-42°Cとされているが、(Watanabe et al., 2002)その温度感受機能についてはまだ不明瞭な点が多く、温度感受性のあるアミノ酸ドメイン等はよく分かっていない。爬虫類での活性化温度を調べることにより、今後の温度感受機能についての解明に役立つと考えられる。

TRPA1 において、すでに報告されているヘビの配列を用いた系統解析の結果から、カメと鳥類がクレード化し、ガラガラヘビ、ニシキヘビが姉妹群を形成する樹形となっていることから、カメと比較するとヘビは特異な配列であることが分かった(Fig. 12)。

本章で行った系統解析の結果、全ての TRP 遺伝子において、爬虫類と鳥類がクラスターを形成したことから、変温動物である爬虫類の thermo TRP は同じ変温動物である両生類よりも恒温動物である鳥類に類似していることが分かった。一方で、哺乳類の TRPA1 は低温感受性があるのに対し、ヘビの TRPA1 は温帯域感受性があるなど感受する温度がヘビでは異なっている。爬虫類全般の TRPA1 が温度感受域性なのか、ヘビのみがそうなのかについては不明であるが、系統樹からはヘビの配列が特異的であることから、カメの TRPA1 の温度感受域はおそらく鳥類や他の恒温動物と似ていると予想できるが、実際のどの位なのかは非常に興味深く、今後の研究が望まれる点である。

第 4 章

Thermo TRP 遺伝子の発現動態の解析

4.1. 背景と目的

第 3 章の系統解析の結果から、本研究で得られた配列は全て既知の thermo TRP とグループニングしたことから、目的通り爬虫類の thermo TRP ホモログを単離することが出来た。しかしながら、thermo TRPs は温度センサーとしての機能だけでなく、様々な化学物質により活性化するため、爬虫類 thermo TRP ホモログが温度センサーとしての働きを持っているかは今のところ不明である。

Thermo TRPs は温度センサーとして主に皮膚の末梢神経で発現が見られることが分かっている(Patapoutian et al., 2003)。そこで、本章では皮膚をはじめとする各組織における発現を調べ、既知の報告と比較することで爬虫類 thermo TRP ホモログの機能を推定することを目的とし、第 2 章で得られた各遺伝子を用いて、各組織から抽出した RNA に対して逆転写反応を行い、PCR によって発現解析を行った。

一方、脊椎動物の中で、両生類、爬虫類および哺乳類の一部の種は冬季の低温に対して冬眠という温度対策行動をとることが知られている。しかしながら、温度環境の変化に対して温度センサーによる温度の感受性は変化するのか、といった点についての報告例は未だない。

TRPV4 は非選択性であり、温度刺激の他に浸透圧、化学物質等によっても活性化し、

さらに皮膚を保護する機能もあると考えられている。このように TRPV4 は広く発現し、様々な働きをしているため、冬眠時における生体の変化を調べるのに適した温度センサーマーカーであると考えられる。そこで本章では冬眠中のカナヘビを用いて TRPV4 の発現解析を行うことで、冬眠中における温度に対する反応を調べることを目的とした。更に、仮に差異が出るとすれば、低温に対する反応なのか、冬眠に対する反応なのかも調べるために、人為的に低温状況下で飼育した個体も同時に解析することで、低温状態と冬眠状態の比較解析も行った。

4.2 材料

材料は発現解析には第 2 章と同様のものを用いた。冬眠時における発現動態の解析には、捕獲した野生のカナヘビを用いて、通常状態のコントロール、人為的に低温条件下で飼育した個体、冬眠状態の 3 つのグループに分けてこれらを用いた。人為的に低温処理を行った個体は、捕獲後のカナヘビを土壌と落ち葉などをいれたケージに入れ、餌を抜き水のみを与えて暗所で 48 時間 8°C に静置した。この低温処理は 7 月に行った。冬眠個体については、まず同上のケージで 11 月まで十分に餌を食せる環境下において室温で飼育した。その後、暗所で 8°C に静置した。冬眠は 11 月下旬から 4 月上旬までのおよそ 4 ヶ月間である。冬眠は、Grenot(2000) と Michaelidis(2002)らの報告を参考にして、個体の動きが著しく鈍くなる、呼吸が遅くなる、深い睡眠状態に入っている、ということにより確認を行った。

4.3. 方法

発現解析には第 2 章と同様の方法を用いた。低温処理を行った個体，冬眠中の個体共に解剖後，速やかに各組織ごとに total RNA を抽出し，逆転写反応により cDNA を合成後，遺伝子特異的 primer を用いた PCR により発現解析を行った(第 2 章参照)。コントロールとして mRNA のスプライシング時における細胞間の相互作用関連タンパクの WAC (Xu et al., 2002)と細胞骨格関連タンパクの一つである β -カテニン遺伝子の CTNNB1(Kraus et al., 1994)を用いた。

冬眠中の個体については，深く冬眠に入っている 1 月～2 月で 3 個体と，覚醒間近の 3 月下旬に 2 個体をそれぞれ解剖して RNA を抽出し，実験に用いた(Fig. 13)。

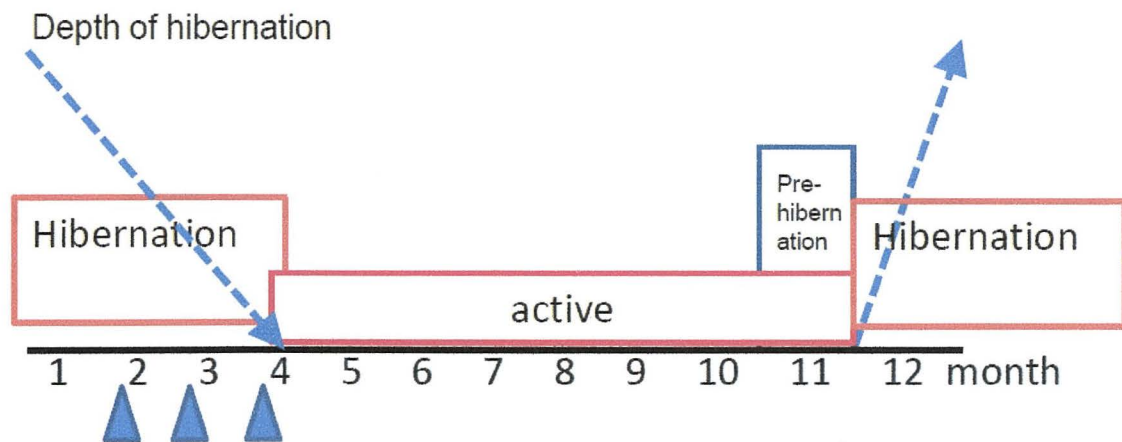


Fig. 13. Schematic representation of the hibernation. April to October are active periods, November is pre-hibernation period, late November to late March, reptiles enter hibernation. Arrows indicate the depth of hibernation. Triangles indicate date of sampling.

5. 結果

(1) 発現解析

カメにおける TRPV2 の発現解析の結果、脳、舌、肺、肝臓、皮膚での発現が観察された(Fig. 14). これは哺乳類で報告されている組織とほぼ同じパターンであり(Caterina et al., 1999; Patapoutian et al., 2003), 発現パターンによると哺乳類と同じ働きをもつものであると考えられる.

カメとシマヘビにおける TRPV3 の発現解析の結果、脳、舌、皮膚でのみ発現が観察された(Fig. 15). 哺乳類では舌、皮膚、末梢神経、背骨根での発現が報告されており、ほぼ一致していることが分かった(Smith et al., 2003; Patapoutian et al., 2003).

TRPV4 において、カメ、シマヘビ、カナヘビで発現解析をした結果、脳、舌、心臓、肺、肝臓、筋肉組織、皮膚と調べたすべての組織で発現が見られた(Fig. 16-A). また、ネガティブコントロールとして、without template, イネ, リンドウの cDNA を用いて TRPV4 の primer で PCR を行ったところ、増幅が見られなかった(Fig. 16-B). 哺乳類においても広く発現が確認されているため(Watanabe et al., 2002; Patapoutian et al., 2003;), TRPV4 も哺乳類と同様の働きを有していると考えられる.

TRPA1 をカメにおいて発現解析した結果、脳、舌、肺、筋肉組織、皮膚で発現が確認された(Fig. 17). 哺乳類においては、背骨根、末梢神経、内耳、皮膚で報告があったが(Story et al., 2003; Patapoutian et al., 2003), 内臓系組織での発現の報告例はない. TRPA1 は温度以外の化学物質でも活性化するという報告があるため、温度センサー以外の働きをこ

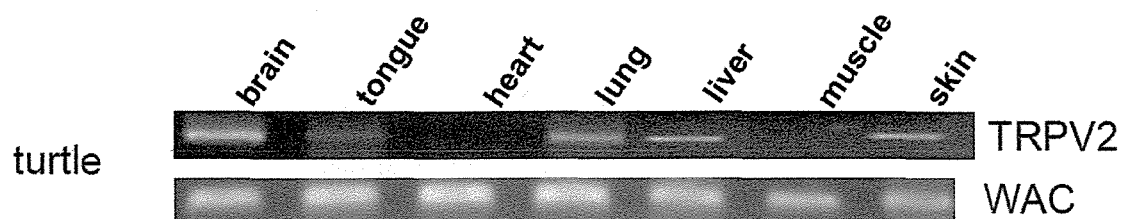


Fig. 14. Expression of TRPV2 mRNA in different tissues/organs turtle. Total RNAs from each tissue/organ was subjected to RT-PCR using TRPV2 -specific primers and the products were run on agarose gel (see MATERIALS AND METHODS). Control experiments were done using primers for WAC mRNA.

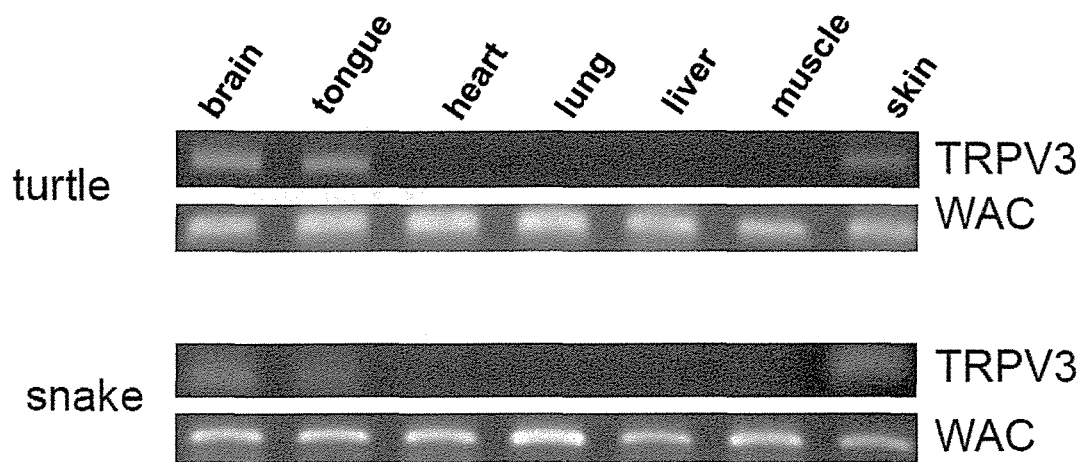


Fig. 15. Expression of TRPV3 mRNA in different tissues/organs in snake and turtle. Total RNAs from each tissue/organ was subjected to RT-PCR using TRPV3 -specific primers and the products were run on agarose gel (see MATERIALS AND METHODS). Control experiments were done using primers for WAC mRNA.

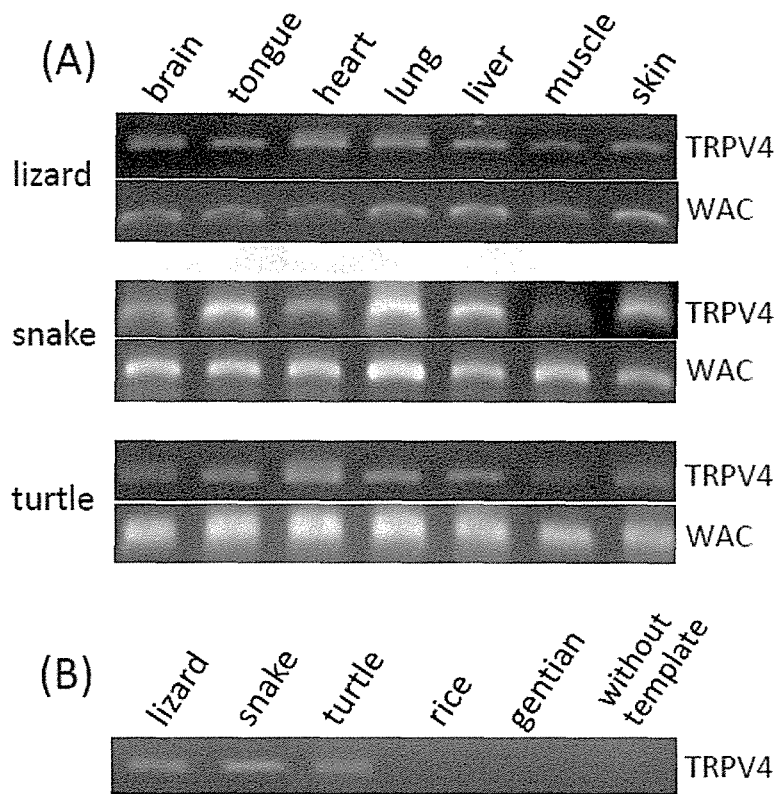


Fig.16. Expression of TRPV4 mRNA in different tissues/organs in lizard, snake, and turtle. (A) Expression of TRPV4 in lizard, snake and turtle. Total RNAs from each tissue/organ was subjected to RT-PCR using TRPV4 -specific primers and the products were run on agarose gel (see MATERIALS AND METHODS). Control experiments were done using primers for WAC mRNA. (B) Specificity of the TRPV4 primers. Total RNAs from rice (*Oryza sativa*) and gentian (*Gentiana triflora*) plants were used as templates for RT-PCR as in (A). Rice and gentian RNAs were negative controls, showing specificity of the primer.

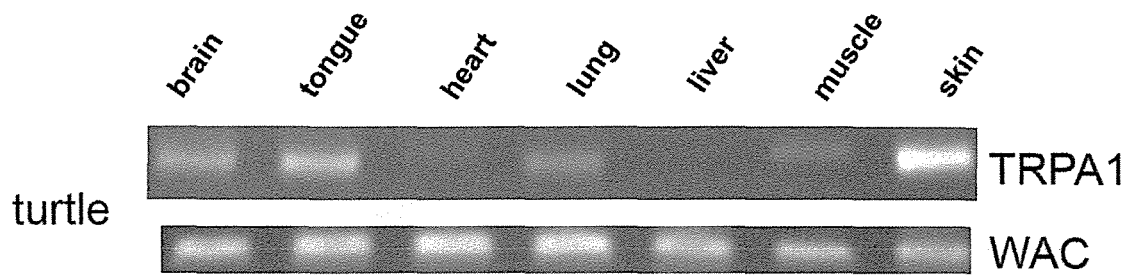


Fig. 17. Expression of TRPA1 mRNA in different tissues/organs in turtle. Total RNAs from each tissue/organ was subjected to RT-PCR using TRPA1 - specific primers and the products were run on agarose gel (see MATERIALS AND METHODS). Control experiments were done using primers for WAC mRNA.

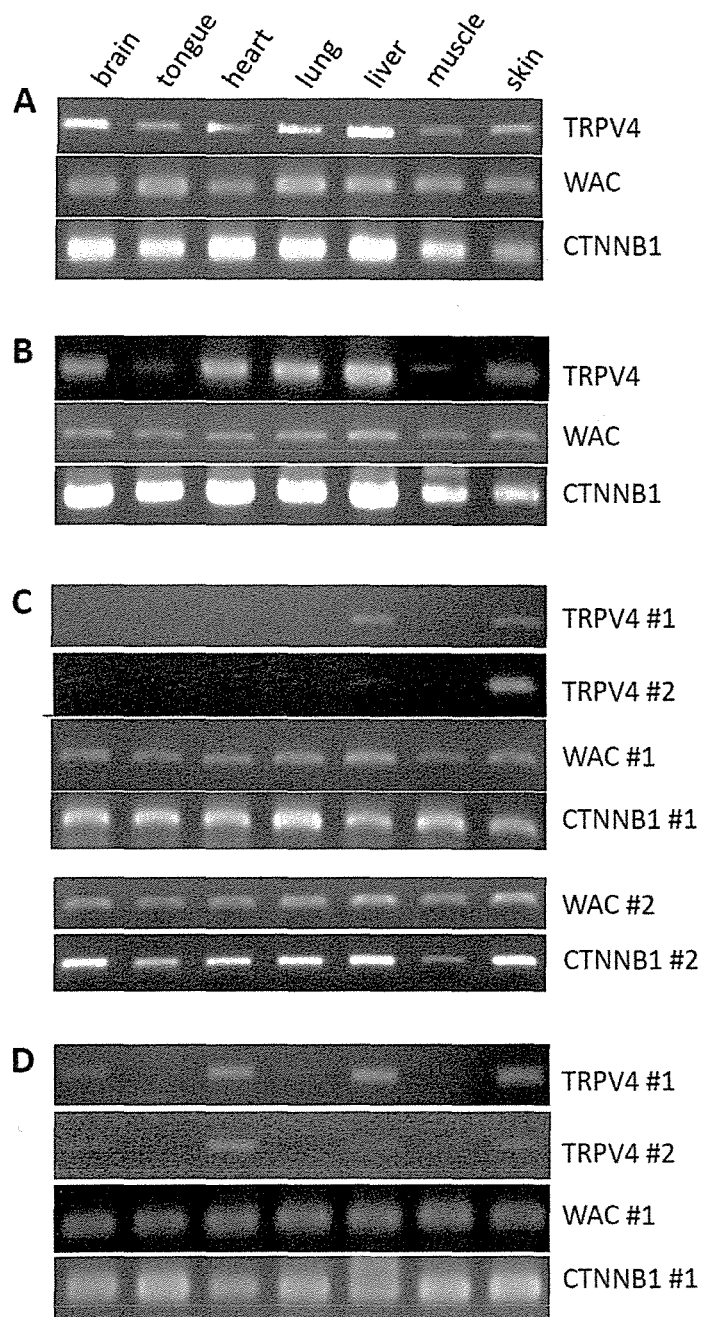


Fig. 18. Cold- and hibernation-related alternation of TRPV4 expression in different tissues/organs in the lizard. Expression of the mRNA was analyzed as in Fig. 3. (A) non-hibernating (control). (B) exposed at 8°C for 48h. (C) mid-hibernation (at the stage about 2 months after entering hibernation). (D) late hibernation (at about 4 months after entering hibernation). TRPV4 #1 and #2 in (C) and (D) indicate results from different animals under the same condition. WAC and CTNNB1 mRNAs were used as controls.

これらの器官で行っていると考えられる。

本章では、調べた全ての thermo TRPs は脳、皮膚と舌で発現することが分かった。脳は温度を感受して自身の体温調節に重要な器官の一つである。また、皮膚は外気温を感受するのに最も重要な器官であり、脳と皮膚における thermo TRPs の発現からは、爬虫類の thermo TRPs は温度感受機構が備わっていると予想することが出来る。さらに、調べた全ての thermo TRPs は舌でも発現が観察された。このことから、爬虫類は舌でも常に温度を感受していることが分かった。

(2) 冬眠時における発現動態

低温処理を行った個体と、冬眠時の個体において TRPV4 の発現解析を行った。低温処理個体の TRPV4 はコントロールの個体(Fig. 18-A)に比べて舌と筋肉組織において発現が低下していた(Fig. 18-B)。コントロールとして用いた WAC, CTNNB1 遺伝子については全ての組織で発現が一定であり、低温の影響はほとんどないことが分かった。

冬眠個体においては、1月下旬の冬眠から2カ月後にサンプリングした個体で、肝臓と皮膚を除く全ての組織で TRPV4 の発現が低下していた(Fig. 18-C)。3月下旬の冬眠から4ヶ月後、覚醒直前の個体においては、脳、心臓、肝臓、皮膚で発現が確認され、舌、肺、筋肉組織で TRPV4 の発現が低下していた(Fig. 18-D)。冬眠中においては全ての期間で肝臓、皮膚で TRPV4 が発現していることが分かった。一方、脳、舌、心臓、肺、筋肉組織といった他の器官では冬眠時は著しく発現が低下することが分かった。さらに、1月下旬の深く冬眠に入っている個体と、3月下旬の覚醒間近の個体の発現を比較したところ、3

月下旬の個体は脳、心臓での発現が回復していることが分かった。

コントロールとして用いた WAC, CTNNB1 遺伝子については全ての組織で発現が一定であり、冬眠時の影響はほとんどないことが分かった。

6. 考察

(1) 発現解析

TRPV2 の発現解析の結果、哺乳類同様カメの TRPV2 も広く発現していることが分かった。哺乳類における TRPV2 は 52℃以上の温熱傷程度の高温度で活性化することが分かっているため、致命的な温熱傷を避けるために色んな組織で発現しているのではないかと考えられる。しかし、温熱に暴露されない組織でも発現しているため、これらの組織では温度センサーとしてではなく、別の働きをしているとも考えられる。

TRPV3 の発現解析の結果、脳、舌、皮膚で発現が確認された。ヒトにおいて、TRPV3 はハーブの一種であるオレガノの成分であるカルバクロール感受性があることが分かっている(Xu et al., 2006)。爬虫類の TRPV3 は舌で発現していることが分かっている。本研究で得られた爬虫類の TRPV3 のアミノ酸配列は一部であるため、カルバクロール感受性のあるドメインを保持しているかは不明であるが、さらに TRPV3 のアミノ酸配列を決定し、カルバクロール感受性のあるドメインの有無が分かれば、爬虫類がオレガノの味を感じる事が出来るかもしれない。脳、皮膚は温度感受に重要な器官であるため、脳、皮膚における発現からは、爬虫類の TRPV3 は thermo TRP としての機能を持っていると考えられ

る。

TRPV4 は調べた全ての組織でユビキタスな発現が確認された。このことは、哺乳類における報告とも一致する(Watanabe et al., 2002; Patapoutian et al., 2003)。TRPV4 は浸透圧による感受性から、腎臓での発現が多いことが明らかとなっているが、本研究では腎臓での発現は確認できなかったため、爬虫類の TRPV4 が浸透圧感受性については不明である。カメ目であるミシシッピアカミミガメ、有鱗目であるシマヘビ、ニホンカナヘビでの発現が一致しているため、ワニ目においては確認されていないものの、爬虫類全般で発現が確認されたと考えられる。

TRPA1 の発現解析の結果、脳、舌、皮膚での発現が確認された。哺乳類の TRPA1 はタマネギやニンニクの成分である allicin 感受性があることが分かっていることから(Story et al., 2003)、爬虫類の TRPV3 のアミノ酸配列を調べることで、タマネギ、ニンニクの辛み成分を感じられるかが明らかとなると考えられる。さらに、ヘビでは TRPA1 はピット器官とよばれる赤外線センサー器官での発現が報告されており(Gracheva et al., 2010)、この器官はヘビ特有のものである。また、哺乳類の TRPA1 は 17°C 以下の冷温感受域であるがヘビの TRPA1 は 27°C-37°C 以上の温帯域で活性化するという報告もあり(Gracheva et al., 2010)、ヘビの TRPA1 は哺乳類に比べて特殊な機能を持っていることが分かっている。ヘビ以外の爬虫類ももしかすると哺乳類とは異なる機能・感受温度領域をもっているのではないかと考えられたため、今後、カメ、ヘビ亜目に近縁なトカゲ亜目といった他の爬虫類の実際の活性化温度を調べることで、今後の研究に役立つと考えられる。

(2)冬眠時における発現動態

本章の RT-PCR の結果から、爬虫類において、冬眠により TRPV4 の発現が低下したことから、TRPV4 の発現は冬眠によりコントロールされていることが分かった。冬眠時の個体においては、肝臓、皮膚でのみ発現がみられ、脳、舌、心臓、肺、筋肉組織での発現は確認できなかった。コントロールの個体と比べて発現が抑制されるという明らかな差異がみられ、この発現の抑制は、冬眠により引き起こされるのか、低温により引き起こされるのかを調べる必要がある。次に、低温処理を行った個体において発現解析を行った結果、舌や筋肉組織での発現が低下したことから、低温状況下では爬虫類の TRPV4 の発現は抑制される傾向にあることが分かった。これは、寒さにより筋肉組織の働きが低下するために誘引されたと考えられる。また、脳、舌、心臓、肺、肝臓、皮膚における発現はコントロールの個体とほぼ同じような発現レベルであり、これらの組織においてはユビキタな発現が確認された。人為的な低温状況下では、冬眠時のような発現の低下は見られなかったため、冬眠時における TRPV4 の発現の低下は冬眠により引き起こされるものであり、冬眠により TRPV4 の発現はコントロールされていると考えられる。

TRPV4 が冬眠時の全ての個体の皮膚で発現していたことから、爬虫類は冬眠中を含め常に皮膚で温度を感知していることが分かった。爬虫類が冬眠から覚醒するための要因として、土壌の温度が示唆されている(Grenot et al., 2000)。冬眠から覚醒するためには常に皮膚で外温を感受しなくてはならないため、TRPV4 の皮膚での発現は冬眠からの覚醒にも必要不可欠であると考えられる。また、TRPV4 は温度センサーの他にも、細胞間結合構造をとり、皮膚のバリアーとしての機能もあることが分かっている。皮膚での TRPV4

の発現は冬眠期間中，または覚醒時における脱水状態から避けるためということも考えられる。

更に，冬眠時の全ての個体の肝臓でも常に発現がみられた。冬眠中の両生類や昆虫は血中のグルコース濃度を上昇させ，耐凍性を高めていることが分かっている(Storey 2006)。肝臓は糖やエネルギー代謝の重要な器官の一つでもあるため，TRPV4 は肝臓においてこのようなエネルギー代謝に関わりのあるような働きもしているのかもしれないと予想される。

1月下旬の深い冬眠状態にある個体と3月の覚醒間近の個体の発現パターンでは，脳と心臓での発現に差異が確認できる。覚醒間近の個体では脳と心臓において発現が見られる一方で，深い冬眠状態の個体では発現が見られない。前述したように，脳は温度を感知するのに重要な器官の一つであり，心臓は覚醒に向けて徐々に拍動が活発になっているので，これらの組織での発現が回復してくる傾向にあると考えられる。

第5章

総合考察

本研究で、新たに爬虫類の TRPV2, 3, 4 を同定し、爬虫類の温度センサーレパートリーが他の四足動物と同様のものを有していることを明らかにした。哺乳類、鳥類、両生類と同様に、6 種類の thermo TRP が確認された。Thermo TRPs の系統解析の結果、TRPV2, 3, 4 において爬虫類の thermo TRP は鳥類の thermo TRP とクラスターを形成したことから、変温動物である爬虫類の温度センサーは同じ変温動物の両生類よりも、恒温動物の鳥類の温度センサーと似ていることが明らかとなり、爬虫類と鳥類は同じような温度感受機構であることが予想される。これは、爬虫類は鳥類と非常に近縁であるという既存の系統類縁関係とほぼ一致した系統関係であり、なんら矛盾しない結果であると考えられる。また、TRPV2 の C-末端領域の解析から、鳥類の TRPV2 の温度感受機構が哺乳類とは異なっている可能性があることが示唆された。鳥類における TRPV2 のパッチクランプ法などによる実際の活性化温度測定が TRPV2 の温度感受機構の解明に役立つと思われる。

TRPV3 は、哺乳類の TRPV3 は 30°C 以上の温帯域で活性化するのに対し (Smith et al., 2002)、両生類のニシツメガエルの TRPV3 においては、17°C の冷温域で活性化するなど動物によって活性化する温度が異なるという報告がある (Saito et al., 2011) が、本研究では爬虫類の TRPV3 の C-末端領域の配列解析と発現解析の結果からはそのような差異は見出すことはできなかった。

本研究では爬虫類のシマヘビとカナヘビの TRPV4 の全長のアミノ酸配列を決定する

ことが出来た。TRPV4には、その主要構造であるTM, pore region, TRP domainの他にN末端にはタンパク間相互作用を持つ6つのARDがあり、第一ARDのすぐ上流にはproline-rich-domain (PRD)を含んでいる。PRDは細胞骨格タンパク質であるPACSIN3と相互作用を持つことが分かっている(D'hoedt et al., 2008)。TRPV4のC末端には、TRPV4のCa²⁺依存的活性化に関連するcalmodulin binding domain (CaMBD)があることが分かっている(Strotmann et al., 2003)。また、IP3 receptorによっても活性が調節されている(Fernandes et al., 2008)。爬虫類のTRPV4にもこれらの主要ドメインが保持されていたため、温度センサーとしてだけのみならず、哺乳類のTRPV4同様にこれらの機能も有していると考えられる。

TRPA1の系統解析の結果、同じ爬虫類であるカメとヘビがグループ化するのではなく、カメと鳥類がグループ化しヘビと姉妹群を形成するという結果となった。カメとヘビのTRPA1は異なる感受温度である可能性が考えられるが、解析に用いた配列が短いためにそのような結果になったとも考えられる。カメにおけるTRPA1の全長を用いて系統解析を行う、また、カメのTRPA1の感受温度を計測することにより、この問題は解決すると思われる。また、温度と痛みには関連性があることが分かっており、TRPV1, TRPV2, TRPA1は侵害温度刺激受容に関与するものと思われている(富永 2004; 2006)。さらに、TRPV3, 4は皮膚のケラチン細胞で発現するために皮膚のバリアーや毛髪との関連性も示唆されている(Imura et al., 2007; Sokabe 2010)。爬虫類のTRPsを調べることによって、新たな製薬開発といった薬学的な分野への貢献も期待される。

発現解析の結果から、爬虫類の全てのthermo TRPsは皮膚で発現が確認された。この

ことは、爬虫類の TRP ホモログは温度センサーとして働いていることを示唆している。

また、舌においても全ての thermo TRPs の発現が見られた。ヘビ・トカゲ類は常に舌を出して匂いを感知しているといわれているが、温度も同様に感知していることが分かった。

冬眠時のカナヘビにおいて、TRPV4 の発現の低下が確認された。冬眠というライフサイクルにおける大きな変化と温度センサー遺伝子の関連例はこれまで報告例はなく、本研究が初である。動物の冬眠時の生理学的な反応として、代謝が著しく低下することが知られている(Herbert et al., 1985; Storey, 2006)。皮膚を除く TRPV4 の発現の低下は代謝の低下によるものであるかもしれない。

一般的な耐凍性に関する適応は、結晶中のグルコース濃度の著しい上昇(Storey et al., 1993; Voituron et al., 2002)や、protein kinaseによる調節などが知られているが(Storey, 2006)、thermo TRP との関わりの報告例はなく、どのようなメカニズムで冬眠中のTRPV4 の発現抑制が行われているかは不明である。哺乳類では冬眠のマーカーとしてHP複合タンパクが知られている(Kondo et al., 1992)。本研究が、今後このようなタンパクを爬虫類において探索するといった、さらなる研究に大きく貢献することを期待する。

要旨

生物は寒冷地から熱帯地域まで様々な環境下で生存しており、日光浴や水浴びといった行動や、発汗、発熱といった生理学的反応により多様な温度環境に適応している。このような温度に対する反応は温度感受機構により齎されるものであり、これに関与する複数の温度センサー遺伝子 TRP (Transient Receptor Potential) が種々の生物種で報告されている。しかしながら、それらの多くは恒温動物のものであり、変温動物である爬虫類についての研究は極めて少ない。

そこで、本研究では、恒温動物と変温動物の温度感受機構の違いを調べるために、変温動物の爬虫類からこれまで未同定であった TRP を分離・同定し、その構造を明らかにするとともに、その系統進化および発現動態を解析して、TRP から見た変温動物の進化および TRP の爬虫類生活環における機能等について考察することを目的とした。発現動態の解析では、これまで研究例のない冬眠期での変動について特に着目した。

研究材料としてアカミミガメ (*Trachemys scripta elegans*)、シマヘビ (*Elaphe quadrivirgata*)、ニホンカナヘビ (*Takydromus tachydromoides*) を用いた。これらの RNA から cDNA を作成し、これまで報告されている他動物の TRP の塩基配列から設計した特異プライマーを用いて PCR を行った。その結果、本研究で初めて TRP サブグループの TRPV2, 3, 4 および TRPA1 を同定し、シマヘビ、カナヘビの TRPV4 については cDNA の全塩基配列およびそれから推定され

る全アミノ酸配列を決定した。シマヘビおよびカナヘビ TRPV4 のアミノ酸配列は、他の動物の TRPV4 に共通して存在する機能ドメインをすべて保持しており、構造の類似性から温度感受機能をもつと考えられた。

次に、本研究で決定した TRP のアミノ酸配列を他の動物の TRP と比較し、系統樹を minimum-evolution 法で作成した。このような解析から、変温動物である爬虫類の TRP は他の変温動物である両生類よりも恒温動物である鳥類のそれに近縁であることがわかった。また、同じ爬虫類でもカメとヘビは系統樹上でクラスターを形成しないことから、これら2つの動物は異なる温度感受機構を持つ可能性が示唆された。これらの結果から、変温動物である爬虫類は恒温動物と同じ温度感受機構を持つ可能性が示唆された。

また、発現動態の解析から次のことが判明した。TRPV2, 3, 4 および TRPA1 mRNA の発現の組織/器官特異性を脳、舌、心筋、肺、肝臓、骨格筋および皮膚で解析したところ、mRNA の種類によって発現パターンは異なっていた。TRPV4 mRNA は調べたすべての組織/器官で発現していたが、他の mRNA の発現は組織/器官によって異なっていた。脳、皮膚および舌は温度感受に重要な器官であるが、これら組織ではすべての TRP mRNA が発現していた。これらの結果は、TRPV2, 3, 4 および TRPA1 が爬虫類でも温度センサーとして機能している可能性を示唆した。

さらに、カナヘビの冬眠期での TRPV4 の発現を冬眠前、冬眠期および冬眠覚醒期で調べた。その結果、冬眠期では皮膚を除くすべての器官で TRPV4 の発現が抑制されていることが分かった。冬眠後約4ヶ月の冬眠覚醒期では、抑制されていた TRPV4 の発現が脳、心筋および肝臓で回復していた。冬眠時でも皮膚の TRPV4 は恒常的に発現していること

から、皮膚をとおした温度感受、体温調節に TRPV4 が関与していることが予想された。

以上、本研究は 4 種類の爬虫類 TRP を同定してそれらのアミノ酸配列を明らかにした。

また、カナヘビの冬眠における TRPV4 の発現変動を解析し、この TRP が冬眠時における

皮膚の温度感受に働いている可能性を示した。これらの結果は本研究が初めてである。

謝辞

本研究を行うに当たり、終始ご指導して下さいました岩手大学農学部附属寒冷バイオフィロ
ンティア研究センターの堤教授に心から御礼申し上げます。

本研究に適切な助言を与えて下さった岩手大学農学部附属寒冷バイオフィロ
ンティア研究センターの齋藤准教授に心から御礼申し上げます。

本研究を行う機会を与えて下さった岩手大学農学部附属寒冷バイオフィロ
ンティア研究センターの上村教授に厚く御礼を申し上げます。

また、研究に際し貴重な助言を頂いた岡崎バイオサイエンス研究所の齋藤 茂氏、弘前
大学医学部の中田 章史氏に、この場を借りて厚く御礼を申し上げます。

実験動物の採集、飼育、解剖にご協力下さいました小栗 清美氏に厚く御礼を申し上げ
ます。

最後に、研究を進めるにあたり、様々な面でご協力下さいました寒冷バイオフィロ
ンティア研究センターのスタッフの皆様、学友、後輩の諸氏に深く感謝致します。

参考文献

- Andersson DA, Chase HW, Bevan S (2004) TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH. *J Neurosci.* 24:5364-9
- Brauchi S, Orta G, Salazar M, Rosenmann E, Latorre R (2006) A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J Neurosci* 26: 4835–4840
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816–824
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398: 436–441
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitk KR (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science.* 288: 306-313
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159
- Damann N, Voets T, Nilius B (2008) TRPs in our senses. *Curr Biol : CB* 18: 880-889
- D'hoedt D, Owsianik G, Prenen J, Cuajungco MP, Grimm C, Heller S, Voets T,

- Nilius B (2008) Stimulus-specific modulation of the cation channel TRPV4 by PACSIN 3. *J Biol Chem* 283:6272–6280
- Everaerts W, Nilius B, Owsianik G (2010) The vallinoid transient receptor potential channel Trpv4: from structure to disease. *Prog Biophys Mol Biol* 103: 2-17
- Fernandes J, Lorenzo IM, Andrade YN, Garcia-Elias A, Serra SA, Fernandez-Fernandez JM, Valverde MA (2008) IP3 sensitizes TRPV4 channel to the mechano- and osmotransducing messenger 5'-6'-epoxyeicosatrienoic acid. *J Cell Biol* 181:143–155
- Gracheva EO, Ingolia NT, Kelly YM, Cordero-Morales JF, Hollopeter G, Chesler AT, Sanchez EE, Perez JC, Weissman JS, Julius D (2010) Molecular basis of infrared detection by snakes. *Nature* 464: 1006-1011
- Grenot CJ, Garcin L, Dao J, Herold J, Fahys B, Tsere-Pages H (2000) How does the European common lizard, *Lacerta vivipara*, survive the cold of winter? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 127: 71-80
- Herbert C V, Jackson D C (1985) Temperature effects on the response to prolonged submergence in the turtle *Chrysemys picta bellii*. II. Metabolic rate, blood acid-base and ionic changes, and cardiovascular function in aerated and anoxic water. *Physiol. Zool.* 58: 670–681
- Hong ST, Bang S, Hyun S, Kang J, Jeong K, Paik D, Chung J, Kim J.(2008) cAMP signalling in mushroom bodies modulates temperature preference

behaviour in *Drosophila*. *Nature* 454(7205):771-5

Huang J, Zhang X, McNaughton PA (2006) Modulation of temperature-sensitive TRP channels. *Semin Cell Dev Biol* 17:638-645

Imura K, Yoshioka T, Hikita I, Tsukahara K, Hirasawa T, Higashino K, Gahara Y, Arimura A, Sakata T(2007) Influence of TRPV3 mutation on hair growth cycle in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 363(3):479-83

Iwabe N, Hara Y, Kumazawa Y, Shibamoto K, Saito Y, Miyata T, Katoh K (2005) Sister group relationship of turtles to the bird-crocodylian clade revealed by nuclear DNA-coded proteins. *Mol Biol Evol* 22: 810-813

Jung C, Fandos C, Lorenzo IM, Plata C, Fernandes J, Gené GG, Vázquez E, Valverde MA (2009). The progesterone receptor regulates the expression of TRPV4 channel. *Pflugers Arch* 459:105-13

Kondo N, Kondo J (1992) Identification of Novel Blood Proteins Specific for Mammalian Hibernation. *Bio Chem* 5: 473-478

Kraus C, Liehr T, Hulsken J, Behrens J, Birchmeier W, Grzeschik KH, Ballhausen WG (1994) Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics* 23: 272-274

Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S (2000) Vanilloid receptor-related osmotically

activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103:525-535

McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D (2002) Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416: 52–58,

Michaelidis B, Loumbourdis NS, Kapaki E (2002) Analysis of monoamines, adenosine and GABA in tissues of the land snail *Helix lucorum* and lizard *Agama stellio stellio* during hibernation. *J Exp Biol* 205: 1135-1143

Montell C (2003) Thermosensation: hot findings make TRPNs very cool. *Current biology* 13: R476-478

Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V (2003) ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* 4: 529-539

Phelps, C.B., Huang, R.J., Lishko, P.V., Wang, R.R., Gaudet, R (2008) Structural analyses of the ankyrin repeat domain of TRPV6 and related TRPV ion channels. *Biochemistry* 47: 2476-2484

Rzhetsky A, Nei M (1992) A Simple Method for Estimating and Testing Minimum-Evolution Trees. *Mol Biol Evol* 9: 945-967

Saito S and Ryuzo Shingai (2006) Evolution of thermoTRP ion channel homologs in vertebrates. *Physiological genomics* 22:219-230

Saito S, Fukuta N, Shingai R, Tominaga M (2011) Evolution of Vertebrate Transient

- Receptor Potential Vanilloid 3 Channels: Opposite Temperature Sensitivity between Mammals and Western Clawed Frogs. *Plos Genet* 7: e1002041
- Seebacher F (1999) Behavioural postures and the rate of body temperature change in wild freshwater crocodiles, *Crocodylus johnstoni*. *Physiol Biochem Zool* : 72: 57-63
- Seebacher F, Murray SA (2007) Transient receptor potential ion channels control thermoregulatory behaviour in reptiles. *PloS ONE* 2: e281
- Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jermank JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418: 186–190
- Shibasaki K, Murayama N, Ono K, Ishizaki Y, Tominaga M(2010) TRPV2 enhances axon outgrowth through its activation by membrane stretch in developing sensory and motor neurons. *J Neurosci* 13:4601-12
- Sokabe T, Tominaga M (2010) The TRPV4 cation channel: A molecule linking skin temperature and barrier function. *Commun Integr Biol* 3: 619-621
- Sokabe T, Fukumi-Tominaga T, Yonemura S, Mizuno A, Tominaga M (2010) The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes. *J Biol Chem* 285: 18749-18758
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden

- AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112: 819–829
- Storey K B, Layne J R, Cutwa M M, Churchill T A, Storey J M (1993) Freezing survival and metabolism of box turtles, *Terrapene carolina*, *Copeia* 1993: 628–634.
- Storey K.B. (2006) Reptile freeze tolerance: metabolism and gene expression. *Cryobiology* 52, 1-16
- Strotmann R, Schultz G, Plant TD (2003) Ca²⁺-dependent potentiation of the nonselective cation channel TRPV4 is mediated by a Cterminal calmodulin binding site. *J Biol Chem* 278:26541–26549
- 富永真琴(2004)温度受容の分子機構—TRP チャネル温度センサー—. *Folia Pharmacol. Jpn.* 124: 219-227
- 富永真琴(2006) TRP channels and nociception *Folia Pharmacol. Jpn.* 127(3) 128-132
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680
- Venkatachalam K, Montell C (2007) Trp Channels. *Annu Rev Biochem* 76:387-417

Vlachova V, Teisinger J, Susankova K, Lyfenko A, Ettrich R(2003)Functional role of

C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1. *J Neurosci* 23:

1340-1350

Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B (2005) Sensing with TRP channels. *Nat*

Chem Biol 1: 85-92

Voituron Y, Storey J M, Grenot C, Storey K B (2002) Freezing survival, body ice content

and blood composition of the freeze tolerant European common lizard,

Lacerta vivipara, *J.Comp. Physiol. B* 172: 71–76

Vriens J, Owsianik G, Voets T, Droogmans G, Nilius B (2004) Invertebrate TRP

proteins as functional models for mammalian channels. *Pflugers Arch* 449:

213-226

Vriens J, Owsianik G, Janssens A, Voets T, Nilius B (2007) Determinants of 4

alpha-phorbol sensitivity in transmembrane domains 3 and 4 of the cation

channel TRPV4. *J Biol Chem* 282:12796–12803

Xu GM, Arnaout MA (2002) WAC, a novel WW domain-containing adapter with a

coiled-coil region, is colocalized with splicing factor SC35. *Genomics* 79:

87-94

Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J,

Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, Clapham DE(2002)

TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel.

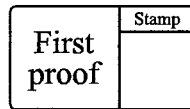
Nature 418: 181-186

Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE (2006) Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. Nat Neurosci. 9(5):628-35

Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B (2002)

Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 277:

47044-47051



Structure and Hibernation-associated Expression of the Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Channel (TRPV4) mRNA in the Japanese Grass Lizard (*Takydromus tachydromoides*)

Kazuya Nagai¹, Yasushi Saitoh¹, Shigeru Saito^{2†}, and Ken-ichi Tsutsumi^{1*}

¹United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, Morioka, Iwate 020-8550, and

²Faculty of Engineering, Iwate University, Morioka, Iwate 020-8550, Japan

Animals possess systems for sensing environmental temperature using temperature-sensitive ion channels called transient receptor potential channels (TRPs). Various TRPs have been identified and characterized in mammals. However, those of ectotherms, such as reptiles, are less well studied. Here, we identify the V subfamily of TRP (TRPV) in two reptile species: Japanese grass lizard (*Takydromus tachydromoides*) and Japanese four-lined ratsnake (*Elaphe quadrivirgata*). Phylogenetic analysis of TRPVs indicated that ectothermic reptilian TRPVs are more similar to those of endothermic chicken and mammals, than to other ectotherms, such as frog and fish. Expression analysis of TRPV4 mRNA in the lizard showed that its expression in tissues and organs is specifically controlled in cold environments and hibernation. The mRNA was ubiquitously expressed in seven tissues/organs examined. Both cold-treatment and hibernation lowered TRPV4 expression, but in a tissue/organ-specific manner. Cold-treatment reduced TRPV4 expression in tongue and muscle, while in hibernation it was reduced more widely in brain, tongue, heart, lung, and muscle. Interestingly, however, levels of TRPV4 mRNA in the skin remained unaffected after entering hibernation and cold-treatment, implying that TRPV4 in the skin may act as an environmental temperature sensor throughout the reptilian life cycle, including hibernation. This is the first report, to our knowledge, to describe reptilian TRPV4 in relation to hibernation.

Key words: hibernation, cold response, TRP, temperature sensing, reptile

INTRODUCTION

Animals experience various environmental conditions such as changing temperature, requiring adaptation at both behavioral and physiological levels. One such mechanism involves temperature-sensitive channels called transient receptor potential (TRP) ion channels. Various TRPs have been identified in animals, and these are categorized into several subfamilies, including TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), and TRPA (ankyrin) (Patapoutian et al., 2003; Vriens et al., 2004; Voets et al., 2005). Thermo-sensitive TRPs (called thermo TRPs) are expressed in the sensory organs and peripheral nervous system, and are involved in sensing temperature, as well as light, atmospheric pressure, and several chemical stimuli (Voets et al., 2005; Damann et al., 2008).

Although animal TRPs have been studied extensively, information concerning to reptilian TRPs is scarce. Reptiles are ectothermic animals, which cannot autonomously regulate their body temperature. Instead, they regulate it by

using environmental energy and behavioral adaptations, such as basking (Seebacher, 1999). Therefore, the physiological roles of reptilian TRPs differ from those of endothermic animals, though ectothermic reptiles are reported to be closer to endothermic avians than to ectothermic amphibians (Iwabe et al., 2005). In these respects, reptilian thermo TRPs are particularly interesting from the evolutionary perspective. In addition, temperature sensing of reptilian TRPs might differ from other animals. For example, mammalian TRPA1 senses low temperature, whereas the snake orthologs senses higher temperature (Gracheva et al., 2010). Moreover, since reptiles are hibernating animals, they might be a suitable model to investigate how hibernation regulates TRPs, or *vice versa*.

Our study aimed to know the function of TRPs in body temperature control and in hibernation in ectothermic reptiles. For this purpose, we focused on TRPV4, as it is a non-selective cation channel involved in sensing temperature, osmotic and chemical stimuli, and in control of skin temperature and barrier formation (Damann et al., 2008; Sokabe and Tominaga, 2010), all of which might concern to the events in hibernation. As an initial step, we report cDNA sequences encoding lizard and snake TRPV4 orthologs, and show phylogenetic relationship of TRPs in animals. In addition, we demonstrate, for the first time, that expression of TRPV4 is controlled in a tissue/organ-specific manner under hibernation status.

* Corresponding author. Tel. : +81-19-621-6242;

Fax : +81-19-621-6242;

E-mail: kentsu@iwate-u.ac.jp

† Present address: Division of Cell Signaling, Okazaki Institute for Integrative Bioscience (National Institute for Physiological Sciences), National Institutes of Natural Sciences, Okazaki, Aichi, Japan

doi:10.2108/zsj.29.000

MATERIALS AND METHODS

Animals

The Japanese grass lizard (*Takydromus tachydromoides*), the Japanese four-lined snake (*Elaphe quadrivirgata*), and red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) used in this study were captured from the fields in Iwate Prefecture, Japan. The specimens were bred at 25°C in the laboratory.

Cold-treatment and induction of hibernation of lizards

Cold-treatment and induction of hibernation of lizards were carried out in a cage with soil and fallen leaves therein. Cold-treatment was carried out using wild lizards captured in July (early summer). The lizards were placed at 8°C for 48 h in the dark without feeding, except water. For induction of hibernation, lizards were fed *ad libitum* at room temperature in the laboratory until prehibernal period (November). Then, the animals were kept at 8°C in the dark, as for the cold-treatment described above. With this treatment, hibernation started at late November and lasted for about four months. Hibernation was characterized by a state of inactivity, no interactions among individuals, and lowered breathing, as described by Grenot et al. (2000) and Michaelidis et al. (2002).

RNA preparation, cDNA synthesis, and expression analysis

Total RNA was extracted from various tissues of the bred specimens, using the acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform method (Chomczynski and Sacchi, 1987), and treated with DNase to eliminate contaminated genomic DNA. To generate first-strand cDNA, 1 µg total RNA was reverse transcribed with oligo (dT)₁₅ primer using ReverTra Ace reverse transcriptase (Toyobo, Osaka, Japan). The cDNA was amplified by PCR with the gene-specific primer sets listed in Table 1 (their positions are shown in Fig. 1). These primers were designed from highly conserved regions of the cognate genes so far reported for animals. The forward and reverse primers sandwiched the intron region, to distinguish the products from genomic DNA. Thermal cycling was conducted as follows: denaturing at 94°C for 5 min followed by 35 cycles of 95°C for 10 sec, 60°C (TRPV4 and CTNNB1, primer set 1 and 3, respectively) or 57°C (WAC, primer set 2) for 30 sec, and 72°C for 30 sec. The products were separated by 2% agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining. WAC (WW domain containing adaptor with coiled-coil; Xu and Arnaout, 2002) and CTNNB1 (catenin beta 1; Kraus et al., 1994) were used as control mRNAs for expression analysis.

3'- and 5'RACE

Full-length cDNA was obtained by 3'- and 5' RACE as follows. The 3'-terminal end of TRPV4 cDNA was obtained by PCR using GeneRacer 3' adapter-specific primer (5'-GCTGTCAACGATACGC-TACGTAACG-3', Invitrogen, CA, USA) and the gene-specific primers (5'-AGATTGAGAACCGCCACGAGATGCT-3' for lizard, and 5'-

GGACAGCAAGACCTTCAGCACCTTC-3' for snake). The 5'-end sequences were determined as follows; the GeneRacer RNA adapter (50 pmol, Invitrogen, CA, USA) was ligated to total RNA (10 µg) with T4 RNA ligase (New England Biolabs), followed by reverse transcription using ReverTra Ace reverse transcriptase (TOYOBO) and random primers. Amplification was done using GeneRacer 5' adapter-specific primer (Invitrogen, CA, USA) and the gene-specific primers (lizard: 5'-GGCAGCTCACCGAAGTAGAAG-TAG-3', snake: 5'-CATCCTTGGGCTGGAAGAA-3').

Sequencing and phylogenetic analysis

Nucleotide sequencing was carried out using an 8-capillary 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Multiple sequence alignment was performed using CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Phylogenetic relationships among the chosen sequences were constructed by minimum-evolution methods (ME; Rzhetsky and Nei, 1987), using MEGA 4 software (Tamura et al., 2007). Nucleotide sequence data are available in the DDBJ/EMBL/GenBank Database under the accession numbers AB666086, AB666087, AB666088, AB666089, and AB666090.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of reptilian TRPV4 cDNAs and deduced amino acid sequences

As an initial step to investigate structure and function of TRPVs in reptiles, we isolated TRPV4 cDNAs from the Japanese grass lizard (*Takydromus tachydromoides*) and the Japanese four-lined snake (*Elaphe quadrivirgata*), as described in Materials and Methods. Both the deduced TRPV4 proteins comprised 868 amino acids. Alignment of these TRPV4s with those of other tetrapods revealed high homology (Fig. 1). Homology between lizard and snake, chicken, human, mouse, rat and frog were 96%, 85%, 84%, 84%, 83% and 79%, respectively. Lizard and snake TRPV4 showed highest similarity to the chicken TRPV4, but differed in that the latter had deletions of 5 and 7 amino acids at N-terminal region and deletion of five amino acids near C-terminus (Fig. 1). Those reptilian TRPV4s had all the structural and functional domains conserved in other TRPs, such as ankyrin repeat (ANK), proline-rich domain (PRD), transmembrane (TM), pore region or pore loop (PL), TRP domains, and calmodulin binding domains (CaMBD) (Venkatachalam and Montell, 2007; Phelps et al., 2008; Everaerts et al., 2010).

Phylogenetic analysis

To better understand genetic relationships of TRPVs of reptiles and of other animals, phylogenetic tree was constructed by ME methods using amino acid sequences of TRPVs (Fig. 2). As shown in the figure, TRPV subfamilies TRPV1, TRPV2, TRPV3, and TRPV4 formed independent clusters. Each subfamily clustered into a clade formed with different animals employed here. TRPV5 and TRPV6 are more divergent; they formed clades that are distant from other TRPVs.

TRPV4 from lizard and snake grouped together and clustered with birds (chicken and turkey), but located as a different clade from frog and fish. Similar tree can be constructed using partial amino acid sequences including those of TRPV2 and TRPV3 from other reptile (turtle, *Trachemys scripta elegans*) (DDBJ/EMBL/GenBank accession nos. AB666086 and AB666087, data not shown). Thus, for all TRPVs analyzed here, reptiles (lizard, snake, and turtle)

Table 1. Primer sets used in this study.

Primer set	Target	Primer ^{a)}	Nucleotide sequence (5' to 3') ^{b)}	Product size (bp)
1	TRPV4	V4F	CTTCTCCAGCCCAAGGATG	299
		V4R	GTCTTGGCAGCCATCATGAG	
2	WAC ^{c)}	wacF	TGCATCACCTCTTCTGTAAAT	271
		wacR	CTGCGGATGATTGGTCTGA	
3	CTNNB1 ^{d)}	ctnF	GAGTTGGATATGGCCATGGA	279
		ctnR	GATGGRATYTGCAKCCYCATC	

^{a)} F: forward primer, R: reverse primer

^{b)} D: G or A or T, Y: C or T, V: G or A or C, W: A or T, K: G or T, R: A or G.

^{c)} WAC: WW domain containing adaptor with coiled-coil (Xu et al., 2002).

^{d)} CTNNB1: catenin (cadherin-associated protein) beta 1 (Kraus et al., 1994).

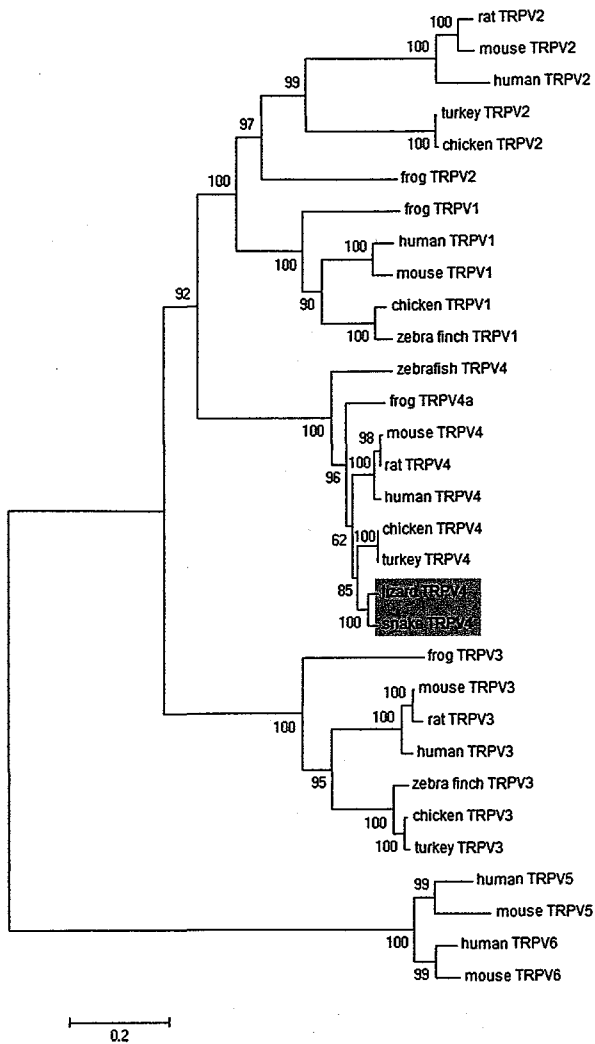


Fig. 2. Phylogenetic tree constructed with vertebrate TRPVs. The tree was constructed using amino acid sequences of TRPVs from various vertebrates, which contain conserved domains including the ankyrin repeat and transmembrane domains (656 residues, corresponding to position from 141 to 796 in lizard TRPV4). Each sequence was aligned for the same region, and used for the tree construction by ME method (Rzhetsky et al., 1992). Bootstrap values were calculated from 1,000 replicates and indicated at the branches (> 50%). Genes that the amino acid sequences were determined in this study are shaded. Database accession numbers of the genes used for the tree construction are; human TRPV1: AJ277028, mouse TRPV1: AB180097, rat TRPV1: AF029310, chicken TRPV1: AY072909, zebra finch TRPV1: XP_002195940, frog TRPV1 pre: XM_002938256, human TRPV2: Af129112, mouse TRPV2: AB021665, rat TRPV2: AF129113, chicken TRPV2: XM_415848, turkey TRPV2 pre: ENSMGAT00000007327, zebra finch TRPV2: XP002195797, frog TRPV2 pre: ENSGALT00000012785, human TRPV3: AJ487035, mouse TRPV3: AF510316, rat TRPV3: AY325813, chicken TRPV3 pre: ENSGALT00000007425, turkey TRPV3 pre: ENSMGAT00000007547, zebra finch TRPV3: XP002195959, anole (green anole) TRPV3 pre: ENSACAT00000001754, frog TRPV3 pre: XM_002938252, human TRPV4: AF263523, mouse TRPV4: AF263521, rat TRPV4: AF263521, chicken TRPV4: AF261883, turkey TRPV4 pre: ENSMGAT00000007141, zebrafish TRPV4: DQ858167, frog TRPV4a pre: ENSXETT00000040300, human TRPV5: NM019841, mouse TRPV5: NM001007572, human TRPV6: NM018646, mouse TRPV6: NM022413.

brain, tongue, heart, lung, liver, muscle and skin. The cognate mRNAs in the snake and turtle were also detected by RT-PCR using the primer set for lizard TRPV4 (Table 1). The primers for lizard worked for snake and turtle, as confirmed by sequencing the PCR products and by RT-PCR using unrelated templates (plant RNAs, Fig. 3B). For control experiments, WAC mRNA was analyzed in parallel. As shown in Fig. 3A, TRPV4 mRNA was ubiquitously expressed in all tissues/organs examined in the lizard, snake, and turtle, though it was less abundant in skeletal muscle in snake.

We next examined whether cold-treatment and hibernation alter expression of the TRPV4 mRNA in lizards. Cold treatment of the lizards was carried out at 8°C for 48 h, and RNAs were extracted from various tissues/organs. In this experiment, two mRNAs (WAC and CTNNB1) were included as controls, in order to firmly show equal recovery of RNA and to show their constant expression. Interestingly, cold treatment altered the mRNA expression in a tissue/organ-specific manner. Expression of TRPV4 mRNA was reduced in tongue and muscle (Fig. 4B), as compared to control lizard (Fig. 4A), while the control mRNAs (WAC and CTNNB1) remained almost unaffected in all tissues/organs.

Hibernation also affected expression of TRPV4 mRNA. In the lizards at two months after entering hibernation (late January), the expression was reduced in all tissues/organs, except for skin and, with less apparent, liver (Fig. 4C). At four months after entering hibernation (just prior to emergence from hibernation), expression of TRPV4 mRNA was restored in the heart and brain (Fig. 4D). These results were

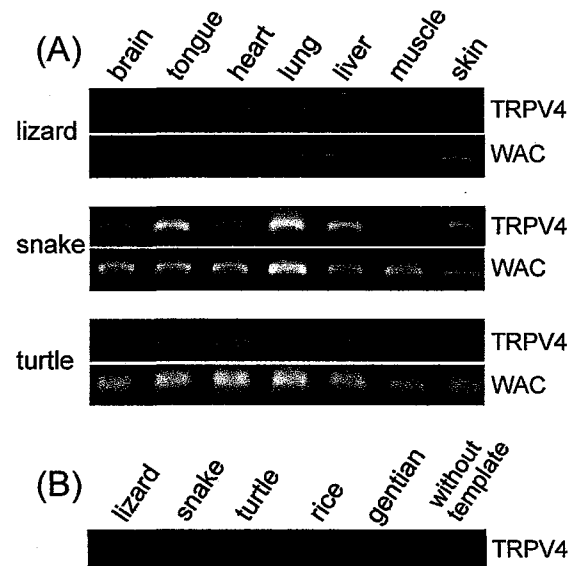


Fig. 3. Expression of TRPV4 mRNA in different tissues/organs in lizard, snake, and turtle. (A) Expression of TRPV4 in lizard, snake and turtle. Total RNAs from each tissue/organ was subjected to RT-PCR using TRPV4-specific primers and the products were run on agarose gel (see Materials and Methods). Control experiments were done using primers for WAC mRNA. (B) Specificity of the TRPV4 primers. Total RNAs from rice (*Oryza sativa*) and gentian (*Gentiana triflora*) plants were used as templates for RT-PCR as in (A). Rice and gentian RNAs were used as negative controls, showing specificity of the primer.

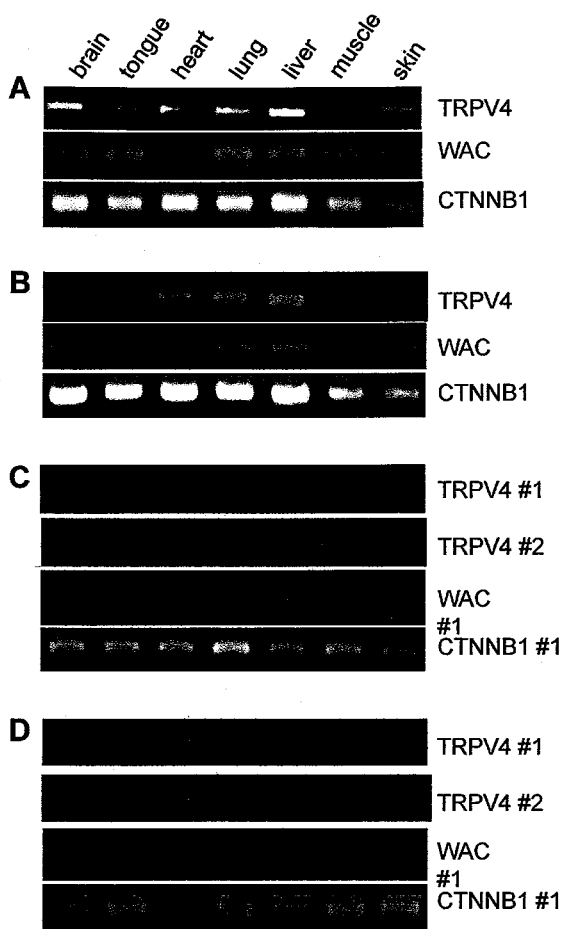


Fig. 4. Cold- and hibernation-related alternation of TRPV4 expression in different tissues/organs in the lizard. Expression of the mRNA was analyzed as in Fig. 3. **(A)** non-hibernating (control). **(B)** exposed at 8°C for 48 h. **(C)** mid-hibernation (at the stage about 2 months after entering hibernation). **(D)** late hibernation (at about 4 months after entering hibernation). TRPV4 #1 and #2 in (C) and (D) indicate results from different animals under the same condition. WAC and CTNNB1 mRNAs were used as controls.

reproducible for different individuals. Thus, expression of TRPV4 mRNA in the skin remains unchanged after entering hibernation, while the expression significantly decreased in other tissues/organs. The TRPV4 levels in the heart and brain restore later during the course of hibernation.

To date, the full amino acid sequence of reptilian TRPVs have been unknown; only partial sequences have been reported for TRPV1 and TRPM8 from lizard and crocodile (Seebacher and Murray, 2007). In this study, we determined, for the first time, complete amino acid sequences of TRPV4 in the lizard and snake. Amino acid sequence of the reptilian TRPV4 shares important structural and functional domains with those of other tetrapods. We also determined partial amino acid sequences of TRPV2 and TRPV3 from turtle. Our data, together with other reports (Saito et al., 2011), show the occurrence of at least six thermo TRP repertoires in reptiles. Although the reptile is ectothermic, phylogenetic tree showed that reptilian TRPVs claded close to endotherms chicken, rather than ectotherms frog and fish.

Expression of TRPV4 mRNA was found to be ubiquitous in tissues/organs in the lizard. Cold and hibernation altered the expression profile, but in different ways. Cold-treatment of the lizard reduced the TRPV4 expression in tongue and muscle, while other tissues/organs remained unaffected. In contrast to cold-treatment, hibernation reduced TRPV4 expression in brain, tongue, heart, lung, and muscle, while the levels of the mRNA in the skin and liver remained nearly unchanged. It is generally assumed that cold is one of the inducers of hibernation. However, our results confirm that hibernation requires several factors/conditions in addition to cold, since expression profiles of TRPV4 differed between cold-treatment and hibernation.

Both ectotherms and endotherms may sense the environmental temperature through skin (Patapoutian et al., 2003; Egan et al., 2005). Brain is also important for sensing temperature, and it regulates animal behavior to adapt environmental change (Hammel et al., 1967; Nelson et al., 1984). Reptiles always sense temperature through skin and tongue. Accordingly, our observation that expression of TRPV4 in the skin remained unchanged during hibernation or cold-treatment also supports the notion that skin is probably one of the major tissues that continuously sense environmental temperature throughout the reptile life cycle, including the hibernation period. In mammals, TRPV4 contributes to the formation of an intracellular junction-dependent barrier in the skin, in addition to sensing of ambient temperatures (Sokabe et al., 2010; Sokabe and Tominaga, 2010). The skin barrier functions to avoid dehydration of the skin. If this is the case for reptiles, TRPV4 may also act to prevent skin from dehydration during hibernation, or at a stage of emergence from hibernation when environmental temperature (soil temperature) increases in early spring (Grenot et al., 2000). However, although amino acid sequence of the reptilian TRPV4 is quite similar to those of thermo-sensitive TRPV4 in other animals, physiological role of the reptilian TRPV4, such as thermo-sensitivity, is actually unknown at present. This point needs to be elucidated in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. A. Rahman in Iwate University for critical reading of the manuscript. We also thank Dr. M. Kuroo at Hiroshima University for valuable suggestions, and K. Kogusuri for technical assistance. This study was supported, in part, by Grants-in-aid from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan (nos.19916009 and 20918013 to K.N.).

REFERENCES

- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156–159
- Damann N, Voets T, Nilius B (2008) TRPs in our senses. *Curr Biol* 18: R880–R889
- Egan GF, Johnson J, Farrell M, McAllen R, Zamarripa F, McKinley MJ, et al. (2005) Cortical, thalamic, and hypothalamic responses to cooling and warming the skin in awake humans: a positron-emission tomography study. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 5262–5267
- Everaerts W, Nilius B, Owsianik G (2010) The vallinoid transient receptor potential channel Trpv4: from structure to disease. *Prog Biophys Mol Biol* 103: 2–17
- Gracheva EO, Ingolia NT, Kelly YM, Cordero-Morales JF, Hollopeter

- G, Chesler AT, et al. (2010) Molecular basis of infrared detection by snakes. *Nature* 464: 1006–1011
- Grenot CJ, Garcin L, Dao J, Herold J, Fahys B, Tsere-Pages H (2000) How does the European common lizard, *Lacerta vivipara*, survive the cold of winter? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 127: 71–80
- Hammel HT, Caldwell FT Jr., Abrams RM (1967) Regulation of body temperature in the blue-tongued lizard. *Science* 156: 1260–1262
- Iwabe N, Hara Y, Kumazawa Y, Shibamoto K, Saito Y, Miyata T, et al. (2005) Sister group relationship of turtles to the bird-crocodylian clade revealed by nuclear DNA-coded proteins. *Mol Biol Evol* 22: 810–813
- Kraus C, Liehr T, Hulsken J, Behrens J, Birchmeier W, Grzeschik KH, et al. (1994) Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics* 23: 272–274
- Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, et al. (2000) Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 103: 525–535
- Michaelidis B, Loumbourdis NS, Kapaki E (2002) Analysis of monoamines, adenosine and GABA in tissues of the land snail *Helix lucorum* and lizard *Agama stellio stellio* during hibernation. *J Exp Biol* 205: 1135–1143
- Nelson DO, Heath JE, Prosser CL (1984) Evolution of Temperature Regulatory Mechanisms. *Amer Zool* 24: 791–807
- Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V (2003) TRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci* 4: 529–539
- Phelps CB, Huang RJ, Lishko PV, Wang RR, Gaudet R (2008) Structural analyses of the ankyrin repeat domain of TRPV6 and related TRPV ion channels. *Biochemistry* 47: 2476–2484
- Rzhetsky A, Nei M (1992) A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol Biol Evol* 9: 945–967
- Saito S, Fukuta N, Shingai R, Tominaga M (2011) Evolution of vertebrate transient receptor potential vanilloid 3 channels: Opposite temperature sensitivity between mammals and western clawed frogs. *PLoS Genet* 7: e1002041
- Seebacher F (1999) Behavioural postures and the rate of body temperature change in wild freshwater crocodiles, *Crocodylus johnstoni*. *Physiol Biochem Zool* 72: 57–63
- Seebacher F, Murray SA (2007) Transient receptor potential ion channels control thermoregulatory behaviour in reptiles. *PLoS ONE* 2: e281
- Sokabe T, Tominaga M (2010) The TRPV4 cation channel: A molecule linking skin temperature and barrier function. *Commun Integr Biol* 3: 619–621
- Sokabe T, Fukumi-Tominaga T, Yonemura S, Mizuno A, Tominaga M (2010) The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes. *J Biol Chem* 285: 18749–18758
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596–1599
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680
- Venkatachalam K, Montell C (2007) Trp Channels. *Annu Rev Biochem* 76: 387–417
- Voets T, Talavera K, Owsianik G, Nilius B (2005) Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol* 1: 85–92
- Vriens J, Owsianik G, Voets T, Droogmans G, Nilius B (2004) Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels. *Pflugers Arch* 449: 213–226
- Xu GM, Arnaout MA (2002) WAC, a novel WW domain-containing adapter with a coiled-coil region, is colocalized with splicing factor SC35. *Genomics* 79: 87–94

(Received September 13, 2011 / Accepted October 5, 2011)