

研究終了報告書

「頸動脈小体における酸素センシング機構の解明」

研究期間：2019年10月～2022年3月

研究者：中尾 章人

加速フェーズ期間：2022年4月～2023年3月

1. 研究のねらい

好気性生物にとって酸素は生存に必要不可欠であり、生体内でエネルギーを蓄積する物質である ATP の産生に必須である。しかし一方で、活性酸素種などの産生基質として生体に様々な障害も引き起こすといったように、酸素は生体にとって両義的に働く。したがって、生体内の酸素濃度の変化を感知し、それに適切に対応するためには、酸素センシング機構が極めて重要である。低酸素に対する生理的な応答は、急性と緩徐な応答に大きく分類される。緩徐な低酸素応答である造血作用や血管形成などには、hypoxia-inducible factor (HIF: 低酸素誘導因子) が中心的な役割を果たすことが知られている (2019年ノーベル生理学・医学賞受賞)。それに対し、急性の酸素センシングには Heymans による頸動脈小体の発見以降 (1938年ノーベル生理学・医学賞受賞)、頸動脈小体による血中酸素濃度感知が圧倒的に重要であると考えられてきた。しかし、近年、頸動脈小体以外にも脳の中樞神経、知覚神経や血管などもその役割を担っていることが報告され、急性の低酸素応答における酸素センサー細胞や分子メカニズムに関する詳細は不明であった。したがって、本研究のねらいは生体における急性の酸素センシング機構を明らかにすることである。

加速フェーズでは、自らが見出した急性の酸素センシングの新規分子メカニズムである TRPA1-PHD-NEDD4-1 経路の脳高次機能における生理学的意義及びその普遍性の解明を目的として、マウス個体を用いた行動学的スクリーニング及び急性の酸素環境変化への適応における酸素センシングを担う酸素受容器として圧倒的な優位性が信じられている頸動脈小体の酸素センシング機構における TRPA1-PHD-NEDD4-1 経路の探索を実施した。

2. 研究成果

(1) 概要

ACT-X で得られた研究成果として、延髄呼吸中枢 pFRG/RTN 領域のアストロサイトの特定の集団が、低酸素状態におかれると TRPA1 カチオンチャネルを細胞表面膜に集積させて数秒から数分の時間スケールで酸素センサーとして働くという、**酸素依存的なチャネルタンパク質の代謝が関与する全く新しい酸素センシングメカニズムを明らかにした** (成果 1: *Uchiyama, *Nakao et al., Curr. Biol. 2020 *co-first author) (京大プレスリリース: http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2020/200717_2.html 新聞報道: 京都新聞(2020年7月17日32面)、日刊工業新聞(2020年7月17日20面)、科学新聞(2020年7月31日4面) 紹介記事: SheikhBahaei, Curr. Biol. 30(17):R1004-R1006. 2020)。一般的に急性の酸素センシングでは、形質膜上に存在するイオンチャネルの活性化により細胞応答が引き起こされるが、本発見では TRPA1 チャンネルタンパク質が低酸素によって細胞内から表面膜へと移行して低酸素へのアストロサイトの応答を惹起するという、チャネルタンパク質の酸

素依存的代謝による急性の酸素感知メカニズムであり、急性の酸素センシングの分子メカニズム解明に大きく前進した。さらに、アストロサイトの TRPA1 チャンネルが、低酸曝露後の呼吸増加 (PHRA: post-hypoxic respiratory augmentation)、即ち呼吸制御の神経可塑性に寄与することも示した (成果 2: Fukushi et al., Front. Physiol. 2021)。Heymans 以来 (1938 年ノーベル生理学・医学賞受賞)、急性の酸素環境変化への適応における酸素センシングを担う酸素受容器として圧倒的な優位性が信じられている頸動脈小体に関する研究を進め、本研究期間に実験系の立ち上げに成功し、glomus 細胞における TRPA1 の関与を検討した。

加速フェーズでは、自らが見出した急性の酸素センシングの新規分子メカニズムである TRPA1-PHD-NEDD4-1 経路の脳高次機能における生理学的意義を明らかにするため、脳内の酸素センサーが欠損したマウスを用いて網羅的に行動学的スクリーニングを行い、脳高次機能における役割を明らかにした。また、TRPA1-PHD-NEDD4-1 経路の普遍性を検討するため、急性の酸素環境変化への適応における酸素センシングを担う酸素受容器として圧倒的な優位性が信じられている頸動脈小体の酸素センシング機構における TRPA1-PHD-NEDD4-1 経路の探索を実施した。

(2) 詳細

ACT-X で得られた主たる研究成果として、**急性の酸素センシング機構である TRPA1-PHD-NEDD4-1 経路を見出した** (成果 1)。その基盤となるメカニズムとして、正常酸素濃度下においては、TRPA1 チャンネルのアンキリンリピート内にある 394 番目のプロリン残基 (Pro394) がプロリン水酸化酵素 PHD によってヒドロキシ化され、さらにユビキチンリガーゼ NEDD4-1 によってユビキチン化されることで形質膜への発現が抑制される。一方低酸素下では、基質となる酸素が存在しないため PHD による TRPA1 のプロリンヒドロキシ化がなされず内在化から解放された TRPA1 チャンネルが表面膜に集積し、細胞内に Ca^{2+} を流入させて ATP 等のグリオトランスミッター放出を誘導し他の細胞に情報を伝達することで、酸素センサーとして働く。**本成果により、急性の酸素センシングの分子メカニズム解明に大きく前進した。**

加速フェーズでは、自らが見出した急性の酸素センシングの新規分子メカニズムである TRPA1-PHD-NEDD4-1 経路の脳高次機能における生理学的意義及びその普遍性の解明を行い、脳高次機能における寄与及び普遍性を示唆する結果が得られた。

3. 今後の展開

本研究を起点とした研究展開により、Heymans による頸動脈小体の発見以降 (1938 年ノーベル生理学・医学賞受賞)、80 年以上の永きに渡って未だに決着を見ない急性の酸素センシングの分子メカニズムの論争に決着をつけることが期待される。特に ACT-X で得られた主たる研究成果である TRPA1-PHD-NEDD4-1 経路は、**普遍的な分子実体として急性の酸素センシング機構の混迷状況に道筋を与える**可能性を有する。したがって本研究を起点として展開される今後 5 年程度の研究から得られる知見は、生命活動の根幹をなす酸素に対する新たな生物学的理解を与え感覚生物学全体に飛躍的な進歩をもたらすものであり、将来的に生理学の教科書に付け加えられるべきものになるはずである。

加速フェーズでは、自らが見出した急性の酸素センシングの新規分子メカニズムである



TRPA1-PHD-NEDD4-1 経路の脳高次機能における生理学的意義及びその普遍性の解明を行い、脳高次機能における寄与及び普遍性を示唆する結果が得られた。このことから生体における酸素センシングの普遍的な分子メカニズムの理解と生物学的意義のさらなる展開可能性が高まり、より大きな学術領域の創成が期待される。

4. 自己評価

研究目的の達成状況

ACT-X 研究期間中に得られた主たる研究成果としては、酸素依存的なチャンネルタンパク質の代謝が関与する全く新しい急性の酸素センシング機構である TRPA1-PHD-NEDD4-1 経路を明らかにした (成果 1)。本経路は**普遍的な分子メカニズムとして急性の酸素センシング機構の混迷状況に道筋を与える可能性を有し、将来の研究展開により、Heymans による頸動脈小体の発見以降 (1938 年ノーベル生理学・医学賞受賞)、80 年以上の永きに渡って未だに決着を見ない急性の酸素センシングの分子メカニズムの論争に決着をつけることが期待される。**この成果を起点に様々に研究展開しており、アストロサイトの TRPA1 チャンネルが、呼吸制御の神経可塑性に寄与していることを発見するなど (成果 2)、**その後の研究も順調に発展**しつつあり、本申請の研究目的は十分に達せられたと考えられる。

研究の進め方 (研究実施体制及び研究費執行状況)

研究実施体制に関しては当初の計画から大きく外れることなく、問題なく研究を遂行した。また、研究成果に直結する効率的な研究費執行ができた (5. 主な研究成果リストを参照)。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

ACT-X 研究期間中に自らが見出した急性の酸素センシングの新規分子メカニズム (成果 1)により、**研究者としてのアイデンティティを確立**した。前述に記載のように、この研究を起点として様々な研究分野が開拓され、新しい価値の創造につながると考えられる。実際に、本研究成果を軸に様々な専門の先生方との共同研究に発展し、研究者ネットワークの形成につながった。現在進行しているこれらの共同研究は実を結びつつもある (成果 2)。加えて ACT-X 研究期間中には様々な課題に挑戦し、**研究者としての個の確立とともに、自身の研究の幅を広げた**。モデル動物としてマウスだけでなくゲノム編集したラットを用いた行動・電気生理学的解析も精力的に行い、マウスモデルでは検出できなかった細胞内の情報伝達を担う cAMP-dependent protein kinase の RI β サブユニットの新規機能を明らかにし、モデル動物としてのラットの有用性を示した (成果 3: Trung et al., Sci. Rep. 2021)。加えて、レドックス感受性 TRP イオンチャンネルと精神疾患の知識を最大限に活かして責任著者として総説を上梓するなど (*Nakao et al., Front. Cell Dev. Biol. 2021 *co-corresponding author)、様々な課題に挑戦した。

ACT-X で得られた主たる研究成果である TRPA1-PHD-NEDD4-1 経路のような急性の酸素センシング機構に関して、臨床的には、急性の酸素センシングの分子実体に迫ることにより、高頻度に見られる睡眠時無呼吸症候群 (突発性の呼吸停止によって間欠性低酸素が引き起こされる)や高山病などの低酸素が関与する疾患の発症・病態を、酸素依存的なチャンネルタンパク質の代謝によるシグナル伝達経路を通して理解でき、将来的には新たな



創薬のターゲットにつながる可能性を有する。

(加速フェーズ実施後更新)

加速フェーズで得られた頸動脈小体の知見を基に、国際的な共同研究に発展した。このように国内のみならず海外の有名な研究者との共同研究に繋がったことは大きな成果と考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 6件

研究期間累積件数: 10件(加速フェーズ実施後更新)

1. Makoto Uchiyama*, **Akito Nakao***, Yuki Kurita, Isato Fukushi, Kotaro Takeda, Tomohiro Numata, Ha Nam Tran, Seishiro Sawamura, Maximilian Ebert, Tatsuki Kurokawa, Reiko Sakaguchi, Alexander J. Stokes, Nobuaki Takahashi, Yasumasa Okada, Yasuo Mori. **O₂-dependent protein internalization underlies astrocytic sensing of acute hypoxia by restricting multimodal TRPA1 channel responses.** *Current Biology* 2020, 30(17), 3378–3396.e7, *These authors contributed equally

本研究では、延髄呼吸中枢のアストロサイトの特定の集団が、低酸素状態において TRPA1 カチオンチャネルを細胞表面膜に集積させて数秒から数分の時間スケールの急性の酸素センサーとして働くという、酸素依存的なチャネルタンパク質の代謝が関与する全く新しい酸素センシングメカニズムを明らかにした。

2. Isato Fukushi, Kotaro Takeda, Mieczyslaw Pokorski, Yosuke Kono, Masashi Yoshizawa, Yohei Hasebe, **Akito Nakao**, Yasuo Mori, Hiroshi Onimaru, Yasumasa Okada. **Activation of astrocytes in the persistence of post-hypoxic respiratory augmentation.** *Frontiers in Physiology* 2021, 12, 1723

本研究は、呼吸制御における神経可塑性にアストロサイトが関与していることを明らかにした初めての報告であり、アストロサイトが低酸曝露後の呼吸増加 (PHRA) に重要であり、アストロサイトの TRPA1 チャネルが PHRA に寄与することを明らかにした。成果 1 から発展した研究である。

3. Hieu Hoang Trung, Toru Yoshihara, **Akito Nakao**, Katsumi Hayashida, Yoshiki Hirata, Koumei Shirasuna, Mitsuru Kuwamura, Yuki Nakagawa, Takehito Kaneko, Yasuo Mori, Masahide Asano, Takashi Kuramoto. **Deficiency of the RI β subunit of protein kinase A causes body tremor and impaired fear conditioning memory in rats.** *Scientific Reports* 2021, 11(1), 2039

本研究では、細胞内の情報伝達を担う cAMP-dependent protein kinase の RI β サブユニットをゲノム編集技術によりノックアウトしたラットを用いて、同遺伝子のノックアウトマウスでは捉えられなかった行動・電気生理学的な表現型を解明し、モデル動物としてのラットの有用性を示した。

(2) 特許出願



なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

中尾 章人「低酸素呼吸応答機構における低酸素感受分子メカニズム機構」第98回日本生理学会大会 2021年03月28日

Akito Nakao「The role of TRPA1 channel in hypoxia sensing」15th Oxford Conference 2022年10月21日 ※加速フェーズ実施の成果

著作物

Akito Nakao[#], Yoshihiro Matsunaga, Katsumi Hayashida, Nobuaki Takahashi. **Role of Oxidative Stress and Ca²⁺ Signaling in Psychiatric Disorders.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021, 9, 615569. [#]co-corresponding author

Tomoyuki Murano, Ryuichi Nakajima, **Akito Nakao**, Nao Hirata, Satoko Amemori, Akira Murakami, Yukiyasu Kamitani, Jun Yamamoto, Tsuyoshi Miyakawa. **Multiple types of navigational information are independently encoded in the population activities of the dentate gyrus neurons.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2022, 119(32), e2106830119. ※加速フェーズ実施の成果

Yasuo Mori, Mizuki Omori, **Akito Nakao**. **Vital but vulnerable: Human TRPV6 is a trade-off of powerful Ca²⁺ uptake and susceptibility to epithelial barrier dysfunction.** *Cell Calcium* 2022, 107, 102652. ※加速フェーズ実施の成果

Jörg Striessnig, **Akito Nakao**, Yasuo Mori. **Voltage-Gated Ca²⁺ Channels. Lessons from Knockout and Knock-in Mice.** *Voltage-Gated Calcium Channels* 2022, 255-357. ※加速フェーズ実施の成果

Akito Nakao[#], Katsumi Hayashida, Hiroo Ogura, Yasuo Mori, Keiji Imoto. **Hippocampus-related cognitive disorders develop in the absence of epilepsy and ataxia in the heterozygous *Cacna1a* mutant mice tottering.** *Channels (Austin, Tex.)* 2022, 16(1), 113-126. [#]co-corresponding author ※加速フェーズ実施の成果

プレスリリース

京都大学プレスリリース:脳における新しい酸素センシング機構の発見

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2020/200717_2.html

新聞報道:

京都新聞「低酸素感知 仕組み一端解明」(2020年7月17日 32面)

日刊工業新聞「低酸素感知 呼吸を調節」(2020年7月17日 20面)

科学新聞「脳内の「アストロサイト」低酸素濃度感知、呼吸促す」(2020年7月31日 4面)

成果1の紹介記事:

Shahriar SheikhBahaei. **Physiology: New Insights into Central Oxygen Sensing.** *Current Biology* 2020, 30(17), R1004-R1006, doi: 10.1016/j.cub.2020.06.101.

京都大学プレスリリース Breathtaking solution for a breathless problem 2022年5月30日



<https://www.kyoto-u.ac.jp/en/research-news/2022-05-30> ※加速フェーズ実施の成果
EurekAlert! Breathtaking solution for a breathless problem MAY 26, 2022

<https://www.eurekalert.org/news-releases/954131> ※加速フェーズ実施の成果

Phys.Org Astroglial channel protein expression stimulates breathing in oxygen-deprived mice MAY 30, 2022

<https://phys.org/news/2022-05-astroglial-channel-protein-oxygen-deprived-mice.html>
※加速フェーズ実施の成果

