

＝総 説＝

TRPA1 チャネルの機能進化

The Functional Evolution of TRPA1 Channels

村木克彦*、松原匡希

Katsuhiko Muraki*, Masaki Matsubara

愛知学院大学薬学部 薬効解析学講座

Laboratory of Cellular Pharmacology, School of Pharmacy, Aichi-Gakuin University

Summary

The Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) channel is a crucial molecular sensor involved in various physiological and pathological processes. Over evolutionary timescales, TRPA1 channels have undergone significant functional diversification, enabling species to adapt to their unique environmental niches. In early vertebrates, TRPA1 primarily functioned as a thermosensor, detecting noxious hot temperatures. However, in mammals, its role has expanded to include the detection of chemical irritants, mechanical stress, and inflammatory signals. This functional expansion is attributed to genetic variations and alternative splicing events that have modified the channel's sensitivity and response characteristics. Furthermore, comparative studies across different species reveal that TRPA1 channels exhibit a high degree of conservation in their core structure, yet possess distinct regulatory mechanisms. For instance, in some invertebrates, TRPA1 is activated by ultraviolet light, a function not observed in vertebrates. These differences highlight the adaptive significance of TRPA1 channels in response to diverse environmental stimuli. Understanding the evolutionary trajectory of TRPA1 channels not only sheds light on their multifaceted roles in sensory biology but also provides insights into potential therapeutic targets for treating pain, inflammation, and other sensory disorders.

Keywords: transient receptor potential channel (TRP channel), channel mutants, single-nucleotide polymorphism (SNP), protein data bank (PDB), AlphaFold, Evolution

*Corresponding author:

Katsuhiko Muraki, Ph.D.

Tel: +81-52-757-6788

e-mail address: kmuraki@dpc.agu.ac.jp

1. はじめに

Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1)チャネルは、ヒトで27種類のtransient receptor potential (TRP)スーパーファミリーを構成する陽イオン透過型イオンチャネルの一つであり、多くの生物種の神経細胞や非神経細胞に広く発現している(1)。生物進化の過程で、TRPA1チャネルは機能的多様化を遂げ、TRPA1チャネルの機能を介して、種々の生物がそれぞれの独自の環境ニッチに適応してきた(2)。事実、初期の脊椎動物では、TRPA1チャネルは主に有害な高温を感知する温度センサーとして機能していた可能性が高い(3-5)。一方、哺乳類ではその役割が拡大し、酸素や化学物質、炎症性シグナルの検出にも関与するようになったと考えられる(6,7)。この機能拡大は、遺伝子変異や選択的スプライシングで、時間をかけて少しずつ、チャネル感受性や応答特性が変化・修正されてきた。さらに異種間での比較研究では、TRPA1チャネルがそのコア構造で高い相同性を示しつつ、種独自の調節機構を有していることも明らかにになっている(8)。例えば、一部の無脊椎動物では、TRPA1チャネルが紫外線によって活性化されるという、脊椎動物には見られない機能を持っている(9)。即ち、紫外線が降り注ぐ太古の地球環境ではTRPA1チャネルが紫外線センサーとして機能したと考えられる。また鳥類のTRPA1チャネルでは、酸素感受性の責任アミノ酸残基と報告されたアミノ酸残基が保存されておらず、低酸素下でもTRPA1チャネルの活性を維持でき、これが高高度における鳥類の飛行の一助になったと考えられる(10)。このようにTRPA1チャネルは、長い進化の過程で多様な環境刺激やその変化に対する適応力を与える分子であったともいえる。そのためTRPA1チャネルの進化的軌跡を理解することは、感覚生物学におけるその多面的な役割を解明するだけでなく、痛みや炎症、その他の感覚障害の治療に有益な情報を提供する。

イオンチャネルの機能不全で引き起こされるチャネル病（チャネロパチー）の解明や治療法の確立の

ためには、その制御に重要なアミノ酸残基の同定が必要である。公開された遺伝子多型 (SNP) データベース (DB) は、生理・病態的なチャネル機能における特定のアミノ酸残基の役割を解明するために極めて有用であるが、その検討は成功しないことも多い。一方、遺伝子改変モデル動物を用いれば、チャネルタンパク質内の特定のアミノ酸残基を遺伝的に操作して、機能獲得型 (GOF) または機能喪失型 (LOF) の表現型を誘導することは可能であるが、変異と表現型のリンクを予め予測することは不可能である。代替的なアプローチとして、異種間でチャネル機能を比較し、ヒトタンパク質における重要アミノ酸残基を同定することが行われてきた。特に最近では、タンパク質構造データバンク (PDB) の飛躍的充実や、AIによる構造予測データの利用で、分子構造レベルで異種間の比較と予測も可能になってきた。こうしたアプローチがTRPA1チャネルの進化的軌跡の理解にも応用できると考えている。

2. 異なる種における TRPA1 チャネルの刺激応答性

これまでに様々な種におけるTRPA1チャネルの刺激応答性が報告されており、その一部を表1にまとめた。ここに掲げた種では、TRPA1刺激薬としてもっとも汎用されるaryl-isothiocyanate (AITC)に対して、いずれも比較的高い反応性を示している。一方、内因性TRPA1アゴニストとして知られる過酸化水素 (H_2O_2) や外来のカフェインに対する反応性は種差が報告されている。このことは、AITC応答性はTRPA1チャネルの進化過程で古くから保存されている一方、カフェイン応答性は、ニワトリTRPA1 (gTRPA1) チャネルまでは保存されていた可能性が高い。

そこでヒト (hTRPA1) やマウスTRPA1 (mTRPA1) チャネルで報告されている亜鉛イオン (Zn^{2+} , (11,12)) が、gTRPA1チャネルでも内因性TRPA1アゴニストとして機能するか検討した(13)。その結果、hTRPA1

と mTRPA1 チャンネルは、細胞外液に添加した Zn^{2+} に応答性を示したが、gTRPA1 チャンネルは無応答であった。図1でも、hTRPA1 と gTRPA1 チャンネルで

同様な結果が得られ、gTRPA1 チャンネルは細胞外 Zn^{2+} に低感受性であることを示している。

表1. TRPA1 の刺激応答性の種差

種	化学刺激物				Accession No.
	AITC	Caffeine	H_2O_2	Carvacrol	
Human ヒト	○	×	○	○	NM_007332.3
Rhesus monkey アカゲザル	○	—	—	—	XP_001083172
Mouse マウス	○	×	○	○	NP_808449.1
Chicken ニワトリ	○	○	△	○	NP_001305389.1
Green anole トカゲ	○	—	—	○	NP_001280042.1
Zebrafish-b セブラフィッシュ	△	○	△	—	NP_001007067.1
Drosophila ショウジョウバエ	○	—	—	—	XP_017071871.1

○は活性化, △は弱い活性化, ×は活性なし, —は未解析を示す。

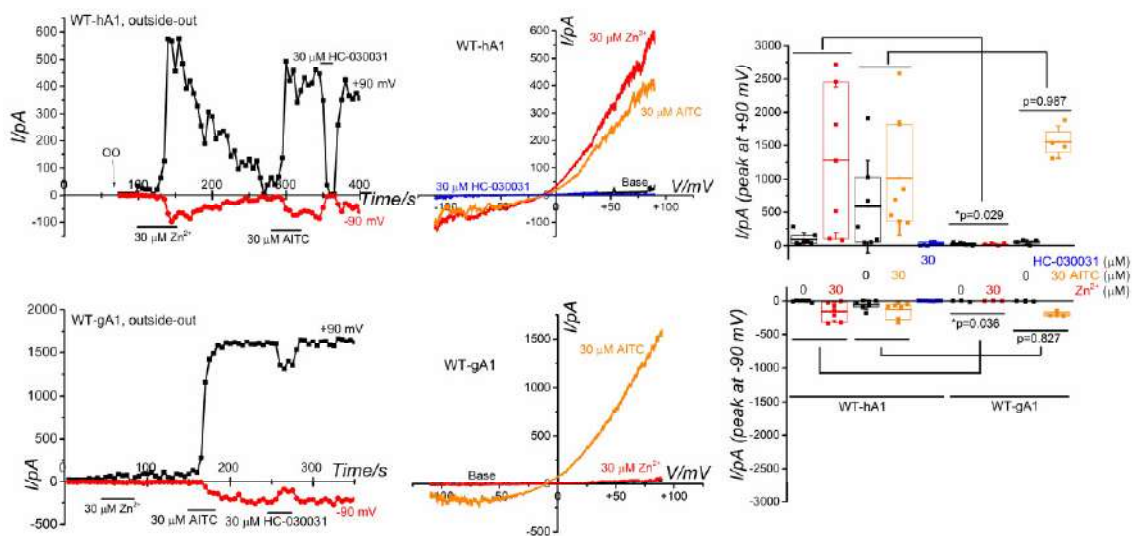


図1. 野生型 hTRPA1 (WT-hA1) および gTRPA1 (WT-gA1) に対する Zn^{2+} および AITC の効果 (Muraki & Matsubara, unpublished data).

それぞれのチャンネル電流は outside-out 単一チャンネル記録法で測定し、時間経過図 (左図)、電流—電圧関係 (中央図)、まとめ図 (右図) として示した。AITC は両種の TRPA1 を有意に活性化したが、 Zn^{2+} は hTRPA1 のみ活性化した。実験法の詳細については(13,14)を参照。

この gTRPA1 チャンネルの Zn^{2+} 低感受性のメカニズムとして、2つの作業仮説を想定した—I) gTRPA1 チャンネルにおける細胞外 Zn^{2+} のチャンネル低透過性、

II) gTRPA1 チャンネルにおける細胞内 Zn^{2+} 結合領域 アミノ酸残基の変異あるいは欠損—である。これを次の2つの方法で解析した(13)。 Zn^{2+} イオノフォア

を利用して、細胞内に Zn^{2+} を直接投与したところ、hTRPA1、gTRPA1 チャンネルともに Zn^{2+} 応答性を示した。さらに inside-out 単一チャンネル記録法で 42 nM の Zn^{2+} を直接、細胞膜の内側に灌流したところ、hTRPA1、gTRPA1 チャンネルともに高い Zn^{2+} 応答性を示した(13)。このことから、gTRPA1 チャンネルは hTRPA1 チャンネルと同様に細胞内の Zn^{2+} に対して応答能を持つことが明らかとなった。

TRPA1 チャンネルの内因性活性化因子として重要な温度の感受性については、様々な生物種で幅広く検討が行われてきた。表2に示すように、マウスと一部のゼブラフィッシュでは TRPA1 チャンネルの低温感受性が報告されている(15,16)。一方、ヒトとのアミノ酸配列の相同性が 60% 程度のニワトリやトカゲの TRPA1 チャンネルは熱（高温）感受性である(4,5)。ハエや蚊の TRPA1 チャンネルも熱感受性であり、

特定のアミノ酸残基の変異でその熱感受性を変え、生育環境に応じた進化を遂げている(17)。一方、hTRPA1 チャンネルの温度感受性については未解決である。hTRPA1 チャンネルが活性化状態あるいは高発現状態にあると、低温感受性が現れる可能性がある(18)、ヒト組織を用いた生理的な検討は難しく結論が出ていない。mTRPA1 チャンネルで低温感受性が認められるが、その活性化温度は低く、生理的な意義は不明である。オキサリプラチン投与の患者で頻発する冷感やしびれの発症メカニズムとして、オキサリプラチンから発生する過酸化物質や細胞内オキサレートが hTRPA1 チャンネルを活性化すると報告された(19,20)。一方、オキサレート産生時でも低温刺激での hTRPA1 チャンネル活性は弱く、低温感受性との関連は不明である。

表 2. TRPA1 の温度応答性の種差

種	温度感受性	全長	ヒトとの相同性	体温
Human	cold or ×*	1119AAs	—	36-37°C
Rhesus monkey	×	1119 AAs	97%	37-38°C
Mouse	cold (<17°C)	1125 AAs	79%	37-38°C
Chicken	heat (>39°C)	1126 AAs	62%	40-42°C
Green anole	heat (>33°C)	1112 AAs	62%	32-38°C
Zebrafish-b	heat/cold (<10°C)	1120 AAs	47%	22-27°C
Drosophila eugracilis	heat (>28°C)	1294 AAs	34%	22-27°C
Mosquito	heat (>22°C, >32°C)	1243 AAs	37%	18-25°C

*報告により結果が異なる。AAs; アミノ酸残基, ×は活性なし。



図 2. 野生型の mTRPA1 (WT-mA1), hTRPA1 (WT-hA1), gTRPA1 (WT-gA1) の部分アミノ酸配列のアライメント比較。 Zn^{2+} 応答に重要なアミノ酸のうち、ヒスチジン残基はこの3種間で保存されているが(黒矢印、黒枠内)、システイン残基はヒトでのみ保存されている(赤矢印、黄色反転)。

3. TRPA1 チャンネルにおける細胞内 Zn^{2+} 結合 AA s の同定

近年のクライオ型電子顕微鏡（クライオ-EM）の急速な進歩で、これまでは難しかったイオンチャンネルをはじめとする膜タンパク質の 3 次元（3D）構造が次々と報告され、TRPA1 チャンネルについても解像度が 3 Å 以下の分子構造が数多く PDB に登録されている(21,22)。また生成 AI 技術を用いた構造予測も急激に進歩し、AlphaFold DB に登録された分子構造モデルが利用可能である(23)。そこでこれらの DB を駆使し、hTRPA1 および gTRPA1 チャンネルの Zn^{2+} 結合メカニズムについて分子レベルで検討した。一方、hTRPA1 チャンネルでは、1021 番目のシステイン残基（C1021）および 983 番目のヒスチジン残基（H983）が、細胞内 Zn^{2+} 応答に重要である(11)。しかし gTRPA1 チャンネルではこのシステイン残基が保存されておらず（図 2、Q1021、赤矢印）、984 番目のヒスチジン残基（H984、hTRPA1 の H983 に相当、図 2 の黒矢印）が gTRPA1 チャンネルにおける細胞内 Zn^{2+} の感知に関わると想定した。この仮説を検証し、さらに hTRPA1 および gTRPA1 チャンネルにおける細胞内 Zn^{2+} の感知に関与する分子構造ドメインを特定するために、metal ion-binding site prediction and modeling server（MIB2）による Zn^{2+} の metal ion affinity (MIA) 予測モデルを使用した。2.88 Å の解像度で取得された hTRPA1 チャンネルのクライオ-EM データ（アミノ酸残基 447-1079, 6PQO, (22)）を基に、細胞内 Zn^{2+} 結合ドメイン（intracellular Zn^{2+} binding domain; IZD）の分子構造をモデル化した(24,25)。この予測モデルでは、hTRPA1 チャンネルの 983 番目のヒスチジン残基（H983）および 987 番目のグルタミン酸残基（E987）が Zn^{2+} に対して高い親和性をもつことが明らかになった(13)。さらに MIB2 で得られたドッキングデータに基づいて、UCSF Chimera の Metal Geometry で hTRPA1 チャンネルの IZD を 3D モデリングした。これにより、hTRPA1 チャンネルの 710 番目のリジン残

基（K710）、714 番目のチロシン残基（Y714）、H983、および E987 の 4 つのアミノ酸残基が、hTRPA1 チャンネル（6PQO）で 4 Å 以内の距離で Zn^{2+} と協調的に相互作用し、IZD1 を形成することを明らかにした（図 3A）。注目すべきことに、これらのいずれのアミノ酸残基も gTRPA1 チャンネルで保存されていた（K716、Y720、H984、および E988）。そこで AlphaFold DB で予測された 3D 構造データ（AF-W8VTH6-F1-model_v4）と MIB2 による MIA 予測モデルおよび Metal Geometry による 3D モデルを組み合わせ、gTRPA1 チャンネルにおける IZD1 を推測した（図 4、AlphaFold DB）。さらに、MIA 予測モデルと 3D モデリングで、 Zn^{2+} が別のドメイン IZD2 によっても認識される可能性が示唆された。IZD2 は hTRPA1 チャンネルの異なる 4 つのアミノ酸残基—711 番目のトリプトファン残基（W711）、854 番目のグルタミン酸残基（E854）、H983、および 979 番目のグルタミン残基（Q979）で構成されており（図 3B）、gTRPA1 チャンネルでもこれが保存されていた（W717, E855, H984、および Q980）。

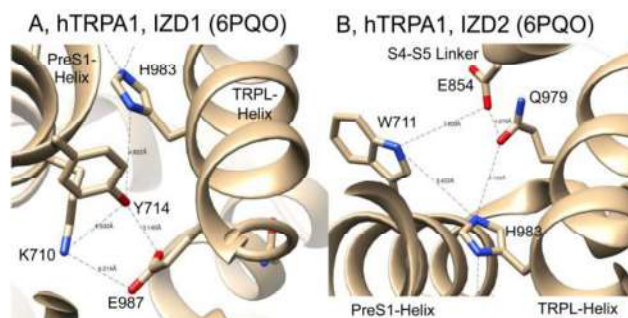


図 3. MIB2 および Metal Geometry で推定された hTRPA1 の IZD1 (A) と IZD2 (B) . K710, Y714, H983, E987 が IZD1 (A) を、W711, E854, Q979, H983 が IZD2 (B) を構成する。推定には hTRPA1 の分子構造モデル 6PQO（PDB）を用いた。原子間距離は UCSF Chimera で計算したものを示す。PreS1-Helix, S4-S5 Linker, TRPL-Helix は hTRPA1 中の構造ユニットを示す。MIB2 および Metal Geometry を用いた IZD s の予測、各データセットの詳細については、(13)を参照。

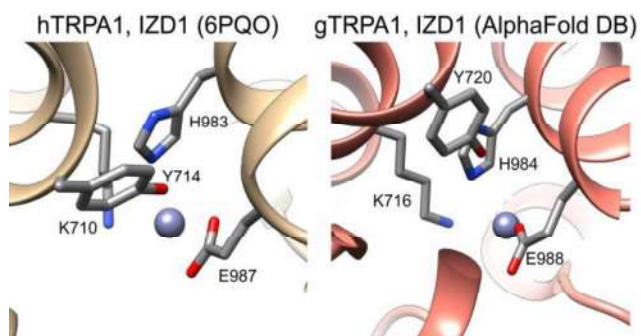


図 4. MIB2 および Metal Geometry で推定された hTRPA1 (左) および gTRPA1 (右) の IZD1. hTRPA1 (K710, Y714, H983, E987) と相同性のあるアミノ酸残基が gTRPA1 (K716, Y720, H984, E988) でも保存され、IZD1 を構成する。球体は予測された Zn^{2+} の位置を示す。分子構造の推定には、hTRPA1 では 6PQO (PDB) を、gTRPA1 では AF-W8VTH6-F1-model_v4 (AlphaFold DB) を用いた。MIB2 および Metal Geometry を用いた各 TRPA1 の IZD1 予測、データセットの詳細については、(13)を参照。

4. 変異 TRPA1 チャンネルを用いた IZD1 および IZD2 の Zn^{2+} 感受性

hTRPA1 および gTRPA1 チャンネルにおける Zn^{2+} 結合領域 IZD1 および IZD2 (IZDs) の重要性をさらに

明確にするため、これらを構成するアミノ酸残基を標的とした変異体を構築し、細胞内 Zn^{2+} に対する応答性をテストした(13)。その結果、表 3 に示すように変異 hTRPA1 および変異 gTRPA1 チャンネルの Zn^{2+} 感受性は大きく減少し、分子モデルでの予測通り hTRPA1 と gTRPA1 チャンネルにおいて、IZDs が機能することが明らかとなった。しかし hTRPA1 チャンネルでは H983A および Q979S 変異体を除き、いずれの変異体でも AITC 感受性が大幅に減少したことから、E987, K710 および E854 はチャンネル活性化機能に重要なアミノ酸残基といえる。実際、チャンネル活性化における E987, K710, E854 の重要性を分子ダイナミクス(MD)解析で予測した報告もあり(26)、著者らの検討は機能面でもこの予測を実証した。一方、gTRPA1 チャンネルでは K716S 変異体を除き、いずれの変異体でも AITC 感受性が保持されていた。これは種によりチャンネル活性化に関わるアミノ酸残基が異なることを示す証拠であり、チャンネルの機能進化を考える点でも興味深い。

表 3. 変異 TRPA1 を用いた IZD1 および IZD2 の Zn^{2+} および AITC 感受性

	Zn^{2+} 感受性 (10 μM)	AITC 感受性 (30 μM)
WT-hA1	+++	+++
H983A-hA1 (IZD1&IZD2)	+	++
E987S-hA1 (IZD1)	×	×
K710S-hA1 (IZD1)	×	×
Y714S-hA1 (IZD1)	×	×
E854S-hA1 (IZD2)	×	×
W711S-hA1 (IZD2)	×	×
Q979S-hA1 (IZD2)	×	+
	Zn^{2+} 感受性 (10 μM)	AITC 感受性 (30 μM)
WT-gA1	+++	+++
H984A-gA1 (IZD1&IZD2)	×	++
E988S-gA1 (IZD1)	×	+
K716S-gA1 (IZD1)	×	×
Y720S-gA1 (IZD1)	×	++
E855S-gA1 (IZD2)	×	++
W717S-gA1 (IZD2)	×	++
Q980S-gA1 (IZD2)	++	+++

活性化の程度は, +++, ++, + で表した。× は活性なし。

5. アミノ酸配列から見た IZDs の進化

著者らの検討により、hTRPA1 や gTRPA1 チャネルは IZDs を介した細胞内 Zn^{2+} 応答能を持つことが明らかとなった。そこで IZDs が種を超えて保存されているか現生種のアミノ酸配列のアライメントデータを基に検討した。表4に示すように、IZDs を構成する7つのアミノ酸残基すべてがヒトから魚類のゼブラフィッシュまで保存されていた。またハエや蚊では IZDs 中の一つのアミノ酸残基でグルタミン酸残基(E)が似た機能特性のアスパラギン酸残基(D)に変わっていたが、他のアミノ酸残基はすべて保存されていた。ホタテやタコなどの水生軟体動物でも

TRPA1 チャネルの IZDs が保存されていたことから、水中生物でも Zn^{2+} 応答性が保持されていると考えられ興味深い。イソギンチャクやクラゲ、スポンジの TRPA1 チャネルはヒトとのアミノ酸配列の相同性が30%前後と低く、また IZDs の Zn^{2+} 結合に重要なヒスチジン残基(H)が性質の異なるロイシン残基(L、イソギンチャク)やアラニン残基(A、クラゲ)、バリン残基(V、スポンジ)に変わっており、 Zn^{2+} 応答性は弱いか欠如している可能性が高い。我々ヒトは、水中生活を営む軟体生物との共通祖先から、IZDs を介した TRPA1 チャネルの Zn^{2+} 応答性を長い進化の間、引き継いできたのかもしれない。

表4. 種間での IZDs の比較

種	Zn^{2+} 感受性	IZD1, IZD2
Human	+++	H983, E987, K710, Y714, W711, E854, Q979
Rhesus monkey	—	H983, E987, K710, Y714, W711, E854, Q979
Mouse	+++	H986, E990, K712, Y716, W713, E857, Q982
Chicken	++	H984, E988, K716, Y720, W717, E855, Q980
Green anole	—	H981, E985, K714, Y718, W715, E852, Q977
Zebrafish-b	—	H988, E992, K717, Y721, W718, E864, Q984
Drosophila eugracilis	—	H1147, E1151, K841, Y854, W842, D 1011, Q1143
Mosquito	—	H1095, E1099, K778, Y782, W779, D 959, Q1091

活性化の程度は, +++, ++ で表した。—は未解析を示す。赤字のアミノ酸残基はヒトとの相違を示す。

種	ヒトとの相同性	IZD1, IZD2
Accession No.		
Mizuhopecten yessoensis ホタテ XP_021365013.1	37%	H988, E992, K709, Y713, W710, D 855, Q984
Octopus vulgaris タコ QHX41565.1	34%	H981, E985, K717, Y721, W718, E853, Q977
Exaiptasia diaphana イソギンチャク XP_020897890.1	31%	I 977, E981, K690, F 694, W691, E981, Q973
Rhopilema esculentum ビゼンクラゲ XP_065057222.1	29%	A 1383, E1387, K1099, Y1103, W1100, P 1258, Q1379
Corticium candelabrum スポンジ XP_062510653.1	29%	V 1036, E1040, K772, F 776, W773, P 910, Q1032

赤字のアミノ酸残基はヒトとの相違を示す。

6. TRPA1 チャンネルにおける細胞外 Zn^{2+} 結合アミノ酸残基の推定

分子構造モデル解析およびその機能解析により、hTRPA1 や gTRPA1 チャンネルは Zn^{2+} 結合領域 IZD1 および IZD2 を有し、細胞内 Zn^{2+} 応答性を持つことが明らかになった。そこで先の作業仮説に戻り、gTRPA1 チャンネルが細胞外 Zn^{2+} に対して低透過性を示すメカニズムについて検討した。hTRPA1 チャンネルの 4 量体構造モデル (PDB : 6PQO) をもとに、gTRPA1 チャンネルの 4 量体構造ホモロジーモデルを構築し、チャンネルのイオン透過領域 (Pore) の構造半径を比較した。しかしチャンネルの 2 価イオンの透過性制御に重要な upper gate 領域および lower gate 領域に非水和 Zn^{2+} ($\sim 1.5\text{\AA}$) に干渉する明確な構造差は発見できなかった (図 5)。一方、TRPA1 チャンネルの細胞外領域のアミノ酸残基が細胞外液中の 2 価イオンの影響を受け、チャンネル機能が修飾を受けることが報告されている(27)。そこで hTRPA1 と gTRPA1 チャンネル pore の出口付近のアミノ酸配列を比較したところ、919 番目のアルギニン残基 (R919) が、gTRPA1 チャンネルではヒスチジン残基 (H920) に置換されていた。さらに、AlphaFold DB で予測された 3D 構造データ (AF-W8VTH6-F1-model_v4) に基づく Zn^{2+} の MIA 予測を行ったところ、gTRPA1 チャンネルの H920, D921, および D925 で高スコア (それぞれ 3.075 の親和性、(13)) が示された。そこで hTRPA1 チャンネルで R919H 変異体を構築して Zn^{2+} 応答調節への関与を検討したところ、R919H 変異体は Zn^{2+} 応答性を失っていた(13)。R919H の重要性を分子メカニズムの観点からさらに理解するために、3D 構造モデルを構築し、その妥当性を変異体で検証した。MIA 予測によると、hTRPA1 チャンネルの R919, E920, および E924 から成る細胞外 Zn^{2+} 結合ドメイン様 (extracellular Zn^{2+} binding domain-like: EZDL) 構造が存在し、 Zn^{2+} と弱く相互作用する可能性が示唆された (E920 および E924 それぞれ、親和性スコア 1.807、(13))。さらに gTRPA1 チャンネルでは H920, D921, お

よび D925 からなる EZDL が、ヒスチジン残基の存在で Zn^{2+} をより効果的に捕捉でき、Metal Geometry を用いた 3D モデリングで EZDL の形成がモデル化できた。一方、hTRPA1 チャンネルの R919H 変異体でホモロジーモデルを構築したところ、R919H, D896, E920, E924 から成る新たな EZDL の形成が予測できた (図 6、(13))。そこで R919H 変異体に EZDL 構成アミノ酸残基の変異を新たに導入した 2 重および 3 重変異体を作製して、R919H 変異体で減弱した Zn^{2+} 応答性がこの変異の導入で回復するか検討した。しかし、いずれの変異体 (R919H-E924A; R919H-E924I; R919H-E920A; R919H-E920A-E924A; R919H-D896A) も、 Zn^{2+} 応答性は回復しなかった。この結果から、hTRPA1 の R919H 変異が Zn^{2+} 応答性を変えることは明らかになったが、その分子メカニズムの同定には至らなかった(13)。

7. EZDL を構成するアルギニン残基とヒスチジン残基の進化上の変化

著者らは TRPA1 チャンネルの細胞外領域の EZDL に存在する hTRPA1 チャンネルの 919 番目のアルギニン残基 (R919) と gTRPA1 チャンネルの 920 番目のヒスチジン残基 (H920、ヒトと相同部位のチキンバリアント) がチャンネルの細胞外 Zn^{2+} 応答に影響を与えることを明らかにした(13)。そこで hTRPA1 チャンネルの R919 と相同部位となるアミノ酸残基が進化でどのように変化してきたのか、現生種のアミノ酸配列のアライメントデータで比較検討した。表 5 に示すように、IZDs に比べ、異種間での EZDL におけるアルギニン残基の保存状態は限定的で、鳥類 (ニワトリ) や一部の爬虫類 (トカゲ)、また初期の哺乳類から分化した有袋類 (タスマニアデビルやコアラなど) では、ヒスチジン置換が見つかった。また最も初期の哺乳類の現生哺乳類であるカモノハシなどの卵生単孔類ではグルタミン残基への置換が見つかった。一方、現生鳥類 100 種でアミノ酸配列を比較したところ、すべての鳥類でヒスチジン置換が見つ

かった。このことから哺乳類全般では、EZDL でアルギニン残基が保存されているが、鳥類や初期哺乳類ではこれがヒスチジン残基に置換され、 Zn^{2+} のイオンチャネル透過性を抑えている可能性がある。すなわち鳥類や一部の爬虫類、初期哺乳類の進化上、 Zn^{2+} の低透過性が有利に働いたのかもしれない。事実、歴史上、環境中（主に海水中）の亜鉛濃度が 10 倍以上に増加した時期があったことが報告されている(29)。約 6600 万年前に巨大隕石がユカタン半島に衝突し、その影響で多くの恐竜が絶滅した。このときに舞い上がった塵が地球の寒冷化をもたらしたが、地表の岩石中の亜鉛も粉塵となり大気中に拡散した（図 7）。生き残った恐竜が鳥類の祖先となり、また

生き残った初期哺乳類の一部が有袋類の祖先となったが、EZDL でのヒスチジン変異の導入が重要だったのかもしれない。現生爬虫類のアミノ酸配列を比較したところ、EZDL にヒスチジンあるいはアルギニン残基が混在していた。この知見は、現生鳥類ではすべてヒスチジン残基が EZDL を構成していたことと比較すると興味深い。「進化は基本、不可逆」という原則からすると、EZDL の構成はアルギニン残基が古く、ヒスチジン化は特殊化とも考えられる。隕石衝突から約 15 万年で哺乳類が爆発的に繁栄を開始したが、このときには Zn^{2+} の高透過性が進化上有利で、それが現在まで引き継がれてきたのかもしれない。

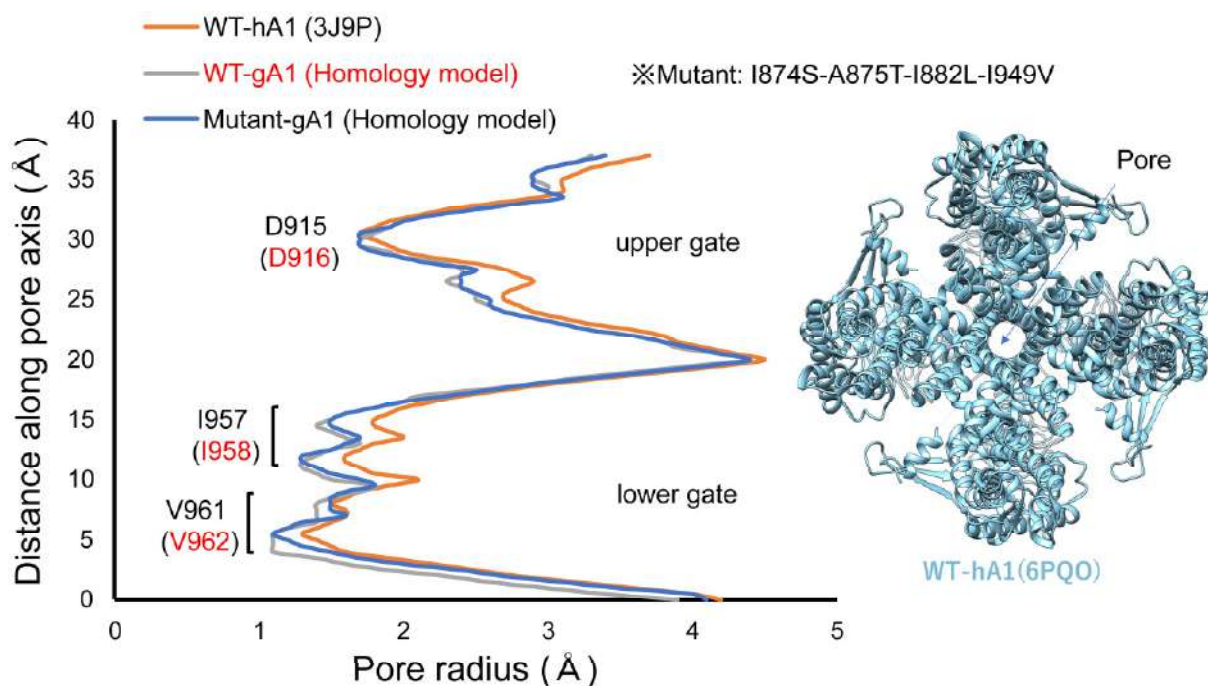


図 5. HOLE program で推測した TRPA1 のチャネルポア (Pore) 半径. 4 量体分子モデルとして WT-hTRPA1 では 3J9P (PDB) を用いた (22)。縦軸は細胞膜内側を基準とした膜貫通長を示す。WT-gTRPA1 および mutant-gTRPA1 では 3J9P をもとに、4 量体の Homology model を構築して HOLE program を実施した(28)。挿絵では 4 量体 hTRPA1 (6PQO) の分子構造を真上（細胞膜外側）から示した。中央に Pore が観察できる。イオン透過を制御する lower gate (I957 (I958) と V961 (V962)) や upper gate (D915 (D916)) において、無水和 Zn^{2+} (半径 $\sim 1.5 \text{ \AA}$) は WT-gTRPA1 や mutant-gTRPA1 に比べ、WT-hTRPA1 を若干通過しやすい傾向にある (Matsubara & Muraki, unpublished data)。

R919H-hA1, Homology model

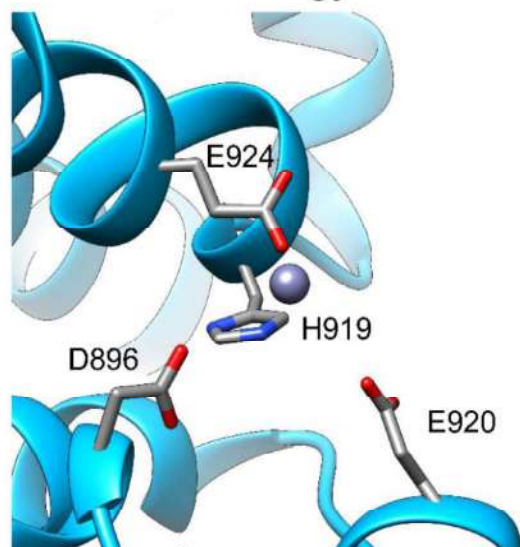


図 6. MIB2 および Metal Geometry で推定された R919H-hA1 の EZDL. D896, H919, E920, E924 が EZDL を構成すると推測された。球体は予測された Zn^{2+} の位置を示す。6PQO (PDB) を基に、SWISS-PORT で Homology model を構築し、MIB2 および Metal Geometry で Zn^{2+} との相互作用をモデル化した。SWISS-PORT を用いた Homology model の構築、MIB2 および Metal Geometry を用いた EZDL 予測、データセットの詳細については、(13)を参照。

8. gTRPA1 チャンネルにおける細胞外 Zn^{2+} 低透過性の分子メカニズムの検討

著者らの検討で、TRPA1 チャンネルの Zn^{2+} 透過性に関する EZDL は発見できなかった。しかし gTRPA1 チャンネルの Zn^{2+} 透過性が低いことは事実であり、その分子メカニズムを解明する必要がある。そこで、これまでの知見をもとに作業仮説を立てて検討した。

これまでに報告された hTRPA1 と gTRPA1 チャンネルのチャンネル機能で、もっとも異なる点は化合物 A-967079 に対する挙動である (30)。A-967079 は hTRPA1 チャンネルに対して強い阻害効果を示すが、gTRPA1 チャンネルに対しては活性化作用を示す。著者らの検討でもこの両面性が示された。そこで A-967079 で gTRPA1 チャンネルの pore を開口させたとき、細胞外 Zn^{2+} が gTRPA1 チャンネルを透過 (活性化) するか検討した。しかし A-967079 存在下、 Zn^{2+} の追加投与は gTRPA1 チャンネルの電流量に有意な影響を及ぼさなかった (13)。A-967079 誘発効果の責任アミノ酸残基の一つは、hTRPA1 チャンネルの 881 番目の

ロイシン残基 (L881) と gTRPA1 チャンネルの 882 番目のイソロイシン残基 (I882) と報告されており (30)、事実、hTRPA1 チャンネルに L881I を導入すると、A-967079 誘発の阻害効果は消失した (Muraki & Matsubara, unpublished data)。そこで hTRPA1 チャンネルで報告された A-967079 結合関連アミノ酸残基 (S873, V948, I878) を基に、相同部位の gTRPA1 チャンネルにヒト型の変異を導入し (I874S, I949V, F879I)、細胞外 Zn^{2+} の効果を検証した。ここでは細胞外 Zn^{2+} の透過性を低下させるヒスチジン残基 (H920) をヒト型に変異させ (H920R)、 Zn^{2+} の透過性を高める変異体を利用した。30 μM までの Zn^{2+} をヒト型の H920R-I874S-I949V-gA1, H920-F879I-gA1, H920R-I874S-I949V-I882L-gA1 チャンネルにそれぞれ投与したが、いずれの変異体でも明確な Zn^{2+} 応答は観察されなかった。このことから、gTRPA1 チャンネルの Zn^{2+} 透過性制御には、A-967079 結合関連アミノ酸残基の関与は低いと考えられる (Muraki & Matsubara, unpublished data)。

表 5. EZDL 中のアルギニン残基とヒスチジン残基の種間比較

種	EZDL	Accession No.
Human	arginine (R919)	NM_007332.3
Rhesus monkey	arginine (R919)	XP_001083172
rabbit	arginine (R918)	XP_008253877.2
Mouse	arginine (R922)	NP_808449.1
Dog	arginine (R921)	XP_038297051.1
Panda	arginine (R921)	XP_002922845.2
Orycteropus afer afer ツチブタ (管歯目ツチブタ科)	arginine (R921)	XP_007945544.1
Monodelphis domestica オポッサム (有袋類)	histidine (H922)	XP_007487041.2
Sarcophilus harrisii タスマニアンデビル (有袋類)	histidine (H915)	XP_031802128.1
Phascogaleus cinereus コアラ (有袋類)	histidine (H923)	XP_020826704.1
Vombatus ursinus ウォンバット (有袋類)	histidine (G923)	XP_027732766.1
Ornithorhynchus anatinus カモノハシ (単孔類, 卵生)	glutamine (Q884)	XP_028924250.1
Tachyglossus aculeatus ハリモグラ (単孔類, 卵生)	glutamine (Q921)	XP_038622683.1
mammalian 哺乳類		
Chicken	histidine (H920)	NP_001305389.1
Green anole	histidine (H917)	NP_001280042.1
Zebrafish-b	glutamine (Q924)	NP_001007067.1
Drosophila eugracilis	valine (V1074)	XP_017071871.1
Mosquito	valine (V1031)	XP_052861895.1

Birds (100 種類): histidine 残基(H) のみ存在: ヒトのアミノ酸配列 (NM_007332.3) をもとに Birds で BLAST を実施した。

Lizard & Snake (100 種類): histidine 残基 (H) と arginine 残基 (R) が混在: ヒトのアミノ酸配列 (NM_007332.3) をもとに Lizard & Snake で BLAST を実施した。以下では H 以外の一部を示す。Varanus komodoensis (R), Lacerta agilis (R, ニワカナヘビ: 爬虫綱有鱗目カナヘビ科 Lacerta 属のトカゲ), Rhineura floridana (R, フロリダワームトカゲ), Podarcis muralis (R, トカゲ), Zootoca vivipara (R, コモチカナヘビ: 有鱗目カナヘビ科コモチカナヘビ属のトカゲ), Podarcis raffonei (R, 壁トカゲ), Phrynocephalus forsythii (R, フォーサイス ヒキガエル頭のトカゲ), Elgaria multicarinata webbii (R, サンディエゴオカアリゲータートカゲ)。

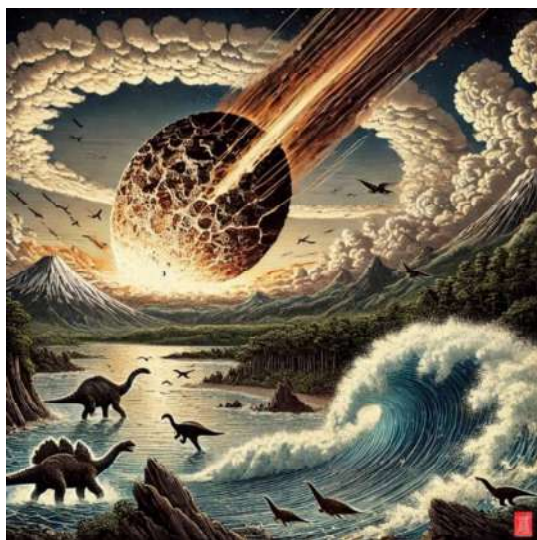


図 7. Deep Impact のイメージ図。約 6600 万年前に地球に衝突した巨大隕石と全盛期であった恐竜の状況を ChatGPT4.0 でイメージとして作成した。この衝突で大気中に金属イオンを含む多くの塵が放出され、地球全体を覆ったと考えられる。そのため衝突の前後で環境中 (主に海水中) の亜鉛濃度が 11 倍程度増加したことが年代測定された粘土層で確かめられている(29)。

9. AlphaFold BD 分子構造モデルを用いた hTRPA1 チャンネルの IZD3 予測

PDB (6PQO) および AlphaFold DB (AF-W8VTH6-F1-model_v4) で公開された TRPA1 チャンネルの構造データを基に、hTRPA1 や gTRPA1 チャンネルは細胞内 Zn^{2+} の結合領域 IZD1 および IZD2 を持つことを明らかにした。一方、AlphaFold DB モデル(AF-O75762-F1-model_v4)では、hTRPA1 チャンネルにおいて W711, C1021, および C1025 から構成される第 3 の IZD (IZD3) の存在も予測された(13)。実際、C1021 をセリン残基に置換すると (C1021S)、 Zn^{2+} 応答が減少すると報告されており(11)、これは C1021 を含む Zn^{2+} 結合ドメインの存在を示唆している。しかし PDB モデル (6PQO) では IZD3 の存在は予測されなかった(13)。6PQO モデルでは IZD3 ポケットに脂質分子が会合しているため(21)、 Zn^{2+} の結合領域が保持できなかった可能性が高い。脂質が解離した PDB モデル (6PQP) では、MIB2 による MIA 予測モデルを基にした Zn^{2+} の相互作用モデルは構築できなかったが、C1021 (1.685) と C1025(2.129)で Zn^{2+} との比較的高い親和性が示されている。AlphaFold DB の AF-O75762-F1-model_v4 モデルを基に、予測構築された IZD3 を図 8 に示す。C1021 と C1025 は共に Inter Facial Helix (IFH)を、IZD2 でもある W711 は Pre-S1 Helix (PreS1)を構成するアミノ酸残基である。さらに 3D 構造上、S4-S5 Linker 内のアミノ酸残基も近傍に存在する。これらのことから、IZD3 が Zn^{2+} 結合ドメインとして機能する可能性は十分ある。一方、C1021 と C1025 が S4-S5 Linker 内の 856 番目のシステイン残基 (C856) とジスルフィド結合を介して、チャンネル機能を制御する可能性も示唆されている(18)。そこで、IZD3 の存在を C1021, C1025, C856 の単独、2 重、3 重変異体を作製して Zn^{2+} 応答性を検討した。図 9 に hTRPA1、mTRPA1、gTRPA1 チャンネルの各 IFH を含む部分アミノ酸配列のアライメントを示す。全長、または IZDs や EZDL に比べ、IFH のアミノ酸レベルの相同性はこの 3 異種間で 10%以下と低いこと

が明らかである。一方、hTRPA1 チャンネルの IFH を構成するアミノ酸残基において、1018 番目のヒスチジン残基 (H1018) の重要性も報告されている。マウスバリエーションである H1018R は、小児ぜんそくと相関性の高い SNP 変異と同定され、この変異体は微粒子刺激による TRPA1 の活性化を増強した(31)。そのため H1018 についても変異体を作製して、その機能を検討した。その結果、C1021, C1025, C856, H1018 の変異は Zn^{2+} 誘発の hTRPA1 チャンネルの活性を変化させることが明らかになった (Muraki & Matsubara, in preparation)。またその分子メカニズムとしては、IZD3 を介した Zn^{2+} 応答性に対する影響よりも、アミノ酸残基の変異でチャンネルの電位依存性が変化した可能性が高かった (Muraki & Matsubara, in preparation)。一方、C1021 および H1018 にはそれぞれ 2 種類の SNP (C1021Y, C1021F, H1018R, H1018Y) が存在するが、H1018R 以外のチャンネル機能は不明であった。著者らはいずれの SNP 変異体においても、内因性の TRPA1 チャンネル活性化因子である Zn^{2+} に対する応答性が有意に変化していることを見出している (Muraki & Matsubara, in preparation)。このため、いずれの SNP 変異も hTRPA1 チャンネルの GOF や LOF を引き起こすと推定しており、今後、臨床的意義の解明が待たれるところである。

10. 霊長類における IFH の進化

TRPA1 チャンネルの異種間 IFH のアライメント比較 (図 9) で明らかなように、IFH は生物進化の過程で変化してきた可能性が高い。そこで現生霊長類を中心に、IFH のアミノ酸残基を比較したところ興味深い結果が得られた (表 6)。現在知られている最も古い霊長類あるいは霊長類に最も近縁な動物の化石の年代は約 6590 万～約 6580 万年前に遡る(32)。分子系統樹上、最も初期の霊長類の現生種はロリスやワオキツネザルなどの曲鼻ザル亜目の霊長類である。この霊長類では、ヒトと比較した場合、TRPA1 全長のアミノ酸配列で 90%前後の相同性を示す一方、

IFH の保存度は低い。また最古のメガネザルの化石の年代は約 5500 万年前まで遡るが、この唯一の現生種フィリピンメガネザルの IFH も保存度は高くない。しかしマーモセットやリスザルなどの広鼻サル類になると状況が一変する。IFH の保存度は格段に高くなり、リスザルとの相同性は 90%を超える。興味深いことにオマキザル、フクロウザル、マーモセットで SNP 変異と同じ F1021 (C1021F) が確認できた。現在までに発掘された最古の広鼻サル類の化石は約 3600 万年前のものであり、メガネザルとの分岐から 2000 万年近く時間が空いている。この間に IFH を大きく変える進化の淘汰圧があった可能性があり、それがメガネザルの現生種の少なさの原因かもしれない。

2300 万年～500 万年頃に繁栄した狭鼻ザル類の現生種がニホンザルを含むオナガザルの仲間であり、広鼻サル類と同様、IFH の保存度が高い。またオナガザルの多くが SNP 変異の Y1021 (C1021Y) を持つことは興味深い。さらにミドリザルには別の SNP 変異の Y1018 (H1018Y) も共存する。これらのことから、SNP 変異 H1018Y, C1021Y, C1021F を持つ変異体の解析は、こうした SNP を持つヒトの TRPA1 チャンネルの表現型を明らかにするだけでなく、前臨床試験に供されることの多いオナガザル上科のカニクイザルやアカゲザル、ミドリザルでの TRPA1 チャンネル機能の推定にも役立つと考えている (表 6)。

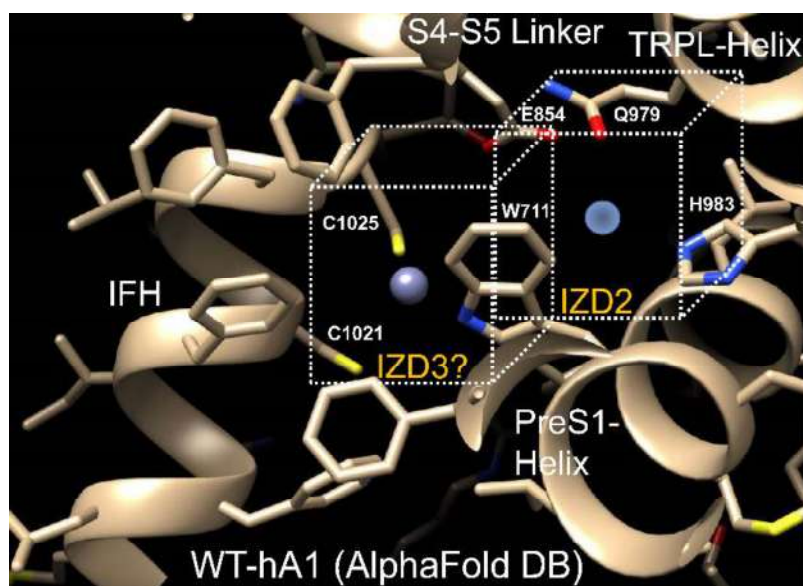


図 8. AlphaFold DB モデル (AF-O75762-F1-model_v4) で予測された WT-hA1 の IZD2 および IZD3. このモデルを MIB2 および Metal Geometry で MIA 予測したところ、W711, C1021, C1025 から構成される IZD3 が予測された(13)。近傍には W711, E854, H979, H983 から構成される IZD2 が存在する。PreS1-Helix, S4-S5 Linker, TRPL-Helix, IFH は hTRPA1 中の構造ユニットを示す。IZD3 の関与の詳細については、投稿準備中 (Muraki & Matsubara, in preparation)。



図 9. ヒト(Homo)、マウス(Mus)、ニワトリ(Gallus) TRPA1 の IFH を中心とした部分アミノ酸配列のアライメント比較。IZD1&2 のヒスチジン残基 (H, 黒枠内) および IZD1 のグルタミン酸残基 (E, 黒枠内) は保存されているが、IFH 前後のアミノ酸残基の保存度はかなり低い。変異体を用いて解析した IFH 中のアミノ酸残基を黄色反転で示す (Muraki & Matsubara, in preparation)。

表 6. 霊長類などにおける IFH の比較

霊長類およびその直前の系統（ヒョケザル、ツバイ）の現生種における IFH のアライメント比較。赤字はヒトと異なるアミノ酸を、直線および分岐の青線は分子系統樹上でのヒトへの進化および分化を示す。（オ）および（テ）は、それぞれオナガザル上科およびテナガザル科を示す。隕石衝突（Deep Impact）による大量絶滅は 6600 万年前頃、最古の霊長類への進化は 6590～6586 万年前頃、ヒト上科への進化は 2300 万年前頃、起こったと推定される。数字は全長中での位置を、%はヒト全長アミノ酸配列との相同性を示す。現生霊長類においても、直鼻猿亜目のメガネザルまでは IFH の相同性が明らかに低い。

Homo sapiens	1015	MLFHIFCFLFCTGEI	1029
ヒト族、ヒト亜族			
Pan troglodytes チンパンジー	1015	MLFHIFCFLFCTGEI	1029
Pan paniscus ボノボ	1015	MLFHIFCFLFCTGEI	1029
ヒト亜科、ヒト族			
Gorilla gorilla gorilla	1015	MLFRIFCFLFCTGEI	1029
ヒト科、ヒト亜科			
Pongo abelii スマトラオランウータン	1015	MLFHVFCFLFCTGEI	1029
Pongo pygmaeus ボルネオオランウータン	1015	MLFHVFCFLFCTGEI	1029
ヒト上科、ヒト科			
Nomascus leucogenys テナガザル	1015	MLFHIFCFLFCNGEI	1029
Symphalangus syndactylus テナガザル	1015	MLFHIFCFLFCNGEI	1029
Hylobates moloch テナガザル	1014	MLFHIFCFLFCNGEI	1028
Colobus angolensis コロボスザル（テ）	1012	ILFHIFCFLFCTGEI	1026
狭鼻小目、ヒト上科 (2300 万年)			
Macaca fascicularis カニクイザル（オ）	1015	LLFHIFYFLFCTGEI	1029
Macaca mulatta アカゲザル（オ）	1015	LLFHIFYFLFCTGEI	1029
Macaca thibetana thibetana	1015	LLFHIFYFLFCTGEI	1029
Mandrillus leucophaeus ドリル（オ）	1015	LLFHIFYFLFCTGEI	1029
Papio anubis アヌビスヒビ（オ）	1015	LLFHIFYFLFCTGEI	1029
Papio anubis アヌビスヒビ（オ）	1015	LLFQHIFYFLFCTGEI	1030
Theropithecus gelada ヒビ（オ）	1015	LLFHIFYFLFCTGEI	1029
Ptilocolobus tephrosceles コロボス（オ）	1012	ILFHIFYFLFCTGEI	1026
Trachypithecus francoisi フランソワルトン	1012	ILFHIFYFLFCTGEI	1026
Rhinopithecus roxellana キンシコウ（オ）	1012	ILFHIFRFLFCTGEI	1026
Chlorocebus sabaeus ミドリザル（オ）	1015	LLFYIFYFLFCTGEI	1029
真猿下目、狭鼻小目			
Cebus imitator オマキザル	1015	ILFHIFFFLFCTGEI	1029
Saimiri boliviensis リスザル	1010	ILFHIFCFLFCTGEI	1024
Aotus nancymae フクロウザル	1015	ILFHIFCFLFCTGEI	1029
Callithrix jacchus マーモセット	1015	ILFHIFCFLFCTGEI	1029
直鼻猿亜目、真猿下目			
Carlito syrichta フィリピンメガネザル	1017	GLFRLFICYIFCSNET	1030
直鼻猿亜目			
Nycticebus coucang ロリス	1042	RLFHLFCYLFQNQET	1056
Otlemur garnettii ガーネットガラゴ	995	RLFHLFYFLFCNHET	1009
Lemur catta ワオキツネザル	1017	RLFNLFCYLFYNQEK	1030
霊長類 (65.9～65.86 my)			
Deep impact (6600 万年)			
Cynocephalus volans ヒョケザル	1017	KLISIFYDFGNQET	1031
皮翼類			
Tupaia chinensis ツバイ	1017	RLLRIFCYLFCVKEA	1031

11. 種選択的な TRPA1 作動薬の開発に向けて

これまで述べてきたように TRPA1 チャンネルの機能は、進化上保存されてきたものもあれば、変化してきたものもある。そのため異種間のアミノ酸レベルの違いを利用した種特異的 TRPA1 作動薬の開発も可能と考えられる。実際、強力な TRPA1 チャンネル活性化薬として日本で開発された JT-010(33)は、著者らの検討でマウスに比べ、ヒトの TRPA1 チャンネルに対して 100 倍以上の効力を示すことが判明した(34)。またこの差異は hTRPA1 チャンネルの 669 番目のフェニルアラニン残基 (F669) が mTRPA1 チャンネルではメチオニン残基に置換され (M670)、JT-010 のベンゼン環と F669 のフェニル基で生じる分子間相互作用が M670 では弱いと推定された(34)。こうした事実から、例えば鳥類や昆虫の TRPA1 チャンネルを標的とした忌避剤の開発も期待できる。しかし AI を利用したタンパク質の分子構造予測や化合物のドッキング予測の精度が、いまだ十分には高くないため、責任アミノ酸残基の同定や有力化合物の創出はいまのところ容易でない。とくにアミノ酸残基を改変したホモロジーモデルの分子構造予測については、信頼性が低いと言わざるを得ない。今後の進展が待たれるところである。

12. おわりに

本稿では、筆者らが最近実施した異種間 TRPA1 チャンネルの機能比較とその進化上の意義について解説した。2022 年 11 月に生成 AI 技術を用いたオープン AI の ChatGPT や AlphaFold が報告され、AlphaFold を利用したタンパク質の予測分子構造 DB も公開された。ヒトやマウスを中心に蓄積されたタンパク質の分子構造モデル (PDB) だけでなく、構造データが不在の異種タンパク質の分子構造を AI で予測し、利用できる時代となった。また SNP DB も日々更新され、多くはないが、疾患の原因が遺伝子レベルで分かるようになってきた。とくに日本人独自の SNP DB や患者の遺伝子 DB が整備されつつあるこ

とは喜ばしい。一方、医療情報に対する保護主義的対応も強まり、SNP DB の利用制限や表現型との紐付け情報の秘匿化などが進みつつある。治療が困難な多因子性疾患への対応には、疾患を多面的に捉え、その情報を統合して治療薬を開発してゆく必要がある。そのためビッグデータや AI 技術の利用は必須であり、我々もそれに備えなければならない。

地球上に脊椎動物が誕生して、約 5 億 1500 万年が経過した。我々の祖先は幾度かの絶滅の危機を乗り越え、約 6590 万年前に霊長類に進化した。その後、約 1200 万年～約 1000 万年前の中新世の中期ごろに、ヒト科最古の霊長類が出現したが、表 6 に示したようにヒト科の現生種は我々ホモ・サピエンス *Homo sapiens* を含めても十指に満たない。一方、ヒト亜族への進化は約 700 万年～約 600 万年前まで遡り、約 250 万年前にホモ・サピエンスと同族で最古級のホモ属ホモ・ハピリスが出現したとされる(35)。また、約 200 万年前にはホモ・エレクトス(36,37)が現れ、ホモ・ハピリスも含め、多様なホモ属が共存したと考えられている。しかし約 4 万年前には、その子孫のホモ・ネアンデルターレンシス (ネアンデルタール人) やデニソワ人は絶滅し(38,39)、ホモ・サピエンスだけが現在まで生き延びている。この選択に関与した様々な要因が提唱されているが、その中でも気候変動は大きな影響を与えた可能性が高い。TRP チャンネルは環境変化の感知に関わるタンパク質であることから、ネアンデルタール人やデニソワ人と現代人の TRP チャンネル遺伝子の比較は人類進化の理解に新たな視点を与える可能性もあり興味深い。

最後に、愛知学院大学薬学部 薬効解析学講座が開設されて、2024 年度で 20 年の節目を迎えた。本稿では、本講座で行ってきた研究活動の最新の研究成果を紹介した。本稿が関係諸氏の興味につながれば幸いである。

追記

著者の松原匡希 (薬効解析学研究室 大学院生)

は、本稿で紹介した内容の一部で 2023 年 7 月 8 日開催の第 69 回 日本薬学会東海支部総会・大会において、学生優秀発表賞を受賞した（「分子構造モデルを用いた TRPA1 の亜鉛結合サイトの推定」松原匡希 & 村木克彦（愛知学院大薬））。

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は、日本学術振興会科学研究補助金「基盤研究（C）（一般）」（研究代表者：村木克彦（20K07599, 2020～2022 年度、24K09700, 2024～2027 年度）、愛知学院大学薬学部 寄付講座研究助成（薬効解析学講座配分金 2024～2026 年度）を受けて実施された。研究の実施に協力いただきました村木由起子博士研究員、波多野紀行講師、鈴木裕可講師に心より感謝申し上げます。また森田あや美助教（現薬効解析学講座所属）、伊藤友香助教（現山梨大学医学部所属）、ならびに、これまで配属した講座卒業研究生の諸氏に深謝いたします。

利益相反

開示すべき利益相反はありません。

参考論文

1. Talavera, K., Startek, J. B., Alvarez-Collazo, J., Boonen, B., Alpizar, Y. A., Sanchez, A., Naert, R., and Nilius, B. (2020) Mammalian Transient Receptor Potential TRPA1 Channels: From Structure to Disease. *Physiol Rev* **100**, 725-803
2. Chen, J. (2015) The evolutionary divergence of TRPA1 channel: heat-sensitive, cold-sensitive and temperature-insensitive. *Temperature (Austin)* **2**, 158-159
3. 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., and Julius, D. (2010) Molecular basis of infrared detection by snakes. *Nature* **464**, 1006-1011
4. Kurganov, E., Zhou, Y., Saito, S., and Tominaga, M. (2014) Heat and AITC activate green anole TRPA1 in a membrane-delimited manner. *Pflugers Arch* **466**, 1873-1884
5. Saito, S., Banzawa, N., Fukuta, N., Saito, C. T., Takahashi, K., Imagawa, T., Ohta, T., and Tominaga, M. (2014) Heat and noxious chemical sensor, chicken TRPA1, as a target of bird repellents and identification of its structural determinants by multispecies functional comparison. *Molecular Biology and Evolution* **31**, 708-722
6. Takahashi, N., Mizuno, Y., Kozai, D., Yamamoto, S., Kiyonaka, S., Shibata, T., Uchida, K., and Mori, Y. (2008) Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin)* **2**, 287-298
7. Takahashi, N., Kuwaki, T., Kiyonaka, S., Numata, T., Kozai, D., Mizuno, Y., Yamamoto, S., Naito, S., Knevels, E., Carmeliet, P., Oga, T., Kaneko, S., Suga, S., Nokami, T., Yoshida, J., and Mori, Y. (2011) TRPA1 underlies a sensing mechanism for O₂. *Nature Chemical Biology* **7**, 701-711
8. Saito, S., and Tominaga, M. (2017) Evolutionary tuning of TRPA1 and TRPV1 thermal and chemical sensitivity in vertebrates. *Temperature (Austin)* **4**, 141-152
9. Guntur, A. R., Gu, P., Takle, K., Chen, J., Xiang, Y., and Yang, C. H. (2015) Drosophila TRPA1 isoforms detect UV light via photochemical production of H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E5753-5761
10. Mori, Y., Takahashi, N., Kurokawa, T., and Kiyonaka, S. (2017) TRP channels in oxygen physiology: distinctive functional properties and roles of TRPA1 in O₂ sensing. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **93**, 464-482
11. Hu, H., Bandell, M., Petrus, M. J., Zhu, M. X., and Patapoutian, A. (2009) Zinc activates damage-sensing

- TRPA1 ion channels. *Nat Chem Biol* **5**, 183-190
12. Andersson, D. A., Gentry, C., Moss, S., and Bevan, S. (2009) Clioquinol and pyriethione activate TRPA1 by increasing intracellular Zn²⁺. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8374-8379
 13. Matsubara, M., Muraki, Y., Suzuki, H., Hatano, N., and Muraki, K. (2024) Critical amino acid residues regulating TRPA1 Zn(2+) response: A comparative study across species. *J Biol Chem* **300**, 107302
 14. Suzuki, H., Hatano, N., Muraki, Y., Itoh, Y., Kimura, S., Hayashi, H., Onozaki, K., Ohi, Y., Haji, A., and Muraki, K. (2014) The NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium activates the human TRPA1 nociceptor. *Am J Physiol Cell Physiol* **307**, C384-394
 15. Oda, M., Kurogi, M., Kubo, Y., and Saitoh, O. (2016) Sensitivities of Two Zebrafish TRPA1 Paralogs to Chemical and Thermal Stimuli Analyzed in Heterologous Expression Systems. *Chemical Senses* **41**, 261-272
 16. 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., and Patapoutian, A. (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819-829
 17. Nguyen, T. H. D., Chapman, S., Kashio, M., Saito, C., Strom, T., Yasui, M., and Tominaga, M. (2022) Single amino acids set apparent temperature thresholds for heat-evoked activation of mosquito transient receptor potential channel TRPA1. *J Biol Chem* **298**, 102271
 18. Sinica, V., and Vlachova, V. (2021) Transient receptor potential ankyrin 1 channel: An evolutionarily tuned thermosensor. *Physiol Res* **70**, 363-381
 19. Miyake, T., Nakamura, S., Zhao, M., So, K., Inoue, K., Numata, T., Takahashi, N., Shirakawa, H., Mori, Y., Nakagawa, T., and Kaneko, S. (2016) Cold sensitivity of TRPA1 is unveiled by the prolyl hydroxylation blockade-induced sensitization to ROS. *Nat Commun* **7**, 12840
 20. Miyake, T., Nakamura, S., Meng, Z., Hamano, S., Inoue, K., Numata, T., Takahashi, N., Nagayasu, K., Shirakawa, H., Mori, Y., Nakagawa, T., and Kaneko, S. (2017) Distinct Mechanism of Cysteine Oxidation-Dependent Activation and Cold Sensitization of Human Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel by High and Low Oxaliplatin. *Front Physiol* **8**, 878
 21. Suo, Y., Wang, Z., Zubcevic, L., Hsu, A. L., He, Q., Borgnia, M. J., Ji, R. R., and Lee, S. Y. (2020) Structural Insights into Electrophile Irritant Sensing by the Human TRPA1 Channel. *Neuron* **105**, e5
 22. Paulsen, C. E., Armache, J. P., Gao, Y., Cheng, Y., and Julius, D. (2015) Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms. *Nature* **525**, 552
 23. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Zidek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., and Hassabis, D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583-589
 24. Lin, Y. F., Cheng, C. W., Shih, C. S., Hwang, J. K., Yu, C. S., and Lu, C. H. (2016) MIB: Metal Ion-Binding Site Prediction and Docking Server. *J Chem Inf Model* **56**, 2287-2291
 25. Lu, C. H., Chen, C. C., Yu, C. S., Liu, Y. Y., Liu, J. J., Wei, S. T., and Lin, Y. F. (2022) MIB2: metal ion-binding site prediction and modeling server. *Bioinformatics* **38**, 4428-4429

26. Habgood, M., Seiferth, D., Zaki, A. M., Alibay, I., and Biggin, P. C. (2022) Atomistic mechanisms of human TRPA1 activation by electrophile irritants through molecular dynamics simulation and mutual information analysis. *Sci Rep* **12**, 4929
27. Kurganov, E., Saito, S., Tanaka Saito, C., and Tominaga, M. (2017) Requirement of extracellular Ca(2+) binding to specific amino acids for heat-evoked activation of TRPA1. *J Physiol* **595**, 2451-2463
28. Smart, O. S., Neduvilil, J. G., Wang, X., Wallace, B. A., and Sansom, M. S. (1996) HOLE: a program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J Mol Graph* **14**, 354-360, 376
29. Maruoka, T., Nishio, Y., Kogiso, T., Suzuki, K., Osawa, T., Hatsukawa, Y., Terada, Y. (2020) Enrichment of chalcophile elements in seawater accompanying the end-Cretaceous impact event. *GSA Bulletin* **132**, 2055-2066
30. Banzawa, N., Saito, S., Imagawa, T., Kashio, M., Takahashi, K., Tominaga, M., and Ohta, T. (2014) Molecular basis determining inhibition/activation of nociceptive receptor TRPA1 protein: a single amino acid dictates species-specific actions of the most potent mammalian TRPA1 antagonist. *J Biol Chem* **289**, 31927-31939
31. Deering-Rice, C. E., Shapiro, D., Romero, E. G., Stockmann, C., Bevans, T. S., Phan, Q. M., Stone, B. L., Fassl, B., Nkoy, F., Uchida, D. A., Ward, R. M., Veranth, J. M., and Reilly, C. A. (2015) Activation of Transient Receptor Potential Ankyrin-1 by Insoluble Particulate Material and Association with Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **53**, 893-901
32. Wilson Mantilla, G. P., Chester, S. G. B., Clemens, W. A., Moore, J. R., Sprain, C. J., Hovatter, B. T., Mitchell, W. S., Mans, W. W., Mundil, R., and Renne, P. R. (2021) Earliest Palaeocene purgatoriids and the initial radiation of stem primates. *R Soc Open Sci* **8**, 210050
33. Takaya, J., Mio, K., Shiraishi, T., Kurokawa, T., Otsuka, S., Mori, Y., and Uesugi, M. (2015) A Potent and Site-Selective Agonist of TRPA1. *J Am Chem Soc* **137**, 15859-15864
34. Matsubara, M., Muraki, Y., Hatano, N., Suzuki, H., and Muraki, K. (2022) Potent Activation of Human but Not Mouse TRPA1 by JT010. *Int J Mol Sci* **23**, 14297
35. Spoor, F., Leakey, M. G., Gathogo, P. N., Brown, F. H., Anton, S. C., McDougall, I., Kiarie, C., Manthi, F. K., and Leakey, L. N. (2007) Implications of new early Homo fossils from Ileret, east of Lake Turkana, Kenya. *Nature* **448**, 688-691
36. Broom, R., and Robinson, J. T. (1949) A new type of fossil man. *Nature* **164**, 322
37. Robinson, J. T. (1953) The nature of *Telanthropus capensis*. *Nature* **171**, 33
38. Higham, T., Douka, K., Wood, R., Ramsey, C. B., Brock, F., Basell, L., Camps, M., Arrizabalaga, A., Baena, J., Barroso-Ruiz, C., Bergman, C., Boitard, C., Boscato, P., Caparros, M., Conard, N. J., Draily, C., Froment, A., Galvan, B., Gambassini, P., Garcia-Moreno, A., Grimaldi, S., Haesaerts, P., Holt, B., Iriarte-Chiapusso, M. J., Jelinek, A., Jorda Pardo, J. F., Maillo-Fernandez, J. M., Marom, A., Maroto, J., Menendez, M., Metz, L., Morin, E., Moroni, A., Negrino, F., Panagopoulou, E., Peresani, M., Pirson, S., de la Rasilla, M., Riel-Salvatore, J., Ronchitelli, A., Santamaria, D., Semal, P., Slimak, L., Soler, J., Soler, N., Villaluenga, A., Pinhasi, R., and Jacobi, R. (2014) The timing and spatiotemporal patterning of Neanderthal disappearance. *Nature* **512**, 306-309
39. Krause, J., Fu, Q., Good, J. M., Viola, B., Shunkov, M. V., Derevianko, A. P., and Paabo, S. (2010) The complete mitochondrial DNA genome of an unknown hominin from southern Siberia. *Nature* **464**, 894-897

