

[別紙 1]

論文の内容の要旨

Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca²⁺ channel isoforms:
molecular structures and functional characterization

ムスカリン性アセチルコリン受容体による TRP6 Ca²⁺ チャネルの調節：
3つのチャネルアイソフォームの分子構造と機能特性

指導教官：デビッド サーフエン 助教授
東京大学医学科研究科
平成十年四月入学
医学博士課程
氏名：張 磊

Ca²⁺による細胞内シグナル伝達は、細胞の増殖、分化、アポトーシスなどの制御に重要な役割を担っている。細胞内の Ca²⁺上昇は、主に小胞体内からの Ca²⁺放出と細胞外からの Ca²⁺流入により起こることが、およそ10年前からの研究により明らかになってきている。多くの細胞と組織においては、イノシトール三リン酸 (IP₃) の産生を促す G タンパク質共役型受容体を活性化すると、二相性の細胞内 Ca²⁺上昇が見られる。最初の Ca²⁺上昇は、小胞体の膜に局在する IP₃ 受容体の Ca²⁺チャネルの開口により、小胞体内に貯えられた Ca²⁺が細胞質に放出されることにより生ずる。次の Ca²⁺上昇は、形質膜に局在する Ca²⁺チャネルの開口により細胞外の Ca²⁺が細胞質へ流入することにより生ずる。一方、小胞体からの Ca²⁺放出は一過性に起こるのに対し、細胞外からの Ca²⁺流入は持続的に起こる。細胞内の Ca²⁺ストアの枯渇より引き起こされる Ca²⁺流入は、この

研究の開拓者の一人である James Putney により capacitative calcium entry (CCE) と名付けられた。現在、CCE を司る Ca^{2+} チャネルの分子レベルの同定は、細胞内 Ca^{2+} シグナル伝達の分野における大きい研究課題の一つとなっている。

CCE チャネルの最初の候補として見つけられたのは、ショウジョウバエの視覚系で機能する *Drosophila* transient receptor potential (dTRP)と TRP-like (dTRPL) の二つ Ca^{2+} チャネルであった。その後、dTRP と dTRPL と高い相同性を示す、七種類のは乳類の Ca^{2+} チャネル (TRP1-7) をコードする cDNA が単離された。それぞれの TRP チャネルの mRNA は、種々の組織で異なった発現分布を示す。各々の TRP チャネルの機能的性質は、主に培養細胞における cDNA により発現系で調べられている。その研究の結果、七つの TRP チャネルは、二つのグループに大別されることができることが判明した。TRP1/2/4/5 は、 Ca^{2+} ストアの枯渇により活性化されるチャネルであるのに対して、mTRP3/6/7 は、 Ca^{2+} ストアと関係なく、Gq と共役する受容体の制御を受けるチャネルである。しかし、それぞれの TRP チャネルの制御機構に関して議論の余地がある。例えば、TRP6 チャネルについては、G タンパク質共役型受容体により制御されるチャネルである報告と、 Ca^{2+} ストアにより制御されるチャネルである報告もある。最近、ヒトの TRP3/6 とマウスの TRP7 は、ジアシルグリセロール (DAG) の直接的作用により活性化される報告もあったが、その活性化の機構や、活性化に関与する TRP チャネルの部位等は、未だ分かっていない。

今回の研究で、TRP6の調節機構を研究するため、ラット(r) TRP6 cDNAのクローニングを RT-PCR の手法を用いて行い、3つの異なるアイソフォームをコードする cDNA を得た。もっとも長いアイソフォームである rTRP6A は 930 個のアミノ酸から成り、rTRP6B は N 末端の 54 個のアミノ酸 (3-56) が欠損し、rTRP6C はさらに C 末端付近の 68 アミノ酸 (735-802) が欠損している。rTRP6A と rTRP6B をコードする発現ベクターを COS 細胞に一過性に導入すると、ムスカリン性アセチルコリン受容体の M₅ サブタイプの活性化を介した Ca²⁺ の流入が上昇し、Ba²⁺ の流入も引き起こした。一方、rTRP6 アイソフォームを発現させた細胞では、小胞体の Ca²⁺ ポンプ (Ca²⁺ -ATPase) 阻害剤サブシガージン (thapsigargin) 処理による細胞内 Ca²⁺ ストアの枯渇は、Ba²⁺ の流入を引き起こさなかった。また、rTRP6A を発現させた細胞では、Ba²⁺ の流入が DAG の類似体である OAG の処理により促進されたが、rTRP6B を発現させた細胞では、OAG 依存的な Ba²⁺ の流入は見られなかった。rTRP6 の cDNA を導入した COS 細胞で、rTRP6B の N 末端 (1-301 aa) あるいは rTRP6A のアンチセンス RNA の発現によりムスカリン性アセチルコリン受容体の M₅ サブタイプ依存的な Ba²⁺ の流入が抑制された。これらの実験結果から rTRP6 が、細胞内 Ca²⁺ ストアには非依存的で、G 蛋白質共役型受容体により調節される Ca²⁺ チャネルの形成に関与していると判明した。rTRP6A や rTRP6B の実験結果とは異なり、rTRP6C を発現させた COS 細胞では M₅ サブタイプの活性化により引き起こされる Ca²⁺ の流入増加や Ba²⁺ の流入は見られず、また OAG 依存的な Ba²⁺ の流入も見られなかった。糖鎖の分析より rTRP6A と rTRP6B は COS 細胞では糖鎖付加されるが、rTRP6C はほとんど糖鎖付加されないことを明らかにした。これらの実験結果

から、DAG による rTRP6A の活性化には N 末端 (3-56 aa) が重要で、第 6 膜貫通領域のすぐ下流に位置する 735-802 aa 領域が、rTRP6 蛋白質のプロセッシングに重要であることが示唆される。