

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名：張 磊

本論文はムスカリン性アセチルコリン受容体による TRP6  $Ca^{2+}$  チャネルの分子構造と機能特性について、下記の新しい事実を明らかにした。

1. 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) が欠損していた。
2. 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  $M_5$  サブタイプの活性化を介した  $Ca^{2+}$  の流入が上昇し、 $Ba^{2+}$  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  $Ca^{2+}$  ポンプ ( $Ca^{2+}$ -ATPase) 阻害剤サプシガージン (thapsigargin) 処理による細胞内  $Ca^{2+}$  ストアの枯渇は、 $Ba^{2+}$  の流入を引き起こさなかった。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  $M_5$  サブタイプ依存的な  $Ba^{2+}$  の流入が抑制された。これらの実験結果から rTRP6 が、細胞内  $Ca^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの形成に関与していると判明した。

3. rTRP6A を発現させた細胞では、DAG の類似体である OAG の処理により  $\text{Ba}^{2+}$ の流入が促進されたが、rTRP6B を発現した細胞では、OAG 依存的な  $\text{Ba}^{2+}$ の流入は見られなかった。この実験結果から、DAG による rTRP6A の活性化には N 末端 (3-56 aa) が重要であることが示唆される。
4. 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  $M_5$  サブタイプの活性化により引き起こされる  $\text{Ca}^{2+}$ の流入増加や  $\text{Ba}^{2+}$ の流入は見られず、また OAG 依存的な  $\text{Ba}^{2+}$ 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、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。

以上、本論文は TRP  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの分子構造と制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。