

審査の結果の要旨

氏名 神田祥一郎

TRPC6(transient receptor potential C)は6回膜貫通型 Ca^{2+} チャネルであり、腎臓では podocyte のスリット膜に発現しているが、2005年にその遺伝子異常で成人発症の家族性巣状糸球体硬化症が起こることが報告された。TRPC6はチロシンリン酸化により活性化されることが知られており、本研究は活性化メカニズムの詳細とそのメカニズムの病態形成への関与について解明すべく解析を行ったものであり、以下の結果を得ている。

1. ビオチン化実験では受容体刺激の下流において TRPC6 が Src family tyrosine kinase により細胞内のチロシンリン酸化を受け、膜発現量が増加した。TRPC6 細胞内領域に存在するチロシンをフェニルアラニンに変えた 8 種類の変異体(Y31F, Y50F, Y85F, Y107F, Y206F, Y208F, Y284F, Y895F)によるリン酸化依存的膜移行を解析したところ、Y284F 変異の膜移行が消失した。TRPC6 のリン酸化を介した膜移行には、N 末細胞内領域に存在する Y284 のリン酸化が関与していることが示された。TRPC6 Y284 周囲のリン酸化/非リン酸化ペプチドを用いたプルダウン実験により、リン酸化した Y284 の結合蛋白として PLC- γ 1 を同定した。si-RNA を用いた PLC- γ 1 のノックダウンでは、リン酸化依存的な TRPC6 の膜移行が抑制された。以上より、Y284 のチロシンリン酸化と PLC- γ 1 との結合が TRPC6 の膜移行に必須であることが示された。

2. TRPC6 とスリット膜構成蛋白との相互作用を解析するために行った共免疫沈降法を用いた実験では、スリット膜の主要構成蛋白である Nephrin が TRPC6 と Y284 のリン酸化依存的に結合し、TRPC6-PLC- γ 1 結合を阻害した。GST-Nephrin-CD(cytoplasmic domain)の deletion 変異を複数作成し、これらを用いてプルダウン実験を行い、TRPC6-Nephrin 結合に必要な Nephrin 部位を 1216-1227 の 12 個のアミノ酸からなる領域と同定した。

3. Nephrin の TRPC6 機能への影響を 2 つの系(膜発現および細胞内への Ca 流入)で解析した。ビオチン化実験では、Nephrin 存在下において TRPC6 のリン酸化依存的膜移行が減少した。Ca インジケータ(Fura-2/AM)を用いて細胞内への Ca 流入を測定すると、Nephrin を共発現することによりリン酸化 TRPC6 を介した Ca 流入が抑制された。以上より、Nephrin は PLC- γ 1 と競合的に TRPC6 に結合することで TRPC6 のリン酸化依存的膜発現およびチャネル活性化に対し、抑制的に働くことが示された。

4. TRPC6 との結合に必要な Nephrin の細胞内領域を同定したが(Nephrin(1216-1227))、Cell-penetrating peptide を用いた方法でこの領域のペプチドを HEK293T 細胞および培養 podocyte の細胞内に導入したところ、この Nephrin ペプチド(1216-1227)は TRPC6-PLC- γ 1

複合体の膜発現および channel 活性を抑制した。In vivo で podocyte 内に導入する適切な方法があれば TRPC channelopathy に対する新たな治療法となりうる可能性が示唆された。

5. 報告されている TRPC6 の患者変異についても同様に Nephrin との結合を解析すると、解析した 6 つの変異(P112Q, N143S, S270T, K874X, R895C, E897K)の内 5 つにおいて Nephrin との結合が低下していた。また患者変異 TRPC6 の機能に対する Nephrin の影響を調べると、全ての変異で Nephrin による抑制を受けず膜発現およびチャネル活性が増大していた。以上より TRPC6 のリン酸化を介した活性化は促進的な PLC- γ 1 と抑制的な Nephrin によって制御され、患者変異では Nephrin による抑制制御が減弱し、TRPC6 機能が亢進していることが明らかになった。

以上本論文は podocyte 特異的な TRPC6 チャネルの制御機構の存在と、一般的な培養細胞でのチャネル活性測定単独では明らかにならなかった病態発症メカニズムを明らかにしたものであり、病態理解に重要な貢献をなすと考えられ、学位授与に値するものと考えられる。