

京都大学	博士 (工学)	氏名	高橋 重成
論文題目	<p style="text-align: center;"><b>TRP channels as sensors of cellular redox status</b> (細胞内酸化還元状態センサーとしての TRP チャンネルに関する研究)</p>		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>酸素は好気性生物が生きていく上で必要不可欠だが、取り入れた酸素に由来する活性酸素種や活性窒素種が極めて高い反応性を有するため、細胞に障害を与える。それらのストレスに対応するため、生物は進化の過程で生体内の酸化還元状態を制御する機能を発達させ、恒常性を維持する能力を獲得している。一方、近年、活性酸素・窒素種は細胞の障害になるだけでなく、細胞内外での情報伝達に積極的にも用いられていることが明らかになりつつある。しかし、正負両面の性質を有する酸素や活性分子種を生体が如何にして感知し、様々な生体応答を調節するのかは未解明な部分が多い。本論文では、細胞内外の多様な環境変化を感知し、細胞内へ <math>\text{Ca}^{2+}</math> をはじめとする陽イオンを透過させる TRP チャンネルに注目し、生命環境に関する上記課題に取り組んでいる。第 1 章、第 2 章、第 3 章ではそれぞれ、一酸化窒素 (NO)、炎症時に産生される活性分子種、酸素を感知する TRP チャンネルの同定が行われている。序論では、生体における酸素および活性分子種の重要性、TRP チャンネルの説明と先行研究の現状、及び本研究の意義などがまとめられている。</p> <p>第 1 章では、NO によるシステイン残基の S-ニトロシル化を介した新規 TRP チャンネル活性化機構を明らかにしている。システイン変異体を用いたラベリング実験及び <math>\text{Ca}^{2+}</math> 濃度測定により、TRPC5 チャンネルのポア領域に存在するシステイン残基 (Cys) 553, Cys558 が NO やシステイン選択的酸化剤によって細胞の内側から修飾されて活性化することを見出している。また、この Cys は他の TRP チャンネルの同じポア領域に保存されており、実際 TRPC1, TRPC4, TRPC5, TRPV1, TRPV3 そして TRPV4 が NO に応答し細胞内に <math>\text{Ca}^{2+}</math> を流入させることも示している。ウシ大動脈内皮細胞においては、TRPC5 が血管弛緩因子による <math>\text{Ca}^{2+}</math> 流入を引き起こすことにより、内皮型 NO 合成酵素を活性化していることも明らかにしている。以上の結果より、弛緩因子刺激下で産出された NO により TRPC5 が酸化を受け、更なる活性化が引き起こされる、正の制御機構が存在することが強く示唆されている。</p> <p>第 2 章では TRPA1 が NO、過酸化水素、プロトン、15-deoxy-<math>\Delta^{12,14}</math>-prostaglandin <math>\text{J}_2</math></p>			

(15d-PGJ<sub>2</sub>)といった内因性炎症物質によって活性化されることを明らかにしている。TRPA1は感覚神経細胞の細胞体が存在する後根神経節細胞(DRG)に高発現し、にんにくに含まれる allicin などの外因性刺激物質で活性化することがこれまで知られていたが、内因性活性化物質に関しては未解明であった。15d-PGJ<sub>2</sub>による TRPA1の活性化には Cys421及びCys621が、NOまたは過酸化水素による TRPA1の活性化には Cys421、Cys641及びCys665がそれぞれ重要であり、アゴニスト間で作用する Cysが異なることを見出している。また、DRGの神経細胞はこれらの炎症性物質により活性化され、その活性化には TRPA1が重要であることを示した。以上のことから、TRPA1は内因性の刺激物質を感知し、炎症という生体情報を伝えていることが示唆されている。

**第3章**では迷走神経において TRPA1が大気中酸素濃度の変化を感知することを明らかにしている。哺乳動物においては、頸動脈小体やその他の化学受容器が酸素濃度の変化を感知し、呼吸活動を変化させることにより体内への酸素供給を制御することがこれまで知られていたが、これらの化学受容器における酸素感知を担う分子実体及びその機構に関しては詳細が未解明であった。高酸素による TRPA1の活性化には Cysの酸化が重要であり、また低酸素による活性化には酸素依存的なプロリン水酸化酵素の阻害が関与することを見出している。また、*Trpa1* 遺伝子欠損 (*Trpa1* KO) マウスを用いた *in vivo* 実験により、高酸素ガス及び低酸素ガス吸入に伴う迷走神経活動の増大、またそれに伴う呼吸反射が *Trpa1* KO マウスでは著しく抑制されることを確認している。その結果、*Trpa1* KO マウスでは通常酸素濃度下においても肺障害、肺高血圧症の症状を示し、本症状はそれぞれ高酸素濃度下及び低酸素濃度下での飼育により、より重篤化することを見出している。以上の知見により、TRPA1は酸素センサーとして機能し、体内への酸素供給を制御することが示されている。

結論では本論文で得られた成果について要約している。

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、正負両面の性質を有する酸素や活性分子種を生体が如何にして感知し、様々な生体応答を調節するのかという課題に関して、TRP チャンネルに着目し研究を行い、その成果についてまとめたものである。得られた成果は次の通りである。

TRP チャンネルのいくつかが一酸化窒素 (NO) により、システイン S-ニトロシル化を介して活性化するという、新規 TRP チャンネル活性化機構を見出している。即ち、分子的分類を超えた NO センサーという新たな機能的分類を提示することに成功している。

炎症時における痛み感覚受容に TRPA1 チャンネルが重要であることが知られていたが、TRPA1 の内因性活性化物質に関しては未解明であった。システイン反応性化合物を用いたスクリーニングにより、TRPA1 が NO、過酸化水素、プロトン、15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub>により活性化することを見出している。以上から TRPA1 が鎮痛薬としての重要な標的分子であることが示唆されている。

生体内において、酸素感知を担う分子実体及びその機構の詳細は未解明であった。TRP チャンネルの酸化感受性を網羅的に評価した結果、迷走神経に発現する TRPA1 が酸素濃度の変化を感知して活性化することを明らかにしている。また、Trpa1 遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo* 実験により、TRPA1 が酸素センサーとして機能し、体内への酸素供給を制御することを示している。本成果は生理学における、極めて重要な発見であるといえる。

以上、本論文では、NO を感知する TRP チャンネルの同定、および炎症性発痛物質を感知する TRP チャンネルの同定を行っている。また、好気性生物が生きていく上で必須の物質である、酸素を感知する TRP チャンネルについても明らかにしている。得られた成果は、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 22 年 10 月 27 日、論文内容とそれに関連した事項について口頭試問を行った結果、合格と認めた。