

京都大学	博士 (工学)	氏名	Polat Onur Kerem
論文題目	Elucidation of TRPC channel regulation mechanism and its contribution to kidney channelopathy. (TRPC チャンネル制御機構とその腎臓チャネルopathyに対する関与の解明)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>生体内に存在する無機イオン濃度は、細胞内外において厳密に制御されている。特にカルシウムイオン (Ca^{2+}) は2次メッセンジャーとして、種々の細胞応答・生理機能において重要な役割を担っている。通常、細胞内の Ca^{2+} 濃度 ($\leq 100 \text{ nM}$) は低く維持されているが、細胞刺激とともに上昇する。細胞はこの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き金とし、遺伝子発現、筋収縮、細胞興奮性、細胞形態変化といった多様な生理的応答を惹起する。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇には、形質膜越えの Ca^{2+} 流入を担う Ca^{2+} チャンネルが重要な貢献を為す。平滑筋や神経細胞等に発現している Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) チャンネルは、受容体刺激によって惹起される細胞応答 (血管収縮性、神経突起形成等) や活動依存的な遺伝子の発現に関与していることが知られている。しかし、その制御を担う分子機構については未解明な点が多い。本論文の第1章では、受容体刺激後の TRPC6 チャンネルにおける Ca^{2+} 依存的な不活性化 (Ca^{2+}-dependent inactivation, CDI) の制御機構の一端を明らかにした。第2章では、腎系球体の代表的な病変である巣状分節性糸球体硬化症 (Focal Segmental Glomerular Sclerosis, FSGS) において同定された TRPC6 タンパク質の遺伝子変異が、Ca^{2+} 依存的な不活性化を破綻させることを見出した。さらに、Ca^{2+} 依存的な不活性化制御と腎臓のろ過機能を担う糸球体上皮細胞であるポドサイト細胞の関連性について検討し、Ca^{2+} 依存的な不活性化制御の破綻が FSGS の原因になることを初めて明らかにした。第3章では、TRPC チャンネルがホスファチジルイノシトール 4,5 ビスリン酸 [$\text{PI}(4,5)\text{P}_2$] の減少に伴い、抑制されることに着目し、その作用部位の探索を行い、$\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ 作用部位として新たに第一膜貫通領域 S1 の N 末端側にある Pre-S1 領域が重要であることを機能解析から見出した。一方、$\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ が TRPC6 の Ca^{2+} 依存的な不活性化制御に関与するか、Pre-S1 領域にアミノ酸置換を有する点変異体を作製し解析したところ、野生型との顕著な違いは見られなかった。このことから Ca^{2+} 依存的な不活性化過程における $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ 解離の寄与は低いことが示唆された。以上のように、本研究は TRPC チャンネル分子の機能機構を解明し、その異常の病態への関与を明らかにしたものである。</p> <p>第1章では、TRPC6 における CDI の分子機構を解明した。TRPC6 は Ca^{2+} イオンを細胞内に透過する陽イオンチャンネルの一つであり、それが担う陽イオン透過活性のブレーキとして CDI 機構を備えている。本章では、CDI の発生におけるカルシウム結合タンパク質 Calmodulin (CaM) の関与についてその分子機構について検討した。その結果、TRPC6 の CDI に coiled-coil ドメインの2量体を介した CaM の橋渡しの分子複合体形成が関与することを、パッチクランプ法などの電気生理学測定法、共鳴エネルギー移動など分光学的測定法、タンパク質クロスリンカーなどの生化学的解析手法を用いた実験により明らかにした。</p> <p>第2章では、FSGS 型 TRPC6 チャンネルにおける CDI とポドサイト骨格形成の連関を明らかにしている。第1章において、coiled-coil ドメインに欠損を有する TRPC6 チャンネルは、顕著な不活性化の遅延を示した。本知見を受けて、coiled-coil ドメインに変異をもつ FSGS 型 TRPC6 変異体において、同様の不活性化が観察されるか、パッチクランプ法を用いた電気生理学的機能解析により検討した。その結果、coiled-coil に変異のある5種類の FSGS 型 TRPC6 の全てにおいて顕著な不活性化の遅延を認めた。また、Inside-out モードのパッチクランプ法を用いた電気生理学的機能解析から CDI が消失していることを確認した。さらに、TRPC6 の coiled-coil 複合体形成を FRET にて解析したところ、野生型に比べ FSGS 型の coiled-coil は複合体形成に異常が観測された。このことから FSGS 型の TRPC6 で</p>			

は coiled-coil 複合体形成異常が CDI の遅延を引き起こすことが明らかとなった。次に、ポドサイトに FSGS 型 TRPC6 チャンネルや CaM 変異体を発現させ、CDI の遅延と細胞障害を確認する実験を行った。受容体刺激を加えると、FSGS 型 TRPC6 チャンネルや CaM 変異体を発現させた細胞では、Ca²⁺流入が持続し、ポドサイトのアクチンフィラメント構造に異常を引き起こすことを確認した。これは、TRPC6 における Ca²⁺依存的な不活性化制御の破綻が FSGS の原因になることを示す初めての事例である。

第3章では、TRPC チャンネルと PI(4,5)P₂ との連関を評価した。TRPC3/6/7 チャンネル群は PI(4,5)P₂ の枯渇により活性が抑制される。また、他の多くの TRP チャンネルにおいても PI(4,5)P₂ が直接的に活性制御に関与することが報告されているが、PI(4,5)P₂ の作用部位は明確でない。そこで本章では、TRPC6 の変異体を作製し、電位依存的に一過的に PI(4,5)P₂ を分解する電位依存性酵素 VSP を用い、一過的抑制、回復の速度論的な測定、解析を行った。その結果、TRPC6 の N 末端、アンキリンリピート、Pre-S1、TRPbox、CaM 結合部位など様々な領域が PI(4,5)P₂ 相互作用に重要であることが明らかとなった。中でも Pre-S1 領域の塩基性アミノ酸に導入した変異体は特に機能的な親和性が減弱しており、受容体刺激による電流密度、活性化速度の遅延などにも影響が及んでいた。一方、Pre-S1 ドメインの変異体において、Ca²⁺依存的な不活性化は野生型とほぼ同じ時間経過を示したことから、CDI 過程への PI(4,5)P₂ の直接的な関与は大きくないことが明らかになった。

以上、本論文は、TRPC チャンネルの機能について実験を行い、TRPC6 の新しい生理学的・病理学的機能を明らかにしており、結論では、本論文で得られた成果について要約している。

氏名	Polat Onur Kerem
----	------------------

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、腎疾患に対する TRPC6 の生理学および病態生理学的寄与の分子的基盤を追究した成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は以下の通りである。

1. TRPC6 チャンネルが担う陽イオン流入活性のブレーキとしてはたらく CDI 機構の一端を明らかにした。即ち、TRPC6 チャンネルの Ca^{2+} 依存的不活性化機構に、coiled-coil ドメインの 2 量体を介したカルモデュリンの橋渡しの分子複合体形成が関与することを、パッチクランプ法などの電気生理学測定法、共鳴エネルギー移動 FRET などの分光学的測定法、タンパク質クロスリンカーなどの生化学的解析手法を用いた実験により明らかにした。
2. 腎糸球体の代表的な病変である巣状分節性糸球体硬化症 FSGS において同定された TRPC6 タンパク質の遺伝子変異において、CDI が破綻していることを見出した。さらに、CDI の破綻の生物学的意義を、腎臓のろ過機能を担う糸球体上皮細胞ポドサイトを用いて探究し、TRPC6 チャンネルにおける Ca^{2+} 依存的不活性化制御の破綻が FSGS の原因になることを初めて明らかにした。
3. TRPC6 チャンネルがホスファチジルイノシトール 4,5 ビスリン酸 [PI(4,5)P₂] の減少に伴い、抑制されることから、その作用部位の探索を行い、PI(4,5)P₂ 作用部位として第一膜貫通領域 S1 の N 末端側にある領域が重要であることを見出した。また、CDI における PI(4,5)P₂ の寄与は低いことも明らかにした。

以上、本論文は、TRP チャンネル及び TRPC6 チャンネル等の薬理的・生理学的機能の新規分子基盤について述べたものであり、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、令和 1 年 09 月 26 日論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公開可能日：令和 2 年 2 月 24 日以降