

## (論文内容の要旨)

本論文は、痛みを誘発するイオンチャネルTRPA1が、冷却と過酸化水素で活性化することを明らかにしたものである。その内容は4章に分かれる。

第一章で、全体の背景を説明している。物理刺激によって痛みが起こる分子機構について現在の知見を述べた後、課題として冷却と過酸化水素の受容体が未知であることを示した。そして、Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) についての従来の実験結果から、”TRPA1が冷却と過酸化水素を受容し、痛みを誘発する”との仮説を立て、その仮説の可否を実証する研究をおこなっている。

第二章では、TRPA1が冷却で活性化される受容体であることを示した。冷却によって活性化される受容体の候補にはTRPM8とTRPA1がある。TRPM8が冷却によって活性化されることはすでに受け入れられている。しかし、TRPA1が冷却で活性化するかどうかは議論が分かれていた。そこで、初代培養した感覚神経細胞およびTRPA1を人為的に発現させたhuman embryonic kidney 293 (HEK293)細胞の低温に対する反応性を、細胞内カルシウム測定法とパッチクランプ法を用いて解析した。初代培養した感覚神経細胞にはTRPA1の活性剤であるallyl isothiocyanate (AITC)で活性化されるものがある。これらの細胞はTRPA1を発現する細胞といえる。それらの細胞のほとんどは冷却で活性化された。また、TRPA1を発現させたHEK293細胞はAITCでも冷却でも活性化された。TRPA1を発現したHEK293細胞から切離した細胞膜片にあるイオンチャンネルは、AITCによっても冷却によっても活性化され、その活性は既知のTRPA1抑制剤であるCamphorで抑制された。温度を18°C以下に下げると、ユニットコンダクタンスは減少したが、開確率は上昇した。冷却で上昇する開確率は、細胞に流れる全電流が冷却によって増加することを説明する。これらの結果は、TRPA1は冷却で活性化するイオンチャンネルであることを示す。

第三章では、TRPA1が過酸化水素の受容体であることを示す。過酸化水素は工業的に作られるだけでなく、生体の中でも生産されている。過酸化水素は痛みを引き起こすことが知られるが、その受容体は分かっていなかった。本章では、TRPA1が過酸化水素の受容体であるとの仮説を立て、細胞内カルシウム測定法とパッチクランプ法を用いてその仮説が真であることを実証した。過酸化水素は、TRPA1を発現したHEK293細胞を活性化した。また、活性酸素、活性窒素もTRPA1を活性化した。過酸化水素によるTRPA1の活性化は、システイン特異的還元剤で抑制された。一方、システイン特異的酸化剤はTRPA1発現細胞を活性化した。過酸化水素は、AITCによって活性化される感覚神経細胞 (TRPA1を発現していると考えられる) を活性化した。これらの実験結果から、TRPA1は過酸化水素によって活性化されるイオンチャンネルであることがわかった。

第四章では、第二章と第三章の結果を踏まえ、全体のまとめと今後の展開について述べている。

## (論文審査の結果の要旨)

冷却と過酸化水素は痛みを誘発する物理刺激である。しかし、その受容体が何であるのか明らかでなかった。本論文は、それらの受容体が、TRP陽イオンチャンネルファミリーのメンバーのひとつであるTRPA1であることを明らかにしたものである。その成果は以下のとおりである。

(1) TRPA1が冷却に反応するかどうかについては、意見が分かれていた。本論文では、TRPA1が冷却で活性化されるとの仮説を立て、初代培養した感覚神経細胞とTRPA1を人為的に発現させた培養細胞を作り、細胞内カルシウム測定法とパッチクランプ法を用いてこの仮説が真であることを実証した。そして、細胞膜の膜片からのパッチクランプ単一チャンネル記録を行うことで、TRPA1が冷却で直接活性化されることを明らかにした。

(2) 過酸化水素は痛みをもたらす。しかし、その受容体は分かっていた。本論文では、TRPA1が過酸化水素の受容体であるとの仮説を立て、初代培養された感覚神経細胞とTRPA1を人為的に発現させた培養細胞を使い、細胞内カルシウム測定法とパッチクランプ法を用いてこの仮説が真であることを実証した。また、過酸化水素以外の活性酸素種と活性窒素種もまたTRPA1を活性化することを明らかにした。

以上のように、本論文は痛みを誘発する受容体についての研究を行い、重要な結果を得ている。(1)では、TRPA1が冷却で活性化されるかどうかについての論争を決着させた。(2)においては、過酸化水素による痛みを媒介する受容体が、TRPA1であることを明らかにした。その手法は、仮説検定に基づくもので説得力がある。また、実験方法として、分子生物学的手法、電気生理学的な手法を適切に使っており、妥当な結論を導いている。

痛みとは、生命個体が周囲の環境にある危険を察知して逃避行動をとるための原初知識といえる。本研究は、痛みという原初知識のメカニズムを明らかにする重要な知見と評価できる。本研究は、特異性の高い新たな鎮痛剤の開発や、痛みが脳でどのように発生しているかを知る手がかりを与えるもので、情報学の発展に十分に寄与している。よって、本論文は博士(情報学)の学位論文として価値あるものと認める。

また、平成21年2月23日に実施された論文内容とそれに関連した諮問の結果、合格と認められた。