

氏名	きのした まりこ 木下真理子
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第500号
学位授与の日付	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科医療科学専攻
学位論文題目	神経型電位依存性 $Ca^{2+}$ チャンネルおよび受容体作動性 $Ca^{2+}$ チャンネルの制御機構に関する電気生理学的研究
論文調査委員	(主査) 助教授 金子周司 教授 佐藤公道 教授 赤池昭紀

### 論文内容の要旨

$Ca^{2+}$  チャンネルは膜電位を検知して開く電位依存性チャンネルと伝達物質によって活性化される受容体作動性チャンネルの2種類に分類される。近年、これらチャンネルファミリー分子を構成するサブユニットの cDNA が数多くクローニングされてきた。電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルは  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ - $\delta$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の各サブユニットで構成されており、異なる  $\alpha_1$  サブユニットは生理学および薬理学的に性質の異なるチャンネルを形成し、神経系に存在する神経型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル P/Q 型 ( $\alpha_{1A}$ ), N 型 ( $\alpha_{1B}$ ), R 型 ( $\alpha_{1E}$ ) は記憶学習, 痛み, 運動調節などの神経機能に重要な役割を果たしている。一方, *trp* (*transient receptor potential*) は *Drosophila* の光受容変異原因遺伝子として発見され, 受容体作動性  $Ca^{2+}$  チャンネルの候補分子として注目されている。哺乳類 TRP cDNA は現在までに7種類がクローニングされており, これらは様々な細胞に存在し, 受容体の活性化を介する細胞内  $Ca^{2+}$  流入に関わっていると考えられる。

著者は神経型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネルおよび受容体作動性チャンネルの制御機構の解明を目的として, アフリカツメガエル卵母細胞翻訳系を用いた電気生理学的研究を行った。はじめに P/Q 型  $Ca^{2+}$  チャンネルにおける  $G\alpha_o$  による膜電位非感受性の抑制機構について研究を行った。次いで, 神経細胞の細胞体や樹上突起上に存在し, 痛みの伝達と制御に関与すると考えられている R 型チャンネルに関して, ペプチド阻害作用について解析した。最後に細胞内  $Ca^{2+}$  ストアの枯渇により活性化されるストア感受性  $Ca^{2+}$  チャンネルに関与が報告されている TRP ファミリーの中で中隔野や海馬などに特異的に発現している TRP4 に着目し, TRP4 の細胞内からの開口調節機構について検討を行った。

#### 第一章 $G\alpha_o$ による P/Q 型チャンネルの制御機構

P/Q 型チャンネルの受容体を介した抑制成分の多くが脱分極プレパルスによって解除されない電位抵抗性の成分であることに着目し, チャンネルを再構成して, その分子メカニズムについて検討した。アフリカツメガエル卵母細胞に電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル  $\alpha_{1A}$  サブユニットを,  $\beta_{1b}$  サブユニット,  $G\alpha_{o1}$ ,  $\kappa$  オピオイド受容体と共発現させた。電気生理学的実験により  $\kappa$  アゴニスト U50488H を適用し  $G_o$  を活性化すると P/Q 型チャンネル電流の抑制が観察され, その抑制は  $\alpha_{1A}$  の C 末合成ペプチド,  $G\alpha_o$  の N 末に対する血清あるいは  $G\alpha_o$  の N 末合成ペプチドの注入によって阻害された。GTP $\gamma$ S 注入による G 蛋白の直接的な活性化で起こる P/Q 型チャンネル電流の抑制に対しても抗  $G\alpha_o$  N 末抗体の処置は有意に阻害効果を発揮した。生化学的な実験で蛋白間相互作用を検討した結果,  $\alpha_{1A}$  C 末 GST 融合蛋白とウシ脳精製  $G\alpha_o$  が結合し, その結合は抗  $G\alpha_o$  N 末抗体によって阻害された。また,  $\alpha_{1A}$  C 末 GST 融合蛋白と  $G\alpha_o$  N 末 MBP 融合蛋白が結合し, その結合は  $\alpha_{1A}$  C 末ペプチド,  $G\alpha_o$  N 末ペプチドのいずれによっても阻害された。これらの結果から, P/Q 型チャンネルは  $G\alpha_o$  の結合によって膜電位に依存しない抑制的調節を受け, この結合は P/Q 型チャンネルの C 末細胞内領域と  $G\alpha_o$  の N 末端の間で起こることが明らかになった。

#### 第二章 新規ペプチド PMP-D2 による R 型チャンネルの選択的抑制

PMP-D2 はトノサマバッタの神経節および脂肪体から抽出された3つのシステイン架橋を有する35アミノ酸からなるペ

プチドである。PMP-D2はN型チャンネル阻害薬  $\omega$ -conotoxin GVIA と三次構造が類似しており、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを阻害することが構造的に予想された。そこでアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて神経型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルに対するPMP-D2の抑制効果について検討した。チャンネルを発現させた卵母細胞において、 $1\mu\text{M}$  PMP-D2の適用によりR型チャンネル電流は53%抑制されたが、P/Q、N型チャンネル電流はそれぞれ15%、7.2%しか抑制されなかった。またPMP-D2はR型チャンネルの定常状態における活性化および不活性化の電位依存性を変化させた。PMP-D2のS-S結合を切った還元型PMP-D2はチャンネル電流をほとんど抑制しなかったことから、チャンネルとの相互作用にはPMP-D2の3次構造が重要であることが明らかになった。

### 第三章 ラット TRP4 で形成されるストア感受性 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの開口における細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の必要性

ラット TRP4 の開口機構について、cut-open 法を使って細胞内環境を人為的に変化させて検討した。まず、whole-cell 記録において thapsigargin によるストア枯渇によって細胞外から  $\text{Ca}^{2+}$  が流入する容量性  $\text{Ca}^{2+}$  流入は TRP4 発現細胞で非発現細胞に比べて2倍に増加した。Cut-open 法によって細胞内を  $\text{Ca}^{2+}$  free にすると細胞外への  $\text{Ca}^{2+}$  溶液適用時にチャンネルを透過する  $\text{Ca}^{2+}$  電流は完全に消失した。非発現細胞では細胞内液に  $300\text{nM}$  まで  $\text{Ca}^{2+}$  を加えても、もとの応答まで完全には回復しなかったが、TRP4 発現細胞の応答は  $110\text{nM}$  の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度でほぼ元の値まで回復した。これらの結果から、TRP4 チャンネルの開口には  $\text{Ca}^{2+}$  ストアの枯渇に加えて細胞質側の因子として数百  $\text{nM}$  の濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  が必要であることが明らかになった。

以上、著者は電気生理学的手法を用いて神経系に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの制御機構を検討した。P/Q型チャンネルが  $G\alpha_o$  の結合によって膜電位に依存しない抑制的調節を受けていることを明らかにした。さらに、R型チャンネルの選択的阻害薬を見出し、R型チャンネルの機能を薬理的に解明する手がかりが得られた。ストア感受性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを形成する TRP4 チャンネルについては、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  が TRP4 チャンネルの開口因子の一つであることを明らかにした。本研究の成果は、 $\text{Ca}^{2+}$  依存的な神経活動の調節機構に関する重要な知見であり、今後の神経薬理学的および生理学的研究の発展に大きく寄与するものである。

## 論文審査の結果の要旨

$\text{Ca}^{2+}$  チャンネルは膜電位を検知して開く電位依存性チャンネルと伝達物質によって活性化される受容体作動性チャンネルの2種類に分類されるが、近年、これらチャンネルファミリー分子を構成するサブユニットの cDNA が数多くクローニングされてきた。電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルは複数のサブユニットで構成されており、神経系に存在する神経型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル P/Q 型 ( $\alpha_{1A}$ )、N 型 ( $\alpha_{1B}$ )、R 型 ( $\alpha_{1E}$ ) は記憶学習、痛み、運動調節などの神経機能に重要な役割を果たしている。一方、*trp* (*transient receptor potential*) は *Drosophila* の光受容変異原因遺伝子として発見され、受容体作動性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの候補分子として注目されている。哺乳類 TRP cDNA は現在までに7種類がクローニングされており、これらは様々な細胞で受容体の活性化を介する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  流入に関わっていると考えられる。本研究において、筆者は神経型電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルおよび受容体作動性チャンネルの制御機構の解明を目的として、アフリカツメガエル卵母細胞翻訳系を用いた電気生理学的研究を行った。

はじめに、筆者は P/Q 型チャンネルの受容体を介した抑制成分の多くが脱分極プレパルスによって解除されない電位抵抗性の成分であることに着目し、オピオイド受容体と P/Q 型チャンネルを共発現させた卵母細胞を対象にして、抗  $G\alpha_o$  抗体や各種のデコイペプチドを用いてその分子メカニズムを検討した。その結果、P/Q 型チャンネルは  $G\alpha_o$  の結合によって膜電位に依存しない抑制的調節を受け、この結合は P/Q 型チャンネルの C 末細胞内領域と  $G\alpha_o$  の N 末端の間で起こることを見出した。

次に、筆者は神経細胞の細胞体や樹上突起上に存在し、痛みの伝達と制御に関与すると考えられている R 型チャンネルに関して、トノサマバツタの神経節および脂肪体から抽出された3つのシステイン架橋を有する35アミノ酸からなるペプチド PMP-D2 の作用を解析した。チャンネルを発現させた卵母細胞を用いた電気生理学的数据から、PMP-D2 が R 型チャンネルに選択的な阻害薬であることを見出し、さらに類似体の構造活性相関からチャンネルとの相互作用には PMP-D2 の塩基性残基のプラス荷電およびペプチドの S-S 結合で形成される3次構造が重要であることが明らかになった。

最後に筆者は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアの枯渇により活性化されるストア感受性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを構成するサブユニットと考えられている TRP ファミリーのうち、中隔野や海馬などで特異的に発現している TRP4 に着目し、その開口調節機構について検討を行った。TRP4 を発現させた卵母細胞に cut-open 法を適用して細胞内環境を人為的に変化させて検討した結果、TRP4 チャンネルの開口には  $\text{Ca}^{2+}$  ストアの枯渇に加えて細胞質側の因子として数百 nM の濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  が必要であることが明らかになった。

以上の研究は、神経系に存在する  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの制御機構を電気生理学的手法を主体にして詳細に明らかにしたもので、本研究の成果は  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な神経活動の調節機構に関する重要な知見であり、今後の神経薬理学的および生理学的研究の発展に大きく寄与するものである。

よって本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成14年2月18日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。