TITLE:

A Potent and Site-Selective Agonist of TRPA1(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Takaya, Junichiro

CITATION:

Takaya, Junichiro. A Potent and Site-Selective Agonist of TRPA1. 京都大学, 2016, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19611>

RIGHT:

許諾条件により本文は2017-03-23に公開

京都大学	博士 (医学)	氏 名	高 屋 潤 一 郎
論文題目	A Potent and Site-Selective Agonist of TRPA1 (TRPA1 の強力かつサイト選択的なアゴニスト)		
(論文内容の要旨)			
<p>Transient receptor potential (TRP) ファミリーに属する TRPA1 は、化学物質センサーの一つとして知られる。この非選択的カチオンチャネルは、多様な反応性化合物によって活性化を受け、痛み、咳、呼吸パターンの変化などの防衛反応を起こす。TRPA1 を活性化する反応性化合物の代表として、ワサビの辛み成分である Allyl isothiocyanate (AITC)が知られている。TRPA1 の活性化は、幾つかのシステイン残基への化合物による修飾が引き金となっている。しかし、どのシステイン残基への修飾が、どのようにチャネルの活性化に寄与しているのかは明確ではなかった。</p> <p>【強力かつ選択的な求電子性アゴニスト】 TRPA1 の活性化メカニズムを検証するため、新規 TRPA1 アゴニストのスクリーニングを行った。1,657 個の求電子性化合物をスクリーニングしたところ、3 つの構造類似性を持つ強力なアゴニスト ($EC_{50} < 1 \text{ nM}$) が同定された。そのうちの 1 つである JT010 (1)に着目して研究をすすめた。非求電子性類縁体の JT010-H は、1 と比較して～1000 倍低い活性しかもたず、求電子性が活性に重要であることが示された。1 は他の TRP チャネル (TRPV1、V3、V4、M2、M8、C5) を活性せず、TRPA1 に選択的であった。</p> <p>【新規アゴニストの作用機序】 求電子性アゴニスト 1 の作用機序を明らかにするため、ビオチン化誘導体 JT010-B (3)を設計・合成した。3 は細胞に発現した TRPA1 を量依存的にビオチン化し、このビオチン化は1 を加えることで競争的に抑えられた。以上の結果は、1 と 3 が共通する修飾サイトを介して TRPA1 に結合していることを示唆している。</p> <p>活性化に重要と考えられている 6 個のシステインをそれぞれセリンに置換した変異体を作成し解析したところ、C621S 変異体のみ 3 によってビオチン化されなかった。また、C621S 変異体は 1 と 3 によるチャネル活性化に抵抗性を示した。これらの結果は、1 と 3 の主要な修飾サイトが Cys621 であることを示している。</p> <p>【電子顕微鏡による TRPA1 とアゴニストの複合体の観察】 精製した TRPA1 四量体と 3 の複合体を電子顕微鏡で観察した。TRPA1 は化合物依存的にアビジン-ゴールドナノパーティクルと結合し、また、その結合位置は細胞質側であると推定された。この結果は、これまでに報告されている Cys621 の位置 (細胞質) と一致する。</p> <p>【結論】 1657 個の求電子性化合物のスクリーニングにより、強力かつ選択的な TRPA1 アゴニストである JT010 を同定した。JT010 の作用機序を調べたところ、このアゴニストは Cys621 を選択的に修飾することで TRPA1 を活性化していることが明らかとなった。この結果は、TRPA1 の活性化にとって、Cys621 の修飾が十分であることを示唆している。本化合物は AITC と比較して、低濃度でサイト選択的に TRPA1 へ結合することから、新たな TRPA1 研究ツールとして活性化メカニズムの詳細な解明への貢献が期待される。</p>			

<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>Transient receptor potential (TRP) ファミリーに属する TRPA1 チャネルは、化学物質センサーの一つとして知られる。このチャネルは、多様な反応性化合物によって活性化を受け、痛み、咳、呼吸パターンの変化などの防衛反応を起こす。本チャネルは新たな鎮痛剤の創薬ターゲットでもあり、その活性化機構の詳細な解明は重要な課題である。申請者は、1,600 を超える化合物ライブラリーから、強力かつ選択的に TRPA1 を活性化する新規アゴニスト JT010 を同定した。新規アゴニストの誘導体を用いた種々の実験により、本アゴニストの作用機序が TRPA1 の Cys621 への選択的な修飾を介したものであることが明らかとなった。この結果は、Cys621 への修飾が TRPA1 の活性化に十分であること示唆する。また、申請者は、ビオチン化誘導体 JT010-B と TRPA1 の複合体を電子顕微鏡によって解析することで、結合位置が TRPA1 チャネルの細胞質側の領域であることを示した。この結果は、アゴニストと TRPA1 チャネルの複合体における修飾部位 (Cys621) の位置情報を与えた。</p> <p>以上の研究は、TRPA1 の新規研究ツール開発に貢献し、ヒトの痛みセンサーである TRPA1 チャネルの活性化メカニズムの解明に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 2 8 年 2 月 1 9 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
<p>要旨公開可能日： 年 月 日 以降</p>			