

京都大学	博士（工学）	氏名	片 野 正 展
論文題目	Elucidation of physiological significance of proteins related to transport of divalent cation (2 価カチオン輸送に関わるタンパク質の生理的意義の解明)		
(論文内容の要旨)			
無機 2 価カチオンは生物体に必須である。中でもカルシウムイオン(Ca^{2+})は真核生物のセカンドメッセンジャーとして、亜鉛イオン(Zn^{2+})はあらゆる生物種におけるタンパク質の補因子として非常に重要な役割を担っている。一方、過剰の Ca^{2+} や Zn^{2+} は有毒であることから、それらの濃度は生体内で厳密に制御されており、輸送体タンパク質を介した形質膜越えの輸送が最も重要な調節機構として働く。しかし、それらの輸送タンパク質の作動原理や生理的意義については未解明な点が多い。第 1 章、第 2 章では形質膜越えの Ca^{2+} 流入に関わる TRP チャネルに、また、第 3 章では Zn^{2+} の輸送に関わるトランスポーターである cation diffusion facilitator (CDF)類似タンパク質に着目し、得られた成果をまとめた。			
第 1 章では、免疫 B 細胞における受容体シグナリングにおいて、ジアシルグリセロール(DAG)により活性化される TRPC3 の機能的役割を明らかにしている。inositol 1,4,5-tris phosphate (IP_3)と DAG を産生する phospholipase C を介した Ca^{2+}シグナリングはリンパ球の活性化等を制御している。IP_3 による小胞体からの Ca^{2+}放出によって活性化されるストア作動性の Ca^{2+}流入は精力的に解明されてきたが、一方、DAG により活性化される Ca^{2+}流入の役割については未だ解明されていない。TRPC3 タンパク質を遺伝的に欠損した免疫 B 細胞を作製したところ、本細胞における DAG により活性化されるカチオン電流及び extracellular signal-regulated kinase (ERK)を持続的に活性化する B 細胞受容体刺激後の protein kinase Cβ (PKCβ)の形質膜への持続的な移行が減弱することを見出している。さらに、TRPC3 タンパク質は PKCβタンパク質と直接的に相互作用することを見出し、TRPC3 が PKCβの形質膜への局在を維持させていることを明らかにしている。以上のことから、リンパ球における PKCβの活性化に関して、TRPC3 は Ca^{2+}透過性チャネル及び足場タンパク質としての機能を合わせ持つことが示された。			
第 2 章では、若年性ミオクロニーてんかん(JME)原因遺伝子である EFHC1 による、過酸化水素 (H_2O_2) が惹起する TRPM2 の活性及び TRPM2 に依存した細胞死の調節機構が明らかにされている。TRPM2 チャネルは H_2O_2などの酸化ストレスや ADP-ribose によって活性化され、細胞死、炎症細胞遊走やインスリン分泌といった生物学的過程に重要な役割を果たしている。しかし、酸化ストレスに誘導される TRPM2 を介した細胞死の細胞内機構についてはほとんど解明されていない。EFHC1 タンパク質が TRPM2 タンパク質と直接的に相互作用することにより、H_2O_2による TRPM2 チャネル活性化の感受性を促進させることを明らかにしている。また、EFHC1 は H_2O_2により誘導される TRPM2 を介した細胞死を増強させることも明らかにしている。一方、JME に関連する変異を含む EFHC1 は、それらの増大効果を消失させることを示している。さらに、<i>in situ</i> hybridization 実験により TRPM2 と EFHC1 は海馬神経細胞及び脳室に共局在することを明らかにしている。以上の結果から、EFHC1 の JME に関連する変異が、TRPM2 を介した細胞死の EFHC1			

京都大学	博士（工学）	氏名	片 野 正 展
による正の調節を消失させることにより、JME 表現型の発現に寄与している可能性が示唆される。 第 3 章では、Archaea <i>Thermococcus kodakarensis</i> の高濃度重金属存在環境下における生存を可能にする、Zn^{2+} 及び Co^{2+} に対する耐性を賦与する分子実体を明らかにしている。Zn^{2+} はタンパク質の補因子として、あらゆる生命体で必須であるが、過剰な Zn^{2+} は細胞に毒性を示す。<i>Thermococcus kodakarensis</i> において、高濃度 Zn^{2+} に対する耐性の基盤となる機構はほとんど解明されていない。金属イオントランスポーターとして知られる CDF に構造が類似する TK2009 に着目している。金属耐性評価及び放射性同位体を用いた金属イオン動態評価により、TK2009 は Zn^{2+} 及び Co^{2+} を排出することにより、<i>Thermococcus kodakarensis</i> に Zn^{2+} 及び Co^{2+} に対する耐性を与えていることを明らかにしている。生育評価及び Zn^{2+} 動態評価により、CDF ファミリーで高度に保存されている 49 番目のアスパラギン酸及び 154 番目のアスパラギン酸は特に Zn^{2+} の輸送に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。 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、無機 2 価カチオン Ca^{2+} 及び Zn^{2+} の細胞内濃度の厳密な制御において、最も重要な調節機構の一つとして働く形質膜越えの Ca^{2+} 及び Zn^{2+} 輸送を担う輸送体タンパク質が如何に機能し生理的役割を果たしているのかという課題に関して、TRP チャネル及び CDF トランスポーター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り、得られた主な成果は次のとおりである。

Ca^{2+} 濃度測定及び電流測定及び TRPC3 タンパク質と PKC β タンパク質の直接的な相互作用実験から、リンパ球において TRPC3 は PKC β 活性化に必要な細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こす Ca^{2+} 透過性チャネル、及び形質膜での PKC β 局在の安定化を担う足場タンパク質としての機能を合わせ持つことが示された。これらの結果は、TRPC3 Ca^{2+} チャネル複合体の B 細胞における生物学的重要性を示す。

EFHC1 は TRPM2 に直接的に相互作用することにより、 H_2O_2 による TRPM2 チャネル活性化の感受性と細胞死を増強するのに対し、JME に関連する変異を含む EFHC1 は、それらの増大効果を消失させることを示している。これらの結果は、TRPM2 と EFHC1 とタンパク質間相互作用を介する神経細胞死が正常な脳機能に重要であるという仮説を支持している。

Archaea *Thermococcus kodakarensis* において、 Zn^{2+} の耐性機構は未解明であった。遺伝子組み換え *Thermococcus kodakarensis* における金属耐性評価、及び放射性同位体を用いた Zn^{2+} 及び Co^{2+} 動態評価により、*Thermococcus kodakarensis* に Zn^{2+} 及び Co^{2+} に対する耐性を与える分子実体として CDF ファミリーの TK2009 を同定した。

以上、本論文では、免疫応答及び細胞死に関わる TRP チャネルの機能と調節機構及び CDF トランスポーターによる Zn^{2+} 耐性機構を明らかにしている。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 23 年 10 月 21 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。