

京都大学	博士（工学）	氏名	加 藤 賢 太
論文題目	Characterization of bioactive molecules using genetically engineered ion channels (遺伝子工学によって作製したイオンチャネルを用いた生理活性分子の特性解析)		
(論文内容の要旨)			
Ca²⁺は広範な生理応答において重要な役割を果たすが、時間的にも空間的にも厳密に細胞質濃度が制御されることにより、特定の細胞シグナルを選択的に伝達している。本論文では、Ca²⁺チャネルによる Ca²⁺シグナルの制御メカニズムを解明するために、Ca²⁺チャネル特異的な活性化剤、阻害剤の同定・開発(第 1 章, 第 2 章)、および Ca²⁺チャネル制御タンパク質の機能解析 (第 3 章, 第 4 章)が行われている。 序論では、細胞内における Ca²⁺イオンの重要性、Ca²⁺チャネルの説明と先行研究の現状、Ca²⁺チャネルと疾患との関連、及び本研究の意義などがまとめられている。 第 1 章では、細胞内 Ca²⁺ストアである小胞体からの Ca²⁺放出を担うリアノジン受容体の新規活性化剤を同定している。チョウ目昆虫に選択的な殺虫活性を示すベンゼンジカルボキサミド誘導体であるフルベンジアミドの作用機序を検討した結果、本化合物がカイコのリアノジン受容体に作用して Ca²⁺放出を惹起する一方で、哺乳類のリアノジン受容体には作用しないことを明らかにしている。また、種選択的作用の決定に重要な領域を分子レベルで確かめ、フルベンジアミドの結合部位が膜貫通ドメインにあり、膜貫通ドメインに含まれる Divergent Region 1 がフルベンジアミドに対する感受性に重要であることを明らかにしている。これにより、Divergent Region 1 を標的とすることで、ベンゼンジカルボキサミド構造を有する新たな活性化剤を開発できることが示唆されている。 第 2 章では、これまで選択的な阻害剤が存在しなかった受容体活性化型 Ca²⁺チャネルである TRPC3 の特異的な阻害剤 (Pyr3)を開発している。ピラゾール誘導体の構造活性相関により TRPC3 に対する選択性に重要な置換基を明らかにしている。また、電気生理学的手法と光親和性ラベル化法により Pyr3 が TRPC3 に直接作用していることが示されている。Pyr3 は DT40 B 細胞において、Ca²⁺流入依存的なシグナル伝達を阻害し、マウスにおいて圧負荷による心肥大を阻害することから、TRPC3 の <i>in vivo</i> での役割を解明する有用なツールであることが明示されている。			

第 3 章・第 4 章では、 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 枯渇によって活性化するストア作動性 Ca^{2+} 流入の活性化因子である STIM1 を用い、相互作用タンパク質の網羅的スクリーニングを行うことにより、形質膜タンパク質 linker for activation of T cells (LAT) (第 3 章)と機能未知タンパク質 coiled-coil domain containing 92 (CCDC92) (第 4 章)を同定している。

第 3 章では、免疫系 T 細胞における持続的な Ca^{2+} 流入に LAT と STIM1 の相互作用が必要であることを明らかにしている。STIM1 が LAT 依存的に T 細胞と抗原提示細胞が形成する免疫シナプスに集積することが示されている。これにより、T 細胞が抗原特異的に免疫応答を活性化するのに必須である持続的な Ca^{2+} 流入が免疫シナプスで起こる可能性が示されている。

第 4 章では、CCDC92 がストア作動性 Ca^{2+} 流入を担う Ca^{2+} チャネルである Orai1 と STIM1 の相互作用を増強させる機能を有することを明らかにしている。CCDC92 は脳での発現レベルが高いことから、神経細胞におけるストア作動性 Ca^{2+} 流入の生理的意義を検討している。その結果、神経細胞においてストア作動性 Ca^{2+} 流入が神経突起伸張を制御すること、およびその過程には STIM1 と CCDC92 が関与することを明らかにしている。また、CCDC92 が神経細胞において中間径フィラメントと同様な局在を示すことから、STIM1 および CCDC92 の新たな機能として細胞形態の維持を示唆している。CCDC92 は、双極性障害の原因遺伝子の候補として報告されているが、その変異により、CCDC92 のストア作動性 Ca^{2+} 流入を増強させる機能が損なわれることを示している。以上の知見は、神経細胞におけるストア作動性 Ca^{2+} 流入の生理的意義を分子レベルで明らかにし、病態との関連の可能性を示唆している。

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、選択的薬剤の存在しなかった Ca^{2+} チャネルの活性化剤、阻害剤の同定・開発、および生理的役割が未解明であった Ca^{2+} チャネルの分子機構の解明を行った研究成果についてまとめたものである。得られた成果は次の通りである。

リアノジン受容体 Ca^{2+} 放出チャネルには、選択的活性化剤が存在しなかった。silkworm からリアノジン受容体をクローニングして、フルベンジアミドが非常に低濃度から活性化作用を示すことを明らかにしている。また、本化合物の結合部位と感受性に重要であるドメイン構造を明らかにすることで、本化合物の種選択的活性化作用の分子機構を提案している。以上の結果は、今後、新たなリアノジン受容体作用薬の開発における重要な指針となると考えられる。

TRPC3 チャネルにも、選択的阻害剤が存在しなかった。本チャネルの選択的阻害剤として、Pyr3 を開発し、TRPC3 の *in vivo* での役割を解明する有用なツールであることを示している。

ストア作動性 Ca^{2+} 流入が担う生理機能の分子機構は未解明であった。この Ca^{2+} 流入を活性化する STIM1 を用いて網羅的スクリーニングを行い、 Ca^{2+} 流入の活性を制御する 2 種類のタンパク質(LAT と CCDC92)を同定している。T 細胞における持続的な Ca^{2+} 流入には、LAT と STIM1 の相互作用が必要であり、STIM1 が LAT 依存的に T 細胞と抗原提示細胞が形成する免疫シナプスに集積することを明らかにしている。また、CCDC92 がストア作動性 Ca^{2+} 流入を担う Orai1 チャネルと STIM1 の相互作用を増強させる機能を有し、神経細胞の突起伸張に関与することを明らかにしている。

以上、本論文では、リアノジン受容体の新規活性化剤の同定、および受 TRPC3 チャネルの新規阻害剤の開発が行われている。また、ストア作動性 Ca^{2+} チャネルが担う生理機構の分子メカニズムが明されている。得られた成果は、学術上、実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 22 年 2 月 22 日、論文内容とそれに関連した事項について口頭試問を行った結果、合格と認めた。