

氏 名 東 智広

学位 (専攻分野) 博士 (理学)

学位記番号 総研大甲第 1074 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 23 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Regulation Mechanisms of TRPV Channels by Protein
Kinase C

論文審査委員 主 査 教授 久保 義弘
教授 富永 真琴
教授 岡田 泰伸
教授 森 泰生 (京都大学)

論文内容の要旨

TRP (transient receptor potential) channels were first described in *Drosophila*, where photoreceptors carrying *trp* gene mutations exhibited an abnormal transient responsiveness to continuous light. In mammals, TRP channels comprise six related protein families (TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPML, TRPP). In general, TRP channels are ubiquitously expressed, indicating that most cells have a number of TRP channel proteins. Of these channels, He focused on TRPV1 and TRPV4 functions. In chapter 1, He investigated the functional interaction of TRPV1 with inflammatory mediators, prostaglandins. Prostaglandin E₂ (PGE₂) and prostaglandin I₂ (PGI₂) are major inflammatory mediators that play important roles in pain sensation and hyperalgesia. The role of their receptors (EP and IP, respectively) in inflammation has been well documented, although the EP receptor subtypes involved in this process and the underlying cellular mechanisms remain to be elucidated. The capsaicin receptor TRPV1 is a nonselective cation channel expressed in sensory neurons and activated by various noxious stimuli. TRPV1 has been reported to be critical for inflammatory pain mediated through PKA- and PKC-dependent pathways. PGE₂ or PGI₂ increased or sensitized TRPV1 responses through EP₁ or IP receptors, respectively predominantly in a PKC-dependent manner in both HEK293 cells expressing TRPV1 and mouse DRG neurons. In the presence of PGE₂ or PGI₂, the temperature threshold for TRPV1 activation was reduced below 35°C, so that temperatures near body temperature are sufficient to activate TRPV1. A PKA-dependent pathway was also involved in the potentiation of TRPV1 through EP₄ and IP receptors upon exposure to PGE₂ and PGI₂, respectively. Both PGE₂-induced thermal hyperalgesia and inflammatory nociceptive responses were diminished in TRPV1-deficient mice and EP₁-deficient mice. IP receptor involvement was also demonstrated using TRPV1-deficient mice and IP-deficient mice. Thus, the potentiation or sensitization of TRPV1 activity through EP₁ or IP activation might be one important mechanism underlying the peripheral nociceptive actions of PGE₂ or PGI₂.

In chapter 2, He examined the interaction of TRPV4 with its binding protein. TRPV4, a member of TRPV subfamily, is a nonselective cation channel that is activated by hypotonic stimulus, warm temperatures (~25-34°C) or chemical compounds such as 4 α -PDD, and is expressed in various tissues. To investigate TRPV4 function, He screened a cDNA library from keratinocytes to identify TRPV4 interacting proteins using a yeast two-hybrid system. Sequence analysis revealed that one of the positive clones partially encodes ENH (Enigma Homologue). He found that the N terminal region of TRPV4 bound to LIM domains of ENH. When both TRPV4 and ENH were co-expressed in HEK293 cells, patch-clamp analyses showed that 4 α -PDD-evoked currents were larger than those observed in cells expressing TRPV4 alone. However, the increase in the 4 α -PDD-evoked currents was prevented by a PMA treatment in the cells expressing TRPV4 with ENH. These results indicate that ENH regulates TRPV4 upon their physical association depending on PKC activity.

TRP (transient receptor potential) チャネルは、6 つのサブファミリーメンバーを包含する大きなファミリーであり、その多様性に富む活性化機構は非常に興味深い。この中で、申請者東智広氏は、TRPV ファミリーの TRPV1 および TRPV4 の機能調節機構に焦点をあてて、研究を行った。実験系としては、*in vitro* 再構成系として HEK293 細胞を用いると共に、TRPV1 の発現が知られている後根神経節神経細胞などを用いて、電気生理学および薬理学的実験を行い、また、種々の遺伝子改変動物を用いた実験を行うことにより、結論を確固たるものとしている。

第一部として、TRPV1 の、炎症性物質 PG (prostaglandins) による活性化機構について解析を行った。その結果、PGE₂ と PGI₂ が、それぞれ、EP₁ 受容体、および、IP 受容体を介して、PKCε (protein kinase C ε) を活性化してチャネルをリン酸化することにより、TRPV1 の、カプサイシンに対する応答を増強し、また、温度刺激に対する閾値を下げていることを明らかにした。さらに、先行研究では、TRPV1 は、PKA (protein kinase A) によるリン酸化の寄与が報告されているが、PGE₂ は EP₄ 受容体を介して、PGI₂ は、低濃度の場合に長時間投与により、IP 受容体を介して、PKA による機能修飾を受けることを確認した。しかし、EP₁ 受容体ノックアウトマウスを用いた実験の結果などから、PKCε の寄与が、より大きいことを結論した。

第二部としては、TRPV4 の、結合蛋白による機能修飾について解析を行った。まず、TRPV4 の発現が知られているケラチノサイトの cDNA ライブラリーから、酵母 two hybrid 法により、結合蛋白として、ENH (Enigma Homologue) を同定し、TRPV4 が、ENH の LIM ドメインに結合することを明らかにした。さらに、ENH を共発現することにより、TRPV4 の、4α-PDD に対する応答が増強し、また、共発現時に、PKCε により、応答が抑制されることを見いだした。さらに、PKCε による機能修飾時に、リン酸化を受けるのは、TRPV1 の場合とは異なり、TRPV4 自体ではなく ENH であることを明らかにした。

以上のように、本論文は、種々の方法論の持つそれぞれのメリットを最大限に活かして得られたデータを統合することにより、TRPV1 および TRPV4 の PKC による機能調節の分子機構を明らかにしたもので、明確な新奇性を持った、優れた論文である。よって、審査委員会は、全員一致で、本論文が学位論文として相応しいものであると判断した。