

氏 名 Gupta, Rupali

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1866 号

学位授与の日付 平成28年9月28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 Identification of the molecular basis for TRPA1 inhibition
utilizing species-specific differences

論文審査委員 主 査 教授 久保 義弘
教授 富永 真琴
教授 古瀬 幹夫
教授 岡村 康司 大阪大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Pain usually arises from noxious stimuli and alerts us to potential danger. Over the last two decades, considerable advances have been made in understanding peripheral pain mechanisms and the development of new analgesics. Transient receptor potential A1 (TRPA1), a member of the TRPA subfamily, has emerged as an important target for studying several types of pain and inflammatory conditions. TRPA1 is known to be activated by various nociceptive stimuli such as noxious cold, pungent natural products like cinnamaldehyde (CA) and environmental irritants. Moreover, TRPA1 is mainly expressed in nociceptive neurons in sensory ganglia, thus TRPA1 serves as a receptor for pain sensation. Since TRPA1 acts as a nociceptive receptor, the development and study of its specific antagonists could aid our understanding of pain relief mechanisms.

Many TRPA1 antagonists have been developed and some of them have entered pre-clinical trials. The discovery of selective TRPA1 antagonists has allowed studies to address the role of TRPA1 in health as well as in various animal disease models. Characterization of TRPA1 from various species revealed that their sensitivity to antagonists differs species-specifically. For example, TRPA1 from either the wild type western clawed frog *Xenopus tropicalis* (wt-fTRPA1) or the green anole lizard *Anolis carolinensis* is not inhibited by A96 or AP-18 (potent TRPA1 antagonists) while both wild type human TRPA1 (wt-hTRPA1) and mouse TRPA1 are inhibited by A96 and AP-18. Effects of HC-030031 (HC), another selective TRPA1 antagonist also differ among species. HC inhibits TRPA1 from human, green anole and chicken; however, it failed to inhibit wt-fTRPA1. Due to this species diversity, comparative analyses of TRPA1 among different species have been proven to be informative for understanding the structure-function relationships.

In this study, through comparative and mutagenesis experiments using TRPA1 from different species, I identified important amino acid residues that are crucial for the antagonistic activities of both A96 and HC in order to clarify the molecular mechanisms of TRPA1 inhibition. By utilizing species-specific differences in TRPA1 inhibition by A96, along with their sequence analysis, I identified two amino acid residues (Ser873 and Thr874) in the TM5 domain that are essential for the antagonistic action of A96. A recent study reporting the detailed structure of wt-hTRPA1 confirmed the binding site of A96 near the regions reported by my group and others via an “induced fit” mechanism involving movement in the Ser873 and/or Thr874 residues. This further supports my findings.

I next attempted to identify the amino acid residues (or regions) involved in the inhibitory effects of HC on TRPA1. For this, I also utilized the species-specific

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

differences in TRPA1 inhibition between human and western clawed frog, and generated a series of TRPA1 chimeras to identify the critical region(s) involved. Further point mutation analyses based on species-specific differences in sequence within the critical region of TM5-TM6 revealed that a single amino acid residue in the linker region of TM4 and TM5 domain, Asn855 contributes significantly to the inhibitory action of HC. Asn855 in hTRPA1 was previously shown to be associated with autosomal-dominant heritable familial episodic pain syndrome.

Because TRPA1 is a unique polymodal signal detector whose action differs by species, it is important to add data from new species in order to understand its distinct physiological functions. For the first time I showed that HC failed to show any inhibitory effect on CA-evoked activation of wild type zebrafish TRPA1b (wt-zTRPA1b) in a heterologous expression system with *X. laevis* oocytes. In addition, I observed an increase in the sensitivity to HC for both fTRPA1 and zTRPA1b mutants containing Asn855 counterpart, which further confirmed the importance of this single amino acid residue.

Lastly, the data from molecular dynamics simulations using wt-hTRPA1 suggested that this single amino acid (Asn855) potentially binds to HC by stable hydrogen bonding. I also found that Asn855 synergistically interacts with the C-terminal region resulting in complete TRPA1 inhibition by HC.

Taken together, the present investigation of the pharmacology of TRPA1 antagonism in different species provided clues for identifying the structural basis of the inhibitory mechanisms, which could facilitate our understanding of the structure-function relationship of TRPA1 and provide novel insights into the search for new analgesic medicines targeting TRPA1.

出願者 Gupta, Rupali 氏は、種々の侵害刺激の受容体である TRPA1 (transient receptor potential A1) チャネルの 2 種のアンタゴニストに対する感受性を決定しているアミノ残基を同定することを目的として、感受性の種間差異に基づいて変異体やキメラ分子を作成し、*in vitro* 発現系としてアフリカツメガエル卵母細胞を用いた 2 電極膜電位固定法による電気生理学実験、およびヒト由来の HEK293 細胞を用いた細胞内 Ca^{2+} イメージング法による実験を用いて機能解析を行った。

第一部として、Gupta 氏は、アンタゴニスト A-967079 (A96) の感受性の種間差異を解析した。その結果、ヒトの TRPA1 (hTRPA1) は高い感受性を示すのに対し、*Xenopus tropicalis* の TRPA1 (fTRPA1) は、ほとんど感受性を示さないことを明らかにした。A96 と類似した AP-18 の感受性を決定する部位が第 5 膜貫通部位 (TM5) であることが知られていることから、Gupta 氏は、hTRPA1 と fTRPA1 の TM5 のアミノ酸配列の違いに着目し、hTRPA1 の変異体、Ser873Ile および Ser873Ile&Thr874Val の機能解析を行い、A96 に対する感受性が減弱していることを観察した。この結果から、hTRPA1 の Ser873 および Thr874 が A96 の感受性の決定に寄与していることを明らかにした。さらに、TRPA1 の結晶構造に基づき、この部位に A96 が "induced fit" 機構により結合することが考察された。

第二部として、Gupta 氏は、アンタゴニスト HC-030031 (HC) に対する感受性の種間差異の解析を行った。その結果、hTRPA1 が高い感受性を示すのに対し、fTRPA1 は、ほとんど感受性を示さないことをまず明らかにした。次に、感受性を決定する部位を同定するために、hTRPA1 と fTRPA1 のキメラ分子を網羅的に作成して機能解析を行い、TM5-TM6 が最重要であること、C 末端領域も寄与することを明らかにした。さらに、TM5-TM6 の両者の異なるアミノ酸残基の変異体を作成して解析し、hTRPA1 の Asn855Ser 変異体が減弱した感受性を示すことを観察した。また、fTRPA1 の Ser880Asn 変異体が感受性を獲得することも見出した。同様なヒト型への変異による感受性の変化は、HC に対し低い感受性を示す zebrafish TRPA1 においても観察された。さらに、fTRPA1 に Ser880Asn 変異を導入するとともに C 末端細胞内領域を hTRPA1 のものに置き換えると、hTRPA1 と同様な非常に高い感受性を獲得することを示した。最後に、分子動力学シミュレーション解析を行い、HC の酸素原子が、hTRPA1 の Asn855 の N δ 原子に長時間安定的に結合することを示した。このように、Gupta 氏は、密接に関連した二つのテーマについて優れた研究成果を挙げた。

以上、本研究は、分子生物学的手法を組み合わせた細胞生理学および分子動力学の解析結果を統合して、hTRPA1 の 2 種のアンタゴニストの感受性を決定しているアミノ酸残基を同定し、さらに、それらのアミノ酸残基が結合部位であることを明らかにしたものである。その科学的価値はもちろんのこと、今後の鎮痛等を目的とした TRPA1 作用薬の開発における価値も高く評価できる。以上の理由から、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。