

氏 名 Kurganov, Erkin

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1944 号

学位授与の日付 平成29年3月24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 Heat-evoked activation of TRPA1

論文審査委員 主 査 教授 久保 義弘
教授 富永 真琴
教授 西田 基宏
准教授 中川 貴之 京都大学

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

Transient receptor potential (TRP) channels are nonselective cation-permeable channels that can be categorized into 7 subfamilies: TRPC (canonical), TRPV (vanilloid), TRPA (ankyrin), TRPM (melastain), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin) and TRPN (NOMPC) (not found in mammals). Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1), a unique member of the TRPA subfamily is a homotetrameric nonselective cation-permeable channel with six transmembrane domains and cytoplasmic N- and C-termini. Although many TRP channel family members contain between 3 and 6 ankyrin repeats (ARs) in the N-terminal region, TRPA1 is distinguished by having an unusually large (16-17) number of AR repeats. The *trpa1* gene was first cloned from lung fibroblasts and originally named ANKTM1 because of these multiple N-terminal ankyrin repeats. TRPA1 is primarily expressed in dorsal root ganglia as well as trigeminal ganglia and nodose ganglia in mammals.

Mouse TRPA1, but not human TRPA1 was identified as a potential mediator of noxious cold stimuli in nociceptive sensory neurons. Meanwhile, TRPA1s from non-mammalian vertebrates (snakes, green anole lizards, frogs and chickens) were shown to be activated by heat, but not cold stimulus. Although the 3-dimensional structure of human TRPA1 has been determined, the mechanism for temperature-dependent TRPA1 activation is unclear. Two different models were proposed that could explain temperature sensitivity of TRP channels. A U-shaped model of temperature sensitivity based on the thermodynamics approach explains how all heat-activated TRP channels are also cold activated, while an allosteric coupling model suggests the existence of two structurally different sensors (voltage and temperature) that interacts to activate the channel. In addition to temperature, Ca^{2+} ions play an important role in both modulation and activation of TRPA1 channel. While activation and modulation of TRPA1 channel by intracellular Ca^{2+} and extracellular Ca^{2+} were reported, the role of extracellular Ca^{2+} in temperature sensitivity of TRPA1 remains unclear. The aim of this thesis work is to investigate whether or not TRPA1 is activated by heat directly and how extracellular Ca^{2+} is involved in heat-evoked activation of TRPA1.

The detailed properties of green anole TRPA1 channel (gaTRPA1) expressed in HEK293T cells exposed to thermal and chemical stimuli were first examined in whole-cell and single-channel recordings. Arrhenius plots showed heat-evoked activation of gaTRPA1 with an activation temperature threshold of 35.8 °C, whereas heat together with the chemical agonist allyl isothiocyanate (AITC) showed synergistic effects on gaTRPA1 channel activation in that either the temperature threshold or activating AITC concentration was reduced in the presence of the other

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

stimulus. To investigate whether or not heat directly activates gaTRPA1 channels, excised inside-out membrane patches from gaTRPA1-expressing HEK293T cells were analyzed by the patch-clamp method. These measurements showed that heat and AITC directly activate gaTRPA1 channels. A comparison of the kinetics of heat- and AITC-evoked single-channel currents revealed that heat-activated currents had shorter open and closed times than those for AITC, thus suggesting different activation mechanisms of heat and AITC.

Significant heat-evoked gaTRPA1 activation was observed in the presence, but not absence of extracellular Ca^{2+} . Moreover, to address whether or not other divalent cations are involved in heat-evoked activation of gaTRPA1, effects of extracellular cations (Mg^{2+} , Ba^{2+} and Sr^{2+}) were examined upon heat stimulation. The absence of extracellular Mg^{2+} did not affect the channel activity upon heat stimulation regardless of the presence of Ca^{2+} . Substitution of extracellular Ca^{2+} with Ba^{2+} and Sr^{2+} did not evoke gaTRPA1 currents upon heat stimulation, but AITC-evoked currents were still observed.

To understand the role of extracellular Ca^{2+} in heat-evoked activation of TRPA1 channels, the extracellular Ca^{2+} -dependent heat sensitivity of gaTRPA1 was compared with the heat-activated TRPA1 channels from rat snake (rsTRPA1) and chicken (chTRPA1). In the absence of extracellular Ca^{2+} , rsTRPA1 and chTRPA1 were activated by heat and generated small inward currents at -60 mV. A single point mutation (Glu894Gln) in gaTRPA1 channel showed small inward currents upon heat stimulation in the absence of extracellular Ca^{2+} at -60 mV, indicating the involvement of Glu894 in heat-evoked activation. Further comparison of extracellular amino acids in TRPA1 from these three species (gaTRPA1, chTRPA1 and rsTRPA1) identified two other negatively charged ones (Glu and Asp) near the outer pore vestibule that are involved in heat-evoked TRPA1 activation in the presence of extracellular Ca^{2+} .

These results suggest that extracellular Ca^{2+} , but not intracellular Ca^{2+} or other extracellular divalent cations, is important for heat-evoked activation of gaTRPA1 and neutralization of acidic amino acids by extracellular Ca^{2+} is involved heat-evoked activation in all three species, which could clarify mechanisms of heat-evoked channel activation.

(別紙様式 3)
(Separate Form 3)

博士論文審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

出願者 Kurganov, Erkin 氏は、温度刺激および AITC 等の化学物質刺激の受容体である TRPA1 (transient receptor potential ankyrin 1) チャネルの活性化機構、特に、その細胞外 Ca^{2+} 依存性とその構造基盤の解明を目的として、グリーンアノール (green anole) トカゲの TRPA1 (gaTRPA1) を主たる対象とする、*in vitro* 発現系としてヒト由来の HEK293 細胞を用いたパッチクランプ法による全細胞電流および単一チャネル電流の解析を行った。

出願者は、まず、gaTRPA1 が高温刺激および AITC に応答すること、どちらの場合も、繰り返し刺激に対しては脱感作が起ることを見出した。また、細胞外 Ca^{2+} 非存在下では、高温応答がほとんど観察されないのに対し、AITC 応答は変化しないことを見出した。さらに、高温刺激と AITC 刺激の相乗効果について解析を行い、AITC に対する濃度応答関係が高温では低濃度側にずれること、AITC 存在下では高温刺激に対する応答の閾値が下がることを観察し、両刺激に対する応答の相乗性を明らかにした。

次に、inside out パッチを用いた単一電流解析を行い、細胞質の内因性物質等の関与なしで高温応答、AITC 応答とも起こることを明らかにした。さらに、AITC 非存在下での高温応答と室温での AITC 応答を比較解析した。その結果、高温応答では AITC 応答に比し、平均開時間および閉時間が顕著に短いことを観察した。また、AITC に対する応答が単一チャネル電流レベルにおいても、細胞外 Ca^{2+} 非存在下で消失する高温応答と異なり、細胞外 Ca^{2+} の存在下と非存在下で顕著な差を示さないことを観察した。これらのデータを踏まえて、高温刺激による活性化と AITC 応答による活性化のメカニズムが異なることが示された。

出願者は、次のステップとして、高温応答の細胞外 Ca^{2+} 依存性について全細胞電流記録によりさらに詳細な解析を行った。その結果、 Mg^{2+} には依存しないこと、 Ba^{2+} では高温応答を起こすことができないこと、 Ca^{2+} 2 mM では 1 mM に比して高温応答の大きさは増大するが温度域値は変わらないこと等を見出した。ニワトリ (chicken) の TRPA1 (chTRPA1) およびヘビ (rattle snake) の TRPA1 (rsTRPA1) では、gaTRPA1 と異なり、 Ca^{2+} 非存在下でも高温応答が観察されたが、 Ca^{2+} 存在下の応答に比べると減弱していた。

最後に、高温応答の細胞外 Ca^{2+} 依存性の構造基盤を探るために点変異体を用いた解析を行った。その結果、ポア細胞外側入り口に位置する、gaTRPA1 に特徴的に存在する Glu894 が強く寄与していること、3 種に共通して見られる Asp918, Glu922 も関与していることを明らかにし、これらの 3 カ所の負電荷を有するアミノ酸残基の重要性を明らかにした。

以上、本研究は、野生型および変異体のパッチクランプ法による電気生理学の解析結果を統合して、gaTRPA1 が高温感受性を示すこと、高温応答と AITC に対する応答が相乗効果を示すこと、高温刺激時と AITC 刺激時の単一チャネル活動が異なること、AITC 応答と異なり高温応答には細胞外 Ca^{2+} が必須であること等を明らかにし、さらに細胞外 Ca^{2+} 依存性の構造基盤を同定したものである。その学術的価値は分子細胞生理学、および生物物理学の見地から高く評価できる。以上の理由から、審査委員会は全員一致で、本論文が学位

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

論文として相応しいと判断した。