

氏 名 岡 田 峯 陽

学位（専攻分野） 博士(学術)

学 位 記 番 号 総研大甲第415号

学位授与の日付 平成11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4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Molecular and Functional Characterization of
Novel TRP Receptor-activated Ca²⁺ Channels from
Mouse Brain

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 池 中 一 裕
教 授 山 岸 俊 一
教 授 井 本 敬 二
教 授 宮 崎 俊 一（東京女子医科大学）

Receptor-activated Ca^{2+} influx that occurs as a second phase of phosphatidylinositol-dependent response, has been recently recognized for its physiological significance. Characterization of mammalian homologues of *Drosophila* TRP proteins is an important clue to understand molecular mechanisms underlying receptor-activated Ca^{2+} influx in vertebrate cells. Especially, TRP homologues have been proposed to encode store-operated channels (SOC) which is activated through Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} store and subsequent depletion of the Ca^{2+} store. However, the hypothesis is still controversial. In order to establish the correlation of cloned TRP homologues and native channels, it is necessary to investigate the functional properties of TRP homologues using the excellent expression system. He has here isolated cDNAs that encode novel TRP homologues, TRP4, TRP5, TRP6, and TRP7 from the mouse brain. All of these homologues were found to be relatively highly expressed in the brain, but their expression was detected also in various organs other than the brain, with various intensities characteristic of each subtype. Among them, first, he characterized the function of the brain-predominant homologue, TRP5. The recombinant expression of the TRP5 cDNA in human embryonic kidney cells potentiated an extracellular Ca^{2+} -dependent increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, evoked by ATP, but not by an inhibitor of ER Ca^{2+} -ATPases, thapsigargin. Whole-cell mode of patch-clamp recordings from TRP5-expressing cells demonstrated that ATP application induced a large inward current in the presence of extracellular Ca^{2+} , which reversed at a positive potential. The TRP5 activity was abolished by omission of intracellular Ca^{2+} and by treatment with a calmodulin antagonist. High concentration of extracellular Ca^{2+} activated TRP5 without ATP stimulation. On the other hand, omission of extracellular Ca^{2+} abolished the activity even in the presence of ATP. These results suggest that TRP5 directs the formation of a highly Ca^{2+} -permeable ion channel which can be activated through receptor-operative pathways other than depletion of Ca^{2+} from Ca^{2+} stores, and that the activity of this channel is highly dependent on Ca^{2+} concentrations inside and outside of cells. Second, the TRP7 function was characterized using the same recombinant expression system. The results show that TRP7 directs the formation of a Ca^{2+} -permeable ion channel with significant basal activity. The activity of TRP7 did not depend on extracellular Ca^{2+} but was enhanced by receptor-stimulation even with the low concentration of ATP which could not induce Ca^{2+} release from the intracellular Ca^{2+} store. The obtained functional characters of the two novel TRP homologues together suggest that mammalian TRP homologues are members of a large family of channels responsible for receptor-activated Ca^{2+} influx including not only SOC but also other diverse subtypes of channels in the family.

論文の審査結果の要旨

代謝型受容体刺激により活性化される受容体作動性 Ca^{2+} 流入は、様々な細胞で報告されているが、その生理的な役割や活性化機構に関する研究は、電位依存性あるいはリガンド作動性 Ca^{2+} 流入の研究と比べて大きく立ち後れている。その最大の原因は受容体作動性チャネルの分子生物学的実体がかつかめていないことにある。この問題点を解決するために、申請者は、Drosophila の TRP 蛋白質の哺乳類ホモログ cDNA を単離するストラテジーで、マウス受容体作動性チャネルの遺伝子クローニングを行った。これは Drosophila の TRP 蛋白質が、視細胞において光刺激が GTP 結合蛋白質 (G 蛋白質)、ホスファチジルイノシトール応答を介して活性化する Ca^{2+} 流入を担うチャネルであると考えられているためである。その結果、マウス脳から4つの新規 TRP ホモログ (TRP4~TRP7) の cDNA を単離した。

まず TRP ホモログの発現分布をノーザンブロッティングによって調べたところ、いずれのホモログも中枢神経系に比較的強く発現しているが、それぞれのホモログは脳の内外においてそれぞれ異なった発現分布を示すことが明らかとなった。

申請者は、これらのうち脳特異的な TRP5 に焦点をあて、G 蛋白質と共役した ATP 受容体を内因性に有するヒト胚腎 (HEK) 細胞に TRP5 を強制発現させ機能解析を行った。TRP5 の発現は、ATP 受容体刺激で引き起こされる細胞外 Ca^{2+} に依存した細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性の上昇を劇的に増強した。しかし TRP5 の発現は、細胞内小胞体上の Ca^{2+} ポンプの阻害剤である thapsigargin で、細胞内 Ca^{2+} ストアを涸渇させることによって活性化される容量性 Ca^{2+} 流入にはほとんど影響を及ぼさなかった。さらに ATP 刺激はストアの涸渇を介さずに TRP5 依存性の Ca^{2+} 流入を引き起こしていることが分かった。この結果は、TRP ホモログが細胞内 Ca^{2+} ストアの涸渇によって活性化される容量性 Ca^{2+} チャネルであるとする一般に受け入れられていた仮説を覆すものであった。

ホールセルパッチクランプ法で膜電位固定して、TRP5 発現細胞から電流を記録すると、細胞外 Ca^{2+} 非存在下で ATP 刺激によって極小さな内向き電流がみられ、細胞外液に Ca^{2+} を加えると大きな内向き電流が現れた。TRP5 の発現によって形成されるチャネルの電流電圧関係を、細胞外の Ca^{2+} 存在下と非存在下でそれぞれ調べた。そこから得られたみかけの逆転電位を使って、Goldman-Hodgkin-Katz の式から算出された透過性の比は $\text{PCa}^{2+} : \text{PNa}^+ : \text{PCs}^+ = 14.3 : 1.5 : 1$ であった。

この TRP5 発現に起因する電流は細胞内の Ca^{2+} に依存しており、パッチ電極内液の Ca^{2+} を完全に除くと全くみられなくなった。このことから TRP5 による Ca^{2+} 流入に対するカルモジュリンアンタゴニストの効果を調べたところ、適正な濃度範囲で抑制がみられ、細胞内の Ca^{2+} の活性化機構に対する関与はカルモジュリンを介するものであることが示唆された。

さらに TRP5 は高濃度の細胞外 Ca^{2+} によって ATP 刺激がなくとも活性化し、しかもその活性は ATP 刺激した時でさえ細胞外 Ca^{2+} に依存していることがわかった。

また TRP7 に関しても同様の系を用いて実験を行ったところ、TRP7 は TRP5 などに比べて、ATP などのアゴニストに依存しない活性が高い Ca^{2+} 透過性イオンチャネルであることがわかった。この TRP7 の活性は細胞外の Ca^{2+} には依存せず、また細胞内 Ca^{2+} ストア

からの Ca^{2+} 放出を引き起こさないような低濃度の ATP によって増強された。

これら得られた結果は、哺乳類 TRP ホモログが容量性 Ca^{2+} 流入のみならずその他多くの種類の受容体作動性 Ca^{2+} 流入を担うイオンチャネルのファミリーに属することを印象づけ、学位授与を行うのに十分である。また、本申請論文および関連領域に関して口頭で試験を行い、十分な学力を備えていることも確認した。さらに、本研究成果の一部は英文雑誌に掲載されており、英語の学力も十分であると判断されたため、合格と判断した。

学問的背景や関連分野や研究動向についての口頭試問を行ったが、いずれに対する応答も満足すべきものであった。本論文は英語で書かれており、また申請者を筆頭著者とする 1 編の英文論文が既に刊行されていることから、英語力も十分なものと判定した。

以上、総合的に判断し、学位を取得するに足る水準に十分達しているものと判断した。