

氏名 原 雄二

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第618号

学位授与の日付 平成14年3月22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 LTRPC2  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeable Channel Activated by Changes in Redox Status Confers Susceptibility to Cell Death

論文審査委員 主査教授 岡田 泰伸  
教授 小幡 邦彦  
教授 井本 敬二  
教授 森 泰生  
助教授 黒瀬 等（東京大学）

## 論文内容の要旨

Redox status changes exert critical impacts on necrotic/apoptotic and normal cellular processes. Key contributors to altered cellular redox status are reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) which are generated by exogenous genotoxic agents such as inflammatory cytokines or chemical carcinogens.

Regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) also plays critical roles in both normal cellular functions and pathological cell degenerations. In acute insults such as hypoxia-ischemia, it has been proposed that the resultant cell fate (necrosis, apoptosis, survival) is dependent on an intracellular ‘ $\text{Ca}^{2+}$  setpoint’. However, the molecular mechanisms of excessive  $\text{Ca}^{2+}$  influx in response to redox dyshomeostasis is still controversial.

He has identified a  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable cation channel LTRPC2 activated by changes in cellular redox status. LTRPC2, originally discovered as a homologue of *Drosophila transient receptor potential*, belongs to ‘Long’ TRP family. LTRPC2 showed abundant RNA expression in the lung, spleen, eye, and brain. LTRPC2 elicited  $\text{Ca}^{2+}$ -entry in response to extracellular  $\text{H}_2\text{O}_2$  at concentrations of micromolar range, in contrast to other types of  $\text{Ca}^{2+}$  channels which require much higher  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations, and under various conditions that generate ROS. Patch-clamp recordings and biochemical experiments demonstrated that the sensitivity of LTRPC2 to redox state modifiers was attributable to an agonistic binding of nicotinamide adenine dinucleotide ( $\beta\text{-NAD}^+$ ) to the MutT motif. Arachidonic acid and  $\text{Ca}^{2+}$  were important positive regulators for LTRPC2. Heterologous LTRPC2 expression conferred susceptibility to death on HEK cells. Moreover, antisense oligonucleotide experiments revealed physiological involvement of ‘native’ LTRPC2 in  $\text{H}_2\text{O}_2$ - and  $\text{TNF}\alpha$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx and cell death in rat insulinoma RIN-5F and human monocyte U937. Thus, LTRPC2 represents an important intrinsic mechanism that mediates  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  overload in response to disturbance of redox state in cell death.

## 論文の審査結果の要旨

細胞内における酸化還元状態は常に厳密に制御されている。しかし外部からの刺激などにより急激に活性酸素種が発生した場合、制御機構が破綻し酸化的障害を受け、細胞死に至る。細胞内レドックス制御破綻により、細胞死に至る経路の一つとして細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度異常が挙げられるが、その作用機序は未だ明らかでない。本研究ではレドックス制御破綻—細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度異常をもたらす経路を解明する目的で、形質膜に存在するチャネル分子、特に *Drosophila* の TRP (Transient Receptor potential) 蛋白質及びその哺乳類ホモログに着目した。その結果、低濃度の活性酸素種に反応して  $\text{Ca}^{2+}$  流入を引き起こすチャネル LTRPC2 を発見したものである。

ノーザンブロッティングにより、マウス LTRPC2 は脳、肺、脾臓、目に発現が確認された。LTRPC2 分子をヒト胚腎細胞へ組換え発現させ、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度測定や電気生理学的測定を行なったところ、既知の  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルでは活性化され得なかった低濃度の過酸化水素により、急劇な  $\text{Ca}^{2+}$  流入が惹起された。また窒素酸化物供与体適用によっても、LTRPC2 チャネル活性化はもたらされた。さらに LTRPC2 はアラキドン酸、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  によっても活性化されることも併せて見出している。LTRPC2 が細胞内レドックス制御破綻により活性化されるメカニズムとして、 $\beta$ -ニコチンアミドアデニンデヌクレオチド ( $\beta$ -NAD<sup>+</sup>) が関与することを突き止めた。ピペット内に  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 存在下、ホールセルパッチクランプ法により、LTRPC2 発現細胞では内向き電流が見られた。この電流は過酸化水素適用時、ニスタチン穿孔法を用いて計測した電流と極めて類似していた。 $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 濃度は、過酸化水素適用により一過的に上昇することが HPLC などにより示されたことから、 $\beta$ -NAD<sup>+</sup> が過酸化水素による LTRPC2 活性化に介在していると考えられた。LTRPC2 のアミノ末端にはアラキドン酸と結合しうる配列 (Arachidonic acid responsive sequence: ARS) が、カルボキシル末端には、MutT モチーフと呼ばれるヌクレオチド結合モチーフが存在するが、欠失変異体を用いた検討の結果、それぞれがチャネル活性に必須であること、さらに生化学的、電気生理学的解析により  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> が MutT モチーフに直接作用することを明らかにした。さらに LTRPC2 の生理的機能として、活性酸素種に反応して細胞死をもたらすことを明らかにした。LTRPC2 組換え発現細胞、内在的に LTRPC2 を発現しているインシリノーマ細胞に活性酸素種を適用した際、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇及び細胞死が引き起こされた。過酸化水素適用だけでなく、腫瘍壞死因子 (TNF $\alpha$ ) 適用による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇及び細胞死が、LTRPC2 アンチセンスオリゴヌクレオチド適用により有意に抑制された。さらに U937 リンフォーマ細胞においても同様に過酸化水素、TNF $\alpha$  適用による細胞死が抑制された。

以上のように、本研究はこれまでその機能が不明であった LTRPC2 が、レドックス破綻により活性化される  $\text{Ca}^{2+}$  透過性カチオンチャネルであることを始めて明らかにしたものであり、さらにはこのタンパクは細胞内レドックス制御破綻から細胞死に至る経路の中心分子の一つであることを示したものであり、分子生物学・細胞生理学分野において大きな貢献をしたものと判定された。

審査委員会における研究発表は、豊富なデータを整然と示しながら明確に行われた。また、引き続いて行われた試問においても、すべてに的確に答え、殆んどすべての実験は申請者自らが実施したものであり、しかもその技術も優れており、考えられる可能性はすべて次から次へと実験的に検討していくという精力的姿勢を持ち、関連分野の学識にも富み、優れた研究能力を持っているものと判定された。本研究成果は国際誌に英文原書論文として掲載されており、本学位論文も適切な英文で書かれていることから英語力も満足できるものと判定された。