

氏 名 Nguyen, Thi Hong Dung

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2206 号

学位授与の日付 2020 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 Structural basis for promiscuous action of monoterpenes on
TRP channels

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
教授 濡木 理
東京大学 大学院理学系研究科

(Form 3)

Summary of Doctoral Thesis

Nguyen, Thi Hong Dung

Structural basis for promiscuous action of monoterpenes on TRP channels

Organisms use sensors such as transient receptor potential (TRP) ion channels to adapt to environmental changes. Members of the TRP ion channel family play important roles as polymodal sensors to detect and respond to changes in temperature, pH, voltage, osmolarity, and exogenous molecules involved in taste, smell, and pheromone responses. Channels in this family include TRP vanilloid 1 (TRPV1), TRP vanilloid 3 (TRPV3) and TRP melastatin 8 (TRPM8) that are all crucial for sensing temperature and natural compounds. TRPV1, a capsaicin receptor is physiologically important for thermal ($>42\text{ }^{\circ}\text{C}$) and chemical nociception in sensory neurons. TRPV3 is also a heat sensor and expressed in various tissues including skin epithelial cells. TRPV3 is responsible for sensation of warm temperature ranging from $35\text{-}39\text{ }^{\circ}\text{C}$, but has also been reported to be initially activated by noxious heat ($>50\text{ }^{\circ}\text{C}$) and sensitized to activation in response to warm temperature. Chemical agonists of TRPV3 include spice extracts that contain monoterpenes such as menthol, camphor and carvacrol, and synthetic agents (including 2-aminoethoxy diphenylborate, 2-APB). Whereas many TRPV subfamily members act as heat sensors, TRPM8 is known to be involved in sensations induced by cool temperatures ($<26\text{ }^{\circ}\text{C}$) and menthol in sensory neurons.

The six TRP subfamilies (TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP, and TRPML) all have a tetrameric assembly consisting of putative six transmembrane secondary structures (S1-S6) with intracellular N and C termini. The S1-S4 and S5-pore loop-S6 are connected by the S4-S5 linker. The structures of several TRP channels were recently extensively clarified by cryo-EM single-particle analysis. The combination of cryo-EM microscopy with nanodisc technology allowed the efficient determination of the location of regulatory lipids.

Menthol is a well-known TRPM8 activator, and is required for cool thermosensation *in vivo*. Menthol can also activate TRPV3 and has bimodal effects on mouse TRPA1. Moreover, several amino acids were shown to be involved in the binding of menthol in mouse TRPM8 and human TRPA1. Furthermore, menthol inhibits capsaicin-activated human TRPV1 activity, indicating that it shows promiscuous actions toward several TRP channels. However, no consensus has been reached regarding menthol binding sites, especially for TRPV3.

I have characterized the pharmacological effects of menthol and other

structurally- related monoterpenes on TRPV3 and TRPV1. I decided to focus on the S4-S5 linker because the S4-S5 linker is known to be important for the functions of several TRP channels. I found that R567 and G573 in the S4-S5 linker of mouse TRPV3 (mTRPV3) are differently involved in the chemical responses wherein G573 is involved in responses to menthol, camphor, and 2-APB, while R567 is involved in menthol action, but not in camphor and 2-APB sensitivity. The arginine and glycine in the S4-S5 linker are conserved in rat TRPV1 (rTRPV1). And I unexpectedly observed rTRPV1 activation by 3 mM menthol. However, both corresponding mutants, R557K and G563S in rTRPV1 lost sensitivity to menthol, camphor and 2-APB, indicating that the involvement of arginine and glycine in monoterpene-evoked activation differs between mTRPV3 and rTRPV1. Then, I found the importance of the positive charge of R567 for activation of mTRPV3 because camphor-evoked mTRPV3 activation was markedly reduced in R567A and R567F mutants.

Temperature sensitivity is a hallmark of TRPV1 and TRPV3 channel function. Then, I examined the temperature sensitivities of the R and G mutants of mTRPV3 and rTRPV1. I found that R557K and G563S of rTRPV1 lost heat sensitivity while R567K and G573S of mTRPV3 showed similar heat sensitivity to the wild type without changes in temperature thresholds, indicating that arginine and glycine in the S4-S5 of mTRPV3 and rTRPV1 have a different involvement in heat-evoked activation.

Finally, the MD simulation analysis revealed that both menthol and camphor bind to R567 of mTRPV3 firmly by the hydrogen bond in the wild type, but they are not fixed and fluctuate in the R567F mutant, supporting the importance of R567 of mTRPV3 for binding of menthol and camphor.

Thus, I identified the putative shared amino acids that are involved in menthol, camphor, and 2-APB-evoked activation in mTRPV3 and rTRPV1 and the importance for these residues were further confirmed in MD simulations. These results provide clues to clarify the structural basis of activation of TRPV3 channels, which could lead to increased understanding of the role of TRPV3 in physiological function and in disease.

博士論文審査結果

Name in Full
氏 名 Nguyen, Thi Hong Dung

Title
論文題目 Structural basis for promiscuous action of monoterpenes on TRP channels

Transient Receptor Potential (TRP) チャネルファミリーのメンバーは、温度、pH、膜電位、浸透圧、種々の化学物質等の刺激を感知するポリモーダルなセンサーとして、生体において重要な役割を果たしている。TRPM8 が低温刺激に応答する一方で、TRPV1 は、42 度以上、TRPV3 は 50 度以上の高温刺激により活性化することが知られている。植物由来の精油の成分であるメントールやカンファー等のモノテルペンや、類似した化学物質である 2-APB は、TRPM8, TRPV1, TRPV3, TRPA1 等に対し、アゴニストもしくはアンタゴニストして作用することが知られている。TRPM8, TRPA1 についてはメントールの作用の構造基盤が報告されているが、TRPV1, TRPV3 については、その作用の構造基盤は知られていない。出願者 Nguyen 氏は、作用部位の同定を目的として、野生型と変異体の機能の比較解析等を行った。

Nguyen 氏は、HEK293T 細胞を *in vitro* 発現系として用い、パッチクランプ法により、野生型および変異体の応答の電気生理学的解析を行った。まず、マウス TRPM8 について、既報の通り、S4-S5 リンカーの R842H 変異、S1 膜貫通領域の Y745H 変異によりメントールに対する応答が減弱することを確認した。次に、マウス TRPV3 を対象とした解析を行い、TRPM8 と異なり、S1 の Y448H 変異によって応答は変化しないこと、S4-S5 リンカーの G573S 変異では、メントール、カンファー、2-APB に対する応答がいずれも減弱すること、R567K 変異では、メントールに対する応答が減弱し、カンファーに対する応答は変化しないこと、R567A 変異、R567F 変異によってはカンファーに対する応答も減弱することを新規に見出した。さらに、ラット TRPV1 の解析を行い、対応する G563S 変異、R557K 変異のどちらによっても、唐辛子成分カプサイシンに対する応答は変化せず、メントール、カンファー、2-APB に対する応答がいずれも減弱することを明らかにした。また、高温に対する応答は、マウス TRPV3 では G573S 変異、R567K 変異いずれによっても変化しないが、ラット TRPV1 の対応する G583S 変異、R557K 変異では応答の減弱が見られることを見出した。さらに、分子動力学シミュレーションにより、マウス TRPV3 に対し、メントールおよびカンファーが安定的に結合すること、R567F 変異でその結合が失われることを確認した。

以上、本研究は、TRPV1 および TRPV3 の野生型および変異体に対するメントールやカンファーの作用等を、*in vitro* 発現系を用いて電気生理学的に解析することにより、その作用の構造基盤を新規に同定し、さらに分子動力学シミュレーションによって知見を確認したものである。本研究は、学際的なアプローチにより生理学的に重要な意義を有する明確な新知見を得たものであり、審査委員会は、全会一致で、本論文が学位の授与に値すると判断した。