氏　　名	ひぐち　たいが **樋口　大河**
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	富医薬博甲第 162 号
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 24 日
学位授与の要件	富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当
教育部名	富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程 薬科学専攻
学位論文題目	PKD2L1 カチオンチャネルの活性化機構の分子生理学的研究
論文審査委員	
（主査）	教　授　　細谷　健一
（副査）	教　授　　水口　峰之
（副査）	教　授　　酒井　秀紀（指導教員）

論 文 内 容 の 要 旨

Transient Receptor Potential (TRP)ファミリータンパク質は、生体恒常性に寄与するイオン輸送だけでなく、環境因子をセンシングし、電気信号への変換を行うなど多機能性を示すイオンチャネルタンパク質である。TRP チャネルの活性化刺激は多岐に渡っており、温度、機械刺激、浸透圧、酸・塩基、酸化ストレスなど、様々な環境因子で活性化される。したがって、感覚制御の側面から TRP チャネルは格好の創薬ターゲットとして精力的に研究が進められている。また、TRP チャネル機能異常は多くの後天性疾患やがんの発生に関与することが報告されてきており、阻害剤あるいは刺激剤の有用性が大いに期待されている。

TRP Polycystin (TRPP)ファミリーに属する Polycystic Kidney Disease 2 like-1 (PKD2L1)は、さまざまな組織に発現することが報告されている。舌の味受容細胞において PKD2L1 が一部の酸味受容に関与する可能性が示唆されているが、他の組織における生理的役割の解明には至っていない。これまでに PKD2L1 は原形質膜で電位依存性カチオンチャネルとして機能することが報告されている。しかしながら、脱分極時に活性化する他の電位依存性 TRP チャネルと異なり、PKD2L1 チャネルは脱分極刺激ではほとんど活性化せず、再分極により著しい活性化を示す。したがって、PKD2L1 チャネルの生理機能の理解に向けて、このユニークな制御メカニズムを明らかにする必要がある。また PKD2L1 は pH 感受性を示すことが報告されているが、その制御メカニズムについては明らかとなっていない。そこで本研究では、PKD2L1 チャネルの活性制御メカニズムの解明を目的として研究を進め、以下の新知見を得た。

第一部　細胞外アルカリ化による PKD2L1 チャネル活性の二相性制御

PKD2L1 を外因的に発現させた Human Embryonic Kidney(HEK)293T 細胞に電気生理学的手法のパッチクランプ記録法を適用し、PKD2L1 チャネルの細胞外 pH 感受性について詳細に検討した。ホールセルレベルおよびシングルチャネルレベルでの記録において、PKD2L1 チャネル活性は pH 8～9 の細胞外溶液では亢進し、pH 10 の細胞外溶液では抑制されるというベル型の pH 依存性を示すことを明らかとした。シングルチャネル解析により、アルカリ化が PKD2L1 チャネルのシン

グルチャネルコンダクタンスではなく開確率を変動することで機能調節することが明らかとなった。また、PKD2L1 チャネルの電位依存性は pH 8〜9 の溶液により過分極方向へ、pH 10 の溶液により脱分極方向へシフトすることを見出した。興味深いことに、pH 10 による PKD2L1 チャネル活性抑制後の pH 低下により一過性の強い PKD2L1 チャネルの活性化(リバウンド活性化)が生じると共に、その電位依存性は大きく過分極側にシフトした。一方、細胞外溶液のアルカリ化により PKD2L1 チャネルのテール電流における脱活性化過程が亢進した。時定数解析の結果、PKD2L1 チャネルには閉状態、開状態、不活性化状態の 3 つのコンホメーションが存在すると考えられた。これらの結果から、PKD2L1 チャネルは細胞外アルカリ化により活性化するが、その後不活性化することが示唆された。つまり、PKD2L1 チャネルはアルカリ環境下で活性化と不活性化の 2 つの異なるメカニズムで調節されるものと考えられた。

第二部　温度による PKD2L1 チャネルのゲーティングの制御

TRP チャネルの電位依存性と温度受容が密接に関連することに着目し、電位依存性を示す PKD2L1 チャネルの温度感受性について検討した。PKD2L1 ホールセル電流は 20〜32℃までの温度上昇にともなって増大し、36℃では減少した。また PKD2L1 チャネル活性化の電位依存性は 32℃までは過分極方向に、36℃では脱分極方向にシフトした。したがって、PKD2L1 の温度による活性調節メカニズムは、これまでに報告されている温度感受性 TRP チャネルと同様であり、PKD2L1 チャネルにおいても電位依存性をシフトすることで温度感受性を示すことが示唆された。また熱刺激により PKD2L1 テール電流がより速く減衰した。シングルチャネル解析により PKD2L1 チャネルゲーティングにおける温度の効果について検討したところ、25℃から 40℃への温度上昇に伴い PKD2L1 チャネルの開確率は減少した。さらに持続時間解析により、40℃では 25℃よりも開口持続時間および閉口持続時間がともに短くなることが示された。興味深いことに高温から急激に温度を下降させると、シングルチャネルおよびホールセルレベルで著しい PKD2L1 チャネルの活性化が観測された。PKD2L1 の温度によるリバウンド活性化は、シングルチャネルコンダクタンスの変化ではなくチャネル開確率の亢進により生じることが明らかとなった。これらの結果から、PKD2L1 チャネルは熱刺激により閉状態から開状態へ、またその後すばやく不活性化状態へと移行すること、さらに熱刺激除去により不活性化状態から開状態への急速な遷移が生じることが示唆された。この熱刺激による状態変化が、PKD2L1 チャネルのリバウンド活性化に重要であることが明らかとなった。

第三部　PKD2L1 の不活性化機構における分子構造基盤

これまでに PKD2L1 チャネルが特徴的な不活性化状態を示すことが明らかになっているが、この不活性化機構についての詳細な研究はこれまで行われていなかった。本研究では、電位依存性カリウムチャネルの結晶構造を参考に PKD2L1 チャネルの構造機能解析を行った。電位依存性カリウムチャネルにおいては、2 種類の電位依存的不活性化、すなわち細胞内 N 末端がポアを閉塞する N-type 不活性化とポア周辺の局所的な構造変化が関与する C-type 不活性化が提唱されている。このカリウムチャネルの不活性化に関連する知見を基に、PKD2L1 チャネルの不活性化機構に関する構造基盤の探索を行った。

PKD2L1 チャネルの細胞内 N 末端を切断した変異体(2-90 番目のアミノ酸残基を削除したΔN)は、野生型(WT)と同様、脱分極時の外向き電流が小さく再分極により内向きテール電流を生じた。一方で推定上のポア外側領域に位置するアミノ酸残基の変異体(N531A/N533A)は WT と異なり、脱分極により大きな外向き電流を生じた。そこで、この PKD2L1 チャネル電流の変化にどちらのアミノ酸残基の変異が重要であるのかを検討した。N531Q 変異体では WT と類似した電流が観測されたが、N533Q 変異体においては脱分極時の外向き電流が増加した。この結果から、PKD2L1 の脱分極による不活性化には 533 番目のアスパラギン残基が重要であることが明らかとなった。次に、アルカリ化や熱による PKD2L1 チャネルの不活性化における 533 番目のアスパラギン残基の関与を検討した。その結果、WT、ΔN 変異体および N531Q 変異体では、pH 10 溶液による刺激の除去や 40℃からの温度低下によりリバウンド活性化が観察されたが、N533Q 変異体ではリバウンド活性化が生じなかった。これらの結果から、脱分極、アルカリ化、熱による PKD2L1 の不活性化機構には 533 番目のアスパラギン残基が共通して重要であることが示唆された。

PKD2L1 の発現系を用いた本研究において、他の TRP チャネルと同様に電位依存性を制御することにより、PKD2L1 チャネルが細胞外アルカリ化および熱刺激に対して感受性を示すことを見出した。また脱分極、アルカリ化、熱による PKD2L1 チャネルの制御には、不活性化状態への移行を介した PKD2L1 に特異的なゲーティングが関与すること、これら刺激による PKD2L1 チャネルの不活性化状態への移行が、刺激除去後のリバウンド活性化に必要不可欠であることを明らかにした。さらに、PKD2L1 チャネルの脱分極、アルカリ化、熱による不活性化に共通した構造基盤として、推定上のポア外側領域に位置する 533 番目のアスパラギン残基が関与することが示唆された。本研究は、チャネルの分子構造に着目した TRP 創薬研究の基盤となるものと考えられる。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

Transient Receptor Potential (TRP)ファミリータンパク質は、生体恒常性に寄与するイオン輸送だけでなく、環境因子をセンシングし、電気信号への変換を行うなど多機能性を示すイオンチャネルタンパク質である。TRPチャネルの活性化刺激は多岐に渡っており、温度、機械刺激、浸透圧、酸・塩基、酸化ストレスなど、様々な環境因子で活性化される。TRP Polycystin（TRPP）ファミリーに属するPolycystic Kidney Disease 2 like-1（PKD2L1）は、さまざまな組織に発現することが報告されている。舌の味受容細胞においてPKD2L1が一部の酸味受容に関与する可能性が示唆されているが、他の組織における生理的役割の解明には至っていない。また、PKD2L1はpH感受性を示すことが報告されているが、その制御メカニズムについては明らかとなっていない。

樋口大河君は、このような背景のもと、PKD2L1チャネルの活性制御メカニズムの解明を目的として、三部にわたる研究を行った。

第一部では、「細胞外アルカリ化によるPKD2L1チャネル活性の二相性制御」について解明するために、PKD2L1を外因的に発現させたHuman Embryonic Kidney（HEK）293T細胞に電気生理学的手法のパッチクランプ記録法を適用し、PKD2L1チャネルの細胞外pH感受性について詳細に検討した。興味深いことに、pH 10によるPKD2L1チャネル活性抑制後のpH低下により一過性の強いPKD2L1チャネルの活性化（リバウンド活性化）が生じると共に、その電位依存性は大きく過分極側にシフトした。一方、細胞外溶液のアルカリ化によりPKD2L1チャネルのテール電流における脱活性化過程が亢進した。時定数解析の結果、PKD2L1チャネルには閉状態、開状態、不活性化状態の3つのコンホメーションが存在することが見出された。不活性状態は、閉状態でも開状態でもない第三の状態で、チャネル開口に向けた待機状態であると考えられた。つまり、PKD2L1チャネルはアルカリ環境下で活性化と不活性化の2つの異なるメカニズムで調節されることが示唆された。

第二部では、「温度によるPKD2L1チャネルのゲーティングの制御」について解明するために、パッチクランプ法により、PKD2L1チャネルの温度感受性について検討した。PKD2L1テール電流は20～32℃までの温度上昇に伴い増大し、36℃では減少した。また、25℃から40℃へ加温するにつれてPKD2L1チャネルの開確率は減少した。さらに、開閉持続時間解析により、40℃では25℃よりも開口持続時間および閉口持続時間が共に減少することが示された。興味深いことに、40℃から急激に温度を下降させると、シングルチャネルおよびホールセルレベルで著しいPKD2L1チャネルの活性化が観測された。PKD2L1チャネルの熱刺激除去によるリバウンド活性化は、シングルチャネルコンダクタンスの変化ではなくチャネル開確率の亢進により生じることがわかった。これらの結果から、PKD2L1チャネルは温度によりゲーティングが制

御されることが示唆された。すなわち、PKD2L1チャネルは加温により活性化するが、直ちに不活性化し、この不活性化が熱刺激除去により惹起されるリバウンド活性化に必要不可欠であるものと考えられた。

第三部では、「PKD2L1の不活性化機構における分子構造基盤」を明らかにするために、PKD2L1チャネルの細胞内N末端を切断した変異体（2-90番目のアミノ酸残基を削除した⊿N）および推定上のポア外側領域に位置するアミノ酸残基の変異体（N531Q/N533Q）を作製し、PKD2L1チャネルの不活性化に重要なドメインの探索を行った。⊿N変異体は、野生型（WT）と同様、脱分極時の外向き電流は小さく再分極により内向きテール電流を生じたことから、脱分極時に不活性化することが示唆された。他方、N531Q変異体ではWTと類似した電流が観測されたが、N533Q変異体においては脱分極時の外向き電流が増大した。この結果から、PKD2L1の脱分極による不活性化には533番目のアスパラギン残基が重要であることが示唆された。また、WT、⊿N変異体およびN531Q変異体ではアルカリ刺激除去や40℃からの温度低下によりリバウンド活性化が観察されたが、N533Q変異体ではリバウンド活性化が生じなかった。これらの結果から、脱分極、アルカリ化、熱刺激によるPKD2L1の不活性化機構には共通して533番目のアスパラギン残基が重要であることが示唆された。

以上の樋口君の一連の研究成果は、アルカリ性の強い膵臓や、絶えず温度変化やpH変化に曝されている舌における新たな生理機能の解明に貢献できる可能性がある。また、今後のPKD2L1チャネル機能の全容解明に向けた重要な知見になるものと考えられ、チャネル研究分野への貢献度も大きいと考えられる。

樋口君の成果は、これまでに２報の国際誌に掲載されている。主査および副査は、樋口大河君の面接試験を行うとともに論文内容について審査を行い、博士（薬科学）の学位を授与するに値すると判定した。

1） Shimizu, T., Higuchi, T., Fujii, T., Nilius, B., and Sakai, H. (2011) Bimodal effect of alkalization on the polycystin transient receptor potential channel, PKD2L1. *Pflügers Arch.* **461:** 507-513.

2） Higuchi, T., Shimizu, T., Fujii, T., Nilius, B., and Sakai, H. (2014) Gating modulation by heat of the polycystin transient receptor potential channel PKD2L1 (TRPP3). *Pflügers Arch.* **466:** 1933-1940.