

氏 名（本籍）	ぬま ざき みつ こ 沼 崎 満 子（東 京 都）
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	博 甲 第 3516 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科
学 位 論 文 題 目	<b>Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin</b> (カルモジュリンによる TRPV1 の脱感作への構造機能協働の解析)
主 査	筑波大学教授 医学博士 吉 川 裕 之
副 査	筑波大学教授 医学博士 大 野 忠 雄
副 査	筑波大学教授 薬学博士 後 藤 勝 年
副 査	筑波大学教授 医学博士 吉 田 薫

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

### （目的）

カプサイシンに暴露された感覚神経終末はその後の侵害刺激に対して反応が低下することが知られており、これは発痛物質カプサイシンが鎮痛薬として用いられる主な理由である。カプサイシン受容体 TRPV1 はカプサイシン以外に、酸、43℃以上の熱という 3 つの侵害刺激に反応するイオンチャネル型受容体であり、痛み受容の中心的分子として注目されている。TRPV1 はカプサイシン投与により細胞外カルシウム依存的な活性化電流の減少（脱感作）を示し、この現象は先に述べた侵害刺激受容神経の反応性の低下を説明するメカニズムの 1 つと考えられている。しかし、その分子機構は不明である。Ca<sup>2+</sup> 結合蛋白であるカルモジュリン（CaM）は、Ca<sup>2+</sup> チャネルや NMDA チャネルといった他の Ca<sup>2+</sup> 透過性イオンチャネルにおいて Ca<sup>2+</sup> 依存性脱感作に関与することが報告されている。そこで、TRPV1 の脱感作における CaM の関与について検討した。

### （対象と方法）

CaM と TRPV1 の結合を生化学的手法により検討した。Myc タグをつけた CaM および TRPV1 を HEK293 細胞に強制発現し、その細胞膜分画を抗 TRPV1 抗体を用いて免疫沈降を行った。SDS-PAGE に展開後、抗 TRPV1 抗体および抗 Myc 抗体を用いてウエスタンブロッティング法により検出した。CaM 結合部位を同定するため、TRPV1 の細胞内ドメインおよび C 末端の 4 つの部位の GST 融合蛋白を作成し、*in vitro* binding assay を行った。ラットの脳 cDNA ライブラリーより PCR 法を用いて CaM の cDNA を取り出した。TRPV1 を強制発現した HEK293 細胞を用いて Ca<sup>2+</sup> キレーターである BAPTA あるいは CaM 阻害薬（W7, calmidazolium）の効果をパッチクランプにより検討した。CaM の Ca<sup>2+</sup> 結合部位である 4 つの EF hand に点変異をいれた変異体を PCR 法により作成し、TRPV1 とともに HEK293 細胞に強制発現させ、パッチクランプを行った。CaM 結合部位を欠損した TRPV1 の変異体を PCR 法により作成し、HEK293 細胞に強制発現させパッチクランプを行った。

## (結果)

免疫沈降法により CaM と TRPV1 の結合が観察された。さらに、TRPV1 に結合する CaM の量はカプサイシン刺激つまり脱感作時に増加した。*In vitro* binding assay により TRPV1 の CaM 結合部位(C 末 35 アミノ酸)を同定した。CaM の結合は  $\text{Ca}^{2+}$  に依存的であったが、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下においても観察された。TRPV1 を発現した HEK293 細胞におけるパッチクランプにおいて、BAPTA および CaM 阻害薬は TRPV1 の脱感作をいずれも抑制しなかった。また、CaM 変異体を強制発現した際も TRPV1 の脱感作に変化はなかった。同定した CaM 結合部位を欠損した TRPV1 の変異体では、野生型で観察される短時間カプサイシンの繰り返し投与による細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な脱感作がほぼ完全に抑制された。一方、長時間カプサイシン投与による脱感作は野生型に比べて有意に低下したものの完全には抑制されなかった。

## (考察)

今回の結果よりカプサイシン受容体 TRPV1 の細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な脱感作に CaM が関与することが明らかとなった。これはカプサイシンが鎮痛薬として使われる鎮痛の分子メカニズムの 1 つと考えられる。細胞内への過度の  $\text{Ca}^{2+}$  流入は細胞にとって有害であり、 $\text{Ca}^{2+}$  透過性チャネルに保存された安全機構として働いているのかもしれない。特に TRPV1 については生体に不可欠である痛み伝達系に関与する感覚神経の防御の意味からも早期の脱感作は重要である。CaM は  $\text{Ca}^{2+}$  結合蛋白であり、TRPV1 への結合も  $\text{Ca}^{2+}$  依存的であった。この結果は他のチャネルの報告と一致している。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$  非存在下においても結合が認められ、すでに TRPV1 に結合している CaM が、チャネルのポア付近で流入した  $\text{Ca}^{2+}$  と速やかに結合し脱感作を引き起こすことが示唆された。BAPTA や CaM 変異体が効果を持たなかった理由かもしれない。 $\text{Ca}^{2+}$  に依存しない CaM の結合は L type  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルにおいても報告がある。CaM 阻害薬が TRPV1 の脱感作を抑制しなかった理由については明らかではないが、これまでもパッチクランプを用いた実験でこれらの阻害薬が効果を持たなかったとの報告があることから、実験条件の問題かもしれない。あるいは、何らかの別の機構が TRPV1 の脱感作に関与する可能性も除外できない。CaM 結合部位を欠損した TRPV1 変異体を用いたパッチクランプの結果から脱感作の早期成分に CaM が関与することが判明した。遅い成分については PKA のリン酸化が関与すると言う報告や脱リン酸化酵素であるカルシニューリンが TRPV1 の脱感作を阻害するという報告があり、リン酸化脱リン酸化といった機構が働いているのかもしれない。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

カプサイシン受容体 TRPV1 はカプサイシン投与により細胞外カルシウム依存的な活性化電流の減少(脱感作)を示し、この現象は侵害刺激受容神経の反応性の低下を説明するメカニズムの 1 つと考えられてきたが、その分子機構は不明であった。この研究で、TRPV1 の細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な脱感作に CaM が関与することが明らかとなった。また、CaM 結合部位である 35 アミノ酸を同定した。この部位に作用し  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 複合体の結合を調整する薬剤の探索は、新たな機序を持つ鎮痛薬の開発に役立つ可能性を示すものといえる。

考察、結論は全て本研究の結果から導き出されており、論理的に計画された実験を行い、これまで未知の分子機構を解明した。独創性においても高く評価される論文である。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。