

氏名(本籍)	まる やま ゆう すけ 丸 山 雄 介 (千葉県)		
学位の種類	博 士 (神経科学)		
学位記番号	博 甲 第 4749 号		
学位授与年月日	平成 20 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	Three-dimensional reconstruction using transmission electron microscopy reveals a swollen, bell-shaped structure of transient receptor potential melastatin type 2 cation channel (透過型電子顕微鏡を用いた三次元再構成法によって明らかにされた, transient receptor potential melastatin type 2 陽イオンチャネルの膨れたベル形構造)		
主査	筑波大学教授	博士(医学)	梶 正 幸
副査	筑波大学教授	理学博士	久 野 節 二
副査	筑波大学講師	博士(理学)	先 崎 浩 次
副査	筑波大学教授	博士(理学)	入 江 賢 児

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

TRP (transient receptor potential) チャネルは、細胞膜に存在する陽イオンチャネルであり、温度、酸化ストレス、浸透圧、味、音など様々な刺激を感知する。TRP チャネルは、哺乳類で 30 種類近く発見されており、アミノ酸配列の相同性から 6 つのサブファミリーに分類される。細胞の分化、増殖などに重要な役割を果たす TRPM サブファミリーには、8 種類のチャネルが含まれ、なかでも TRPM2 は、酸化ストレスや温度変化を感受するカルシウムイオン透過性チャネルとして特に注目を集めている。TRPM2 は ADP-ribose (ADPR) によって活性化され、ADPR は TRPM2 分子内部の ADPR ホスファターゼドメイン (NUDT9-H ドメイン) に結合する。本研究では、TRPM2 の開閉機構を理解するために、NUDT9-H ドメインを含む TRPM2 分子全体の三次元構造を明らかにすることを目的とした。

(対象と方法)

FLAG タグを付けた TRPM2 を培養 HEK293 細胞で多量に発現させ、このチャネルが正常な機能を有することを蛍光色素による細胞内カルシウム濃度変化と電気生理学的測定のとおり方法により確かめた。次いで、界面活性剤で可溶化した TRPM2 を、抗 FLAG 抗体によるアフィニティー精製とゲルろ過クロマトグラフィーで精製し、SDS-PAGE とウェスタンブロットを行った。さらに精製した TRPM2 を用いて、native-PAGE および架橋実験により、何量体を形成するかを調べた。次に、この精製タンパク質を酢酸ウランで負染色して透過型電子顕微鏡で観察、撮影し、粒子解析法により三次元再構成を行った。

(結果)

FLAG タグ付き TRPM2 チャネルを発現させた HEK293 細胞にチャネル活性化因子である H_2O_2 を投与すると、カルシウムイオンが流入した。さらにこのチャネルが ADPR に反応して開くこと、TRPM2 に特徴的な電流-電圧の関係を保持していることを電気生理学的実験によって確認した。可溶化後に抗 FLAG 抗体によ

るアフィニティー精製とゲルろ過クロマトグラフィーで精製した TRPM2 蛋白質は、銀染色およびウェスタングロットで約 160kDa のバンドとして検出された。native-PAGE および架橋実験により調べた結果、TRPM2 は四量体であると推定された。この精製タンパク質を負染色し、透過型電子顕微鏡を用いて観察したところ、多くは角の丸い二等辺三角形か台形状であった。この精製 TRPM2 タンパク質に抗 FLAG 抗体を結合させ、電子顕微鏡で観察したところ、ベル形粒子の膨れた側への抗体結合が観察された。次いで、撮影されたタンパク質画像から単粒子解析法によって三次元再構成を行ったところ、分解能 2.8nm の再構成が得られた。この分子を頂上方向から見ると、角の丸い正方形の輪郭をしており、幅は 17nm、対角線の長さは 18nm であった。また、横方向から見ると、その高さは 25nm であった。詳細に構造を解析した結果、TRPM2 は、小さな半球形の細胞外領域と、大きく膨れた細胞内領域、その中間の膜貫通領域の 3 つのドメインに分けられた。膜貫通領域と細胞外領域は、密度の高い中心核が連続した外殻に囲まれた構造であり、細胞内領域は、巨大で隙間が多い複雑な構造であった。この細胞内領域から細胞質側に四角柱状に突き出た構造があった。断面を見ると、TRPM2 は全体的には、外殻と内殻からなる二層状の構造であった。

(考察)

精製した FLAG タグ付き TRPM2 チャンネルは、本来のチャンネルとしての性質をよく保持しており、生化学的解析から四量体であると推定された。透過型電子顕微鏡を用いた観察では、角の丸い二等辺三角形か台形状の粒子が観察され、抗 FLAG 抗体との結合実験から、ベルの下方にあたる膨れたドメインが細胞質側に位置すると考えられた。単粒子解析法には分解能 2.8nm の三次元再構成が得られ、幅が 17nm、高さが 25nm であった。TRPM2 は、小さな半球形の細胞外領域と、大きく膨れた細胞内領域、それらの間の膜貫通領域の 3 つのドメインに分けられる。細胞内領域から細胞質側に四角柱状に突き出た構造があり、抗 FLAG 抗体がこの近くに結合することから、この構造が NUDT9-H ドメインだと推定された。TRPM2 は外殻と内殻からなる二層状の構造を有しており、電位依存性ナトリウムチャンネルや IP_3 受容体と共通であった。

今回明らかにした TRPM2 の構造は、TRPC3 に次ぐ TRP チャンネルでの 2 番目の解析であり、特に TRPM サブファミリーでは最初の例である。TRPM2 と TRPC3 を比較すると、分子の大きさや全体の構造、すなわち小さくて密度の高い細胞外領域と膨れた複雑な細胞内領域を持つという点で 2 つのチャンネルは似ていたが、TRPM2 に特徴的な構造も明らかになった。第一に、TRPM2 は TRPC3 より複雑な構造を持ち、膨らんだ細胞質領域がより繊細な柱からできている。TRPM2 は複数のシグナルに対するセンサーとして働くため、その細胞質ドメインは、複数のシグナルを同時に受けるためのマルチリガンド結合部位になっているのであろう。この複雑な構造は、TRPM2 の長い N 末端領域が形成していると考えられ、TRPC3 とは異なる種類のリガンドに適応するために発達したと思われる。第二に、TRPM2 は、NUDT9-H ドメインと推定される、四角柱状の特徴的な出っ張りをその細胞質端に持つ。TRPC3 は、代わりに 4 つのフットボール形の構造を細胞質端に持ち、それらは IP_3 受容体との結合部位だと推定されている。従って、どちらの TRP チャンネルも、開閉の調節部位が細胞膜のイオンゲートから離れた分子の細胞質端に位置しており、大掛かりな立体構造変化が開閉を制御している可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

TRPM2 イオンチャンネル蛋白質を精製し、電子顕微鏡を用いてその三次元構造を世界に先駆けて解明した優れた研究である。得られた知見は新しく独自性のあるものであり、イオンチャンネルの構造と機能に関する新しい知見を与える。膜蛋白精製と構造決定という困難な実験を成し遂げた優れた学位論文研究であると評価することができる。

よって、著者は博士（神経科学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。