

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目

PHPIa/下痢症の原因となる新しい α_s 変異体の分子機構、
および
G 蛋白質共役受容体と G 蛋白質の 共役に関する解析

指導教官 藤田敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程内科学専攻

学生証番号 97392 榎田紀子

【はじめに】

進化を通じて多様性を共に獲得してきた G 蛋白質共役受容体と G 蛋白質は、ホルモン作用、循環調節、感覚・神経伝達、生体防御など多様な情報ネットワークに関与する。細胞膜受容体を介する情報伝達において、これら G 蛋白質系はキナーゼ系と双璧を成している。われわれは、2つの視点から G 蛋白質のシグナル伝達についての研究を進めた。(I)新しい「G 蛋白質病」を解析し、G 蛋白質の作用機構についての新しい知見を得た。(II)多様性をもった G 蛋白質と多様性をもった受容体の相互作用を網羅的に把握することを目標に、簡便な再構成法を確立した。以下に要約を示す。

(I) 偽性副甲状腺機能低下症 Ia 型/下痢症の原因となる新しい G_s 変異体の解析

細胞内情報伝達系において G 蛋白質はその本幹を担うため、G 蛋白質の異常の多くは致命的であり、G 蛋白質病の多くはまれな内分泌疾患などに限られる。偽性副甲状腺機能低下症 Ia 型は、機能喪失 (loss of function) 性の代表的 G 蛋白質病の 1 つである。G_s の 2 アレルの機能喪失は致死だが、1 アレルの喪失は PHPIa を呈し、G_s を介するホルモンの作用不全をきたす。ほとんどの変異で G_s 蛋白発現の消失が機能喪失を生じるが、G_s 蛋白質の発現がありながら機能喪失をきたす G_s 変異体が数例発見され、それらの解析は G 蛋白質の作用機構の解明に大きく寄与してきた。今回、PHPIa と下痢症 (幼少時期) を合併するロンドンの一家系で、グアニンヌクレオチド結合部位の 4 アミノ酸残基 (AVDT) が繰り返し配列をとる新しい G_s 変異体が発見された。この解析によって、本症候群の病態メカニズムが明らかとなるとともに、G_s の脱感作を制御するパルミチン酸化と、その疾患における意義について新たな知見が得られた。

【結果と考察】

生化学的検討 (GTPγS binding assay、steady state GTPase assay) を行う目的で、 α s-AVDT を Sf9 細胞より精製した。 α s-AVDT 蛋白は、(1) GDP の放出速度が少なくとも 30 倍に亢進していること、(2) GTP の加水分解が抑制されていることがわかった。この結果 GTP 結合型が蓄積し、受容体刺激なしでエフェクターを活性化できる、つまり constitutively active な蛋白と結論される。一方、グアニンヌクレオチド存在下で蛋白を反応させると、 α s-AVDT は α s-WT に比べ約 100 倍早く失活することから、不安定な蛋白であると考えられた。一方、遺伝的に G_s を欠損する cyc-細胞に α s-WT あるいは α s-AVDT を安定に発現させ、受容体刺激前後での cAMP 蓄積量を測定した。無刺激下では、 α s-AVDT 安定株は constitutive activity を示した。しかし、いったん受容体刺激を加えると、 α s-WT とは明らかに異なり、loss of function を呈した。 α s-AVDT 安定株での蛋白発現をみると、 α s-WT のそれと比べてごくわずかであった。

以上、 α s-AVDT は不安定な蛋白である結果 loss of function をきたし、全般的には PHPIa を呈すると考えられる。一方、もし constitutive activity が腸管特異的に増強されるならば、コレラと同様のメカニズムによって下痢を呈すると考えられる。もしそうであるのなら、そのメカニズムとして考えられるのは、(1) 腸管細胞特異的に α s-AVDT 蛋白の発現が亢進する可能性、(2) 腸管細胞特異的に α s-AVDT がエフェクターの存在する細胞膜に局在する可能性、が挙げられる。 α s-AVDT 蛋白発現は特異的に多いということはなく (1) の可能性は否定され、(2) の可能性について検討

した。

α_s -WT あるいは α_s -AVDT の局在を検討したところ、静止状態で不活性型の α_s -WT は細胞膜に局在していた。一方、 α_s -AVDT は活性型である結果、通常の細胞では脱パルミチン酸化による脱感作を受け細胞質に局在するのに対し、腸管細胞由来の IEC-6 では細胞膜に局在していた。それに一致して、エフェクターの活性の増大も観察された。腸管細胞で α_s -AVDT が細胞膜に局在する理由として、腸管細胞では脱パルミチン酸化が抑制されていると推定される。そこで、アデノウイルスベクターを用いて脱パルミチン酸化を制御するパルミチン酸エステラーゼを発現させたところ、細胞膜に局在していた α_s -AVDT は細胞質へ移行し、これに一致してエフェクターの活性化も低下した。

以上から、腸管細胞では脱パルミチン酸化が抑制されていることによって α_s -AVDT は活性型であるにもかかわらず細胞膜に局在すると考えられる。その結果 constitutive activity が増強され、下痢を呈すると推定される。

本解析の結果から以下の2点が考察される。

- (1) 細胞特異的に $G_s\alpha$ の脱感作を制御するパルミチン酸化
- (2) G_s 作用機構解明に役立つ新たな G_s 変異体を発見するためのポイント
 - (1) パルミチン酸化は細胞特異的に G_s の脱感作を制御する

受容体の脱感作は、持続的な刺激に対して細胞の反応を鈍化あるいは消失させるもっとも一般的なメカニズムである。GRKs(G protein coupled receptor kinases)や arrestin は受容体の脱感作に重要な役割を有している。一方、 G_s レベルでの脱感作も存在する。今回の研究により、パルミチン酸化による G_s の局在と脱感作の制御が、細胞特異的にコントロールされていることが明らかとなった。今後 G 蛋白質のパルミチン酸化は、心不全や高血圧といった脱感作の異常を原因とする心血管系の疾患に対する新たな治療のターゲットとなりうると考えられる。

- (2) G_s 作用機構解明に役立つ新たな G_s 変異体を発見するためのポイント

これまで、蛋白発現はありながら PHPIa を呈する変異体や、蛋白発現がなくとも in vitro translation によって機能蛋白を作成できる変異体の解析によって、 G_s の作用機構そのものが明らかとなってきた。 G_s の活性は GDP-GTP 交換反応と GTP の加水分解からなるサイクル(α_s サイクル)で制御されており、理論的には6つのステップそれぞれに異常を呈する変異体が存在するはずである。(1)受容体-G蛋白質の相互作用の障害、(2)不安定性、(3)GTP結合の障害、(4)G蛋白質-エフェクターの相互作用障害、(5)局在の異常、(6)異常な GTPase 亢進による不活化である。実際、これまで発

見されてきた蛋白発現のある Gs 変異体は、すべていずれかにマップされる。このマッピングによって、Gs 変異体がどこでどのように正常に機能できないかの理解が容易になる。さらに、それらを解析することによって、正常な G 蛋白質共役受容体-G 蛋白質-エフェクターの相互作用の分子メカニズムが明らかになっていくと考えられる。今後、示唆的な Gs 変異体を発見するためには、(1)PHPIa を呈しながらも Gs 蛋白発現が正常な症例、(2)PHPIa に加えて何らかの臨床所見を呈する症例に注目していくことが重要である。

(II) 簡便な再構成法による G 蛋白質 共役受容体と G 蛋白質の 共役性についての検討

多くの循環調節ホルモンは G 蛋白質 共役受容体を介して作用する。われわれが現在までに手にしている薬剤の約半分は G 蛋白 共役受容体をターゲットとしていることを考慮すると、受容体-G 蛋白質のシグナルの解明は非常に重要である。しかし、個々の受容体がどの G 蛋白質と 共役するかについては、必ずしも明らかになっていない。そこでわれわれは、受容体と G 蛋白質との共役を直接検討する簡便な再構成法を確立した。

再構成法を確立するため、G 蛋白質の精製と、受容体を発現させた細胞膜の調整から行った。Sf9 細胞に目的の α, β, γ ($\alpha_s, \alpha_i2, \alpha_{12}, \alpha_{13}, \alpha_q, \beta_{1\gamma 2}$ 等)をコードしたバキュロウイルスを感染させることにより蛋白を発現させた。 α_s 以外の G 蛋白質については、その細胞から細胞膜を調整し、適切な可溶化剤により可溶化後、何段階かのカラムにより大量に蛋白を精製した。 α_s に関しては細胞質より精製した。一方、受容体に関しては、目的の受容体をアデノ-デキストラン法を用いて COS-7 細胞に強発現させ、細胞膜を調整した。精製 G 蛋白質と調整細胞膜を適切なバッファーで再構成することにより、再構成法が成立していることを確認した。つまり、受容体と α, β, γ がそろってはじめて、アゴニスト刺激により G 蛋白質の活性化が認められた。

この方法を用いて、1つのアゴニストが複数の受容体を刺激し、さらには 1 つの受容体が複数の G 蛋白質と共役する、といったクロストークを解き明かす作業を現在進めているところである。一例として、心血管系における主要なカテコールアミン受容体である β_1 アドレナリン受容体と β_2 アドレナリン受容体と G 蛋白質との 共役性についての解析を行った。今後、哺乳類細胞での dominant negative 変異 G 蛋白質(プロトタイプ作成済み)を用いた検討と組み合わせることにより、受容体-G 蛋白質の 共役の解析や薬物のスクリーニングに幅広い応用が期待される。