

[別紙2]

## 審査の結果の要旨

氏名 榎田 紀子

本研究は、(1)偽性副甲状腺機能低下症 Ia (PHP-Ia)/下痢症の原因となる新しい  $\alpha s$  変異体の分子機構を解析し、また、(2)G蛋白質共役受容体とG蛋白質の共役の簡便な解析法を樹立しこれを応用することを目的に行われた。下記の結果を得ている。

1. PHP-Ia/下痢症の原因となる  $\alpha s$ -AVDT (GDP/GTP 結合部位の4残基 AVDT が繰り返し配列をとる新しい変異)を Sf9 細胞より精製し、生化学的解析を行った。その結果、(a)  $\alpha s$ -AVDT は GDP の放出速度が少なくとも 30 倍に亢進していること、(b) GTP の加水分解が軽度に抑制されていることを明らかにした。このため、 $\alpha s$ -AVDT は活性型変異体として機能する。一方で、 $\alpha s$ -AVDT は細胞内で主な GTP の存在下に  $\alpha s$ -WT に比べて約 100 倍速く失活する。すなわち、 $\alpha s$ -AVDT は活性型であるとともに不安定な蛋白質であることを明らかにした。

2. PHP-Ia は、1アレルの  $\alpha s$  の不活性化を原因とする疾患である。 $\alpha s$ -AVDT が不安定な蛋白質であることは、PHP-Ia という表現型を説明する。一方で、もし活性型変異であるという特性が腸管特異的に発揮されれば、コレラと同様なメカニズムによって下痢を呈すると考えられる。事実、 $\alpha s$ -AVDT は腸管細胞由来の細胞株で活性型である特性が特異的に増強された。

3. 静止状態で  $\alpha s$  は細胞膜に局在する。活性化すると細胞膜局在シグナルであるパルミチン酸化がはずれる(脱パルミチン酸化)ことによって細胞質へと移行する。 $G_s$  の潜在的な脱感作機構である。腸管細胞由来の細胞株では、 $\alpha s$ -AVDT が活性型であるにもかかわらず、脱パルミチン酸化が抑制されていることによって、細胞膜に局在し活性が特異的に亢進していた。この特徴は、アデノウイルスを用いてパルミチルエステラーゼを過剰発現することによって抑制された。

これらの結果から、 $\alpha s$ -AVDT による PHP-Ia/下痢症のメカニズムが明らかとなると

もに、 $\alpha_s$ の局在と活性を制御するパルミチン酸化が細胞特異的に制御されていることが明らかとなった。

4. G蛋白質共役受容体とG蛋白質、および、G蛋白質系に作用する薬物の多様性は拡大の一途をたどっている。しかし、どの受容体がどのG蛋白質を活性化するのかという基本的な課題(共役の特異性)はかならずしも明らかになっていない。そこで、受容体とG蛋白質の共役を直接検討する目的で簡便な再構成法を確立した。アデノウイルスを用いて任意の受容体を過剰発現した細胞膜に、SF9細胞より精製したG蛋白質 $\alpha$ 、 $\beta$   $\gamma$ サブユニットを再構成し、アゴニスト添加によるG蛋白質を活性化を検討するものである。

5. これを用い、一応用例として循環調節に重要な $\beta_1$ 、 $\beta_2$ アドレナリン受容体とG蛋白質の共役について検討した。現在のドグマは $\beta_1$ 受容体は $G_s$ のみに、一方 $\beta_2$ 受容体は $G_s$ と $G_i$ に共役するというものである。本検討によってリン酸化された $\beta_2$ 受容体が $G_i$ と共役するという現在の理論以外のメカニズムが作動している可能性が示唆された。

以上本論文は、(1)PHP-Ia/下痢症の原因となる $\alpha_s$ -AVDTの解析、(2)G蛋白質共役受容体とG蛋白質の共役の簡便な解析を、哺乳類細胞への遺伝子導入と精製G蛋白質を用いた生化学的検討を駆使して達成したものであり、学位の授与に値するものと認められる。