

論文の内容の要旨

論文題目 G蛋白質共役型受容体のC末端の役割-LTB4受容体の解析から

指導教官 三品昌美教授

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

機能生物学専攻

氏名 奥野利明

<目的>

G蛋白質共役型受容体の細胞内C末端部位、特に細胞膜直下のヘリックス8の機能を明らかにする

<背景>

G蛋白質共役型受容体は、7回細胞膜を通過する構造を持ち、細胞外からの刺激を細胞内に伝える機能を持つ。これらの受容体は、特に創薬のターゲットとして注目されているが、活性化や不活性化の分子機構や細胞内での輸送機構などに関しては、あまりよく分かっていない。最近、G蛋白質共役型受容体の一つであるロドプシンの結晶構造が明らかにされたが、この研究によって、細胞内C末端部位にヘリックス8と呼ばれる8番目のヘリックス構造が存在することが明らかになった。しかしながら、この構造の生物学的機能は、ほとんどわかっていない。筆者は、G蛋白質共役型受容体であるロイコトリエンB4 (LTB4)受容体のヘリックス8が、活性化された受容体の不活性化に必要であることを見いだした。この受容体の特異的なリガンドであるLTB4はアラキドン酸の代謝物であり、白血球の強力な活性化因子である。ノックアウトマウスの解析も複数のグループで進められ、*in vivo*で免疫反応や炎症反応に深く関わっていることが明らかにされている。

<方法>

複数のG蛋白質共役型受容体において、様々な細胞内C末端変異体をPCR法により作成した。野生型及び変異型LTB4受容体(BLT1)の発現ベクターを培養

細胞に形質転換し、LTB4 の結合実験、フローサイトメトリー、Cell-ELISA など細胞生物学的実験を行った。また、形質転換した細胞から膜画分を回収し、LTB4 や GTP γ S の結合実験など生化学的手法を用いた実験を行った。次に、恒常的に野生型または変異型 BLT1 を発現する細胞を樹立し、LTB4 依存的なシグナル伝達を解析した。さらにロドプシンの結晶構造から、BLT1 の推定立体構造を作成し、ヘリックス 8 の変異が受容体構造に与える影響について推論した。

<結果>

G 蛋白質共役型受容体である BLT1(高親和性 LTB4 受容体), BLT2 (低親和性 LTB4 受容体), PAFR (血小板活性化因子受容体)や CysLT1 (ロイコトリエン C4, D4 受容体)の細胞内 C 末端を欠損させた発現ベクターを構築した。HEK293 細胞に一過性発現させ、細胞表面での発現量をフローサイトメトリーで解析したところ、BLT2, PAFR, CysLT1 の細胞表面での発現量が野生型に比べて低下していた。BLT1 の C 末端変異では、細胞表面での発現量は変わらなかった。ところが野生型及び変異型 BLT1 を発現させ、LTB4 の結合実験を行ったところ、変異型 BLT1 が野生型に比べて極めて高い結合能を示した。フローサイトメトリー、ウエスタンブロット及び共焦点レーザー顕微鏡での解析の結果、細胞膜上での発現量は、変異体と野生型で顕著な違いがないことが分かった。また、Cell-ELISA 法を用いて、受容体刺激後の細胞内への受容体取り込みを観察した。刺激後の細胞内取り込みが起こりやすいことが知られている PAFR は、細胞表面の受容体量の顕著な減少が観察された。一方、変異型、野生型 BLT1 のいずれも、細胞表面上での受容体量の減少は、ほとんど認められなかった。また、これら受容体の G 蛋白質活性化能を観察するために膜画分を調製し、GTP γ S の結合実験を行ったところ、変異型 BLT1 も野生型と同様に GDP-GTP 交換反応を引き起こした。

次に GTP γ S 存在下での LTB4 結合実験を行った。野生型 BLT1 では GTP γ S の濃度依存的に LTB4 結合量の低下が観測されたが、変異型 BLT1 では、結合量の低下がほとんど見られなかった。Scatchard 解析を行ったところ、野生型 BLT1 は GTP γ S の存在によって高親和性から低親和性に変化した。変異型 BLT1 では低親和性への変化はきわめて弱いものであった。また変異型 BLT1 を発現する細胞において、LTB4 依存的な細胞内 Ca²⁺濃度や代謝活性の持続的上昇が観測された。さらにロドプシン結晶構造をもとに BLT1 の分子モデルを作成した。

その結果、両親媒性を持つヘリックス 8 の疎水性残基 (Val302, Leu304 及び Leu305) が細胞膜の内側に向けて配置しうることがわかった。

<考察>

BLT2, PAFR, CysLT1 の細胞表面での発現量が野生型に比べて低下していたことから、これらの分子においては、細胞内 C 末端が細胞表面での発現に必要であると考えられる。一方 BLT1 では、変異型 BLT1 が野生型に比べて極めて高い結合能を示した。細胞膜上での発現量は変異体と野生型で違いなく、細胞内への受容体取り込みも観測されなかった。膜画分を用いた LTB4 の結合実験の際に、GTP γ S を存在させると野生型 BLT1 は低親和性に変化した。一方、変異体は GTP γ S の影響が少なく、構造変化を起こしにくいことが推察された。LTB4 依存的なシグナル伝達を観察したところ、変異体は野生型に比べ、シャットダウンされにくいことが分かった。この結果は、変異型が活性化状態から不活化されにくいことを示唆し、先の結合実験の結果と合致すると考えられる。BLT1 の分子モデルの結果から、ヘリックス 8 が脂質 2 重膜の表面にそって存在し、両親媒性の疎水性アミノ酸が膜に係留されるように配置していると予想される。以上の変異体を用いた種々の実験結果、及び分子モデルの解析結果を合わせ、BLT1 のヘリックス 8 が、G 蛋白活性化後の低親和性構造への変化に重要な役割を果たしていると推測した。今後の検討課題として、他の G 蛋白共役型受容体におけるヘリックス 8 の機能の解明、受容体-G 蛋白複合体の立体構造の解明によってより詳細な BLT1 のヘリックス 8 の機能解明があげられる。