

審査の結果の要旨

氏名 奥野利明

本研究は、外界からの刺激を細胞内に伝える G 蛋白質共役型受容体の細胞内 C 末端の機能を明らかにするため、様々な変異型受容体を作成し、種々の生化学的、分子細胞生物学的解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

- 1、BLT2 (低親和性 LTB4 受容体), PAFR (血小板活性化因子)及び 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。野生型及び変異型受容体を 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結果、BLT2、PAFR 及び CysLT1 の細胞内 C 末端が細胞表面上での発現に関与することを示した。
- 2、BLT1 (高親和性 LTB4 受容体)の細胞内 C 末端変異では、細胞表面での発現量が変わらない一方、LTB4 の結合実験において変異型 BLT1 が野生型に比べて極めて高い LTB4 結合能を示した。この原因が、細胞膜上での受容体発現量や、受容体刺激後の細胞内への受容体取り込みによることでないことを示した。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すことを示した。
- 3、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 解析の結果、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するが、変異型 BLT1 では低親和性に変化しにくいことを示した。
- 4、野生型 BLT1 或いは変異型 BLT1 を定常的に発現する CHO 細胞を樹立し、LTB4 依存的なシグナル伝達を観察した結果、細胞内 Ca²⁺濃度や代謝活性の持続的上昇が観測され、細胞内 C 末端の変異によりシグナルがシャ

ットダウンされにくいことを示した。

- 5、G 蛋白質共役型受容体で唯一、結晶解析がなされているロドプシン構造をもとに BLT1 の 3 次元分子構造モデルを作成した結果、変異部位がヘリックス 8 と呼ばれるドメインであることや、このドメインの細胞膜への係留が受容体構造変化の起点となりうることを示した。

以上、本論文は G 蛋白質共役型受容体のヘリックス 8 が、受容体活性化後の低親和性構造への変化に関わることを、及びシグナルの OFF に関わることを明らかにした。本研究は、これまでほとんど未知であった G 蛋白質共役型受容体のヘリックス 8 の新たな機能を明らかにしたものであり、G 蛋白質共役型受容体—G 蛋白質複合体の活性化・不活性化の分子機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。