

論文の内容の要旨

論文題目 インスリン様増殖因子 2 型受容体と三量体 G 蛋白質との共役機構

氏名 村 山 芳 武

マウス線維芽細胞 Balb/c 3T3 細胞で、上皮細胞増殖因子 (EGF)と血小板由来増殖因子 (PDGF) を処理した後、インスリン様増殖因子 1 型(IGF- I)または 2 型(IGF- II)を処理すると、細胞の外から内へのカルシウム流入が起こることを、西本らは報告した。彼らはこのカルシウム流入が百日咳毒素 (PTX) 処理で抑制されることを見いだした。PTX 感受性はシグナルが三量体 G 蛋白質、特に Gi や Go という Gi 様蛋白質を介することを意味する。

一方、IGF- II 受容体 (IGF- II R) は 1987 年クローニングされ、一回膜貫通構造で、細胞内にチロシンキナーゼ活性化配列を持たないことが明らかとなった。IGF- II は、細胞内にチロシンキナーゼ活性化配列を持つインスリン受容体や IGF- I 受容体を介して増殖シグナルを伝えると考えられていた。さらに 1988 年クローニングされたマンノース 6-リン酸 (M6P) の受容体、カチオン非依存性 M6P 受容体 (CIMPR) との 99% のホモロジーが明らかとなった。CIMPR はゴルジで M6P を付加された蛋白質を認識、結合し、ライソゾームに運ぶ役割を持ち、それ自体のシグナル伝達能は認められていなかった。三量体 G 蛋白質共役受容体は一般に 7 回膜貫通構造と考えられていたため、IGF- I や IGF- II 刺激により、7 回膜貫通構造受容体に対するアゴニストが放出され、オートクリン因子のように働いて G 蛋白質を活性化している可能性を否定できなかった。

た。

そこで、本研究では、精製 IGF-II R と精製 Gi2 とをリン脂質膜に再構成し、IGF-II 刺激で Gi2 が活性化されることを示した。PTX 処理で IGF-II による Gi2 活性化は約 70%抑制された。IGF-II R が一般の G 蛋白質共役受容体と同様の様式で Gi2 と共役することを示唆する結果である。スズメバチ毒素マストパランが Gi 様蛋白質を活性化するという報告があった。そこで、疎水性残基の中に塩基性残基が散在する配列を IGF-II R の細胞内ドメインに探して、相当配列を合成した。結果、2410-2423 の 14 アミノ酸残基に相当する合成ペプチド (peptide14) が、*in vitro* で直接 Gi を特異的に活性化することを見いだした。当該ペプチドに対する抗体が、ペプチドレベルや再構成系での IGF-II R による Gi 活性化を容量依存性に抑制することを明らかにした。また peptide14 の種々の修飾ペプチドを合成、調べた結果、G 蛋白質活性化配列条件として、20 残基以内の領域で、(1) N 末側に少なくとも 2 つの塩基性残基 (B) が存在し、(2) C 末側が B-B-X-B または B-B-X-X-B (X は非塩基性残基) というモチーフが重要な役割を演じている可能性を見いだした。

この条件を満たす配列は多くの 7 回膜貫通型受容体に存在している。その中で、 β_2 -アドレナリン受容体 (β_2 AR) の第 3 細胞内ループ C 末側の 15 残基 (β III-2) に相当するペプチドが直接 Gs を活性化し、その N 末の RRSS が特に Gs 活性化に重要であることを示した。 β III-2 は β_2 AR の Ser²⁶² を含み、これは PKA でリン酸化されるセリンである。Gs 活性化の帰結としての A キナーゼ活性化により β III-2N 末の RRSS の 2 番目の S がリン酸化を受け、その結果、 β III-2 は Gs よりもむしろ Gi を活性化することになることも発見した。 β_2 AR の脱感作機構に重要な意味を持つと考えられる結果である。

IGF-II R 細胞内ドメインの Gi 活性化配列 14 残基を β_2 AR の Gs 活性化配列 15 残基で置換したキメラ IGF-II R を作成した。IGF-II 非刺激時にある程度の Gs 活性化能を示し、低濃度 IGF-II 処理で容量依存性の Gs 活性化を認めた。受容体の G 蛋白質活性化メカニズムを考える上で興味深い結果であった。

これまで IGF-II R と CIMPR が同一であるという多くの報告があるが、それらは蛋白質や DNA レベルでの形態的ホモロジーや、リガンドの結合様式や、抗体による認識であった。機能としての CIMPR と IGF-II R との同一性を確認するため、CIMPR 欠損細胞にヒト CIMPR を発現させ、M6P アフィニティカラムで精製した CIMPR と精製 Gi2 とをリポソームに再構成して、IGF-II 処理で Gi2 が活性化されることを明らかにした。機能としても CIMPR が IGF-II R と同じシグナル伝達機能を持つ受容体であることを示したのは本研究が最初である。また、ここで用いた CIMPR はヒト cDNA から直接発現させた蛋白質であるから、実際に一回膜貫通受容体が G 蛋白質と共役し得ることを証明したことになる。

各種細胞膜を用いて調べたところ、GTP γ S 存在で β -グルクロニダーゼ結合の親和性の低下が見

られず、CIMPR/IGF-II R が M6P 刺激では三量体 G 蛋白質と共役しないことが示唆された。M6P は CIMPR/IGF-II R に対する結合部位が IGF-II とは異なり、IGF-II 結合を抑制しない。ところが、CIMPR/IGF-II R-Gi リボソームで、M6P 存在で IGF-II の Gi 活性化が抑制されることが明らかになった。この実験結果は *in vivo* での CIMPR/IGF-II R のシグナル伝達機能に関する矛盾する結果を説明できる可能性がある。IGF-II が実際に CIMPR/IGF-II R に結合しているにも関わらず、細胞の代謝や増殖に対する何らのシグナル伝達能を発揮しないという報告がある。他方では、CIMPR/IGF-II R は IGF-II 結合後細胞内シグナルを惹起するという報告がある。IGF-II 処理で受容体シグナルが惹起されない理由の一つは、本研究から、内在性に CIMPR/IGF-II R に結合する M6P または M6P 含有蛋白質が抑制するためと考えられる。TGFβ₁ 前駆体やプロリフェリンが側鎖に M6P を持ち、高親和性に CIMPR/IGF-II R に結合するという報告がある。その後、白血病抑制因子 (LIF) が M6P を介して高親和性に CIMPR/IGF-II R に結合するという報告もあった。これらが、IGF-II の CIMPR/IGF-II R を介するシグナルに影響を及ぼす可能性が考えられる。この場合、M6P あるいは M6P 含有蛋白質の存在が単なる Gi 活性化抑制なのか、同時に他の G 蛋白質を活性化するのかを明らかにすることが今後の課題である。