

審査の結果の要旨

氏名 高橋 一彰

学位論文「チロシン硫酸化酵素の遺伝子導入による発芽型バキュロウイルス系での機能性ヒトケモカイン受容体タンパク質発現方法の開発」について審査した結果を報告する。

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、細胞膜を7回繰り返して貫通するという特徴的な共通構造を持っており、におい、光、ホルモン、脂質、アミノ酸、神経伝達物質などの刺激を細胞内に伝達する重要な膜タンパク質分子群である。また GPCR は疾患と関連している場合が多いことから、医薬品開発の標的として注目されている。さらに近年、疎水性アミノ酸領域を7回もつ GPCR 遺伝子をゲノム DNA や cDNA のデータベースから見出すことが可能になっているが、多くの GPCR はリガンドが未知であるオーファン受容体のままである。これらのことから GPCR の機能解析が強く求められているが、GPCR は疎水性が高く従来の発現系では機能的に発現しないことが多く、解析が遅れている。このため GPCR を活性が保持された状態で発現させるシステムの開発が必要とされている。バキュロウイルス発現系は、目的タンパク質を昆虫細胞内に大量に発現させる系として広く利用されているが、GPCR をはじめとする膜タンパク質のリコンビナントバキュロウイルスを昆虫細胞に感染させたときに、昆虫細胞から発芽したバキュロウイルス上にこれらの膜タンパク質が機能を保持して発現することが分かっている。本研究は、GPCR である CCR2b および CCR5 を発芽型バキュロウイルスに発現させ、そのときの CCR2b および CCR5 のチロシン硫酸化修飾について解析し、その修飾の欠損を補う発現方法を開発するものである。

本研究の前半では、ケモカイン受容体 CCR5 を発現した発芽型バキュロウイルスを抗原として、抗体の作製を試みている。CCR5 は免疫系細胞の遊走に関わっているほかに、HIV が免疫系細胞に感染する際に共受容体として利用して細胞内に入り込むことが知られており、CCR5 に対する抗体はその機能解析や AIDS 治療薬の開発に必要な不可欠である。本研究で作製された抗 CCR5 抗体は CCR5 の C 端領域を認識し、ウェスタンブロットや細胞膜の透過性を亢進させた細胞の FACS 解析に利用できることから、SDS による変性、未変性に関わらず CCR5 に反応し、広く利用できることが示された。また CCR5 の N 端領域を認識する抗体が作製されなかったことは、抗原として使用した発芽型バキュロウイルスに発現した CCR5 は、N 端領域の構造が哺乳類細胞に発現したものとは異なる可能性を示唆した。

本研究の後半では、発芽型バキュロウイルス上に発現した CCR5 および CCR2b の N 端領域の構造について検討を行っている。CCR5 に対する抗体反応により、発芽型バキュロウイルス上に発現した CCR5 の N 端領域の構造は、哺乳類細胞に発現した CCR5 と異なっていることが明らかとなった。また発芽型バキュロウイルス上に発現した CCR5 およ

び CCR2b は、そのリガンドである RANTES や MCP-1 と結合しないことが明らかとなり、その N 端領域に何らかの欠損があることが示された。しかしこの抗 CCR5 抗体に対する反応やリガンド結合活性の欠如は、チロシン硫酸化転移酵素 TPST-1 の共発現により回復することを発見した。つまり CCR5 および CCR2b を単独で発現させた場合には、N 端領域のチロシン残基が硫酸化修飾されていない状態であり、TPST-1 の共発現により簡便に硫酸化修飾された CCR5 や CCR2b が発現できることを明らかにした。これまでに CCR5 のチロシン硫酸化修飾は、CCR5 とリガンドとの結合に重要であることが報告されているだけでなく、CCR5 と HIV の結合にも重要であることが報告されている。本研究のチロシン硫酸化修飾法は TPST-1 の共発現の有無により CCR5 の硫酸化修飾の有無が大きく表れることから、硫酸化修飾にターゲットを絞った AIDS 治療薬のスクリーニングに与える影響は極めて大きいと考えられる。またこれまでにチロシン硫酸化修飾は多くの膜タンパク質で起こっていると考えられているものの、その機能が解明されたものは CCR5 や CCR2b などごく一部である。これは現在チロシン硫酸化修飾と膜タンパク質の機能を解明するために用いられている実験系が、チロシン残基をフェニルアラニンに改変する方法であるため、はじめに硫酸化修飾されるチロシン残基を同定する必要があることが原因と考えられる。一方、本法はチロシン残基の同定を必要とせず、膜タンパク質とチロシン硫酸化修飾を研究する上でも新たな実験方法となることが考えられる。

よって本論文は博士（学術）の学位請求論文として合格と認められる。