

## [課程—2]

### 審査の結果の要旨

氏名 廣田 信哲

本研究では、family 1GPCR に高度に共通するアミノ酸残基の変異体の一部が ER で処理されること、それらが薬理的シャペロンにて形質膜に移行すること、しかしそのシグナル伝達能についてはそれぞれの変異体により差があることを確認し、アミノ酸残基の変異によりおこる変化の違いについて検証した。

1) 本論文では、ヒト型血小板活性化因子 (PAF) 受容体を研究材料とし、ロドプシン型 GPCR の多くに保存されている 7 つの膜貫通領域 (TM1-TM7) 内アミノ酸のアラニンへの置換変異体 (L59A・D63A・M64A・F241A・F245A・C244A・P247A・D289A・P290A・Y293A) を作製した。その変異体を HeLa 細胞に発現させ、細胞膜表面への発現量をフローサイトメトリーで調べたところ、L59A, D63A, F245A, P247A を導入した細胞において変異体の細胞膜表面の発現が顕著に低下していることを見出した。以降の解析では、ロドプシンの結晶構造解析において TM1 内アスパラギン・TM7 内アラニンと水素結合を形成することが報告されている TM2 のアスパラギン酸の変異受容体 (D63A)、蛋白質を屈曲させる構造を持つ TM6 のプロリンの変異受容体 (P247A) に着目することとした。

2) この 2 つのアミノ酸残基の重要性は、他の GPCR (ヒト型ロイコトリエン B<sub>4</sub> 第二受容体・ヒト型 GPR43) の当該残基の変異体も形質膜発現が低下することで検証した。

3) 共焦点顕微鏡観察、グリコシダーゼ処理を行った後のウェスタンブロッティングにて変異体 (D63A, P247A) が ER に局在することを確認した。つまり、変異体は ER 排出されず、その多くが ERAD によって分解処理されていることが推察された。

4) ERAD 機構による速やかな分解処理の運命にある変異受容体は、量・質ともにこのままではアミノ酸残基の変異による影響を明らかにすることは困難である。そこで私は薬理的シャペロン (PAFR 特異的なリガンド) を利用した。変異体を発現させた HeLa 細胞に PAF 受容体のリガンド (アゴニストである methylcarbanyl [mc]-PAF またはアンタゴニストである Y-24180) を作用させたと、変異体の細胞膜表面への発現量が野生株と同等レベルまで上昇することを確認した。これは脂溶性リガンドが細胞内に入り、変異体と結合することにより、その立体構造を変化させ、その変化によって変異体が ERAD を回避し、細胞膜表面への発現が上昇したものと推察した。

5) 変異体の細胞膜表面発現までのタイムコースを観察したところ、Y-24180 添加 30 分後

より変異体の細胞膜表面への発現は認められ、6時間のうちに飽和状態となった。この時間経過は上記の推察を支持するものと考えられる。なお、薬理的シャペロン処理による変異受容体の ER 搬出亢進については、共焦点顕微鏡解析での膜局在、成熟糖鎖修飾の出現、ユビキチン化受容体の減少などからも検証した。

6) 薬理的シャペロン処理により細胞膜に移送した変異受容体について、機能解析としてリガンド刺激後の細胞内カルシウムイオン上昇を観察した。P247A 変異体については、PAF 濃度依存的に野生型受容体と同程度のカルシウムレスポンスを検出が確認されたが、D63A 変異体については、測定範囲の PAF 濃度でカルシウムレスポンスを検出することはできなかった。この結果は、D63A 変異体は構造上のダメージが大きく、リガンド結合性や G 蛋白質共役能の低下などの理由により、受容体としての機能を失っていることが推察された。

本研究では GPCR に共通するアミノ酸残基の変異体の及ぼす影響を薬理的シャペロンを用い、細胞膜表面への蛋白質発現を回復した上でシグナルを観察して明らかにした。技術上の問題で野生株と変異体間での結晶解析による構造比較が行われていない現状において新たなアプローチであり、学位の授与に値するものと考えられる。