

## 審査の結果の要旨

氏名 安田 大恭

本研究は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)が有する Helix 8 構造が小胞体での品質管理過程の通過、即ち小胞体搬出において重要であることを明らかにしたものである。本研究では、主にロイコトリエン B<sub>4</sub>第二受容体(BLT2)を用い、その Helix 8 変異体の細胞内局在解析や、特異的リガンドの変異 BLT2 に対する薬理的シャペロン作用の解析を試みることで下記の結果を得た。

1. BLT2 の Helix 8 欠損変異体(BLT2/ $\Delta$ H8)を作製し、形質膜における受容体の発現量を flow cytometry 解析した。その結果、BLT2 の野生型(BLT2/WT)に比べて BLT2/ $\Delta$ H8 の形質膜発現量は著しく低下していた。さらに、共焦点顕微鏡観察による細胞内局在解析やN型糖鎖特異的なグリコシダーゼを用いた修飾解析より、BLT2/ $\Delta$ H8 は小胞体に蓄積していることを明らかにした。
2. BLT2 以外にもドパミン 1 型受容体(D1R)やリゾフォスファチジン酸 2 型受容体(LPA2)の Helix 8 欠損変異体を作製し、これら変異 GPCR も野生型に比べて形質膜発現が有意に低下していること、並びに BLT2/ $\Delta$ H8 同様、小胞体に蓄積していることを確認した。
3. BLT2 の Helix 8 内点変異体を多数作製し、各変異体の形質膜発現量を解析した結果、Helix 8 内の疎水性アミノ酸残基のアラニン置換で受容体の形質膜発現量は、著しく低下することを見出した。
4. 細胞培養液中に BLT2 の合成リガンド、或は内因性リガンドを添加すると、BLT2/ $\Delta$ H8 の形質膜発現量は経時的、且つ、リガンド濃度依存的に増加した。これらリガンドが薬理的シャペロンとして働き、BLT2/ $\Delta$ H8 の形質膜輸送を促進したと推察した。
5. 薬理的シャペロンの作用で形質膜に発現させた BLT2/ $\Delta$ H8 は、BLT2/WT と同様、内因性アゴニストに対し、濃度依存的な細胞内カルシウム応答を起こした。

以上、本論文は Helix 8 を欠損させた BLT2 や D1R、LPA2 変異体の解析から、Helix 8 構造が受容体の小胞体搬出に重要であることを明らかにした。また、小胞体に蓄積した BLT2/ $\Delta$ H8 が特異的リガンドの薬理的シャペロン作用で形質膜に移送されたことから、Helix 8 が小胞体における BLT2 の立体構造の形成や維持に重要であることが推察された。さらに、これまで C 末端領域内に ER 搬出モチーフが同定されていた幾つかの GPCR において、それらが Helix 8 を構成するアミノ酸であることを見出し、こうした知見からも Helix 8 の小胞体搬出における重要性を示唆した。これまで Helix 8 はシグナル伝達における役割以外はほとんど知られていなかったが、本研究は GPCR の小胞体搬出における Helix 8 構造の新たな重要性を明らかにした。ある種の疾患が、Helix 8 構造の遺伝的変異で当該 GPCR が小胞体内蓄積することに起因する場合、薬理的シャペロンが治療法として有用である可能性を示唆することにもなり、学位の授与に値するものと考えられる。