

## 審査の結果の要旨

氏名 間中 勝則

本研究は、疾患の解析から、多様な機能を持つシグナル伝達系であるGPCRおよびGタンパク質の働きを明らかにするため、先天性の腎性尿崩症の症例において、原因遺伝子の一つであるvasopressin V2 受容体の遺伝子変異の確認を行い、変異タンパク質の機能解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. 部分腎性尿崩症の2症例からDNA塩基配列の解析の結果、2種類のV2受容体の変異が同定された。1種類はY128Sと言う変異で、完全な腎性尿崩症として既報の変異であったが、本研究では部分腎性尿崩症の表現型を示し、部分腎性尿崩症としての報告は初めてであった。もう一種類の変異は、新たな変異でS333delという3塩基1アミノ酸の欠失であった。
2. COS7に変異受容体をover expressionし、AVP刺激に対するcAMPの蓄積を測定し、機能解析を行った。同時に、2005年にFeldmanらによってNSAID(nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis) の原因として報告されたgain of functionの変異であるR137L、また同部位にも関わらずloss of functionの変異であるR137H、部分腎性尿崩症の表現型をとるS329Rについても同時に解析し比較した。cAMP assayの結果から、R137LはAVP刺激なしでも、wild typeのV2受容体と比較してベースの活性化が認められるgain of functionの変異であり、R137HはcAMPの蓄積が減弱しており最大限刺激してもwild typeのベースの活性化程度でありloss of functionの変異であることに合致する結果と考えられた。また、S333del、Y128S、S329RもcAMPの蓄積は減弱していたがAVP刺激によりある程度の蓄積は認められることからpartial loss of functionの変異であることに合致する結果と考えられた。
3. 変異受容体タンパク質の局在を免疫染色及びcell surface ELISAで確認したところ、wild typeと比較して、R137H、S333del、Y128S、S329Rの変異受容体は膜での発現量が低下していた。R137Lの変異受容体は、膜での発現量の低下は軽度であった。膜での発現量の低下の原因として、traffickingの問題またはinternalizationの問題の可能性を考えた。internalizationを阻害する、V2受容体の362x (362番以降の欠失) およびDominant Negative Dynaminを使い、膜の発現量に対するinternalizationの影響を確認した。R137LおよびR137Hでは膜での発現量が増加したが、S333del・Y128S・S329Rでは膜での発現量は増加を認めず、後者の3種類の変異はinternalizationの問題よりはtraffickingの問題があることが示唆された。
4. OPC3またはOPC4と言うシャペロン効果があるといわれている薬剤で変異受容体のtraffickingを補助したところ、免疫染色・Cell surface ELISAともに膜での受容体の発現量の増加を認めた。
5. OPC3およびOPC4で、変異受容体の膜の発現量が大幅に増加したため、発現量の増加

により機能低下を補うことが出来る可能性を考え、OPC3またはOPC4存在下でのcAMPの蓄積を確認した。Wild typeのV2受容体に対してはcAMPの蓄積を減弱させたのに対して、R137H・S333del・Y128S・S329Rでは膜の受容体の発現量増加の影響か、cAMPの蓄積は増加していた。即ち、wild typeの受容体に対してはinverse agonist作用を示し、loss of functionの変異受容体 ( R137H・S333del・Y128S・S329R ) に対してはagonist作用を示すという、受容体の状態によって異なる作用を示した。この結果は、protean agonismの一例と考えられた。

以上、本論文はヒトの部分腎性尿崩症から同定されたV2受容体の変異を同定し、その機能解析を行った。その結果、受容体の状態に応じてリガンドが働きを変え得ることを示した。

本研究はこれまでほとんど実例がなかったprotean agonismの一例を示している。今後の創薬においてもこのprotean agonismという概念は重要になると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。