

審査の結果の要旨

氏名 藤澤 興

本研究は有顎類の顎顔面の形態形成において上・下顎の領域決定を担うことが知られているエンドセリン A 型受容体の細胞内情報伝達機構を明らかにするため、エンドセリン A 型受容体遺伝子座に任意の遺伝子をノックインしたマウスを作成する系および培養細胞を用いてエンドセリン A 型受容体のサブタイプ特異的な役割の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. エンドセリン B 型受容体の第二、第三細胞質内ドメインおよび細胞質 C 末端をエンドセリン A 型受容体に置換したキメラ受容体をエンドセリン A 型受容体遺伝子座位ノックインしたマウスを作成し、顎顔面の骨格形態および遺伝子発現の解析を行った。その結果、エンドセリン A 型受容体の細胞質 C 末端は A 型受容体および B 型受容体のサブタイプ特異性を賦与する重要なドメインであり、エンドセリン A 型受容体の下流の情報伝達に必要であることが示された。
2. エンドセリン A 型受容体および B 型受容体の性質の違いを明らかにするため、両受容体が $G\alpha_{q/11}$ 下流のシグナル伝達経路を活性化しうるか、カルシウムイオンの細胞質内濃度上昇、MAPK ファミリーのリン酸化、SRE の転写活性を指標に比較したところ、両受容体間で優位な差は見られず、両受容体は $G\alpha_{q/11}$ を活性化しうることを示された。
3. リガンド (ET-1) 刺激後の受容体の細胞内動態を明らかにするため、エンドセリン A 型受容体、B 型受容体および B 型受容体の細胞質 C 末端を A 型受容体に置換したキメラ受容体 (以下 Cter) の C 末端に EGFP 遺伝子を融合させた遺伝子を用い、細胞膜表面のビオチン標識後、GFP 抗体で免疫沈降を行ない、総発現量および膜表面の発現量を定量化したところ、A 型受容体は ET-1 刺激後細胞質に取り込まれるが再度細胞膜表面にリサイクルされる一方で、B 型受容体はいったん細胞質に取り込まれるとリソソームで分解されることが示された。Cter は細胞膜表面へのリサイクルはされないもののリソソームでの分解は免れ、細胞質 C 末端が細胞質内での受容体の分解を制御していることが示唆された。

4. サブタイプ特異的な受容体の細胞内動態の機構を明らかにするため、ET-1 刺激による各受容体のリン酸化を比較したところ、B 型受容体でサブタイプ特異的なリン酸化が起こることが示された。B 型受容体の細胞質 C 末端のセリン残基をアラニン残基に置換することでリン酸化が起こりにくい変異体を作製したところ、上記で観察されたような B 型受容体の細胞膜表面の発現量の減少や受容体の分解が起こらなくなったことから、B 型受容体のリン酸化が受容体の分解を制御していることが示唆された。
5. ダイナミン阻害剤を用いてエンドセリン A 型受容体の細胞質内移行を阻害したところ、受容体の下流で活性化されるシグナル伝達（ERK のリン酸化および SRE の転写活性化、下顎特異的な遺伝子の発現誘導）が抑制されたことから、エンドセリン A 型受容体の細胞質内移行が下流のシグナル伝達に必要であることが示された。

以上、本論文はエンドセリン受容体のリガンド結合後の細胞内動態が受容体のサブタイプ特異性を担う重要な因子であることを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった顎顔面の上・下顎領域決定におけるエンドセリン A 型受容体の細胞内情報伝達機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。