

## 論文内容の要旨

### 論文題目

ヒトグアニル酸シクラーゼ B 受容体並びにその細胞外ドメインの大量生産と生化学的解析  
(Large-scale production and characterization of human guanylyl cyclase-B receptor and  
of the extracellular domain)

氏名 岡本 直樹

グアニル酸シクラーゼ B 受容体 (GC-B) はグアニル酸シクラーゼ (GCase) 受容体ファミリーに属する分子量約 120K の膜一回貫通型受容体である。GCase 受容体は細胞外にリガンド結合部位を、細胞内に ATP によって制御を受けるキナーゼ様ドメイン及び GCcase ドメインを持ち、ホモダイマーとして機能する。細胞外ドメイン (ECD) にリガンドが結合すると、細胞内の GCcase ドメインが活性化され、GTP を細胞内セカンドメッセンジャー cGMP へと変換する。

GCcase 受容体ファミリーのメンバーの内、GC-A と GC-B はナトリウム利尿ペプチド受容体としても知られている (図 1)。GC-B は軟骨、血管内皮細胞、脳、肺、子宮など広範な組織で発現しており、C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) が結合することによって軟骨形成、血管平滑筋細胞弛緩や線維芽細胞増殖抑制などの生理活性が引き起こされる。

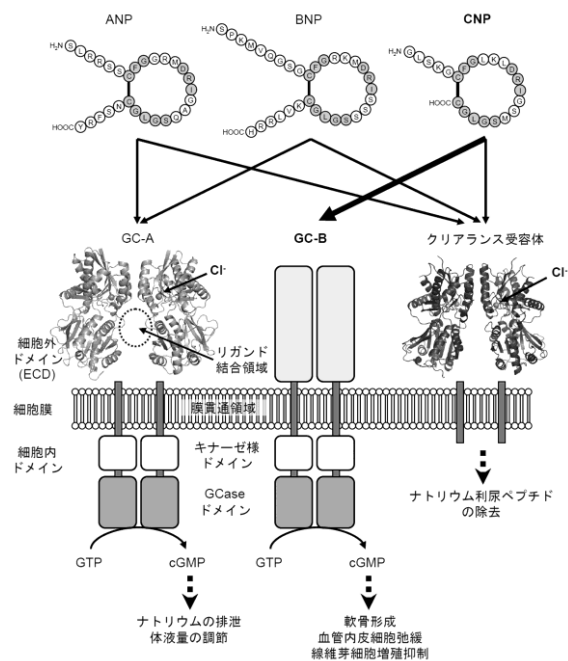


図 1 ナトリウム利尿ペプチドの受容体選択性



10  $\mu\text{M}$  以上であり、期待通り CNP が GC-B の GCCase 活性を最も活性化した。GC-B に対する ANP の  $\text{IC}_{50}$  は CNP の 20~40 倍程度であるのに対し (表 1)、GC-A に対する CNP の  $\text{IC}_{50}$  は ANP の 300 倍以上であると

リガンド	$\text{IC}_{50}$ (nM)		$\text{EC}_{50}$ (nM)
	ECD	全長	全長
ANP	280 $\pm$ 27	59 $\pm$ 9.5	>10,000
BNP	760 $\pm$ 63	110 $\pm$ 11	>10,000
CNP	7.5 $\pm$ 0.7	2.9 $\pm$ 0.5	78 $\pm$ 15

表 1 GC-B に対する各リガンドの  $\text{IC}_{50}$  と  $\text{EC}_{50}$

の報告がある。すなわち、GC-A は ANP と BNP に存在し CNP には存在しない C 末端尾部 (図 1) を結合に利用することで CNP を排除していると考えられる。一方、GC-B ではナトリウム利尿ペプチドに C 末端尾部が存在すると阻害されるような構造変化を GCCase 活性の発現のために必要とすることで、ANP と BNP を排除していると考えられる。さらに、GC-A ECD の結晶構造解析から、ANP 結合によって引き起こされる単量体自体の構造変化は小さく、二量体の位置関係が変わることが見出されている。したがって、GC-A と GC-B では二量体インターフェイスが異なっていることがリガンド選択性の本質であると考えられる。

GC-A において Asp71, Trp74, Phe96, His99 は二量体化及び GCCase 活性の制御に関与することが示されているが、Trp74 以外は GC-B と共通である。ヒト GC-B では Trp74 は Leu67 に相当し、この Leu は全ての GC-B で保存されている (図 3)。GC-B ECD の Leu67 を Trp に替えた変異体では、CNP 結合活性が野生型の 7.4% にまで低下していた。このことは、GC-B は GC-A とは異なる二量体インターフェイスを持っていることを示唆している。

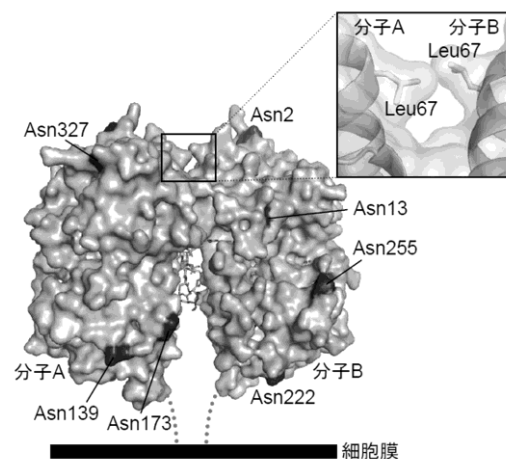


図 3 GC-B ECD ダイマーのホモロジーモデル (CNP 結合型) 二量体化部位における Leu67 の相互作用様式及び糖鎖修飾されると予想される Asn 残基を示す。

また、CNP-RR と CNP-QR に対する精製 ECD の  $\text{IC}_{50}$  を測定したところ、それぞれ 60, 160 nM であった。すなわち、CNP-RR, CNP-QR に対する精製 ECD の親和性は、それぞれ野生型の 13%, 4.7% にまで低下したことになる。CNP の Lys10 を Arg に替えた変異体に対する GC-B の GCCase 活性は、野生型の約 70% であったという報告を考慮すると、このことは、CNP の Lys4 が GC-B との結合に関与することを示唆するものである。

次に、Cl<sup>-</sup>濃度が CNP 結合活性に与える影響について解析した。結晶構造解析から GC-A ECD には Cl<sup>-</sup>結合サイトが存在し (図 1)、Cl<sup>-</sup>濃度依存的に ANP 結合活性を変化させることが明らかにされている。GC-A において Cl<sup>-</sup>結合サイトを形成するアミノ酸残基は GC-B でも高度に保存されている。実際、精製 ECD の CNP 結合活性は Cl<sup>-</sup>濃度依存的に増加した ( $\text{EC}_{50} = 5.2 \text{ mM}$ )。さらに、GC-B において Cl<sup>-</sup>結合サイトを形成すると予想されるアミノ酸残基の内、Ser47 を Ala, Thr, Asp に変えた変異体では、CNP 結合活性が野生型に比べてそれぞれ 3.2, 57, 92% にまで低下した。

続いて、CNP 結合活性に果たす糖鎖の役割を調べた。精製 ECD を PNGase F 処理したところ、37°C では変性処理した ECD を用いた場合と同様の切断パターンを示し、糖鎖が完全に除去された産物が主に得られたが (図 4A, 矢尻)、CNP 結合活性はほぼ完全に失われていた。一方、sialidase A 処理したところ、分子量 60~70K と、未処理の ECD に比べて均質な試料が得られ、CNP 結合活性はほぼ完全に保たれていた。すなわち、GC-B において糖鎖は CNP 結合あるいは ECD の構造安定化に寄与することが示唆された。

そこで CNP 存在下で精製 ECD を PNGase F 処理した。SDS-PAGE の結果、6 本の明瞭なバンドが検出されたことから (図 4B)、ECD には少なくとも 5 か所の糖鎖修飾部位があり、CNP が結合することで、それら全ての糖鎖の PNGase F による切断が阻害されることがわかった。また、この産物の CNP 結合活性は

完全に保たれていたことから、ECD の CNP 結合活性には少なくとも 1 つの糖鎖修飾が必須であると考えられる。実際に、GC-B において潜在的な糖鎖修飾部位の Asn に変異を入れた結果、唯一 Asn2 の糖鎖修飾が構造の安定化に重要であるとの報告がある。

GC-A の結晶構造を鋳型に作製した GC-B のホモロジーモデル (図 3) において、Asn2 は ECD の二量体化部位の近くにあり、その周辺には Arg や Asp (二量体化に関与すると予想される Asp64 を含む) などの電荷を持つアミノ酸残基が複数存在している。Asn2 に結合している糖鎖はそれらのアミノ酸残基が正しく相互作用するようにガイドすることで、二量体化の安定化に寄与しているのかもしれない。一方、完全に脱糖鎖した GC-A は ANP 結合活性を保っていたという報告がある。以上のことから、GC-A と GC-B では糖鎖の果たす役割は異なっており、GC-B において糖鎖は ECD 二量体の構造安定化に寄与していることが示唆された。

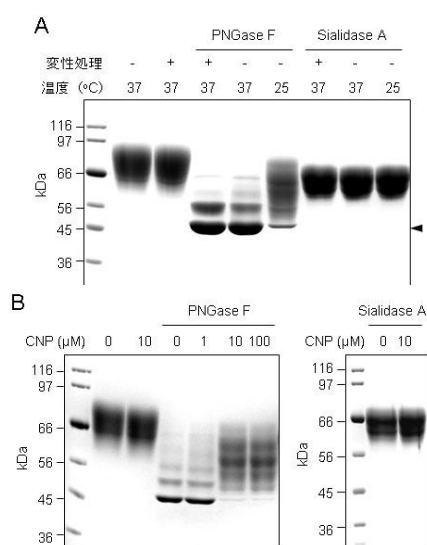


図4 精製 ECD の糖鎖切断実験  
(A) グリコシダーゼ処理 (24 時間) による精製 ECD の糖鎖切断パターン  
(B) CNP 存在下でのグリコシダーゼ処理 (24 時間、37°C) による精製 ECD (10 μM) の糖鎖切断パターン