

氏名	やまぐちともひろ 山 口 知 宏
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	論 理 博 第 1445 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	リガンド依存的なエンドセリンB型受容体とカベオリン-1の相互作用研究

論文調査委員 (主査) 教授 藤吉好則 教授 七田芳則 教授 森 和 俊

### 論 文 内 容 の 要 旨

エンドセリン受容体 (ETR) はGタンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、リガンドに対する解離定数は極めて小さく、また複数の三量体Gタンパク質を介して様々なシグナル伝達経路を活性化できる。従ってETRにとってシグナル伝達の終息機構および伝達経路の選択機構が重要であると考えられる。また、ETRは細胞内輸送機構についてはよく研究されているが、細胞表面での局在について詳しい報告はほとんど無い。

GPCR等のシグナル伝達タンパク質の細胞表面局在に関与する機構としてカベオラが知られている。このカベオラの主要な構造タンパク質はカベオリンであり、足場ドメインと命名されたドメインで様々なシグナル伝達タンパク質と相互作用し、その活性を制御する。エンドセリン受容体A型 (ET<sub>A</sub>R) はリガンド非依存的にカベオリン-1と複合体を形成し、カベオラに局在することが示されている。また、ET<sub>A</sub>Rは血管平滑筋細胞に、エンドセリン受容体B型 (ET<sub>B</sub>R) は血管内皮細胞に主に発現しているが、これらは共にカベオリンが豊富に発現している細胞であることから、カベオリンがETRによるシグナル伝達に関与していると考えられる。従ってET<sub>B</sub>Rとカベオリン-1との相互作用と、受容体の局在変化、およびそれらがシグナル伝達において果たす役割についての研究を行った。

ET<sub>B</sub>Rがカベオリン-1に介在分子なしに直接結合することによって複合体を形成し、ET-1の結合によってこの複合体は解離することが明らかになった。ET<sub>B</sub>R側の相互作用部位は同定できなかったが、カベオリン-1がその立体構造を識別していることが示唆され、一方カベオリン-1側については足場ドメインとC末細胞内ドメインであることが判明した。

また細胞分画法による実験では、カベオリン-1の発現によってET<sub>B</sub>Rが部分的にカベオラに局在し、ET-1の添加によってET<sub>B</sub>Rがカベオラ外に移動する現象が観察された。カベオラ構造を変性させると、ET<sub>B</sub>Rによるシグナル伝達が阻害された。これらの結果から、ET<sub>B</sub>Rのカベオラ局在のモデルを提案し、ET<sub>B</sub>Rとカベオリン-1の相互作用がそのシグナル伝達を制御する可能性を示した。

GPCRによるシグナル伝達において、三量体Gタンパク質活性化の分子機構は、構造学的には明らかになっていない。その解明のためにはGPCR-Gタンパク質複合体の立体構造を解く必要がある。GPCRとGタンパク質複合体の構造解析には、二次元結晶を用いた電子線構造解析が有効であると考えられるが、二次元結晶の作製には膜タンパク質を可溶化し、精製した膜タンパク質を脂質二重膜へ効率よく再構成する必要がある。また、リガンド結合型ET<sub>B</sub>Rと三量体Gタンパク質 (G<sub>i</sub>) 複合体の二次元結晶化にはこの複合体の単離・精製が必要である。ET<sub>B</sub>Rの脂質二重膜への再構成条件評価システムを確立し、リガンド結合型ET<sub>B</sub>R-G<sub>i</sub>複合体の定量的な単離を可能にする条件を求めた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は膜を介するシグナル伝達の中心をなす膜タンパク質であり、創薬研究の中心をなしている。血圧の制御をするホルモンとして発見されたエンドセリン (ET) の受容体であるエンドセリン受容体 (ETR)

は、リガンド結合能が極めて高く、複数の三量体Gタンパク質、Gi, Gq, Gs, Go等を活性化できる。従ってETRにとって、シグナル伝達を止める機構と伝達経路の選択機構は極めて重要である。GPCRが内在化されることによってシグナルの伝達を止める機構は知られているが、内在化のみで速くシグナル伝達を制御できるかは疑問視されている。シグナル伝達に関わる分子を求めるこれまでの研究では、複数のGタンパク質、中でも反対の動きをするGタンパク質を両方とも活性化する結果になっている。それ故、細胞における実際のシグナル伝達の研究が必須である。

申請者は、ETRのシグナル伝達機構、特にエンドセリン受容体B型 (ET<sub>B</sub>R) のカベオラでの局在機構を研究して、ET<sub>B</sub>Rがエンドセリン受容体A型 (ET<sub>A</sub>R) とは異なり、リガンド依存的にその局在を変える機構を発見した。

カベオラを構成する主要なタンパク質としてカベオリンが知られている。リガンド (例えばET-1) が、ET<sub>B</sub>Rに結合する前は、このカベオリンと直接相互作用して共局在しているが、ET<sub>B</sub>RにET-1が結合するとカベオリンとET<sub>B</sub>Rの相互作用が弱くなること、さらには、ET<sub>B</sub>Rがカベオリンの足場ドメインおよびC末細胞内ドメインと直接相互作用していることを明確に示した。異なるアンタゴニストの影響についても研究を進め、基底状態の構造を安定化するインバーサゴニストである、RES-701-1の結合では、カベオリンとの相互作用は変化しないが、BQ788では相互作用が顕著に弱まることを示した。このことから、ET<sub>B</sub>Rの構造によってカベオリンとの相互作用が制御されていることを示唆した。また細胞分画法による実験により、カベオリン-1の発現によってET<sub>B</sub>Rが部分的にカベオラに局在し、ET-1の添加によってET<sub>B</sub>Rがカベオラ外に移動する現象を観察確認した。さらに、カベオラ構造を変性させると、ET<sub>B</sub>Rによるシグナル伝達が阻害されることも証明した。カベオラには様々なシグナル伝達分子が局在していることが知られている。例えば、Gqはカベオラに局在していることが知られている。これらの事実と今回の実験結果から、申請者は、ET<sub>B</sub>Rのカベオラ局在のモデルを提案した。すなわち、リガンドが結合する前にはET<sub>B</sub>Rとカベオリン-1の相互作用によって、ET<sub>B</sub>Rがカベオラにおいて効率よくGqを活性化して、カルシウム濃度を上昇させるように働き、その直後にはその場から離れることによって、そのシグナル伝達を止める機構モデルを提案した。

申請者は、カベオリンが豊富に発現している血管内皮細胞において、ET<sub>B</sub>RがカベオラでGタンパク質の活性化制御を行う分子機構の一部を解明した。GPCRによるシグナル伝達制御は重要であり、本研究は、そのシグナル伝達機構の一部を解明した注目すべき成果である。以上の審査結果を総合して、本論文が理学博士の学位取得に十分な内容を持つものと結論した。なお、論文内容とそれに関連した試問の結果、合格と認めた。