

| | |
|----------|--|
| 氏名 | しま だ よし み 島 田 良 美 |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (農 学) |
| 学位記番号 | 論 農 博 第 2352 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 13 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 | Analysis and Application of Ligand Binding Mechanism of Receptor Proteins (受容体タンパク質のリガンド結合機構の解析と応用) |
| 論文調査委員 | (主 査) 教授 熊谷英彦 教授 佐々木隆造 教授 清水 昌 |

論 文 内 容 の 要 旨

受容体タンパク質は、あらゆる生物において細胞接着やシグナル伝達など、生体の恒常性を維持するために不可欠な分子である。本論文は、フィブロネクチンの細胞接着モチーフ Arg-Gly-Asp (RGD) 配列の受容体結合機構の解析とその応用に関する研究、並びに代謝型グルタミン酸受容体のリガンド結合機構に関する研究を取りまとめたものであり、その内容は以下のように要約できる。

1. 細胞接着モチーフ RGD 配列の受容体結合機構の解析と同モチーフを二ヶ所に有するリゾチームの作製

フィブロネクチンの細胞接着活性を担うモチーフ、RGD 配列は、受容体インテグリンに認識される。その機構を解明するため、ヒトリゾチーム分子内の α -ヘリックス、 β -シート、 β -ターン、折り返し様構造のそれぞれの領域にアミノ酸置換により、RGD 配列を導入し、これら 4 種類の変異体をそれぞれ酵母細胞で発現させた。その中で、 β -ターン構造に RGD 配列を導入した変異体 (47RGD4) のみがリゾチーム溶菌活性を保った状態で分泌発現され、その細胞接着活性は以前にループ部分に RGD 配列を挿入した場合 (74Val と 75Asn の間、74RGD4) と同等であった。そこで、その応用研究としてこれら二種類の変異、47RGD4 及び 74RGD4 を一分子内に持つ変異体を作製した。この変異体はリゾチーム溶菌活性を保持したまま分泌発現され、細胞接着活性は相加的に増強されていた。

2. RGD 配列を導入したインテグリン特異的な組織型プラスミノゲン活性化因子の作製

組織型プラスミノゲン活性化因子 (tPA) に血小板上のインテグリン α IIb β 3 への結合を介した高い血栓特異的結合性を賦与することを目的として、RGD 配列を導入する研究を行った。即ち、tPA 分子表面でかつ活性中心から離れているループ部位 (148位及び344位) またはリンカー部位 (175位及び270位) を選び、RGD 配列を導入し、変異体を COS-1 細胞で発現させた。これらを精製後、血栓溶解活性を測定した結果、148位、175位、344位での変異体が、野生型 tPA と同等の溶解活性を示した。また、インテグリン α IIb β 3 に対する結合活性を測定したところ、148位、270位での変異体が RGD 特異的な結合能を有していた。そこで、これら両変異体について、インテグリン α IIb β 3 に結合させた状態での血栓溶解活性を測定した。その結果、148位変異体のみが遊離状態と同程度の血栓溶解活性を示すことを確認した。

3. 代謝型グルタミン酸受容体細胞外領域部分の発現とそのリガンド結合能

代謝型グルタミン酸受容体サブタイプ 1 (mGluR1) の細胞外全領域を含む変異体 mGluR113 を昆虫細胞で発現させ、その培養上清から可溶性 mGluR113 を精製した。そして、mGluR1 に対するアゴニストである [3 H]-キスカル酸を用いてこの変異体の結合活性を測定した。その結果、野生型の同受容体と同等の結合活性を認め、mGluR1 の特異的なリガンド結合には細胞外領域のみで十分であることを明らかにした。

4. 代謝型グルタミン酸受容体細胞外領域ドメイン部分の発現とそのリガンド結合能

先に得た可溶性 mGluR113 をプロテアーゼで限定分解し、ロイシン、イソロイシン、バリン結合タンパク質 (LIVBP) 相同領域と、それに続くシステインリッチ領域の 2 つのドメインに分離した。さらに、LIVBP 相同領域のみを含む変異体 mGluR114 を昆虫細胞で発現させ、単一タンパク質になるまで精製した。そして、mGluR114 が、野生型受容体や

mGluR113と同等のアゴニスト結合活性を有することを認めた。即ち、LIVBP 相同ドメイン領域のみでも特異的なリガンド結合が起こることを確認した。

論文審査の結果の要旨

本論文の著者は、生体内受容体タンパク質の分子認識機構を解析し、さらにその結果を研究・臨床両面において活用することを意図したタンパク質工学的研究を行った。

評価すべき主な点は以下のとおりである。

1. 細胞接着は、多細胞組織の形成、維持に必須であり、再生、炎症、腫瘍転移などに重要な役割を果たしている。フィブロネクチンの細胞接着部位である Arg-Gly-Asp (RGD) 配列は、他の細胞接着に関与するタンパク質にも存在し、受容体である細胞側のインテグリンに認識される。著者は、このような RGD 配列をリゾチーム分子に挿入し、受容体による認識に必須の立体的構造を明らかにした。さらにリゾチーム分子の二ヶ所に同配列を導入し、リゾチームの溶菌活性を保持したまま、細胞接着活性を相加的に賦与することに成功した。この分子は、RGD 配列を認識する細胞間の架橋剤としての応用が期待できる。
2. 組織型プラスミノゲン活性化因子 (tPA) に RGD 配列を導入することにより、tPA 本来のフィブリン親和性に加え、高い血栓特異的結合能を賦与することに成功した。この tPA 分子は改良型血栓溶解剤の開発に役立つものである。
3. 興奮性シナプス神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体には、イオンチャンネル型と代謝型が存在する。代謝型グルタミン酸受容体は7回膜貫通型で G タンパク質と共役しており、アミノ酸配列の相同性、共役する細胞内シグナル、発現部位、アゴニストの選択性などに基づいて、8つのサブタイプに分類される。これまでサブタイプ特異的なアゴニスト、アンタゴニストは発見されておらず、研究及び臨床の見地から、その早急な開発が求められているが、このためにはリガンド結合部位とその結合様式を精密に解明する必要がある。著者はこのうちのサブタイプ1 (mGluR1) の細胞外領域を昆虫細胞で発現させ、単一タンパク質に精製した。この可溶性 mGluR1 は野生型受容体と同等の選択性と結合活性を持っており、これにより受容体機能領域の確認と抽出に成功したことになる。
4. この可溶性 mGluR1 をプロテアーゼで限定分解し、ロイシン、イソロイシン、バリン結合タンパク質 (LIVBP) 相同領域とシステインリッチ領域とは構造的に分離できることを明らかにした。そして、LIVBP 相同領域のみを昆虫細胞で発現させ、単一タンパク質まで精製した。その結果、同領域のみでも野生型受容体と同等の結合活性があることを発見した。このようにして得られた可溶性 mGluR1 の機能部分は、リガンド結合部位の三次元構造解明と受容体を介する情報伝達機構解析のための有力な研究材料となる。

以上のように、本論文は、受容体とリガンドとの結合機構を分子レベルで精密に解析し、その結果の応用研究を行ったものであり、得られた新知見は構造生物学、生体情報応答学及びそれらの応用分野に寄与するところが大きい。

よって本論文は、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年1月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。