

氏名	野村 礼
学位(専攻分野)	博士 (生命科学)
学位記番号	生博第 143 号
学位授与の日付	平成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	生命科学研究科高次生命科学専攻
学位論文題目	ヘテロ二量体代謝型GABA受容体の細胞外リガンド結合領域サブユニット間の直接の相互作用の検出
論文調査委員	(主査) 教授 垣塚 彰 教授 根岸 学 教授 渡邊 大

### 論文内容の要旨

三量体GTP結合タンパク質共役型受容体である $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)<sub>B</sub> 受容体は、2つのサブユニット、GABA<sub>B1</sub>受容体 (GBR1) とGABA<sub>B2</sub>受容体 (GBR2) でヘテロダイマーを形成している。GBR1の細胞外領域にリガンド結合部位が存在し、GBR1が細胞外シグナルを受け取ることで受容体が初期活性化される。一方GBR2はG-タンパク質との相互作用を担っており、GBR1が受け取った細胞外シグナルを細胞内へ伝達する役割がある。このように、GABA<sub>B</sub>受容体 (GBR) が受容体としての本来の機能を発揮するには、GBR1とGBR2の両方の働きが必要となる。2つのサブユニット間の相互作用は受容体機能に非常に重要であるが、現在のところ、特に細胞外領域における受容体活性、相互作用のメカニズムに関する詳細な生化学的データは十分には得られていない。そこでこれらの情報を得るための第一ステップとして、GBRの細胞外領域を可溶性タンパク質として大量発現させるシステム構築を始めた。その結果得られたGBR1の可溶性細胞外領域タンパク質の一つに、明確なりガンド結合が確認され、またその結合能は、全長GBR1のリガンド結合能とほぼ同等であった。次に、これらの2つのサブユニットの可溶性細胞外領域 (ECR) タンパク質を用いてGBR1とGBR2の細胞外領域での直接の相互作用を調べた。GBR1とGBR2のECRタンパク質を共発現させ、その培養上清のGBR1に付加したタグに対するアフィニティークラムからの溶出で、GBR1と共にGBR2も抽出できたことから細胞外領域の相互作用を示した。また密度勾配遠心法を行うことで、サブユニット間の相互作用を再確認し、さらに、可溶性GBR-ECRがホモオリゴマーを形成することを明らかにした。また、これまでに細胞レベルの実験で報告されているGBR1のアゴニストアフィニティーを高める効果は、2つのサブユニットの細胞外領域の相互作用により起こることを分子レベルで証明した。今回の結果から、ヘテロダイマー受容体のアゴニストアフィニティーを調節する細胞外領域間の相互作用の重要性が示された。また、我々が今回調製した可溶性GBR-ECRは、これからの構造学的研究の発展を切り開いていくと期待される。

### 論文審査の結果の要旨

$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA)<sub>B</sub> 受容体は、神経伝達物質であるGABAを認識し、抑制性の神経伝達を調節しているG-タンパク質共役型受容体 (GPCR) である。GABA<sub>B</sub>受容体はクラスCのGPCRに属し、そのクラスの特徴として、細胞外領域にリガンドが結合する。GABA<sub>B</sub>受容体の初期活性化メカニズムを解明するためには、細胞外領域のリガンド結合様式を理解することは必須である。そのため細胞外領域に注目した研究が進められているが、現在までに十分な生化学的、構造生物学的データは得られていない。

申請者は、バキュロウイルス昆虫細胞発現システムを用いてGABA<sub>B</sub>受容体の2つのサブユニットであるGBR1とGBR2の細胞外領域のタンパク質大量発現系構築を行い、可溶性GABA<sub>B</sub>受容体の細胞外領域タンパク質を得ることに成功した。さらに精製したGABA<sub>B</sub>受容体細胞外領域タンパク質にリガンド結合活性があることを示し、この蛋白質を用いて正確なりガンド結合能を測定した。また、2つのサブユニットの共発現を行った場合、片方に付加したタグ特異的なアフィニティークラム

ラムによって、2つのサブユニット両方が精製されることを示し、細胞外領域での相互作用を示した。さらに相互作用を確認するため密度勾配遠心法を行い、GBR1とGBR2の細胞外領域がヘテロダイマー形成することを示した。一方、それぞれのサブユニット単独で密度勾配遠心法を行ったところ、GBR1とGBR2の細胞外領域は、それぞれホモオリゴマー形成することも明らかにした。これまでに、GBR1にリガンドが結合し、GBR2はGBR1のリガンドアフィニティーを高める効果があると報告されている。申請者は、精製タンパク質を用いてリガンド結合活性測定を行ったところ、2つのサブユニットの細胞外領域の相互作用は、GBR1のアゴニストに対するアフィニティーを高め、一方アンタゴニストに対するアフィニティーには効果がないということを明らかにした。

以上の結果から、申請者はGABA<sub>B</sub>受容体の2つのサブユニットの細胞外領域の可溶性タンパク質を得ることに成功し、またリガンド結合に必要な細胞外領域を決定したと結論している。さらに2つのサブユニットは細胞外領域で直接相互作用し、その直接の相互作用の効果はリガンド結合を担うGBR1のアゴニストに対するアフィニティーを高める効果があることを示した。これらの研究は、GABA<sub>B</sub>受容体の細胞外領域の活性化メカニズムの解明の第一歩として役に立ち、さらには細胞外領域の立体構造解析へ向けて、大きく貢献することが期待される仕事である。よって、本論文は、博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、平成20年1月22日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。