

| | | | |
|--|--|-----|--------|
| 京都大学 | 博士 (医学) | 氏 名 | 三好 健太郎 |
| 論文題目 | Ubiquitination of the μ -opioid receptor regulates receptor internalization without affecting $G_{i/o}$ -mediated intracellular signaling or receptor phosphorylation (μ オピオイド受容体のユビキチン化は $G_{i/o}$ を介したシグナルおよび受容体のリン酸化に影響を与えることなく受容体の内在化を調節する。) | | |
| (論文内容の要旨) | | | |
| <p>μ オピオイド受容体 (MOP) は鎮痛作用を示すが長期投与によって薬剤耐性をきたす。MOP は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に属し様々な翻訳後修飾を受ける。リガンドと結合した MOP は $G_{i/o}$ を活性化し下流にシグナルを伝達する。活性化した MOP はリン酸化、ユビキチン化などの翻訳後修飾を受け細胞内へ内在化する。内在化した受容体は一部がプロテアソーム系に入り分解され、分解されなかった受容体は再度細胞膜表面にリクルートされて感受性を回復する。この MOP のサイクルがオピオイドに対する感受性の変化、すなわち耐性の形成に関与していると考えられている。本研究では MOP のユビキチン化が内在化の制御に加え $G_{i/o}$ を介したシグナル伝達、MOP のリン酸化とどのように関係するかを解明に取り組んだ。</p> <p>まず MOP の細胞内領域においてユビキチン化される 8 つのリジン残基がユビキチン化を受けないようにアルギニン残基に置換したユビキチン化欠損受容体 (8KR) を作成し、野生型 MOP (WT) をそれぞれ HEK293 細胞に過剰発現させ、合成オピオイド [D-Ala2, N-Me-Phe4, Gly5 -ol] -Enkephalin (DAMGO) で刺激して MOP の内在化、$G_{i/o}$ を介した MAPK 活性化、MOP のリン酸化の差異を検証した。</p> <p>DAMGO 刺激により WT は速やかに内在化し 8KR は内在化するが WT と比較して遅延した。この内在化にユビキチン化が関与することを確認するためユビキチン化活性酵素 (E1) 阻害剤で WT を処理し DAMGO で刺激を行うと 8KR と同様に内在化が遅延しユビキチン化が内在化の効率を調整することを明らかにした。次に 4 つの細胞内領域に存在するどのリジン残基が内在化に寄与するかを検討した。8KR の各細胞内領域のアルギニン置換をリジン残基に戻した株 (1、2、3、4RK) に DAMGO で刺激すると 1RK 細胞は WT と同等に内在化するが 2、3、4RK 細胞は遅延し 1 つ目の細胞内領域のリジン残基のユビキチン化が MOP の内在化に寄与することを明らかにした。</p> <p>次に MOP 下流の $G_{i/o}$ を介した MAPK の活性化および MOP のリン酸化に対するユビキチン化の影響を検討した。8KR を DAMGO で刺激したところ、$G_{i/o}$ を介した MAPK の活性化および MOP のリン酸化は WT 同等で、E1 阻害剤処理した WT でも同様の結果であり MOP のユビキチン化の有無は MOP 下流の $G_{i/o}$ を介した MAPK の活性化および MOP のリン酸化に影響しないことがわかった。またプロテアソーム分解経路が MAPK の活性化に影響を与えているかを検討した。プロテアソーム阻害剤の有無によって DAMGO 刺激による $G_{i/o}$ の MAPK の活性化を比較したが両者に有意差を認めず MOP のユビキチン化は $G_{i/o}$ を介した MAPK の活性化および受容体のリン酸化には影響を与えることなく内在化の効率を調整することを明らかにした。</p> <p>オピオイド耐性は受容体のターンオーバー、シグナル伝達の強弱、リン酸化の強弱などの複数の機構が関与することが示唆されている。本研究は MOP のユビキチン化が $G_{i/o}$ 経路や MOP のリン酸化に影響を与えずに内在化の効率を調整することで、受容体のターンオーバーを制御することを明らかにしユビキチン化と MOP の耐性にかかわる機構との関係の一端の解明に寄与した意義のある研究であると考えられる。</p> | | | |

(論文審査の結果の要旨)

μ オピオイド受容体 (MOP) の翻訳後修飾の一つであるユビキチン化が G タンパク質経路の下流のシグナルに及ぼす影響、MOP のリン酸化および MOP の内在化に与える影響について検証した。

まず HEK293 細胞に野生型 MOP およびユビキチン化欠損変異体を過剰発現させ両者にオピオイド刺激によって起こる G タンパク質経路の下流のシグナルに及ぼす影響、リン酸化および MOP の内在化ユビキチン化の有無による影響を検証した。G タンパク質経路の下流のシグナルおよび MOP のリン酸化は MOP のユビキチン化の有無に影響なくオピオイド刺激によってどちらも引き起こされることを明らかにした。一方で MOP の内在化に関してはユビキチン化欠損変異体は野生型と比較して内在化されるまでに要する時間は遅延することを明らかにした。この結果からユビキチン化が G タンパク質を介したシグナル伝達および受容体のリン酸化に影響を与えることなく MOP の内在化の効率を制御していることを明らかにした。

以上の研究は MOP のシグナル伝達およびリン酸化とユビキチン化との関係を明らかにするとともにユビキチン化と MOP のターンオーバーとの関係の解明に貢献しオピオイドの耐性形成の機構の解明に寄与することが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 6 年 3 月 18 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降