

論文審査の結果の要旨

氏名 此上 祥史

本論文は序論および 2 章からなり、第 1 章ではカイコガ前胸腺刺激ホルモンレセプターの新規構造の解明、第 2 章ではリガンドである前胸腺刺激ホルモンの調製法について述べられている。

昆虫の前胸腺刺激ホルモン (Prothoracicotropic hormone; PTTH) は、脳で産生・分泌される神経ペプチドである。PTTH は、前胸腺と呼ばれる器官に発現している細胞膜上の標的分子 (レセプター) に作用して、細胞内のシグナル伝達経路を活性化することで、昆虫の脱皮ホルモンであるエクジソンの産生・分泌を促進し、最終的に脱皮や変態などの現象を引き起こすことが報告されている。また、PTTH は異なる昆虫種間でほとんど交差活性を示さないことが知られている。このような PTTH の高い標的特異性は、PTTH のレセプターが PTTH の構造上の違いを厳格に認識していることに由来すると考えられる。

第 1 章では、PTTH レセプターである一本鎖チロシンキナーゼ型レセプターである Torso の C 端に FLAG タグを付加したカイコガ Torso 全長を、S2 培養細胞に一過的に発現させ解析を行った。その結果「自己リン酸化」や「細胞内シグナル経路の活性化」が PTTH 刺激に依存して起きる一方、一本鎖チロシンキナーゼ型レセプターによく見られる「二量化」は PTTH 刺激を行わなくても観測された。また、還元・非還元 SDS-PAGE による解析の結果、カイコガ Torso の二量化はジスルフィド架橋を介していることを明らかにした。さらに、カイコガ Torso の C 端から配列の一部を削っていった一連の短鎖変異体を作製し、カイコガ Torso の分子間ジスルフィド架橋は膜貫通領域に存在すると予想された。また、カイコガ Torso の膜貫通領域に存在する 3 つのシステイン残基をすべてフェニルアラニンに置換した変異体 (FFF 変異体) を作製したところ、ジスルフィド架橋を介した二量体を形成しなくなった。以上の結果から、カイコガ Torso は、PTTH 刺激前から膜貫通領域に存在する分子間ジスルフィド架橋を介して二量体を形成しており、チロシンキナーゼ型レセプターとしてはこれまでには見られなかった新規の二量体構造を取っていることを明らかにした。さらに、架橋剤を用いて FFF 変異体を処理すると PTTH で刺激する前から二量化が観測されたことから、Torso は分子間ジスルフィド架橋がなくても、非共有結合的な会合によって二量体を形成してしまうこと、FFF 変異体は PTTH で刺激しなくても自発的に自己リン酸化していることを明らかにした。これらの結果から、膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋は、二量体内で 2 分子の Torso を適切な配置に保つことで、自発的な自己リン酸化を抑える役割をもつと考えられた。一方で、FFF 変異体

は、自発的な自己リン酸化を起こしているにもかかわらず、たとえ PTTH で刺激をしても細胞内シグナル経路の下流に位置する ERK のリン酸化を促進することはないことを明らかにした。このことから、膜貫通領域にある分子間ジスルフィド架橋は Torso の細胞外領域の構造形成に深く関わり、PTTH との相互作用や細胞内情報伝達にも影響していると考えられた。

第 2 章では、リガンドである PTTH とレセプターである Torso の相互作用解析を将来的な目標として、ブレビバチルス菌分泌発現系を用いた大量発現系の構築ならびに二量体型 PTTH 精製法の検討を行った。まず、付加する分泌シグナル配列や培養時間の検討を行い、天然型二量体型 PTTH を得る最適培養条件を見いだした。しかしながら、最適条件でも培地中には単量体や高分子多量体を形成しているものも含まれていたために、 Ni^{2+} -NTA カラムクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相 HPLC などを駆使して、二量体 PTTH の精製を行った。その結果、最終精製品は逆相 HPLC 上で単一ピークとして、非還元 SDS-PAGE 上で単一なバンドとして観察されるまで精製することに成功した。さらに、最終精製品は S2 培養細胞に発現させたカイコガ Torso の自己リン酸化を引き起こすことも確認した。

以上のように、本論文は PTTH 受容体である Torso がこれまでの一本鎖チロシンキナーゼ型レセプターとは異なり、膜貫通領域にある分子間ジスルフィド結合が構造形成、リガンド認識と細胞内情報伝達に重要であることを初めて明らかにしたものである。また、PTTH の Torso との相互作用部位の特定のための基盤となる天然型二量体型 PTTH の大量調製法を確立したものである。

なお、本論文第 1 章は、楊易文、荻原麻理、引場樹里、片岡宏誌、齋藤一樹との共同研究であるが、論文提出者が主体となって、実験および解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分大きいと判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1770 字