論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目　カイコガ前胸腺刺激ホルモンレセプターの

新規構造の解明とそのリガンドの調製

氏　　名　　此上　祥史

序論

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。例えば、カイコガの PTTH は、カイコガの脱皮・変態を誘導するが、同じ鱗翅目であるタバコスズメガの脱皮・変態は誘導しないことが報告されている。一方で、タバコスズメガの PTTH は、タバコスズメガの脱皮・変態を誘導するが、カイコガの脱皮・変態は誘導しないことが報告されている。このような PTTH 活性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。そのため、PTTH とそのレセプターとの相互作用は非常に魅力的な研究対象であるにもかかわらず、肝心の PTTH レセプターは長い間明らかにされてこなかった。そのような状況の中、2009 年、PTTH のレセプターが「Torso」と呼ばれるチロシンキナーゼ型レセプターであることが報告された。しかし、PTTH と Torso との相互作用どころか、PTTH 刺激によって Torso がどのように活性化するのかさえ明らかにされてこなかった。そこで、本研究では、カイコガ PTTH と Torso との相互作用解析に先駆けて、Torso がどのような性質を持ったレセプターなのかを明らかにすることにした。

結果と考察

第 1 章

1-1. カイコガ Torso の二量化様式

一般に、カイコガ Torso のような一本鎖のチロシンキナーゼ型レセプターでは、リガンド刺激によって「①二量化」、「②自己リン酸化」、「③細胞内シグナル伝達経路の活性化」という一連の現象を介して標的細胞の活性化が起きることが報告されている。

そこで、まず、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、それらの現象を観測した。カイコガ Torso では、「②自己リン酸化」や「③細胞内シグナル経路の活性化」は PTTH 刺激に依存して起きることが明らかになった。それに対して、「①二量化」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、そのカイコガ Torso の二量化はジスルフィド架橋を介していることが明らかとなった。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、それらを非還元 SDS-PAGE で分析したところ、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。実際に、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）では、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が明らかになった。

1-2. 膜貫通領域に存在する分子間ジスルフィド架橋の役割

次に、膜貫通領域の分子間ジスルフィド架橋を欠いた FFF 変異体を S2 培養細胞に発現させ野性型と比較することで、Torso の分子間架橋の役割を調べた。

まず架橋剤 BS^3 で 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が明らかになった。また、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が明らかになった。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演じていると考えられる。

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かった。分子間ジスルフィド架橋を欠いた FFF 変異体では本来とは別のチロシン残基がリン酸化されてしまい、細胞内シグナル経路を活性化できなかったものと考えられる。

分子間ジスルフィド架橋を欠くことにより、PTTH に対する正常な応答性が無くなったことから、分子間ジスルフィド架橋の有無によって、Torso の構造が異なってくると考えられた。

そこで、分子間ジスルフィド架橋を有する野生型 Torso と、分子間架橋を欠いた FFF 変異体とを、スペーサーの長さが異なる 3 種類の架橋剤で処理した。野生型 Torso は Sulfo-DSG（スペーサー長：7.7 Å）や BS^3（11.4 Å）に反応して二量体のバンドを示したが、Sulfo-EGS（16.1 Å）には反応しなかったのに対して、FFF 変異体では野生型が反応しなかった Sulfo-EGS にも反応して二量体のバンドを示した。これらの架橋剤がいずれも親水性であって細胞膜に侵入・透過することができないことを考えると、この実験結果は、たとえ FFF 変異体が非共有結合的な会合によって二量体を形成するとしても、分子間ジスルフィド架橋を有する野生型 Torso とその分子間架橋を欠いた FFF 変異体では、細胞外領域の構造が明らかに異なることを示している。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 との相互作用にも影響していると考えられる。

第 2 章

リフォールディング操作を必要としないリガンド PTTH の調製法の確立

PTTH を大腸菌に発現させると沈殿してしまうので、これまでは活性のあるリコンビナント体を得るために常にリフォールディング操作を施してきたが、そのような煩雑な操作を行わずに活性のある PTTH を調製したいと考えた。PTTH のような分子内に複数のジスルフィド架橋をもつタンパク質の発現に有効と思われる発現宿主を検索したところ、産生したリコンビナントタンパク質を細胞外へ分泌する能力に優れたブレビバチルス菌が有望であることがわかった。実際に、ブレビバチルス菌分泌発現系の標準的な手法を用いて C 端に His_6 タグを付加したカイコガ PTTH を発現させたところ、可溶性タンパク質として分泌されたため、その一部を精製して第 1 章の実験に供した。しかし、相互作用解析などに適用することを考えて、より多くのカイコガ PTTH が得られる条件の検討を行った。

リコンビナントタンパク質の分泌発現に大きく影響する分泌シグナルの最適化を行った結果、ブレビバチルス菌の細胞壁タンパク質の分泌シグナル配列を用いると、より多くの PTTH が分泌発現することが明らかになった。

培地中に分泌された PTTH を非還元 SDS-PAGE で分析したところ、天然体であるとされる二量体を形成している PTTH が観測された。しかし、単量体や高分子多量体を形成しているものも観測されたため、Ni^+-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。最終精製品は、逆相 HPLC 上でも非還元 SDS-PAGE 上でもほぼ単一であり、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が確認された。

総括

本研究で、チロシンキナーゼ型レセプターとしてカイコガ Torso がまったく新しい構造を取っていることが明らかとなり、膜貫通領域にある分子間ジスルフィド架橋がリガンドの分子認識にも影響する可能性が示された。よって、PTTH と Torso との相互作用解析には、細胞外領域だけではなく、膜貫通領域を含む Torso 全長を用いる必要があると考えられる。

本研究で確立した手法では、リフォールディング操作を施すことなく、活性のあるカイコガ PTTH が調製できた。ブレビバチルス菌は安定同位体標識されたアミノ酸を含む培地で培養することで、安定同位体標識タンパク質を比較的容易に調製できることが報告されている。その手法を適用し、安定同位体標識 PTTH を調製することで、NMR スペクトル測定を用いた解析もできると考えている。