

審査の結果の要旨

氏名 談 莫東

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR : G-protein Coupled Receptor) は、既知のタンパク質の中では最大のスーパーファミリーを形成しており、生体内で増殖、分化、アポトーシスなどの様々な細胞運命の決定に関わっていることが知られている。一部の GPCR はその細胞内局在変化によって活性を調節しているが、その局在変化を一細胞レベルで精度よく定量解析する方法は確立されていない。

本論文では、血球系の細胞で発現していることが知られている3種の GPCR を、血球系細胞由来の非接着性細胞に発現させ、GPCR のリガンド刺激/環境変化依存的な細胞内局在の時間的変化を一細胞レベルで画像解析する技術の開発を目的とした研究であり、全4章から構成されている。

第1章は緒言であり、本論文の目的と構成について簡潔に述べられている。

第2章は背景であり、GPCR 動態の解析に用いたペプチド連結酵素 Sortase A (SrtA) による蛍光標識方法、光分解性リンカーを有する脂質-PEG を用いた細胞アレイ作製方法、GPCR 局在の画像解析方法と、細胞膜領域と細胞内領域の2コンパートメントモデルに基づく GPCR 動態のシミュレーションモデルについて述べている。

第3章では、第2章で述べた手法を用いた、pH 環境あるいはリガンド依存的な3種の GPCR (G2A, OGR1, BLT1) の細胞内局在の動態解析結果が示され、議論、考察されている。すなわち、インターロイキン (IL-3) 依存性マウス細胞株である Ba/F3 細胞に、SrtA の認識タグを N 末端に融合した3種類の GPCR をそれぞれ恒常発現させた Ba/F3 細胞の作製方法とその結果を示している。さらに、光リソグラフィーによりコラーゲンコートガラス基板上に作製した脂質-PEG 分子のアレイパターン上にこれらの GPCR 発現 Ba/F3 を固定化後、SrtA により蛍光標識した GPCR の細胞外 pH あるいはリガンド依存的な局在変化を一細胞レベルで解析した結果について述べている。

プロトン感知受容体である G2A, OGR1 は、弱塩基性環境下で細胞内部に移行し、弱酸性環境下で細胞膜へ還流することを明らかにしている。これらの受容体の動態は、弱酸性環境下では細胞膜上の GPCR 濃度を高めて細胞内への G2 期停止シグナルや炎症性シグナルを伝達し、生理的条件である弱塩基性環境下で脱プロトン化した GPCR を細胞膜から細胞内の初期エンドソームに移行させることにより、これらのシグナルを抑制することに対応しているのではないかと考察している。さらに、2コンパートメントモデルに基づいて GPCR 動態をシミュレーションし、実験結果に良く適合する GPCR の細胞内移行速度定数、細胞膜への還流速度定数を求めている。その結果、G2A の場合には弱酸性、弱塩基性のいずれの環境下でもこれ

らの速度定数は変化しないのに対して、OGR1 の場合には弱塩基性環境下では弱酸性環境下と比較して細胞内移行速度定数、細胞膜への還流速度定数がともに約2倍と大きくなることを示している。このような特性の違いが、弱塩基性環境下で脱プロトン化によって形成されるヒスチジンペアの数が G2A では1個、OGR1 では2個に存在することに起因する可能性を指摘している。

また、LTB4 (LeukotrieneB4) 受容体である BLT1 もリガンド LTB4 刺激により細胞内に内部移行するが、G2A、OGR1 と比較してその内部移行量は少ないことを明らかにしている。BLT1 細胞内ドメインの C 末端領域の複数のセリン、スレオニンの水酸基が LTB4 刺激により段階的にリン酸化され、リガンド依存的細胞遊走活性、脱顆粒反応活性に関わることが知られている。この LTB4 依存的な BLT1 細胞内ドメインのリン酸化とその細胞内局在変化との関連性を調べるため、そのリン酸化部位のセリン、スレオニンを全てアラニンにアミノ酸置換したリン酸化部位欠損変異体 BLT1 (Δ phos) を作製し、LTB4 刺激後の細胞内動態を評価している。その結果、リン酸化部位の有無に関わらず BLT1 は細胞内部に移行し、シミュレーションにより推定した速度定数にも差異が無いことを明らかにしている。また、リガンドが結合した BLT1 の細胞内移行速度定数、リガンドが解離した BLT1 の細胞膜への還流速度定数は G2A、OGR1 と比較して数倍大きな値であることを示している。これは、BLT1 がリガンドの濃度勾配を検知するには、常にリガンドを結合していない BLT1 を細胞膜上に提示する必要があり、BLT1 のターンオーバーを高く保っているためでは無いかと考察している。以上、本章では脂質-PEG 表面を用いた非接着性細胞の固定化技術、SrtA による GPCR の蛍光標識技術と画像解析技術を組み合わせた手法により、定量的な GPCR の細胞内局在変化の動態を解析する手法を確立し、G2A、OGR1、BLT1 などの GPCR の細胞内局在動態を明らかにすることに成功している。

第4章では、BLT1 を発現した Ba/F3 細胞を基板上に固定し、リガンド濃度勾配依存的な細胞の形状変化と、蛍光標識 BLT1/の細胞膜上での局在変化をもとに受容体の活性レベルを評価するための手法について述べられている。LTB4 の濃度勾配を形成したマイクロチップの基板上に蛍光標識した BLT1 発現 Ba/F3 を固定して観察した結果、ごく一部の細胞で濃度勾配依存的な指向性をもった形状変化および BLT1 の局在性を観察することに成功している。しかし、大半の細胞では形状変化が観察されず、これは基板と細胞との接着面積が広すぎて細胞の形状変化が抑制されているためと考察し、細胞と基板の接着面積を制限するため、今後、脂質-PEG の細胞接着力をさらに強化し、細胞の直径より小さな直径の脂質-PEG スポット上に Ba/F3 を固定した一細胞アレイを作製して観察を行う必要があると述べている。

結論と展望では、本論文の総括と今後の展望について述べられている。

以上、本論文は、従来の技術では困難であった非接着性細胞における GPCR のリガンド刺激/環境変化依存的な細胞内局在の時間的変化を一細胞レベルで画像解析する技術を開発したものであり、この成果は、細胞工学、細胞生物学、創薬分野の発展に大きく寄与する。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。