

学位論文題名

The nematode leucine-rich repeat-containing,
G protein-coupled receptor (LGR) protein homologous
to vertebrate gonadotropin and thyrotropin receptors is
constitutively activated in mammalian cells.

(脊椎動物のゴナドトロピン受容体ならびに甲状腺刺激ホルモン受容体と
相同性を有する線虫受容体は哺乳動物細胞において
恒常的に活性化している)

学位論文内容の要旨

緒言

ゴナドトロピン受容体 (LHR, FSHR) は甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR) とともに細胞膜7回貫通型 G 蛋白質共役型受容体ファミリーに属し, その膜貫通領域においては非常に高いアミノ酸配列の相同性を有している. 近年, これらの受容体と相同性を有する新しい受容体 (leucin-rich repeat-containing G protein-coupled receptor: LGR) がヒトやラット, マウスにおいてクローニングされたが, そのリガンドやセカンドメッセンジャーに関しては未だ不明である. 本研究では, すでにそのゲノムが解明されている線虫 (*C.elegans*) において相同性を有する受容体のクローニングとセカンドメッセンジャーを同定した. さらにこの受容体と LHR とのキメラ受容体を独自に作成し, 受容体の恒常的活性化に重要な役割を果たす受容体内領域の同定を試みた.

研究材料と方法

C.elegans ゲノムのホモロジー検索により, ゴナドトロピン受容体と相同性を有する受容体の存在が明らかとなったため, 独自に作成したプライマーを用いて, *C.elegans* の全 RNA から RT-PCR を施行し, 予測されるサイズの遺伝子増幅産物を得た. 塩基配列を決定し, 目的とする cDNA であることを確認した. 受容体 cDNA を発現ベクターである pcDNA3 に組み込み, 大腸菌を用いてプラスミド DNA を精製した. 一過性トランスフェクションは, ヒト胎児腎線維芽細胞由来の 293T 細胞に対し, 培養ディッシュ (5%牛胎児血清, 100 μ g/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシン, および 2mM L-グルタミン添加 DMEM/F12) あたり 12 μ g のプラスミド DNA を用いてリン酸カルシウム沈殿法により行い, 48 時間後に細胞を実験に供した. ラクトペルオキシダーゼ法にて標識した 125 I-hCG(human chorionic gonadotropin)を用いて飽和結合試験を行った. 細胞の cAMP 産生量は, IBMX(3-isobutyl-1-methyl-xanthine, 0.25mM)存在下での培養上清を用い RIA 法にて測定した. イノシトールリン酸加水分解実験には, 受容体蛋白を一過性に発現した 293T

細胞を $[^3\text{H}]$ myo-inositol で標識して用い、20mM の LiCl 存在下での $\text{IP}_1, \text{IP}_2, \text{IP}_3$ をイオン交換カラムで分離した。受容体の細胞膜上の発現量を比較するために、作成した受容体に共通の FLAG-M2 抗体 (マウス由来) で認識されるように受容体の N 末端に DYKDDDV(Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Val)のエピトープを付加し、細胞膜表面の M2 抗体結合量を ^{125}I で標識した抗マウス IgG 抗体 (ヤギ由来) の放射能活性で測定した。

成 績

ゴナドトロピン受容体を用いたホモロジーサーチにより目的の遺伝子は線虫の 5 番染色体のコスミドクローン CH50.2 に同定されたため、これをもとに作成したプライマーを用いて全 RNA から RT-PCR を施行し、予測したサイズの増幅産物を得た。この受容体 (nematode LGR: nLGR) cDNA のオープンリーディングフレームは 2790bp であった。推定されるアミノ酸配列は、シグナルペプチド (30 アミノ酸) を含めて 929 個からなり、403 個の N 末端細胞外領域、262 個の細胞膜 7 回貫通領域、234 個の C 末端細胞内領域を有していた。細胞膜 7 回貫通領域においては、ゴナドトロピン受容体とは約 50% のアミノ酸配列の相同性を認めた。293T 細胞に一過性にトランスフェクションで発現させた nLGR では、LHR と同程度の細胞膜表面への発現が認められた。しかし、nLGR を発現した細胞はリガンドの刺激なしに高濃度の cAMP を産生していたため恒常的活性化状態にあることが判明した。なお、LH, FSH, TSH, ならびに hCG の刺激には無反応であった。また、イノシトールリン酸代謝回転においては、恒常的活性化を認めなかった。

恒常的活性化状態に重要な領域を同定するために、nLGR の N 末端細胞外領域を LHR の対応する領域と置換したキメラ受容体 L-N(TM-C)を細胞膜表面に発現させたところ同様に恒常的活性化状態を示したが、hCG に対しては結合能を有するが、その刺激に反応を認めなかった。その逆に、恒常的活性化を示すことがすでに知られている D578Y 変異を持つ LHR の N 末端細胞外領域を nLGR のそれと置換したキメラ受容体 N-L(TM-C) D578Y も恒常的活性化状態を示した。さらに N 末端細胞外領域と C 末端細胞内領域が LHR 由来の L-N(TM)-L も恒常的活性化状態を示した。一方、LHR の第 3 細胞内ループ(i3)の C 末端側の 5 個のアミノ酸配列を nLGR のそれと置換した L-N(i3C)-L も恒常的活性化状態を示した。

考 察

近年、LHR、FSHR、および TSHR などの糖蛋白ホルモン受容体と高い相同性を有する N 末端細胞外領域に leucin-rich repeat を有する受容体 LGR がヒトやラット、マウスなどでクローニングされた。さらに、同様の受容体は無脊椎動物 (ショウジョウバエ、イソギンチャク、カタツムリ) においても発見されている。しかし、これらの受容体のすべてにおいてリガンドは同定されておらず、また申請者らが LGR7 において cAMP がセカンドメッセンジャーのひとつであることを発見した以外には、その細胞内情報伝達機構に関して不明である。本研究では、まずこれらのリガンドやセカンドメッセンジャーの同定の一助になるものとして、すでにその全塩基配列が解明された *C.elegans* のホモログの cDNA クローニングを試みた。現在までに、ロドプシン型受容体、細胞膜 7 回貫通型化学受容体、および他の類似受容体などからなる多数の G 蛋白質共役型受容体が同定されているが、*C.elegans* のゲノム解析により、全ゲノムの約 5% が細胞膜 7 回貫通型受容体からなること、さらに、哺乳類の G 蛋白質に相当する遺伝子が存在することが明らかとなった。

ホモロジーサーチで予測した塩基配列が実際に PCR 産物として得られ、この nLGR の cDNA を用いて 293T 細胞をトランスフェクションし一過性に発現させたところ、この nLGR は細胞の cAMP 産生の亢進から恒常的活性化状態を示すことが判明した。また、LHR とのキメラ受容体を用いた組換え実験により、nLGR は単にアミノ酸配列においてホモロ

ジを有しているだけでなく、構造的にも類似していることが示された。キメラ受容体の恒常的活性化状態の有無により、nLGRの細胞膜貫通領域が活性化の立体構造をとっていることが推測された。さらに、LHRの第3細胞内ループのC末端側の5個のアミノ酸配列をnLGRのそれと置換したキメラ受容体も恒常的活性化状態を示したことから、この部位の立体構造の変化が受容体の恒常的活性化のみならず、リガンドによって引き起こされる受容体の活性化機構にも重要であることが示唆された。今回クローニングしたnLGRは293T細胞を用いた実験系で恒常的活性化を示したが、その局在は今回検討されていない。しかし、実際に*C.elegans*においても恒常的活性化状態にある可能性が考えられる。また、*C.elegans*のゲノムに対して糖蛋白ホルモン受容体のリガンドである α や β サブユニットを用いてホモロジー検索を試みたが、相同性を有するものは発見できなかった。このことから、nLGRはリガンドを必要とせず、LGRは進化の過程においてそれぞれに対応したリガンドを獲得して進化してきた可能性がある。

本研究ではLHR、FSHR、およびTSHRなどの糖蛋白ホルモン受容体以外のLGRでセカンドメッセンジャーが初めて同定された。恒常的活性化状態にあるnLGRはLGRの活性化機構を解明する上で役立つと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

学 位 論 文 題 名

The nematode leucine-rich repeat-containing,
G protein-coupled receptor (LGR) protein homologous
to vertebrate gonadotropin and thyrotropin receptors is
constitutively activated in mammalian cells.

(脊椎動物のゴナドトロピン受容体ならびに甲状腺刺激ホルモン受容体と
相同性を有する線虫受容体は哺乳動物細胞において
恒常的に活性化している)

ゴナドトロピン受容体 (LHR, FSHR) は細胞膜 7 回貫通型 G 蛋白質共役型受容体ファミリーに属し, 近年, これらの受容体と相同性を有する新しい受容体 (leucin-rich repeat-containing G protein-coupled receptor: LGR) がヒトやラット, マウスにおいてクローニングされたが, そのリガンドやセカンドメッセンジャーは未だ不明である. 本研究では, ゲノムが解明されている線虫 (*C.elegans*) において相同性を有する受容体のクローニングとセカンドメッセンジャーを同定した. さらにこの受容体と LHR とのキメラ受容体を独自に作成し, 受容体の恒常的活性化に重要な役割を果たす受容体内領域の同定を試みた.

C.elegans ゲノムのホモロジー検索により, ゴナドトロピン受容体と相同性を有する受容体の存在が明らかとなったため, 独自に作成したプライマーを用いて, *C.elegans* の全 RNA から RT-PCR を施行し, 予測されるサイズの遺伝子増幅産物を得た. 塩基配列を決定し, 目的とする cDNA であることを確認した. 受容体 cDNA を発現ベクターである pcDNA3 に組み込み, 大腸菌を用いてプラスミド DNA を精製した. 一過性トランスフェクションは, ヒト胎児腎線維芽細胞由来の 293T 細胞に対し, 培養ディッシュ (5% 牛胎児血清, 100 μ g/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシン, および 2mM L-グルタミン添加 DMEM/F12) あたり 12 μ g のプラスミド DNA を用いてリン酸カルシウム沈殿法により行い, 48 時間後に細胞を実験に供した. ラクトペルオキシダーゼ法にて標識した 125 I-hCG (human chorionic gonadotropin) を用いて飽和結合試験を行った. 細胞の cAMP 産生量は, IBMX (3-isobutyl-1-methyl-xanthine, 0.25mM) 存在下での培養上清を用い RIA 法にて測定した. イノシトールリン酸加水分解実験には, 受容体蛋白を一過性に発現した 293T 細胞を [3 H]myo-inositol で標識して用い, 20mM の LiCl 存在下での IP₁, IP₂, IP₃ をイオン交換カラムで分離した. 受容体の細胞膜上の発現量を比較するために, 作成した受容体に共通の FLAG-M2 抗体 (マウス由来) で認識されるように受容体の N 末端に DYKDDDV (Asp-Tyr-

Lys-Asp-Asp-Asp-Val)のエピトープを付加し、細胞膜表面の M2 抗体結合量を ^{125}I で標識した抗マウス IgG 抗体 (ヤギ由来) の放射能活性で測定した。

ゴナドトロピン受容体を用いたホモロジーサーチにより目的の遺伝子は線虫の 5 番染色体のコスミドクローン CH50.2 に同定されたため、これをもとに作成したプライマーを用いて全 RNA から RT-PCR を施行し、予測したサイズの増幅産物を得た。この受容体

(nematode LGR: nLGR) cDNA のオープンリーディングフレームは 2790bp であった。推定されるアミノ酸配列は、シグナルペプチド (30 アミノ酸) を含めて 929 個からなり、403 個の N 末端細胞外領域、262 個の細胞膜 7 回貫通領域、234 個の C 末端細胞内領域を有していた。細胞膜 7 回貫通領域においては、ゴナドトロピン受容体とは約 50% のアミノ酸配列の相同性を認めた。293T 細胞に一過性にトランスフェクションで発現させた nLGR では、LHR と同程度の細胞膜表面への発現が認められた。しかし、nLGR を発現した細胞はリガンドの刺激なしに高濃度の cAMP を産生していたため恒常的活性化状態にあることが判明した。なお、LH, FSH, TSH, ならびに hCG の刺激には無反応であった。また、イノシトールリン酸代謝回転においては、恒常的活性化を認めなかった。

恒常的活性化状態に重要な領域を同定するために、nLGR の N 末端細胞外領域を LHR の対応する領域と置換したキメラ受容体 L-N(TM-C) を細胞膜表面に発現させたところ同様に恒常的活性化状態を示したが、hCG に対しては結合能を有するが、その刺激に反応を認めなかった。その逆に、恒常的活性化を示すことがすでに知られている D578Y 変異を持つ LHR の N 末端細胞外領域を nLGR のそれと置換したキメラ受容体 N-L(TM-C) D578Y も恒常的活性化状態を示した。さらに N 末端細胞外領域と C 末端細胞内領域が LHR 由来の L-N(TM)-L も恒常的活性化状態を示した。一方、LHR の第 3 細胞内ループ(i3)の C 末端側の 5 個のアミノ酸配列を nLGR のそれと置換した L-N(i3C)-L も恒常的活性化状態を示した。

LHR, FSHR, および TSHR などの糖蛋白ホルモン受容体以外の LGR でセカンドメッセンジャーが初めて同定された。恒常的活性化状態にある nLGR は LGR の活性化機構を解明する上で役立つと考えられる。

公開発表に際し、副査の石橋教授より、キメラ受容体作成自体によるアーチファクトの発生について、nLGR の恒常的活性化に重要なループを含めた膜貫通領域の部位について、nLGR のリガンドの予測について、また副査の藤本教授からは、恒常的活性化の定義について、i3C 末端側の 5 個のアミノ酸をすべて置換した理由などについて、それぞれ質問があった。最後に主査の本間教授からは、キメラレセプターのスカッチャード解析結果と免疫学的測定結果との相違について、線虫の受容体に対するイノシトール系の関与ならびに受容体の生理的役割について、などの質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は自身で行った実験の結果や報告されている知見をもとに概ね的確に応答した。

審査員一同は、本研究の成果を高く評価し、申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。