

学位論文題名

The ectodomain of the luteinizing hormone receptor interacts with exoloop 2 to constrain the transmembrane region: studies using chimeric human and fly receptors.

(黄体化ホルモン受容体における細胞外ドメインと  
第2細胞外ループの相互作用による膜貫通領域の抑制：  
ヒトとショウジョウバエのキメラ受容体を用いた研究)

学位論文内容の要旨

緒言

糖タンパクホルモン受容体である黄体化ホルモン受容体 (LHR) は、卵胞刺激ホルモン受容体 (FSHR)、甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR) とともに7回膜貫通型Gタンパク質共役型受容体遺伝子族に属する。近年、これらと相同性を有する新しい受容体 (leucine-rich repeat-containing, G protein-coupled receptors: LGR) が哺乳類で同定され、さらにショウジョウバエにも二つの LGR (LGR1, LGR2) が存在することが明らかとなった。本研究では、LHRとショウジョウバエ LGR2 のキメラ受容体を用いて、LHRにおけるN末端細胞外ドメインと第2細胞外ループの相互作用を明らかにした。

研究材料と方法

キメラ受容体の作成は Polymerase chain reaction (PCR) を用いて行い、Sanger 法にてその塩基配列を確認した受容体 cDNA を発現ベクターである pcDNA3.1Zeo 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、HEK293T 細胞に対して、培養ディッシュ (10%ウシ胎児血清, 100 $\mu$ g/ml ペニシリン, 100 $\mu$ g/ml ストレプトマイシン, 2mM L-グルタミン添加 DMEM/F12) あたり、10 $\mu$ g のプラスミド DNA を用いてリン酸カルシウム沈殿法にて行い、48時間後に細胞を実験に供した。細胞の cAMP の産生量は IBMX (3-isobutyl-1-methyl xanthine, 0.25mM) の存在下での培養上清を用いて、RIA 法にて測定した。ホルモン飽和結合試験はラクトペルオキシダーゼ法にて  $^{125}$ I で標識した hCG (human chorionic gonadotropin) および FSH (folliotropin) を用いて行った。細胞膜表面上の受容体の発現量をモニターするために、作成した受容体のN末端に FLAG-M1 エピトープを付加し、細胞膜表面上の FLAG-M1 モノクローナル抗体結合量を、二次抗体である  $^{125}$ I 標識抗マウス IgG 抗体 (ヤギ由来) の放射能活性を測定した。

## 結果

トランスフェクションした HEK293T 細胞において、ショウジョウバエ LGR2 の N 末端細胞外ドメインを LHR の対応する領域と置換したキメラ受容体 (LDR) は恒常的活性化状態にあり、さらに、hCG に対する反応を示すことが判明した。N 末端細胞外ドメインを FSHR の対応する領域と置換したキメラ受容体 (FDR) についても検討を行ったが、同様の結果が得られた。この結果より、我々は LHR の N 末端細胞外ドメインが細胞外ループのいずれかと相互作用をすることで受容体の不活性化状態を保っているという仮説をたて、それにもとづき、LDR の細胞外ループを LHR の細胞外ループと置換した。LHR の第 2 細胞外ループをもつ LDR 変異体では、cAMP 産生能の基礎値の減少が認められたが、第 1 あるいは第 3 細胞外ループをもつ変異体ではそれは認められなかった。さらに、LHR の不活性化の維持に重要であることが示唆されている LHR の N 末端細胞外ドメイン上の 'ちょうつがい領域' に注目し、ショウジョウバエ LGR2 におけるその対応領域を LHR の 'ちょうつがい領域' と置換した。この受容体、ショウジョウバエ LGR2 (TYPS) は恒常的活性化を示した。さらに、第 2 細胞外ループを LHR の第 2 細胞外ループと置換したショウジョウバエ LGR2 (TYPS) (EL-2) では cAMP 産生能の著明な低下を認めた。

## 考察

本研究では、LHR の第 2 細胞外ループが、N 末端細胞外ドメイン上の 'ちょうつがい領域' と相互作用することで、膜貫通領域の活性化を抑制していることが示唆された。これまで既に、合成ペプチドを用いた無細胞系の実験で、標識 hCG の  $\alpha$  サブユニットと 'ちょうつがい領域' に対応するペプチドには相互作用が認められ、それは第 2 細胞外ループに対応するペプチドによって競合的に阻害されることが報告されているが、キメラ受容体を用いた本研究でも、これと合致する結果が得られた。これらの事実と合わせて考えると、LHR のリガンドによる信号伝達について、次のように推測することができる。リガンド非存在下では、LHR は 'ちょうつがい領域' と第 2 細胞外ループの相互作用により、不活性化状態が維持されているが、細胞外ドメインの、おそらくは leucine-rich repeat にリガンド (hCG) が結合し、さらに hCG の  $\alpha$  サブユニットは 'ちょうつがい領域' と第 2 細胞外ループの相互作用を阻害し、結果として膜貫通領域の活性化を引き起こしている可能性が高い。

本研究で得られた LHR のリガンドによる活性化機序のモデルは今後、糖タンパクホルモン受容体や他の G タンパク質共役型受容体の活性化機構の解明に大いに役立つと期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 征 一 郎

副 査 教 授 石 岡 輝 雄

副 査 教 授 本 間 研 一

## 学 位 論 文 題 名

The ectodomain of the luteinizing hormone receptor interacts with exoloop 2 to constrain the transmembrane region: studies using chimeric human and fly receptors.

(黄体化ホルモン受容体における細胞外ドメインと  
第2細胞外ループの相互作用による膜貫通領域の抑制：  
ヒトとショウジョウバエのキメラ受容体を用いた研究)

7回膜貫通型Gタンパク質共役型受容体 (LHR, FSHR など) と相同性を有する新しい受容体 (leucine-rich repeat-containing, G protein-coupled receptors: LGR) が哺乳類で同定され、ショウジョウバエにも2つのLGR (LGR1, LGR2) が存在することが明らかとなった。LHRとショウジョウバエ LGR2 のキメラ受容体を用いて、LHRにおけるN末端細胞外ドメインと第2細胞外ループとの相互作用を明らかにすることを目的とした。

キメラ受容体の作成は PCR を用いて行い、Sanger 法にてその塩基配列を確認した受容体 cDNA を発現ベクター (pcDNA3.1Zeo) 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、HEK293T 細胞に対して、培養ディッシュあたり、10  $\mu$ g のプラスミド DNA を用いてリン酸カルシウム沈殿法にて行い、48時間後に細胞を実験に供した。細胞の cAMP の産生量は IBMX の存在下での培養上清を用いて、RIA 法にて測定した。ホルモン飽和結合試験はラクトペルオキシダーゼ法にて  $^{125}$ I 標識 hCG および FSH を用いて行った。細胞膜表面上の受容体の発現量をモニターするために、作成した受容体のN末端に FLAG エピトープを付加し、細胞膜表面上の FLAG-M1 モノクローナル抗体結合量を、二次抗体である  $^{125}$ I 標識抗マウス IgG 抗体 (ヤギ由来) の放射能活性を用いて測定した。

トランスフェクションした HEK293T 細胞において、ショウジョウバエ LGR2 のN末端細胞外ドメインを LHR の対応する領域と置換したキメラ受容体 (LDR) は恒常的活性化状態にあり、さらに、hCG に対する反応を示すことが判明した。N末端細胞外ドメインを FSHR の対応する領域と置換したキメラ受容体 (FDR) についても、同様の結果が得られ

た。この結果より、LHR のN末端細胞外ドメインが細胞外ループのいずれかと相互作用をすることで受容体の不活性化状態を保っているという仮説をたて、それにもとづき、LDR の細胞外ループを LHR の細胞外ループと置換した。LHR の第2細胞外ループをもつ LDR 変異体では、cAMP 産生能の基礎値の減少が認められたが、第1あるいは第3細胞外ループをもつ変異体ではそれは認められなかった。さらに、LHR の不活性化の維持に重要であることが示唆されている LHR のN末端細胞外ドメイン上の‘ちょうつがい領域’に注目した。ショウジョウバエ LGR2 におけるその対応領域を LHR の‘ちょうつがい領域’と置換した受容体 LGR2(TYPS)は恒常的活性化を示した。さらに、第2細胞外ループを LHR の第2細胞外ループと置換したショウジョウバエ LGR2(TYPS)(EL-2)では cAMP 産生能の著明な低下を認めた。

以上、LHR の第2細胞外ループが、N末端細胞外ドメイン上の‘ちょうつがい領域’と相互作用することで、膜貫通領域の活性化を抑制していることが示唆された。

公開発表に際し、石橋教授(副査)より、DLGR2ではなく、ヒトや哺乳類のLGRのキメラを用いなかった理由、cAMP産生量は、細胞膜表面の受容体蛋白量比で補正したものであるかについて、LDR(EL-3)でcAMP産生能の基礎値の著明な減少が認められ、LDR(EL-1,3)では認められない理由、LDR変異体のhCGによるdose responseについて、質問があった。また、本間教授(副査)からは、FLAGエピトープから得られた受容体発現量とリガンド結合能との一般的関係について、細胞膜表面に発現している受容体の機能について、とくに spare receptor の存在について、Scatchard plot 解析における、LDR、FDRの2つの受容体が有する異なるメカニズムについて、「ちょうつがい」領域以外の、adenyl cyclase 活性を上昇させる hot spot について、質問があった。藤本教授(主査)からは、LGR4,5,6のリガンドについて、「ちょうつがい」領域の変異でLHRの恒常的活性化が認められた臨床的報告について、リガンドとLHRとの結合のエクス線結晶解析の可能性について、本研究成果の、将来的な臨床応用の可能性について、質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、自身のデータ解析結果、これまでの文献的知見、などをもとに概ね妥当な回答をなした。

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。