

学位論文題名

スフィンゴシン1-リン酸受容体の 機能における糖鎖の役割

学位論文内容の要旨

Endothelial differentiation gene product (Edg) は、生理活性脂質であるスフィンゴシン1-リン酸をリガンドとする、7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体(GPCR)である。最近の研究から、スフィンゴシン1-リン酸は、細胞表面に発現しているEdgファミリー受容体を介してMAPキナーゼ活性化や細胞内カルシウムイオン濃度の増加など、さまざまな細胞応答を引き起こすことが明らかになった。スフィンゴシン1-リン酸はまた、細胞内でセカンドメッセンジャーとして機能することも示唆されている。

スフィンゴシン1-リン酸受容体を含む多くのGタンパク質共役型の7回膜貫通型受容体は、翻訳後、細胞表面へ移行する過程で、糖鎖付加、パルミチン化、リン酸化、ユビキチン化、硫酸化など、さまざまな修飾を受けることが知られているが、これらの翻訳後修飾の役割は完全には明らかではないものが多い。

そこで、本研究では、(1) スフィンゴシン1-リン酸受容体 Edg-1 に付加されたアスパラギン結合型糖鎖の受容体機能における役割を検討した。また、(2) Edg-1 のN末端領域が、細胞表面への発現の過程で切断されることを見出し、その役割について検討した。さらに、(3) 免疫系細胞に特異的に発現しているにもかかわらず、ほとんど機能が明らかではないスフィンゴシン1-リン酸受容体 Edg-6 の機能解析を行った。

これらの研究を通して、細胞表面に発現するタンパク質に結合した糖鎖の新たな役割が明らかになった。これらの知見は、スフィンゴシン1-リン酸とその受容体の生理的な役割を明らかにするために重要であると思われる。

1. リガンド依存的な Edg-1 の細胞内移行における糖鎖の役割

7回膜貫通型受容体(GPCR)を含む多くの細胞表面に発現するタンパク質は糖鎖修飾されていることが知られている。しかし、これらのタンパク質に付加した糖鎖の役割は完全には明らかではない。そこで、本研究では、スフィンゴシン1-リン酸受容体 Edg-1 が糖鎖修飾されているかを検討し、Edg-1 に結合した糖鎖の役割を検討した。まず、Edg-1 のアスパラギン残基を他のアミノ酸に置換した変異体を用いて Edg-1 の糖鎖結合部位を検討し、Edg-1 が、30番目のアスパラギン残基において糖鎖修飾されていることを明らかにした。次に、Edg-1 に付加した糖鎖の役割を検討するため、糖鎖修飾を受けない変異型(N30D) Edg-1 を安定に発現するCHO細胞を作成した。この細胞を用いて Edg-1 における糖鎖の役割を検討した。その結果、N30D-Edg-1 では、野生型 Edg-1 と比較して、リガンド親和性には有意な差がないにもかかわらず、低濃度のリガンド刺激に応答して細胞内へ移行する受容体数が減少することを見出した。細胞表面に発現する受容体の多くは、細胞表面に均一に分布しているのではなく、さまざまな情報伝達分子が集積している細胞膜マイクロドメイン上に不均一に局在することが知られている。また、細胞表面に局在するタンパク質に結合した糖鎖や糖脂質の糖鎖は、糖鎖-糖鎖の相互作用によって情報を制御することが示唆されている。そこで、Edg-1 に結合した糖鎖の有無が、Edg-1 の細

胞膜マイクロドメインへの集積に関与するかを検討した。その結果、N30D-Edg-1では、野生型 Edg-1 と比較して、マイクロドメインに集積する割合が減少することを見い出した。このことは、リガンド刺激依存的な N30D-Edg-1 の細胞内移行が減少したと強い相関がある。以上のことから、Edg-1 の細胞膜マイクロドメインへの局在制御に、Edg-1 の糖鎖が重要な役割を持つことを明らかにした。この研究では、7 回膜貫通型受容体 (GPCR) のマイクロドメインへの集積が糖鎖の有無に依存していることを初めて明らかにし、受容体の細胞内移行に糖鎖の有無が影響することを初めて示唆した。

2. Edg-1 の N 末端細胞外領域は、その糖鎖修飾過程に影響する

本研究では、培養細胞に発現させたスフィンゴシン 1-リン酸受容体 Edg-1 と Edg-3 の N 末端領域が切断されることを見い出した。そこで、Edg-1 の N 末端領域の役割を検討するため、Edg-1 の N 末端切断領域を欠失した変異体を作製し、切断部位を同定した。培養細胞へ一過性に発現させた Edg-1 は、小胞体で糖鎖修飾を受けた後、ゴルジ体でさらに複合型糖鎖による修飾を受けてから細胞表面へと移行する。しかし、Edg-1 の N 末端切断領域を欠失した変異体では、小胞体では糖鎖付加されるが、ゴルジ体での糖鎖修飾が行われず、大部分は細胞表面へは発現しなかった。また、Edg-1 の N 末端切断部位に塩基性アミノ酸を導入した変異体では、ゴルジ体で修飾される糖鎖の分子量が増加した。これらの結果は、Edg-1 の N 末端領域のアミノ酸配列が、Edg-1 の細胞表面への発現と適切な糖鎖修飾過程に影響することを示している。血管内皮細胞に発現している Edg-1 と Edg-3 は、スフィンゴシン 1-リン酸依存的な血管の環状構造形成に重要な役割を担っている。糖タンパク質に結合した糖鎖の種類の変化は、癌の悪性度と密接な関係があることが示唆されており、また、膜タンパク質における細胞外領域の切断異常は多くの疾患に関与していることから、これらの受容体の N 末端切断に生理的意義の存在が示唆された。

3. 細胞表面に発現した Edg-6 はリガンド刺激依存的に細胞運動を亢進させる

スフィンゴシン 1-リン酸受容体 Edg-1, Edg-3, Edg-5 の mRNA の発現は、多くの組織で普遍的に観察されるのに対し、Edg-6 の mRNA の発現は免疫系・血球系の細胞に局在している。しかし、培養細胞に過剰に発現させた Edg-6 は細胞表面へは発現しにくい。Edg-6 の機能解析はほとんど進んでいない。このように、培養細胞への発現が困難な 7 回膜貫通型受容体は比較的多く存在する。本研究では、N 末端にエピトープタグを付加した Edg-6 や、Edg-6 と GFP との融合タンパク質は、小胞体に留まり、細胞表面へは発現しないことを明らかにした。一方、C 末端にタグを付加した Edg-6 は細胞表面へ局在することを見い出した。そこで、Edg-6 を安定に細胞表面に発現する CHO 細胞を作製し、スフィンゴシン 1-リン酸受容体としての Edg-6 の機能を検討した。まず、細胞表面に発現した Edg-6 は、アスパラギン結合型糖鎖による修飾を受けていることを明らかにした。次に、Edg-6 安定発現細胞は、スフィンゴシン 1-リン酸に対する細胞遊走能を、百日咳毒素感受性に亢進させることを見い出した。さらに、この細胞運動能の亢進は、ドミナントネガティブ Cdc42 の共発現によって抑制されることを明らかにした。これらの結果から、スフィンゴシン 1-リン酸依存的な Edg-6 を介する情報伝達経路の一部が、細胞運動能の調節に関与している可能性が示唆された。スフィンゴシン 1-リン酸は、いくつかの免疫疾患に関与することが示唆されているが、その分子機構は明らかではない。本研究で得られた知見は、免疫系細胞におけるスフィンゴシン 1-リン酸の役割を明らかにするうえで重要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 五十嵐 靖 之
副 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 助教授 川 原 裕 之
副 査 助教授 井ノ口 仁 一

学 位 論 文 題 名

スフィンゴシン 1-リン酸受容体の 機能における糖鎖の役割

申請者は、新しい生理活性脂質として近年注目されているスフィンゴシン 1-リン酸(以後 S1P と略)受容体のうち S1P1 (EDG-1) および免疫細胞などに特異的に発現する S1P4 (EDG-6)の生理機能の解明を試み、N 末結合糖鎖のリガンド刺激依存的な受容体の細胞膜マイクロドメインへの集積や細胞内移行の制御、免疫細胞などに特異的に発現する S1P4 (EDG-6)の細胞運動の亢進などに関して新知見を得、本学位論文として申請した。

血小板から放出される新規生理活性脂質 S1P の 7 回膜貫通型 GPCR 受容体としては現在 5 つのファミリーが知られている。すなわち S1P1 (EDG-1), S1P2 (EDG-5), S1P3 (EDG-3), S1P4 (EDG-6), S1P5 (EDG-8)が知られている。このなかで S1P1 はそのノックアウトマウスが胎生致死であることもあり、その発現調節や機能調節の研究が求められていた。申請者は S1P1 受容体の N 末端 30 番目にアスパラギン酸 N 型糖鎖が結合していることを初めて見だし、糖鎖非結合型変異体を作製しこれを細胞に導入し、生化学的、細胞分子生物学的手法を駆使することによって、受容体 N 末端糖鎖の役割がリガンド刺激依存的な受容体の細胞膜マイクロドメインへの集積や受容体の細胞内移行の制御にあることを見いだした。この結果は世界のトップジャーナルの一つである FASEB J. に掲載され注目を集めた。

申請者は更に、S1P1 が ER、ゴルジ体を通して細胞膜に輸送される過程で、N 末端切断というプロセッシングを受けることを初めて明らかにし、この現象に糖鎖がかかわっていることを示唆する結果を得た。こうした結果は血管にあって、血管新生など血管内皮細胞の運動増殖制御などの重要な働きを持つと考えられている S1P1 受容体の制御を目指す創薬を試みる上でも貴重な知見が得られたといえ、今後の発展が多いに期待される。

免疫細胞などに特異的に発現する S1P4 (EDG-6)は、S1P を介した免疫細胞の運動の制御の可能性や、新規の免疫抑制剤として欧米や日本の製薬企業で開発の試みられている FTY720 との関わりが注目されている。S1P4 は他の受容体ファミリーと違ってその細胞膜表面への発現が難しいため研究が遅れていた。申請者はこの課題に取り組み、様々な試行錯誤の末、細胞膜表面に S1P4 を発現できる実験系を構築し、これを用いて細胞表面に発現した受容体が S1P 刺激でその細胞運動が亢進されることを Boyden Chamber を使用した実験系で初めて明らかにした。更にその受容体の下流のシグナル分子としての低分子 G タンパク質の一つである CDC42 の関与を、pull down assay 法や不活性型 CDC42 を導入することによって明らかにした。この結果は Genes Cells. に発表された。

以上が申請者の研究の主な成果であるが、このほかにも申請者は S1P 受容体の機能に関して英文論文 3 報、邦文論文、総説 2 報を発表するなど、この世界で進められているこの分野の研究の進展に大いに寄与したといえることができる。

以上、本論文審査委員会は、本論文をスフィンゴシン 1-リン酸受容体 S1P1 の糖鎖機能に関する新知見および免疫細胞特異的に発現する S1P4 の細胞運動制御に関する新知見といった申請者の研究内容を水準の高い内容であると判断し、幸野貴之氏を博士（薬学）の学位を受けるに十分値すると認めた。