

論文内容の要旨

申請者氏名 太田 茂之

GPR56はGタンパク質共役受容体(G protein-coupled receptor, GPCR)ファミリーの1つであるAdhesion GPCRファミリーに属している。構造的に長い細胞外ドメインをもち、GPCR Proteolysis site (GPS)と呼ばれるモチーフで自己切断され、細胞外ドメインと膜貫通領域になるが、自己切断を受けた後も両者は相互作用している。しかし、リガンドがまだ見つかっていないオーファン受容体であり、シグナル伝達の詳細は解析されていなかった。GPR56は腫瘍化に関連するという報告もされており、GPR56のシグナル伝達経路や機能を詳細に解明することは、創薬における新たなターゲット分子の候補につながる。先行研究においてマウスのGPR56細胞外ドメインに対するポリクローナル抗体を作製し、その抗体が機能的に働くことを報告している。このことを受け、本研究においては、GPR56を発現しているヒトグリオーマU87-MG細胞を用い、GPR56のより詳細な活性化のメカニズムを解析することを目的とした。

まず、ヒトのGPR56の細胞外ドメインに対する種々のモノクローナル抗体の効果を検討した。ボイデンチャンバーによる細胞遊走アッセイを行い、3種類の抗体が細胞遊走を抑制する機能抗体であることを見出した。そこでGPR56と共役するGタンパク質を同定するために、Gタンパク質ファミリーの1つであるGqの特異的な阻害剤であるYM-254890の効果を検討したところ、抗体による細胞遊走抑制の効果がキャンセルされた。このことから、GPR56がGqを介して細胞遊走抑制効果を示すことが示唆された。さらに、機能的な効果を示した抗体によって細胞内カルシウムの上昇がみられ、その上昇はYM-254890によりキャンセルされることから、機能抗体はGqを介して細胞内カルシウム応答を引き起こすことが判った。また、Rhoキナーゼの阻害剤であるY27632によって抗体の遊走抑制が阻害されたことから、GPR56はGq及びRhoキナーゼの活性化を介して細胞遊走を制御することが判った。次に、抗体による受容体活性化メカニズムを調べるために、機能性および非機能性抗体存在下での共免疫沈降を行ったところ、機能性抗体を作用させた場合に細胞外ドメインと膜貫通ドメインの相互作用が強くなるという結果が得られた。細胞外ドメインを欠失した変異体は、全長の受容体より強いシグナルを惹起することから、細胞外ドメインが抑制的に働いており、リガンドが細胞外ドメインに結合すると、その抑制が解除されて受容体が活性化されるというモデルが考えられていたが、リガンドが結合することで細胞外ドメインと膜貫通ドメインの相互作用が強まり受容体が活性化されるという新たな受容体活性制御機構が判明した。

以上の結果は、機能抗体がGPCRの解析に有用なツールであることを示しており、他のオーファン受容体の研究への応用や抗体医薬への応用が考えられる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 太田 茂之

現在は創薬研究をする際、分子標的医薬という考え方で研究開発が行われている。そのなかで現在使われている薬の少なくとも 3 分の 1 以上が膜受容体のなかで最も多い G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) をターゲットとしている。このことから新薬の開発という点において GPCR 研究は非常に重要である。GPCR はヒトでは約 800 種類あることが知られている。GPCR の中でも特にリガンドが分かっていないものをオーファン GPCR と呼んでいる。現在オーファン受容体は 100 種類以上あるといわれており、新薬のターゲット候補としてその研究が求められている。GPCR は Rhodopsin、Glutamate 受容体、Frizzled、Secretin 受容体、Adhesion GPCR の 5 つのサブファミリーに分類できる。GPR56 を含む Adhesion GPCR ファミリーの多くはオーファン受容体であり、その生理機能はまだ未解明な部分が多い。オーファン受容体研究においては、リガンド探索がその研究の律速となっていた。

申請者は当研究室において作製した GPR56 の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体を用いて、以下のことを明らかにした。まず、3 種類のモノクローナル抗体が G タンパク質の一つである Gq を介してヒトグリオーマ U87-MG 細胞の遊走を抑制する機能抗体であった。また、この機能抗体は GPR56 を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させること、さらに Rho キナーゼの活性を介して遊走を阻害していた。免疫沈降の実験においては、これらの機能抗体が受容体の細胞外ドメインと膜貫通領域の相互作用を強める働きをして活性化していることを示唆した。これまでに、ヒト GPR56 のシグナル伝達において Gq を介することを直接示した報告はなかった。申請者は機能抗体を用いてヒト GPR56 シグナル伝達経路の解析を初めて行い、Gq シグナルおよび Rho キナーゼが関与していることを明らかにした。また、Adhesion GPCR ファミリーにおいて細胞外ドメインと膜貫通領域の相互作用に関しての直接的な活性化機構との関連を示している報告はなかったが、本研究において相互作用が受容体の活性化に重要であるということを初めて示唆した。これらのことは GPCR に対する機能抗体を使用することが、Adhesion GPCR ファミリーのオーファン受容体研究において有用であることを示し、同ファミリーを標的とした抗体医薬の開発応用への可能性を強く示唆している。

以上のように、本論文はオーファン受容体 GPR56 のシグナル伝達と活性化機構に関して新たな知見を与えるもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。