

論文内容の要旨

申請者氏名 野島 悠佑

GPR56はGタンパク共役受容体(GPCR)の一つであり、脳形成時における神経細胞遊走の制御や、癌細胞における転移や増殖などの様々な生理機能制御への関与が報告されている。GPR56はGPCRタンパク分解サイト(GPS)を含む長い細胞外ドメインを持つことを特徴とするadhesion GPCR (aGPCR)ファミリーに属する。aGPCRは主に細胞接着、細胞増殖、および遊走に関与するGPCRのサブファミリーであり、これら細胞機能を果たすために細胞外ドメインが重要であることが示唆されているが詳細は不明である。aGPCRはGPSにおいて自己触媒的に切断され、N末端断片(NTF)および7回膜貫通領域を含むC末端断片(CTF)の2つの断片が生成される。このGPSでのaGPCRの切断の生理学的意義、およびNTFとCTF間の相互作用の役割はほとんど解明されていない。一方、クモ毒である α -Latrotoxin (LTX)の受容体であるLetrophilin1 (LPHN1)も脳に高発現するaGPCRである。これまでにLPHN1NTFはGPR56CTFを含むaGPCRのCTFと相互作用し得ることが報告された。当研究室の先行研究においてGPR56の活性がLPHN1NTFを共発現させることにより抑制されたことから、LPHN1NTFがGPR56CTFとキメラ複合体を形成し、受容体機能の多様性を生みだしているモデルを推定した。そこで本研究では、シグナル伝達におけるGPR56とLPHN1の相互関係とその機能を探ることを目的とした。

まず中枢神経系におけるGPR56およびLPHN1の発現パターンを調べた。幼若神経細胞ではGPR56のNTFとCTFはどちらも細胞膜全体で共局在していたが、分化させた神経細胞ではGPR56NTFは細胞体に局在する一方、CTFは神経突起に存在していた。このことからGPR56のNTFとCTFは神経細胞の分化に伴い、それぞれ異なる細胞内局在を示すことが明らかとなった。また分化させた神経細胞の突起にLPHN1NTFの発現が確認された。胎児マウスの脳切片においてGPR56NTFは脳室帯に多く発現していたが、GPR56CTFは主に分化した神経細胞が局在する中間帯で検出され、LPHN1NTFは中間帯から皮質板の領域に分布していた。またLPHN1NTFとGPR56CTF2つの断片が複合体を形成することを免疫沈降実験により示した。以上のことからGPR56のNTFとCTFはそれぞれ大脳皮質の異なる領域に時期特異的に局在し、発達過程の脳内、特に成熟神経細胞の突起において、GPR56CTFはGPR56NTFだけでなくLPHN1NTFとも相互作用する可能性が示された。更にLTXの受容体非依存的な効果を示さない変異体であるLTXN4Cを用い、神経細胞のカルシウム応答にGPR56が関わることを示した。またLPHN1NTFとGPR56CTFのキメラ複合体はLTXN4Cが誘導するシグナルを流し得ることを示した。

これらの結果は、LPHN1NTFとGPR56CTFがキメラ受容体を形成し、シグナル伝達を担うことを示しており、aGPCRのGPS切断の意義と、異なるaGPCRによる複合体形成およびシグナル伝達制御機構に関する新たな知見を提供する。

□ やむを得ない事由[図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 野島 悠佑

Gタンパク質共役受容体(GPCR)はヒトゲノム上 800 種類以上存在する最大のスーパーファミリーであり、様々な生理機能に関わることから現在の医薬品の 1/3 は GPCR を標的としている。GPR56 と Latrophilin1 (LPHN1) が属する adhesion GPCR (aGPCR) は GPCR タンパク分解サイト(GPS)で自己切断を受け、N 末断片(NTF)と C 末断片(CTF)に分かれる特徴をもつが、切断の生理学的意義は不明である。

申請者はマウスの全脳における GPR56 および LPHN1 の発現時期をウェスタンブロット法により調べた。その結果、GPR56 および LPHN1 両者の NTF と CTF は異なる発現パターンを示すことを明らかにした。またマウス脳およびマウス初代神経細胞における GPR56 および LPHN1 の発現場所を調べた。その結果、GPR56 の NTF と CTF はそれぞれ大脳皮質の異なる領域に強く発現し、発達過程の大脳皮質の中間帯、特に成熟神経細胞の突起において、GPR56CTF は GPR56NTF だけでなく LPHN1NTF とも相互作用する可能性を見出した。次にマウス脳および GPR56CTF と LPHN1NTF を共発現させた HEK293 の細胞ライセートを用い、抗 GPR56CTF 抗体による免疫沈降実験を行った。その結果、LPHN1NTF と GPR56CTF の相互作用を明らかにし、両者によるキメラ複合体形成の可能性を示した。更にキメラ受容体の機能を調べるために、初代培養神経細胞において細胞内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)のイメージング測定を行った。LPHN1 のリガンドとして知られる LTX は四量体を形成し細胞膜に細孔を生じさせることで受容体非依存的な細胞外カルシウムの流入を引き起こす。そのため申請者は細孔を形成しない変異体である LTXN4C を作成し使用した。その結果、LTXN4C により誘導される Ca^{2+} 応答は、GPR56 をノックダウンさせた初代培養神経細胞で減少していた。更に GPR56 ノックアウトマウス由来神経細胞では LTXN4C に対する Ca^{2+} 応答は消失していた。LTXN4C により誘導される Ca^{2+} 応答は GPR56 依存的であることが示唆されたため、更に HEK293 細胞を用いた詳細な解析を行った。LPHN1NTF と GPR56CTF を共発現させた HEK293 細胞を LTXN4C で刺激し、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化を観察したところ、ポジティブコントロールである LPHN1 全長を発現させた細胞と同程度の $[Ca^{2+}]_i$ の増加が見られた。一方、LPHN1NTF または GPR56CTF を単独で発現させた細胞では応答が見られなかった。これらの結果は、LPHN1NTF と GPR56CTF がキメラ受容体を形成し、シグナルを伝達する能力を有することを示しており、aGPCR がその一部を交換して受容体機能の多様性を生み出すというモデルを新たに提唱するものである。

以上のように、本論文は aGPCR の GPS 切断の意義を提供し、aGPCR をターゲットとした選択的薬剤の開発を進めるための、重要な分子基盤を新たに示したもので、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。

やむを得ない事由[図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】