

論文要旨

Differential intracellular signaling through PAC1 isoforms as a result of alternative splicing in the first extracellular domain and the third intracellular loop.

〔 PAC1 の第一細胞外ドメインと第三細胞内ループの選択的スプライシングによって生じるバリエーションの組み合わせが細胞内シグナル伝達能に与える影響 〕

牛山美奈

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、記載する)

多機能神経ペプチド PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) の受容体である PAC1 は、7 回膜貫通部位を持つ G タンパク共役型受容体 (G-protein-coupled receptor, GPCR) である。マウス PAC1 は少なくとも 18 個のエクソンから構成され、複数の領域での mRNA の選択的スプライシングにより多数のバリエーションの存在が報告されている。選択的スプライシングは主に第一細胞外ドメイン (the first extracellular domain; EC1 domain) と第三細胞内ループ (the third intracellular cytoplasmic loop; IC3 loop) で生じ、これまでに単一のバリエーションについて多様なリガンド特異性、細胞内シグナル伝達能を示すことが知られているが、バリエーションの組み合わせによる影響についての報告はない。今回我々は、それぞれ 2 種類の EC1 domain のバリエーションと IC3 loop のバリエーションの組み合わせにより 4 種類の PAC1 アイソフォーム (N/R, N/HOP1, S/R, and S/HOP1) の全長 cDNA をクローニング後、安定発現細胞株を樹立し、3 種類のリガンド (PACAP-38, VIP および maxadilan) を用いて、受容体とリガンドの親和性を確認後、cAMP 産生刺激活性と細胞内カルシウム濃度上昇活性を指標として PAC1 アイソフォームの性状解析を行い、受容体とリガンドの親和性および細胞内シグナル伝達能に与えるバリエーションの組み合わせの影響について検討を行った。

【材料および方法】

1. RT-PCR 法による PAC1 アイソフォームのマウス組織分布の解析
2. レセプターバインディングアッセイ
3. cAMP 産生刺激活性の測定
4. 細胞内カルシウム濃度上昇活性の測定

【結果】

1. RT-PCR 法による PAC1 アイソフォームのマウス組織分布の解析

それぞれ 2 種類の EC1 domain のバリエーションと IC3 loop のバリエーションに特異的な 4 種類のプライマーを組み合わせ、マウス各組織における PAC1 アイソフォームの組織分布を解析した。その結果、今回検討を行ったすべての組織で N/R と N/HOP1 が優位に発現していた。また、前立腺においては N/R よりも N/HOP1 の発現レベルが高かった。さらに、脳と心臓においては S/R がわずかに発現していた。

2. レセプターバインディングアッセイ

3 種類のリガンドの親和性は、4 種類すべての PAC1 アイソフォームにおいて PACAP-38 > maxadilan >> VIP の順番であった。EC1 domain のバリエーションが同一である場合、IC3 loop が HOP1 型のバリエーションでは、R 型のバリエーションに比べ親和性が上昇した。また、IC3 loop のバリエーションが同一である場合、EC1 domain が S 型のバリエーションでは N 型のバリエーションに比べ親和性が低下する傾向がみられた。

PACAP-38 は、EC1 domain が S 型の場合、IC3 loop のバリエーションの変化の影響をあまり受けなかった。また、VIP は 4 種類すべての PAC1 アイソフォームに対し有意な親和性を示したが、その親和性は低く、明確なバリエーションによる影響は見られなかった。

3. cAMP 産生刺激活性の測定

3 種類のリガンドは、4 種類すべての PAC1 アイソフォームにおいて maxadilan > PACAP-38 >> VIP の順に高い cAMP 産生刺激活性を示した。EC₅₀ 値により詳細な比較を行うと、EC1 domain が N 型の場合、S 型の場合に比べて、IC3 loop が HOP1 型の場合にみられる活性の低下は顕著であった。一方、IC3 loop のバリエーションが HOP1 型の場合は、R 型の場合に比べて、EC1 domain のバリエーションが S 型のときにみられる活性の上昇は顕著であった。これらの傾向は 3 種類すべてのリガンドに共通してみられ、特に、VIP はバリエーションの変化の影響を受けて大きく活性が変化した。その活性は maxadilan や PACAP-38 に及ばなかった。また、PACAP-38 は、EC1 domain のバリエーションの影響を強く受け、EC1 domain が S 型の場合、IC3 loop のバリエーションが HOP1 型であっても、わずかに活性が上昇した。

4. 細胞内カルシウム濃度上昇活性の測定

3 種類のリガンドの細胞内カルシウム濃度上昇活性の高さはアイソフォームごとに異なった。バリエーションに変化による細胞内カルシウム濃度上昇活性への影響は、cAMP 産生刺激活性と同様の傾向が見られた。

【結論及び考察】

一般に、リガンドと受容体の親和性には第一細胞外ドメインの構造が、細胞内シグナル伝達能には第三細胞内ループの構造が関与するとされており、選択的 mRNA スプライシングによって生じるバリエーションは、リガンドと受容体の親和性や細胞内シグナル伝達能を変化させることで特有の機能を発揮すると考えられる。PACAP の受容体である PAC1 は脳や末梢の組織に広く分布しており、その選択的スプライシングによって生じる多くのバリエーションは、PACAP の多機能性に寄与していると考えられている。

今回我々は、PAC1 の構造と機能の関係を解明することを目的とし、3 種類のリガンドとマウスに発現している 4 種類の PAC1 アイソフォームの安定発現株を用いて、受容体とリガンドの親和性および細胞内シグナル伝達能に対する 2 つの領域に存在するバリエーションの組み合わせの影響について検討を行った。その結果、親和性に対するバリエーションの影響はリガンドごとに異なり、VIP は親和性が低く、明確な傾向が見られなかったが、PACAP-38 と maxadilan では、IC3 loop が HOP1 型の場合に親和性が上昇する傾向がみられ、IC3 loop の構造がリガンドと受容体の親和性に影響を与えることが明らかとなった。細胞内シグナル伝達能に関しては、EC1 domain が N 型の場合、IC3 loop が HOP1 型の場合にみられる活性の低下は顕著となった。一方、IC3 loop が HOP1 型の場合、EC1 domain が S 型の場合にみられる活性の上昇は顕著となった。これらのことから、細胞内シグナル伝達能に IC3 loop の構造だけでなく EC1 domain の構造も影響を与えることが明らかとなった。このように EC1 domain と IC3 loop の構造は互いに影響し合い、複雑なシグナル伝達能を生み出し、複数の領域で選択的スプライシングが生じる PAC1 においては、それぞれのアイソフォームの真の性質を明らかにするために、バリエーションの組み合わせの影響を考慮する必要があることが示唆された。本研究は、PACAP の多機能性を理解するだけでなく、GPCR の構造と機能の関連を考慮する上で有用な知見となり得る。

論文審査の要旨

報告番号	医研第 660 号	氏名	牛山美奈
審査委員	主査	秋山伸一	
	副査	小澤政之	乾明夫
<p>Differential intracellular signaling through PAC1 isoforms as a result of alternative splicing in the first extracellular domain and the third intracellular loop (PAC1 の第 1 細胞外ドメインと第 3 細胞内ループの選択的スプライシングによって生じるバリエーションの組み合わせが細胞内シグナル伝達能に与える影響)</p> <p>マウス PACAP 受容体 (PAC1) は 18 個のエクソンから構成され、選択的スプライシングの違いより複数のバリエーションの存在が報告されており、これらのバリエーションはリガンドと受容体の親和性および細胞内シグナル伝達能を変化させることで特有の機能を発揮することが知られている。</p> <p>本研究では、それぞれ 2 種類の細胞外ドメインのバリエーション (N 型および S 型) と細胞内ループのバリエーション (R 型および HOPI 型) の組み合わせによる 4 種類の PAC1 アイソフォーム (N/R, N/HOPI, S/R および S/HOPI) の安定発現株と 3 種類の PAC1 リガンド (PACAP-38, maxadilan および VIP) を用い、リガンドと受容体の親和性、cAMP 産生刺激活性および細胞内カルシウム濃度上昇活性に与える第 1 細胞外ドメインと第 3 細胞内ループのバリエーションの組み合わせの影響についての検討を行っている。</p> <p>本研究で得られた新知見は以下の 3 点である。</p> <ol style="list-style-type: none">1. マウス正常組織において 4 種類の PAC1 アイソフォームが発現しており、その発現の比率は組織ごとに異なった。2. 親和性は、細胞外ドメインのバリエーションが N 型および細胞内ループのバリエーションが HOPI 型の場合に上昇した。3. 細胞内シグナル伝達能 (cAMP 産生刺激活性および細胞内カルシウム濃度上昇活性) は、細胞外ドメインのバリエーションが S 型および細胞内ループのバリエーションが R 型の場合に上昇した。 <p>以上により、PAC1 の親和性や細胞内シグナル伝達能は細胞外ドメインと細胞内ループのバリエーションの組み合わせの影響を受けて変化することが証明された。</p> <p>本研究は、一つの遺伝子の複数の領域において選択的スプライシングが生じる PAC1 は、リガンド特異性、親和性および細胞内シグナル伝達能において多様性を生み出し、PACAP の多機能性に関与することを示した。また、その真の性質を明らかにするために、バリエーションの組み合わせの影響を考慮する必要があることを明らかにし、G タンパク共役型受容体の構造と機能の関係において有用な知見を与えた。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。</p>			

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 660 号	氏名	牛山美奈
審査委員	主査	秋山伸一	
	副査	小澤政之	乾明夫

主査および副査の3名は、平成19年8月16日、学位請求者 牛山美奈君に対して、論文内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) リガンドの親和性と細胞内シグナル伝達能に相関がみられないのはなぜか。
 (回答) 一般に、リガンドの効果はリガンド-受容体結合量に比例するとされているが、リガンドの影響を受けず構成的な部分活性を示す受容体の存在などにより、リガンド-受容体結合量と細胞内シグナル伝達能に比例関係が欠如する場合も知られている。本研究において、その機序についての詳細は不明であるが、4種類の PAC1 アイソフォームは、アミノ酸配列の欠失または挿入により受容体の活性化状態に違いが生じ、情報伝達効率を変動させることでリガンドに対する応答を制御していると考えられる。

質問2) PACAP の血中濃度はどれぐらいか。
 (回答) PACAP-38 は、ヒト血漿中において約 23×10^{-12} M との報告がある。

質問3) 実験に使用した安定発現株は、モノクローナルな細胞株か。
 (回答) PAC1 アイソフォームを組み込んだプラスミドをトランスフェクション後に、限界希釈法によりクローンを単離した。

質問4) 強制発現させた PAC1 の発現は、クローン間で異なるか。
 (回答) 作製した安定発現株はクローンによって PAC1 の発現効率が異なるため、一つのアイソフォームごとに複数のクローンで cAMP 産生刺激活性を測定し、安定した cAMP 産生刺激活性をもつクローンを使用した。

質問5) 強制発現させた PAC1 の免疫染色の際に Triton-X を使っているのはなぜか。
 (回答) 蛍光免疫染色に使用した一次抗体が、PAC1 の細胞内部分を認識する抗体であるため 0.4% Triton-X により処理を行った。

質問6) レセプターバインディングアッセイは、膜画分を用いて行っているが、細胞全体を使って行っていないのか。
 (回答) 細胞全体を使ってのレセプターバインディングアッセイは行っていない。

質問7) 一般に、選択的スプライシングがうまく機能しないことで不具合が生じることがあるのか。
 (回答) 選択的スプライシングに異常が生じた場合、機能を欠いたタンパク質や細胞障害性の異常タンパク質が産生され、疾患発症の原因となることある。筋強直性筋ジストロフィーの患者では、Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -transporting ATPase (SERCA1, Ca^{2+} を小胞体内に再吸収するカルシウムポンプ) の異常スプライシングが起こることが分かっている。

質問 8) 親和性や細胞内シグナル伝達能が変化するメカニズム何か。

(回答) アミノ酸の欠失や挿入による受容体の立体構造の変化が原因であると考えている。

質問 9) リガンドごとに親和性やシグナル伝達能に違いがみられる理由は何か。

(回答) 3 種類のリガンドは PAC1 と結合し作用を発揮するが、結合する際の受容体の立体構造の変化はリガンドごとに異なる。このため、リガンドごとにバリエーションの違いによりリガンドと受容体の親和性やシグナル伝達能が受ける影響に違いが見られると考える。

質問 10) 他の動物種においても、バリエーションが臓器特異的に存在するのか。

(回答) ヒトおよびラットにおいてもバリエーションの発現は確認されているが、第 1 細胞外ドメインのバリエーションと第 3 細胞内ループのバリエーションの組み合わせを、臓器ごとに検討した報告はない。

質問 11) PAC1 アイソフォームは疾患と関連があるか。

(回答) ラット胸腺において、放射線照射前には発現していなかった HIP および HIPHOP 型のバリエーションの発現が照射後に確認されている。また、ヒト前立腺癌においては細胞内ループのバリエーションが R 型のアイソフォームのみが発現しており、予後に関連しているのではないと考えられている。

質問 12) maxadilan の PAC1 結合部位がわかっているか。

(回答) PAC1 と maxadilan の結合には、C 末端のリジン残基が必須であり、PAC1 の活性化には、14-51 位のジスルフィド結合と、33 位のスレオニン残基が必須である。

質問 13) PAC1 が多くのエクソンから構成されることの意味は何か。

(回答) 多くのエクソンから構成されることで、特有の親和性や細胞内シグナル伝達能を持った複数のバリエーションが生じ、PACAP の情報伝達効率を多様化させ、PACAP の多機能性に寄与していると考えられる。

質問 14) CHO 細胞に内在性の PAC1 は発現しているのか。

(回答) CHO 細胞には、内在性の PAC1, VPAC1 および VPAC2 は発現していないとの報告がある。

質問 15) 第 3 細胞内ループ以外の細胞内ループにバリエーションがあるのか。

(回答) 細胞内ループに関しては、第 3 細胞内ループ以外にはバリエーションの報告はない。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。