



Title	Structural Characterization of Ligand-Binding Domain of Guanylyl Cyclase C
Author(s)	長谷川, 慎
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155155
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	長谷川 慎 ^{はせがわ まこと}
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 14402 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科有機化学専攻
学位論文名	Structural Characterization of Ligand-Binding Domain of Guanylyl Cyclase C (グアニル酸シクラーゼCのリガンド結合領域の構造に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 下西 康嗣 (副査) 教授 関口 清俊 教授 長谷 純宏

論文内容の要旨

グアニル酸シクラーゼC (以下, GC-C) は, 細胞外ドメインで特定の生理活性ペプチドをリガンドとして受容することにより活性化され, 細胞内ドメインにおいて cyclic guanosine-3'5'-monophosphate (cGMP) を合成し, それを細胞内における信号として外部情報を伝達する機能を担う受容体蛋白質である。GC-Cは小腸, 腎臓などの臓器の上皮細胞に存在しており, ペプチドホルモンにより活性化され, 細胞内cGMP濃度を上昇させる。それに伴い, 最終的に塩素イオンおよび水分子の細胞外流出が起こる。また, 腸管感染菌が分泌する毒素のひとつである耐熱性エンテロトキシン(STa)は, この情報伝達経路を強く活性化することにより水様性の下痢を引き起こす。本研究において, GC-Cの情報伝達機能を構造論的見地から明らかにすることを目的として, リガンドである生理活性ペプチドを認識する部位とその構造要因を調べた。

(1) GC-C細胞外ドメインの発現系の確立および発現蛋白質の機能評価

407 アミノ酸残基からなるGC-C細胞外ドメイン(ECD)を, 培養細胞を用いて発現させた。培養細胞の大量培養により目的蛋白質を得て, アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。ECDがGC-Cと同等のリガンド結合能を有することを放射性標識リガンド結合解析により明らかにした。また, リガンド結合に誘起されてECDの多量体が形成されることを分子間架橋実験により観察した。

(2) GC-C細胞外ドメインのリガンド結合部位の決定

GC-Cのリガンド認識の仕組みを理解するために, リガンド結合部位を光親和性標識法により決定した。それに先立ち, 光親和性標識を行うための架橋反応基を分子内に持つリガンドアナログとして biotinyl-[Gly⁴, Pap¹¹]STp(4-17) を化学合成した。この biotinyl-[Gly⁴, Pap¹¹]STp(4-17) をリガンド固有の結合親和性により ECD に会合させ, 紫外線を照射して両者間に共有結合を形成させた。この標識 ECD を蛋白質分解酵素により処理し, ペプチド断片の混合物より光親和性標識されたペプチドを単離した。単離されたペプチドを質量分析法により同定したところ, 387-393 位に相当するペプチド断片であることが明らかになった。さらに, この部位のアミノ酸残基を置換した GC-C を遺伝子組換え法により培養細胞に発現させたところ, リガンド結合能に大きな影響を与えた。これらの結果から, この部位がリガンド結合部位であると結論した。

(3) 細胞外ドメイン糖鎖修飾構造の役割

GC-Cの一次構造には8カ所のN結合型糖鎖修飾配列が含まれ, その糖鎖修飾は機能発現に必須である。その役割

を詳細に明らかにするために、糖鎖修飾部位を欠いた変異蛋白質を調製した。それぞれ1カ所の糖鎖修飾部位を欠損した変異型 GC-CあるいはECDに関して機能評価を行ったところ、変異型は著しくリガンド結合能が低下しており、そのリガンド結合能の低下は、リガンド最大結合量の低下に起因していることが明らかとなった。最も影響の大きい Asn-379 変異型は、著しく変性剤に対する対抗性を損なっており、糖鎖構造の役割がリガンド結合部位近傍の構造安定化にあることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

近年、外部刺激による受容体を介した細胞の情報伝達機構の解明は、多くの研究者の注目するところとなっているが、本研究は、膜結合型グアニル酸シクラーゼCの情報伝達機能を、構造論的見地から、解明することを目的として行われたものである。この研究を通じて、膜結合型グアニル酸シクラーゼC全蛋白質の機能を保持したリガンド結合領域を単一の精製試料として得ることに初めて成功し、それをを用いて、新たにデザインした光親和性標識リガンドとの反応によって、リガンドを認識する部位を同定し、さらに、リガンド認識機能に関わる397位糖鎖の構造安定化への寄与を明らかにした。

以上、長谷川君の研究は膜結合型グアニル酸シクラーゼCのリガンド認識構造を明らかにし、細胞情報伝達機構の分子論に貢献するものであり、本論文は、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。