

Title	Studies on Membrane-associated Guanylyl Cyclase Receptor for Escherichia Coli Heat-stable Enterotoxin
Author(s)	和田, 昭裕
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39049
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	和 田 昭 裕
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 5 3 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 9 月 2 6 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	Studies on Membrane-associated Guanylyl Cyclase Receptor for <i>Escherichia coli</i> Heat-stable Enterotoxin (大腸菌の産生する耐熱性エンテロトキシン受容体膜結合型グアニル 酸シクラーゼに関する研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 下 西 康 嗣 (副査) 教 授 長 谷 純 宏 教 授 相 本 三 郎

論 文 内 容 の 要 旨

毒素原性大腸菌の産生する耐熱性エンテロトキシン (STa) は、ヒトや家畜に急性の下痢を引き起こすペプチド性毒素として知られている。菌体から放出された毒素である STa は、宿主の腸管上皮細胞膜上に存在する膜結合型グアニル酸シクラーゼ (STaR) に結合して、細胞内 cGMP 濃度の上昇を引き起し、その結果、cGMP 濃度に依存して、細胞内蛋白質のリン酸化が起こる。リン酸化による蛋白質の活性化や抑制化機構は明らかではないが、最終的にクロロイオンの吸収阻害、ナトリウムイオンの分泌促進、それに伴う水の流出が認められる。本研究は、STaR の STa 結合領域の特徴と機能を明らかにする目的で、以下の項目について行なった。

第一に、ブタ STaR 遺伝子のクローニングと動物細胞における遺伝子の発現をおこないブタ STaR の機能を調べた。既知のラット STaR の遺伝子をプローブとして、クローニングしたブタ STaR の cDNA は 3773 塩基からなり、1073 残基のアミノ酸からなるコーディングリージョンをすべて含んでいた。ハイドロパシー・プロットの結果、ブタ STaR は N 末端に 23 残基からなるシグナルペプチドがあり、成熟蛋白質として 1050 残基からなる約 121kDa の膜一回貫通型蛋白質であると考えられた。ブタ STaR とヒトおよびラット STaR の相同性はそれぞれ 87% および 82% であり、ブタ STaR はラットよりヒト STaR に近いアミノ酸配列であった。STaR 間において、細胞外領域に比べて細胞内領域は良く保存されていた。また、このブタ STaR 遺伝子を動物細胞に発現させると、特異的に STa 結合活性 ($K_i = 7.9$) を示し、STa 濃度に依存して細胞内 cGMP 濃度の上昇 ($EC_{50} = 10^{-8} - 10^{-7} M$) が認められた。

第二に、STaR 上の STa 結合に重要な部位を明らかにする為に、ブタ STaR の約 400 残基からなる細胞外領域の部位特異的変異体を 18 種類作製した。その結果、STa 結合活性を全く示さない 2 種類の STaR 変異体 (M8 と M15) が認められた。また、wild-type の STaR の約 2 倍の STa 結合活性を示す M6 が得られた。興味深いことに、M1 の部位を変異させたすべての STaR 変異体は、STa 結合活性に比較して cGMP 活性の低下が認められた。次に、STa 結合活性を示さない M8 と M15 の蛋白質の発現を確認する為に、11 残基のアミノ酸からなる市販のモノクローナル抗体 (mAbI2CA5) の認識するインフルエンザのヘマグルチニン (Ha) のエピトープを導入した Ha-STaR を作製した。この Ha-STaR を鋳型にして、STa 結合活性に影響を与えた M8 と M15 を変異させた Ha-M8 と Ha-M15 を作製

した。Ha-M8とHa-M15はHaエピトープが挿入されてもSTa結合活性を示さず、Haエピトープを導入したことによるSTa結合活性への影響はなかった。さらに、mAb12CA5を用いたHa-M8とHa-M15の免疫沈降により、これらの蛋白質の発現は認められた。従って、ブタSTaR上のM8とM15の部位(Arg136Met138とAsp347Asn348)はSTa結合に重要な部位であることがわかった。

第三に、膜結合型グアニル酸シクラーゼ受容体の細胞外領域の特徴を調べた。STaRは現在までに大別して6種類の蛋白質(NPR-A, NPR-B, NPR-C, STaR, retGC, sapGC)が知られている膜結合型グアニル酸シクラーゼ受容体ファミリーに属する。これらの蛋白質は、いずれも分子中央で細胞膜を一回貫通している蛋白質である。細胞内領域の相同性が高いことに比べて細胞外領域の相同性は低く、細胞外領域の特徴は明らかではなかった。そこで、13種類の膜結合型グアニル酸シクラーゼ受容体の細胞外領域のアミノ酸配列を並べてみると、すべての受容体に6残基のアミノ酸が保存されていることがわかった(ブタSTaRにおいて; Cys72, Gly98, Pro99, Cys101, Asp347, Asp351)。このことから膜結合型グアニル酸シクラーゼ受容体の細胞外領域の共通なモチーフとして、N末端近くにGPモチーフ(CX₂₀₋₂₅GPXCXY or CX₂₀₋₂₅GPXCXXY)が、細胞膜の近くにDXXGDモチーフがあることがわかった。

第四に、膜結合型グアニル酸シクラーゼ受容体の細胞外領域に存在するDXXGDモチーフの役割を調べる為に、ブタSTaRのDNCGD(アミノ酸347-351)のアミノ酸残基をそれぞれAに換えたHa-STaR変異体を作製した。いずれのHa-STaR変異体も免疫沈降により蛋白質の発現は確認されたが、DXXGDモチーフ中の保存されているアミノ酸残基(D, G, D)をAに換えたHa-STaR変異体にはSTa結合活性とcGMP形成能は認められなかった。従って、膜結合型グアニル酸シクラーゼ受容体ファミリーの細胞外領域に存在するDXXGDモチーフは、リガンドの結合およびグアニル酸シクラーゼ領域の活性化に重要な部位であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

毒素原性大腸菌の産生する耐熱性エンテロトキシン(STa)は、ヒトや家畜の腸管上皮細胞膜上に存在する膜結合型グアニル酸シクラーゼ(STaR)に結合し、細胞内cGMP濃度の上昇にともなって細胞内から外への電解質の分泌促進、それに伴う水の流出ひいては下痢をもたらす。

和田昭裕君は、STaRの機能を明かにする目的で、1)ブタSTaR遺伝子のクローニングと動物細胞での発現、2)STaR変異体の作製と機能、3)一群の膜結合型グアニル酸シクラーゼの細胞外領域における共通のモチーフの検索と機能について研究を行い、1)STaRは、種間において細胞内ドメインは高い相同性を示すのに対して細胞外ドメインには相同性の高い領域と低い領域が存在すること、2)STaRの細胞外領域のArg136, Met138, Asp347, Asn348がSTaとの相互作用に重要であること、3)膜結合型グアニル酸シクラーゼの細胞外ドメインの共通なモチーフとしてGPモチーフとDXXGDモチーフが存在すること、4)後者のモチーフでは、保存されているアミノ酸をAlaに変異することによってSTaとの結合活性が全く失われることなどを見いだした。

以上のように、本論文は、耐熱性エンテロトキシンに対する膜結合型グアニル酸シクラーゼの機能について新しい知見を与えたものであり、博士(理学)の学位論文として充分価値あるものと認める。