



Title	副甲状腺ホルモンによって活性化されるシグナルとその活性部位の探索
Author(s)	高須, 尚
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42793">https://hdl.handle.net/11094/42793</a>
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	高須 尚
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 15859 号
学位授与年月日	平成13年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	副甲状腺ホルモンによって活性化されるシグナルとその活性部位の探索
論文審査委員	(主査) 教授 土井 健史
	(副査) 教授 前田 正知 教授 今西 武 教授 西原 力

#### 論文内容の要旨

骨粗鬆症は近年の急速な高齢化に伴い表面化してきた疾患の一つであり、今後ますますその深刻度が加速されていくものと予想される。一方骨粗鬆症を含めた骨領域に関する研究はこれまであまり注目されておらず、他領域と比較して大きく遅れていた。近年になりようやくその重要性がクローズアップされ始め、ここ数年で骨疾患に対する基礎研究が飛躍的に進歩してきた。

正常な状態では、人間の骨は骨を形成する骨芽細胞と骨を吸収する破骨細胞によって骨代謝(リモデリング)を行っており、常に新しい骨に置き換えられている。しかし年齢とともにこの形成・吸収のバランスが崩れ、相対的に骨吸収が骨形成を上回ることによって骨量減少が引き起こされる。これが骨粗鬆症の主原因であると考えられている。副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone, PTH)はこのようリモデリングバランスの崩れを修正し、骨量を増加させる唯一の因子として最も注目を集めている。現在のところその作用機序については不明な点が多く、そのメカニズム解明が骨粗鬆症の原因究明に役立つのではないかとされている。従ってPTHの作用機構を研究することは学問的のみならず医学的見地からも重要であり、現在世界的にもその研究に力が注がれている。

PTHは生体内では主に血液中のミネラル、特にカルシウムとリン濃度の調節に働いている重要なホルモンと考えられている。事実その作用は腎臓、小腸、骨などの体内のミネラル代謝を司る重要な組織で強く確認されている。これまでの報告よりこれらの組織に対する作用はアミノ(N)末端から34個のアミノ酸[PTH(1-34)]で十分であることが知られており、35番目以降のアミノ酸は副甲状腺からの分泌過程に関与していると考えられている。そのため現在ではPTHの研究においてほとんどの場合PTH(1-34)が使用されている。一方PTHレセプター(PTHR)は7回膜貫通部位を有するGタンパク質結合型レセプターファミリーに属しており、細胞外部位でPTHを認識し、細胞内部位でGタンパク質を介して情報を伝達する。これまでPTHRとカップリングすることが知られているGタンパク質はGsとGqの2種類であり、それぞれがadenylate cyclase(AC)またはphospholipase C(PLC)を介してプロテインキナーゼA(PKA)またはプロテインキナーゼC(PKC)を活性化することが報告されている。しかしPTHの様々な生理作用に対して、これらのシグナルがどのように寄与しているかは依然不明である。以上の背景より、本研究ではPTHによって活性化されるシグナルの性質を明らかにするために、PTHRを介した2種類のタンパク質Gs、Gq活性化に影響を与える要因について、PTHリガンドとレセプターの両面からの検討を行った。

まず最初にPTHRを恒常的に発現する複数の細胞株を樹立し、PTHによって活性化されたシグナルがPTHR発

現レベルによってどのような影響を受けるかについて調べた。本系は、同一のバックグラウンドの細胞を使用することによってレセプター発現レベルの違いのみに着目し、且つ安定した結果を得ることができる点で非常に有用な系である。その結果 PTHR の発現量によって、1) Gタンパク質を介するシグナルの最大活性(量)のみならず時間依存性(質)までが影響を受けること、2) 種間(ヒトとラット)での PTHR 反応性に相違があること、を明らかにした。前者は、リガンドのシグナル伝達機構を理解する上でリガンドの濃度以外に細胞あたりのレセプター発現量も重要な要因になり得ることを意味しており、各組織または細胞の各分化段階でのレセプター発現レベルの違いを十分考慮する必要があることを示唆している。また後者は医薬品開発過程において、前臨床試験の結果を臨床試験に外挿する際の慎重な位置付けを促すものと考えられる。

続いて樹立した細胞株を用いて、PTH リガンドのレセプターを介する Gs, Gq シグナル活性化に重要なアミノ酸部位の同定を行った。その結果従来考えられていた活性化部位と異なり、hPTH (1-34) の Gs 活性化には N 末端側の数アミノ酸が、Gq 活性化には N 末端側の  $\alpha$  位のアミノ基がフリーで存在することが必須であること、更にレセプターとの結合には C 末端側の 28 番目から 31 番目のアミノ酸が大きく寄与していることを明らかにした。また PTH による Gq 活性化は Gs 活性化に比べて結合能力に強く依存している結果を得た。これはリガンドがレセプターに結合後、Gq よりも Gs の方が活性化されやすい可能性を示唆しており、両活性の生理的意義を推測する上で重要な情報である。

最後に本実験を通して得られたすべての情報を基にして、Gs タンパク質を選択的に活性化する PTH 変異体の創製を行った。その結果 Gs 活性を hPTH (1-34) と同程度に保持しつつ、且つ Gq 活性が全く観察されない PTH 誘導体 [Gly<sup>1</sup>, Arg<sup>19</sup>] hPTH (1-28) を得ることに成功した。このペプチドはラットの PTHR に対しても高い選択性を維持していることから、PTH の *in vivo* における骨形成作用メカニズムをシグナルの観点から追求することを可能にする非常に有用な手段となり得る。

PTH は現在注射剤として骨粗鬆症治療薬を対象とした開発が進められている。しかし将来の患者のニーズ、医療保険制度におけるコスト削減などの社会的状況を鑑みると、低分子化による次世代 PTH 様経口剤の開発が避けられない状況にある。そのためにはまず PTH の作用メカニズムを把握し、そこから骨形成に本質的な活性のみを選択する必要がある。本研究は、このような次世代 PTH 創製において非常に重要なステップになると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

正常な状態では、人間の骨は骨を形成する骨芽細胞と骨を吸収する破骨細胞によって骨代謝を行っているが、年齢とともにこのバランスが崩れ、骨量減少を引き起こした場合、これが骨粗鬆症の原因となる。副甲状腺ホルモン(PTH)はこのバランスの崩れを修正し、骨量を増加させる唯一の因子であるため、医学的見地からも注目を集めている。

こういった背景下、高須君は、PTH によって活性化されるシグナルの性質を明らかにするために、PTH 受容体(PTHR)を介した2種類のタンパク質 Gs, Gq の活性化について検討を行った。

最初に PTHR を恒常的に発現する複数の細胞株を樹立し、シグナルを調べた結果、PTH の濃度以外に細胞あたりのレセプター発現量もシグナルの性質に影響することを見出した。続いて樹立した細胞株を用いて、PTH の Gs, Gq シグナルに重要なアミノ酸部位を探求し、hPTH (1-34) ペプチドについて従来考えられていた部位と異なる部位が、Gs の活性化、Gq の活性化に重要であることを明らかにした。更にレセプターとの結合に C 末端側の 28 番目から 31 番目のアミノ酸が大きく寄与することを見出した。最後に得られたすべての情報を基にして、Gs タンパク質を選択的に活性化する PTH 由来ペプチド分子の創製に初めて成功した。

以上の結果は、博士(薬学)の学位論文に値するものと認める。