

| | |
|--------------|---|
| Title | Structural Characterization of the Transmembrane- Juxtamembrane Region of Fibroblast Growth Factor Receptor 3 |
| Author(s) | 玉垣, 裕子 |
| Citation | |
| Issue Date | |
| Text Version | ETD |
| URL | https://doi.org/10.18910/52271 |
| DOI | 10.18910/52271 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (玉垣 裕子)

論文題名

Structural Characterization of the Transmembrane-Juxtamembrane Region of Fibroblast Growth Factor Receptor 3
(繊維芽細胞増殖因子受容体3の膜貫通-膜近傍部位の機能構造解析)

受容体型チロシンキナーゼは細胞の増殖や分化に関与している一回膜貫通型の受容体である。従来、単量体で存在している受容体が細胞外領域におけるリガンド結合に伴い、二量体を形成することで細胞質内の機能が発現すると考えられてきた。しかし、近年、リガンドが結合していない、非活性時においても受容体が二量体を形成していることやリガンド結合に伴い細胞質内領域が非対称な二量体を形成することなどの知見が得られており、受容体の活性化機構の再考が求められている。受容体の活性化機構を明らかにするためには受容体全長の構造情報を得ることが有益であるが、受容体型チロシンキナーゼの全長の結晶構造は明らかになっていない。水溶性部分である細胞外、細胞内領域、個々に関する結晶構造は明らかになっているものの、それらを繋ぐ膜貫通-膜近傍 (TM-JM) 部位に関する情報は乏しく、細胞外と細胞内が連動した形での活性化機構は理解されていない。

そこで申請者は、受容体型チロシンキナーゼの骨形成に関与している繊維芽細胞増殖因子受容体 3 (FGFR3) の TM-JM 部位の機能構造解析を行い、既存の受容体型チロシンキナーゼに関する情報と照らし合わせることで細胞外と細胞内が連動した形での受容体の活性化機構の解明を目指し研究を行うこととした。FGFR3 の TM 部位において常時活性を示す変異 G380R と A391E が見出されている。それら変異型と野生型の TM-JM 部位ペプチドの脂質二重膜中における構造比較を各種分光学的手法にて行うことにより、活性化機構における TM-JM 部位の役割を考察することとした。

各種分光学的手法を用い、TM-JM 部位の構造機能解析を行うためには、部位特異的標識した TM-JM ペプチドが必要である。このようなペプチドの調製は生物学的調製法では困難であるため、合成化学的手法により試料調製を行う。細胞質内膜近傍 (IJM) 部位の C 末端にチオール基と反応するマレイミドを含む蛍光物質を導入した TM-IJM ペプチドを調製する際、チオール基を保護するためのチアゾリジン環形成とペプチド同士を縮合させる Native Chemical Ligation 法を用いて、目的のペプチドを調製した。G380R、A391E 変異型配列のペプチドも同様の方法で合成した。

得られた三種類 TM-IJM ペプチドをそれぞれ脂質二重膜に挿入し、生体膜の構成成分であるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) の添加に伴う蛍光強度の変化を観察した。野生型の TM-IJM 部位は PIP₂ の添加に伴い、蛍光強度の減少が観察されたことから、野生型の IJM 部位は脂質二重膜中と結合しており、PIP₂ の添加に伴い IJM 部位同士が近接し、自己消光したと考えられる。一方、両変異型では PIP₂ を加えても蛍光強度に変化が見られなかった。このことから変異型の IJM 部位は野生型とは異なる構造を形成していることがわかる。変異型に関しては膜の組成の変化に影響を受けない構造の一つとして膜から解離している構造が考えられる。そこで、次に Trp を IJM 部位の C 末端に導入したペプチドを合成し、同様に蛍光実験を行った。置かれた環境の極性により Trp の蛍光の極大波長は異なる。Trp が疎水性環境に存在しているとき極大波長が短波長側に、親水性環境に存在しているとき極大波長が長波長側に現れる。実験の結果、変異型の極大波長は野生型より長波長側に観察され、変異型の IJM 部位はより親水性の環境に存在していることがわかった。このことから変異型の IJM 部位は膜から解離していることが示唆された。

次に IJM 部位の構造の違いの要因となる TM 部位の構造解析を偏光 FT-IR を用いて行った。その結果、変異型の TM ヘリックスの方が野生型と比較して脂質二重膜に対してより垂直に近い角度で埋まっていることがわかった。これらのことから TM ヘリックスの脂質二重膜に対する配向と IJM 部位の膜からの解離には相関があると考えられる。その相関を明らかにするため、野生型配列の TM ヘリックスの配向を脂質二重膜の厚さにより変化させ、IJM 部位の挙動に変化が現れるかを上記の PIP₂ を用いた蛍光実験で検証した。その結果、TM ヘリックスが 20° 以上の角度を持って配向しているときは IJM 部位が膜と結合しており、TM ヘリックスが ~20° の角度を持って配向するとき、IJM 部位が膜から解離することが示唆される結果が得られた。このことから、TM ヘリックスの配向と IJM 部位の膜からの解離には相関があることがわかった。

以上の結果から FGFR3 の活性化機構においては細胞外領域におけるリガンド結合により TM ヘリックスが脂質二重膜に対してより垂直に近い角度で配向し、IJM 部位が膜から解離することで細胞質内の機能が発現すると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

| | |
|-----------------|----------------|
| 氏 名 (玉 垣 裕 子) | |
| 論文審査担当者 | (職) 氏 名 |
| | 主 査 教授 高 木 淳 一 |
| | 副 査 教授 北 條 裕 信 |
| | 副 査 教授 藤 原 敏 道 |

論文審査の結果の要旨

対象論文（繊維芽細胞増殖因子受容体 3 の膜貫通一膜近傍部位の機能構造解析、英文タイトル Structural Characterization of the Transmembrane-Juxtamembrane Region of Fibroblast Growth Factor Receptor 3）は、繊維芽細胞増殖因子受容体 3（FGFR3）膜貫通一細胞質内膜近傍部位の構造と受容体機能との相関について述べたものである。FGFR3 の膜貫通部位には常時活性型の変異が見出されているが、本論文では、野生型、常時活性変異型配列に関して膜貫通一細胞質内膜近傍部位に相当するペプチドを化学合成し、脂質二重膜中における構造比較解析を分光学的手法によって行った。そして、細胞質内膜近傍部位に関して、野生型配列では脂質二重膜に結合しているのに対し、常時活性変異型配列では脂質二重膜から解離することを見出した。膜貫通部位に関しては、両配列において異なる会合面を介して二量体を形成すること、並びに膜貫通ヘリックスの脂質二重膜に対する配向が異なることが明らかとなった。これらの結果をもとに、FGFR3 の活性化メカニズムを考察するとともに、化学合成ペプチドと組み換え発現蛋白質を使った「半合成的」アプローチによる部分標識試料の作製という挑戦的な課題に対し、予備的段階の proof-of-concept 実験にまで成功した。これらは有機化学的手法と構造生物学的手法を用いて細胞上のシグナル伝達メカニズムの分子レベルでの解明につなげたものである。よって、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。