

副甲状腺細胞

—カルシウム感受性受容体の構造—

吉本勝彦* 斎藤史郎**

Parathyroid cells : structure of Ca^{2+} sensing receptor

Katsuhiko Yoshimoto¹, Shiro Saito²

¹Otsuka Department of Clinical and Molecular Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, ²First Department of Internal Medicine, School of Medicine, The University of Tokushima

Summary

Using expression in *Xenopus* oocytes, Brown et al. cloned a bovine parathyroid Ca^{2+} sensing receptor (BoPCaR1). The 1,085 amino acid membrane protein is included in a class of putative seven transmembrane-spanning structures that activate the phosphoinositol pathway through G proteins. Receptor activation presumably elevates intracellular Ca^{2+} to inhibit secretion of PTH. BoPCaR1 has a big extracellular domain at the amino terminus. BoPCaR1 is most similar to the metabotropic glutamate receptor. BoPCaR1 mRNA is found in cells that have well known Ca^{2+} sensing function. Inheritance of one inactive Ca^{2+} sensing receptor gene causes familial hypocalciuric hypercalcemia (FHH) and autosomal dominant hypocalcemia. Mutations in the extracellular domain and in a portion of the third intracellular loop domain decrease the receptor's sensitivity, causing FHH. Extracellular domain mutations increase the receptor's activity at low Ca^{2+} concentration to cause autosomal familial hypocalcemia.

Key words: Ca^{2+} sensing receptor, Parathyroid, G protein-coupled receptor, Familial hypocalciuric hypercalcemia, Autosomal dominant hypocalcemia

はじめに

細胞外液カルシウム濃度の恒常性の維持は、動物がさまざまに変化する外的および内的環境に適応して生存してゆくための必須の機能である。この恒常性を維持する機構は、細胞外液カルシウム濃度を感知する受容体、受容体から細胞内への情報伝達系、そして効果器の作用により形成されている。カルシウム代謝調節に重要な役割をはたしている副甲状腺細胞には、細胞内カルシウム濃度の増加により、副甲状腺ホルモン(PTH)分泌が抑制されるという他のホルモン分泌細胞とは異なる特性がある(図1)¹⁾。

最近の分子細胞生物学の進歩により、このカルシウム濃度を調節する一連の流れを構成する蛋白分子の実体が次第に明らかになってきている。本稿では最近クローニングされたカルシウム感受性受容体の構造と、遺伝的にカルシウム代謝異常をきたすことが知られていた疾患におけるカルシウム感受性受容体遺伝子の異常について述べる。

I. ウシカルシウム感受性受容体 cDNA のクローニング

1993年、Brownらによってウシの副甲状腺よりカルシウム感受性受容体がアフリカツメガエル卵母細胞を用いた「発現クローニング法」によりクローニングされた(図2)²⁾。この受容体は細胞膜中に深く埋め込まれ、微量しか存在

* 徳島大学医学部・臨床分子栄養学(大塚)講座

** 同・第1内科

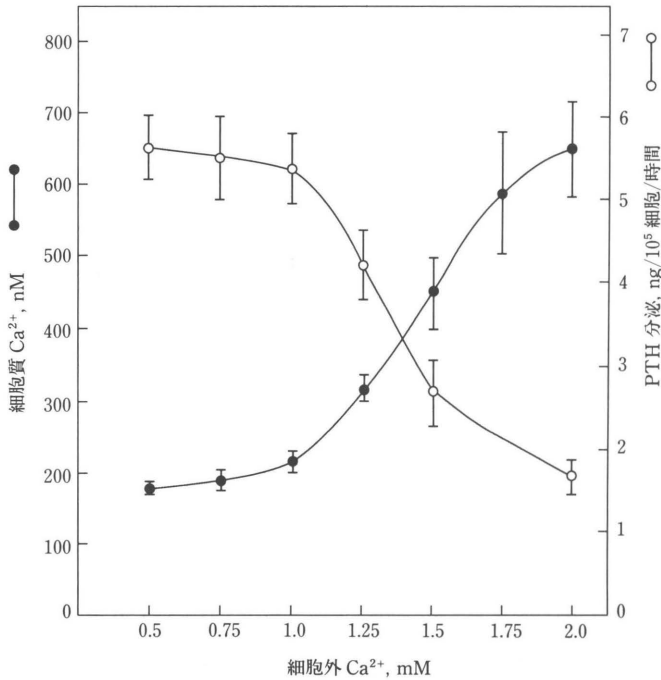


図1 細胞外 Ca^{2+} 濃度の変化に伴う細胞質 Ca^{2+} 濃度および PTH 分泌の変化
ウシ分散副甲状腺細胞を用いた実験(Brown E et al¹⁾ より引用)

しないため精製が非常に困難であった。そこで、cDNA にコードされる蛋白を卵母細胞に作らせ、その蛋白の生理活性でスクリーニングする方法がとられた。この細胞では、リガンドと結合した受容体は百日咳毒素感受性の G 蛋白を活性化し、イノシトールリン脂質代謝回転の促進、inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) の生成、細胞内カルシウム濃度の上昇に伴って開口するクロライドイオンチャンネルにより膜電流が生じる。実際のクローニングの過程は以下の通りである。ウシ副甲状腺より抽出した mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、カルシウム感受性受容体のアゴニストである Gd^{3+} (ガドリニウム) に対する反応を確認した。次いで、mRNA をアガロースゲル電気泳動によりサイズ別に分離し、それぞれの画分を卵母細胞に注入し、活性画分を得た。この mRNA 画分より cDNA を合成し、目的のサイズの cDNA を得、それを 1 方向性にベクターに組み込み、大腸菌を形質転換させた。コロニーより各プレートごとにプラ

スミド DNA を抽出、精製し、RNA ポリメラーゼにより合成した cRNA を卵母細胞に注入し、3~4 日間培養後 Gd^{3+} に対する電気生理学的反応を検討した。活性を示した cDNA プールを徐々に細分化していき、最終的に 5.3 kb のウシカルシウム感受性受容体(BoPCaR1) cDNA をクローニングした。この BoPCaR1 cDNA を卵母細胞に注入し、カルシウム、マグネシウム、ガドリニウム、ネオマイシンに対する電気生理学的反応を検討すると、副甲状腺のそれと同じ結果が得られた。

II. カルシウム感受性受容体の構造

1,085 個のアミノ酸よりなり、G 蛋白共役型受容体のスーパーファミリーに属する(図 3)。本受容体は 3 つの構造ドメインより構成され、N 端は親水性の 613 個のアミノ酸(最初の 21 個のアミノ酸はシグナルペプチド)からなり、9 カ所の N-グリコシル化部位が存在することより、細胞外ドメインと考えられる。中心部は 250 個

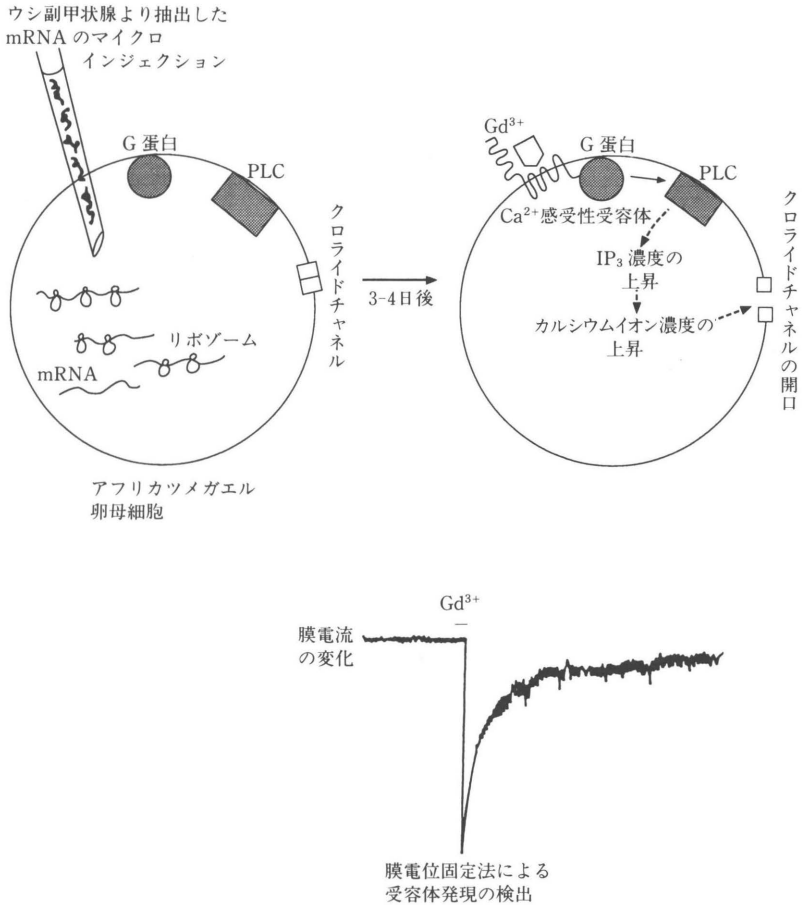


図2 卵母細胞内で発現させた受容体をリガンド(Gd³⁺)で刺激した際のシグナル伝達メカニズム

PLC: ホスホリパーゼ C (中村元直ら¹⁰⁾ の図を一部改変)

の amino 酸よりなる膜貫通領域で、G 蛋白共役型受容体スーパーファミリーに特徴的な 7 回膜貫通構造を有する。C 端は 222 個の amino 酸よりなる細胞内ドメインと考えられる。本 cDNA を用いて *in vitro* 翻訳系で合成させた蛋白はグリコシル化されること、およびウシ副甲状腺細胞における BoPCaR1 はグリコシル化されていることが確認されている。

大きい細胞外ドメインは代謝調節型グルタミン酸受容体、および甲状腺刺激ホルモン、ゴナドトロピンなどの糖蛋白ホルモン受容体にも認められるが、BoPCaR1 は代謝調節型グルタミン酸受容体と相同性を有している。特に N 端

ドメイン、第 1 および第 2 細胞外ループに位置する 20 個のシステイン、N 端ドメインに存在する疎水性部位、第 1 および第 3 細胞内ループに両者の相同性が認められる。また、プロテイン C キナーゼ (PKC) によるリン酸化部位が第 1、第 3 細胞内ループ内の各 1 カ所および C 端細胞内ドメイン内の 2 カ所の計 4 部位に存在する。副甲状腺細胞における細胞内カルシウムイオンやイノシトールリン酸の増加が PKC の活性化により減弱することから、PKC によるリン酸化が受容体の機能を調節している可能性がある。

本受容体は代謝調節型グルタミン酸受容体と

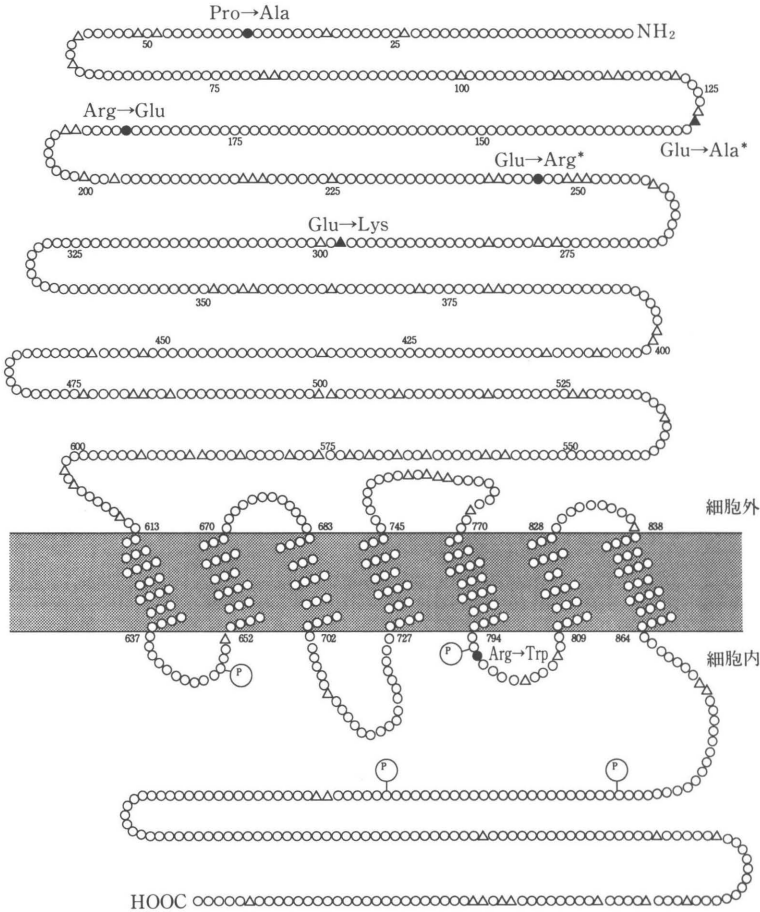


図 3 カルシウム感受性受容体の概略図

△, 酸性アミノ酸; ○, 他のアミノ酸; ●, ▲, 4 家系の FHH および 2 家系の家族性副甲状腺機能低下症(*)における変異部位; ⊙, PKC によるリン酸化部位(Pollak M et al⁵⁾ の図を一部改変)

相同性を有しているが、L-グルタミン酸や代謝調節型グルタミン酸受容体特異的のアゴニストを作用させても、もちろん電気生理学的反応はおこらない。また本受容体は細胞外カルシウムイオンに対し、Kd が mM オーダーという低い親和性を示す。このことは本受容体が EF ハンド、Epidermal Growth Factor (EGF) 様繰り返し構造のような高親和性 Ca 結合部位をもたないことと一致する。N 端細胞外ドメインの 2 カ所、第 2 細胞外ループに 2 個あるいは 3 個連続して酸性アミノ酸が存在する部位があり、カルシウムイオンや多価イオンの結合に働いていること

が予測される。

BoPCaR1 mRNA の発現はウシ副甲状腺と腎、脳、甲状腺に認められることより、腎近位尿細管、ヘンループの上行脚、甲状腺 C 細胞などにおける細胞外カルシウムの作用はカルシウム感受性受容体を介すると考えられる。

III. 家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症症例におけるカルシウム感受性受容体の変異

家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症 (familial hypocalciuric hypercalcemia, FHH)

は常染色体優性遺伝形式をとる稀な疾患で、高カルシウム血症があるにもかかわらず、尿中カルシウム排泄量の低下を伴うことと、血漿副甲状腺ホルモン(PTH)濃度が正常であることを特徴としている。無症候性であり、検査時に高カルシウム血症により発見されるが、尿路結石や尿濃縮力の低下は認められない。新生児重症副甲状腺機能亢進症(neonatal severe hyperparathyroidism, NSHPT)は高度の高カルシウム血症、高PTH血症、副甲状腺過形成を示すが、NSHPTはFHHの家系内の血族結婚で出現するため、FHH遺伝子のホモ接合体がNSHPTの病因と考えられている³⁾。これまで、副甲状腺や腎においてカルシウムに対する感受性を欠いていること、すなわちPTH分泌のセットポイント(PTH分泌が50%抑制されるカルシウム濃度)が右へ移動していることが本症の原因と考えられてきた。(詳細は本誌、家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症の項を参照)

ヒトカルシウム感受性受容体遺伝子はハムスター-ヒトハイブリッド細胞パネルを用いた解析により、連鎖解析で決定されたFFH/NSHPT座位(3q2)⁴⁾と同じ第3染色体に位置していることが明らかにされた。そこでPollakらは本遺伝子の異常がFFH/NSHPTの原因である可能性を考え、FFHおよびNSHPT症例における解析を進めた⁵⁾。サザンブロット解析では明らかな欠失や挿入は認められなかったため、彼らはBoPCaR1 cDNAをプローブとして、20 kb以上にわたる6個のエクソンよりなるヒトカルシウム感受性受容体遺伝子を単離した。そしてRNase protection assay法でFHHの3家系のカルシウム感受性受容体遺伝子を検討すると、FHH発症例ではこの遺伝子の点突然変異が証明された(図3)。カルシウム感受性受容体遺伝子のN端の細胞外ドメインをコードしているエクソン3内の変異が2家系で見られ、1家系はコドン186のArgがGluに、別の1家系ではコドン298のGluがLysに置換していた。第3の家系には第3細胞内ループのエクソン6内のコドン796のArgがTrpに置換していた(R796W)。これらの変異は同一家系内におい

てFHH発症例にのみ認められ、正常血清カルシウム値を呈する例では認められなかった。さらにNSHPTの症例はこの変異のホモ接合体であることが確認された。

これらの変異が認められたアミノ酸はヒトとウシの間で保存されており、FHHに認められた変異(R796W)を導入したBoCaR1遺伝子をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させると、カルシウム、ガドリニウム、ネオマイシンに対する電気生理学的反応は正常遺伝子の5~10%しか認められなかった。これらのFHH家系で認められたカルシウム感受性受容体遺伝子の細胞外ドメインの変異はカルシウムとの結合障害を、第3細胞内ループの変異は細胞内シグナル伝達障害を惹起すると考えられる。またHeathらもFHH症例において、Pollakらと異なる3種の変異を同定している⁶⁾。わが国のFHH症例においてもエクソン1内のコドン40に、ProからAlaへの置換をもたらす変異がホモ接合体として認められた。両親はそれぞれヘテロ接合体の変異を有するが非常に軽症であった⁷⁾。これらの結果より、受容体の変異の部位あるいは変異により置換されるアミノ酸残基の種類によりFHHの臨床症状の程度が変化し得る可能性が示唆された。

以上よりFHHとNSHPTの副甲状腺細胞では、カルシウム感受性受容体の遺伝子異常により、細胞外カルシウムの認識に障害が起り、高カルシウム血症の存在下でもPTHの分泌が続いていることが明らかとなった。腎尿細管においても受容体の変異により、高カルシウム血症が存在するにもかかわらず、カルシウムの再吸収が増加していることが想定される。

IV. 常染色体優性遺伝を示す家族性副甲状腺機能低下症症例におけるカルシウム感受性受容体の変異

最近Pollakらにより、常染色体優性遺伝を示す家族性副甲状腺機能低下症(autosomal dominant hypocalcemia)において、カルシウム感受性受容体遺伝子のN端細胞外ドメインを構成するエクソン2内のコドン128にGluか

ら Ala への置換をもたらす変異が報告された⁸⁾。この変異を導入した BoCaR1 遺伝子をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させると、低濃度 (0.5 mM) あるいは高濃度 (5 mM) の細胞外カルシウム濃度のいずれにおいても、変異体は野生型に比べ有意な IP_3 の生成の増加を認めた。また Perry らも本疾患症例においてコドン 246 での Glu から Arg への変異を見出している⁹⁾。この変異は、FHH に認められる受容体の「loss of function」ではなく、カルシウムに対する親和性を増加させ、そのセットポイントを低下させるという受容体の「gain of function」を惹起していると考えられる。

おわりに

カルシウム感受性受容体の単離、同定が行われたことの意義は大きく、その遺伝子の異常と疾患との関連を検証する研究が直ちに行われ、興味深い結果が得られている。しかし、本受容体のもつ大きな細胞外ドメインと、膜貫通部および細胞内ドメイン内の PKC のリン酸化部位などの特異な構造の意義、副甲状腺や腎におけるカルシウム感受性受容体の情報伝達機構、in situ hybridization 法による脳での局在、さらに FHH や家族性副甲状腺機能低下症における変異が dominant に作用する機構などについて、今後の検討が必要である。

文 献

- 1) Brown E M : Extracellular Ca^{2+} -sensing, regulation of parathyroid function and role of Ca^{2+} and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol Rev* **71** : 371-411, 1991.
- 2) Brown E M, et al : Cloning and characterization of Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366** : 575-580, 1993.
- 3) Pollak, M R, et al : Familial hypocalcemic hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism : Effects of mutant gene dosage on phenotype. *J Clin Invest* **93** : 1108-1112, 1994.
- 4) Cho Y-H W, et al : The gene responsible for familial hypocalcemic hypercalcemia maps to chromosome 3q in four unrelated families. *Nature Genet* **1** : 295-300, 1992.
- 5) Pollak M R, et al : Mutations in the human Ca^{2+} -sensing receptor gene cause familial hypocalcemic hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell* **75** : 1297-1303, 1993.
- 6) Heath H, III : Familial benign hypercalcemia-From clinical description to molecular genetics. *West J Med* **160** : 554-561, 1994.
- 7) 小石佐和子ら : カルシウムセンシングレセプター遺伝子に変異を認めた低カルシウム尿性高カルシウム血症の 1 例. *日内分泌会誌* **70** : 695, 1994. (抄録)
- 8) Pollak M R, et al : Autosomal dominant hypocalcemia caused by a Ca^{2+} -sensing receptor gene mutation. *Nature Genet* **8** : 303-307, 1994.
- 9) Perry Y M, et al : A missense mutation in the Ca^{2+} -sensing receptor gene causes familial autosomal dominant hypoparathyroidism. *Am J Hum Genet* **55** : A17, 1994. (Abstract)
- 10) 中村元直, 清水孝雄 : アフリカツメガエルの卵母細胞を用いたレセプター遺伝子の発現クローニング. *バイオマニュアルシリーズ 3 遺伝子クローニング実験法* (横田崇, 新井賢一編), p 138-256, 羊土社, 1993.