

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08231

研究課題名(和文) ムスカリン性アセチルコリン受容体のRGSを介した新しいG蛋白質シグナル制御の研究

研究課題名(英文) Regulation of the m2 muscarinic ACh receptor-mediated signaling by RGS proteins

研究代表者

古谷 和春 (FURUTANI, KAZUHARU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40452437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞のm2ムスカリン性アセチルコリン受容体(m2R)を活性化すると、G蛋白質シグナル伝達系を介してカリウムチャネルが活性化される。これは心拍リズム制御の分子機構である。G蛋白質シグナル調節タンパク質4(RGS4)がこの細胞内シグナル伝達系を制御することは知られていた。本研究では、m2Rの部分活性薬の活性制御における役割を調べた。結果として、RGS4はPilocarpineなどm2Rの部分活性化薬の作用にみられる電位依存性などの特性の発現に必須であり、その機構の構造基盤の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Activation of the m2 muscarinic acetylcholine receptor (m2R) in cardiomyocytes induces the potassium channel opening via the G protein signaling system. This is a molecular mechanism of heart rate control. It has been known that regulators of G protein signaling 4 (RGS4) regulates this intracellular signal transduction system. In this study, we investigated the role in determining the signal transduction efficacies of m2R partial agonists such as pilocarpine. As a result, we found that RGS4 is essential for the characteristics mode of action of m2R partial agonist, such as its voltage dependence, and clarified a part of the structural basis of the underlying mechanism.

研究分野：薬理学

キーワード：細胞内シグナル伝達 受容体 カリウムチャネル G蛋白質シグナル 電気生理学

1. 研究開始当初の背景

(1) G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は生体膜上で外界からの情報を受容し、その情報を細胞内の G 蛋白質シグナルに変換して伝達する。研究代表者らは、m2 ムスカリン性アセチルコリン受容体 (m2R) が、Gα サブユニットの GTPase 活性を増強する G 蛋白質シグナル調節蛋白質 (RGS) 4 の働きを促進し、G 蛋白質シグナルを抑制することを見いだした。この新規 G 蛋白質シグナル制御機構はリガンド依存的であり、m2R のパーシャルアゴニストで特に顕著であり、細胞応答がフルアゴニストと比較して部分的になる分子機構であることを報告していた。この新規知見により、GPCR は G 蛋白質シグナル伝達を促進する機能とシグナルを抑制する機能をともに兼ね備え包括的に G 蛋白質シグナルを制御するものと認識を新たにしていた。

(2) 研究代表者らは、ムスカリン性アセチルコリン受容体の RGS を介した新しい G 蛋白質シグナル制御機構の理解を進めるべく予備的検討をおこなった。種々のアゴニストの G 蛋白質シグナル活性化効率、RGS 存在下において、膜電位の影響を大きく受けることが分かった。即ち、情報の受容/情報の変換/細胞内へのシグナル伝達に関わる m2R 分子の機能は、従来考えられていたよりも多機能であり、他分子との相互作用や膜での物理学的環境要因を統合して細胞機能を制御していると考えられた。この理解無しでは、生理的に起こるシグナル伝達の理解には到達できないと思われた。

2. 研究の目的

本研究では、予備的検討の成果に立脚し、GPCR (m2R) の RGS を介した G 蛋白質制御機能に関する4つの論点を設定した。それは 1) 生理学的特性、2) パーシャルアゴニスト作用への貢献 (リガンド依存性)、3) 電位依存性、そして 4) 分子機構と構造基盤、である。すべての論点には、予備的な実験結果に基づいた作業仮説を立てた。1) RGS4 の G 蛋白質シグナル抑制機能は m2R のリガンドおよび膜電位の制御を受けダイナミックに変化する、2) リガンド毎に RGS 依存的 G 蛋白質シグナル制御の強度が異なりこれが細胞応答の大きさを定める、3) m2R が膜電位の変化を感知し、その情報が RGS に伝達され、G 蛋白質シグナル制御機構に電位依存性をもたらす、4) m2R と RGS4 の直接的相互作用がシグナル伝達を制御している。これらを検証し明確な答えを出すことによって、m2R の RGS を介した新しい G 蛋白質シグナル制御機構の基礎的理解を得ることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

研究手法および実験材料：イオンチャネル機能の解析は電気生理学的手法を用いた。実験動物 (ラット) から単離した心筋細胞に内因性に発現するイオンチャネル、ならびに培養

哺乳類細胞やアフリカツメガエル卵母細胞に異所性に発現させた GIRK チャネルを流れる電流をパッチクランプ法もしくは二極電極膜電位固定法により測定した。GIRK チャネル電流を評価することで、薬物や RGS4 の G 蛋白質シグナル伝達系への効果を評価した。本研究に必要な Kir チャネルの遺伝子は既に研究室に所持しており、実際に異所性に発現させ電流を測定し、研究に用いた実績があった。研究実施体制：研究代表者は研究統括と実験遂行を担う。連携研究者の倉智は Kir チャネルの分子機能制御とその生理的役割の研究で多数の業績をあげており世界的に著名である。実験結果を倉智と議論し、助言を得て進めることで、最重要な課題に軸足を置き、最適な方法論で研究を進めた。

4. 研究成果

(1) m2R 依存的 GIRK チャネル活性化における RGS 制御の生理的特性の測定

以前の研究により、この制御機構に膜電位依存性が認められていた (研究当初の背景 2)。この膜電位依存性を定量的に理解する実験をおこなった。実験には、この現象を最初に観察した単離ラット心筋細胞、そして分子レベルの詳細な解析には異所性発現系としてアフリカツメガエル卵母細胞を用いた。電気生理学の実験手法の膜電位固定法により膜電位を操作すると、pilocarpine 投与により活性化される Gβγ 依存的なカリウム電流は膜電位を大きく過分極させると抑制機構がより強く働くことが分かった (図 1)。また pilocarpine の濃度を濃くすることによっても抑制機構が強くなることが分かった (図 1)。膜電位変化による抑制の制御は可逆的であり、抑制の増強と緩和はミリ秒から数秒のタイムレンジでダイナミックに起こることが分かった (図 2)。

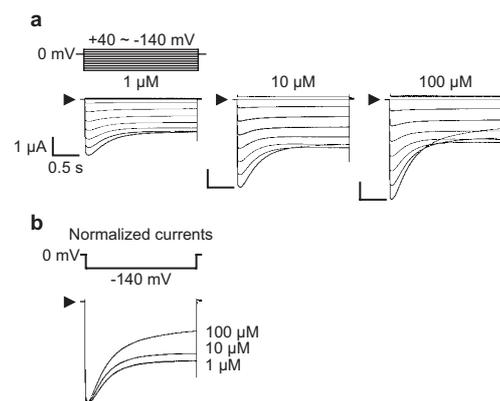


図 1. 膜電位の過分極によって抑制される pilocarpine 惹起カリウム電流の膜電位依存性とリガンド濃度依存性

アフリカツメガエル卵母細胞に m2R、Kir3.1、Kir3.4、RGS4 を発現させ、pilocarpine により活性化される GIRK 電流を測定

(a) 1-100 μM pilocarpine 活性化 GIRK 電流

(b) -140 mV への過分極パルス後の peak 値で標準化された pilocarpine 活性化 GIRK 電流

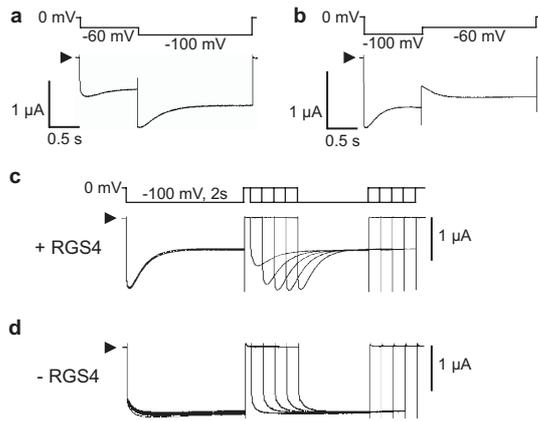


図 2.過分極による pilocarpine 惹起カリウム電流抑制の可逆性

アフリカツメガエル卵母細胞に m2R、Kir3.1、Kir3.4、RGS4 (d を除く) を発現させ、pilocarpine により活性化される GIRK 電流を測定

(a-d) 膜電位を変化させたときの pilocarpine 惹起カリウム電流の経時的変化の典型例

(2) m2R のリガンド依存的な RGS を介した抑制効果の評価

pilocarpine は m2R の部分活性化薬として知られているが、その他の m2R 部分活性化薬も同様の制御機構を引き起こすこと、薬物の種類によって抑制の強度に差があることを観察した (図 3)。

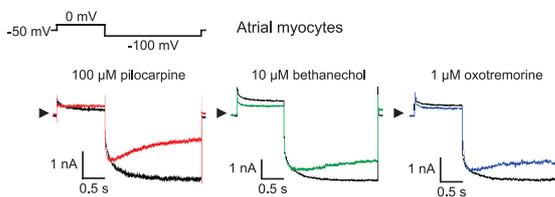


図 3.各種 m2R 部分活性化薬惹起カリウム電流

ラット単離心房筋細胞に飽和濃度の pilocarpine (100 μM)、bethanechol (10 μM)、oxotremorine (1 μM) を処置し、活性化される GIRK 電流を測定。黒いトレースは ACh (1 μM) による GIRK 電流

(3) RGS 依存的 GIRK 電流の抑制における m2R の膜電位センサーとしての関与
DRY motif と呼ばれる m2R を含むクラス A GPCR で保存された配列は、受容体のアゴニスト依存的な構造変化に関与することが良く知られているが、この部位に変異を入れると m2R の電位依存的な構造変化が抑制されることも報告されている。そこで我々も m2R の DRY motif に点変異を導入し、Pilocarpine 刺激下での細胞応答の電位依存性を評価した。その結果、この変異体では電位依存性が重篤に損なわれていた (図 4)。この結果から、RGS 依存的な GIRK 電流の抑制において m2R が膜電位センサーとして働いていると考えられた。

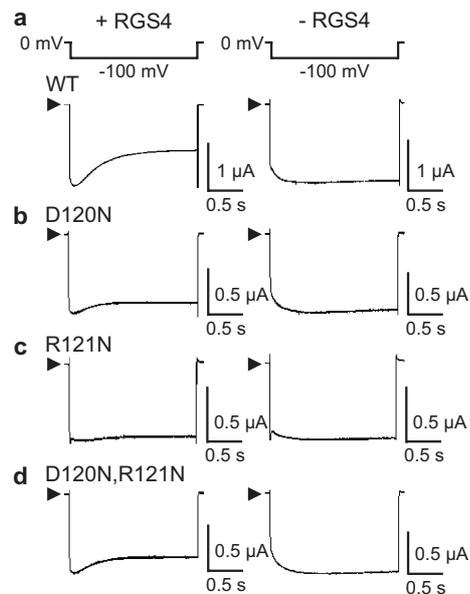


図 4.m2R DRY motif への変異導入による pilocarpine 惹起カリウム電流の電位依存性への影響

アフリカツメガエル卵母細胞に m2R の野生型もしくはその変異体、Kir3.1、Kir3.4、RGS4 (左カラムのみ) を発現させ、pilocarpine により活性化される GIRK 電流を測定

(4) m2R DRY motif 変異体のリガンド感受性の解析

(3) の項目で説明したように、m2R の DRY motif と呼ばれる部位に点変異を導入すると、この変異受容体を介したシグナル伝達では電位依存性が損なわれていた。この領域は受容体のアゴニスト依存的な構造変化に関与することが既に報告されており、我々は RGS4 による抑制機構が pilocarpine の濃度依存性を示す結果を得ていたことから (結果 1)、変異受容体を介したシグナル伝達の電位依存性の変化は受容体の pilocarpine への感受性の変化の結果起こっている可能性も考えられた。この可能性を調べるため、変異受容体の pilocarpine に対する応答性を解析したところ、野生型と差がないことが分かった (図 5)。

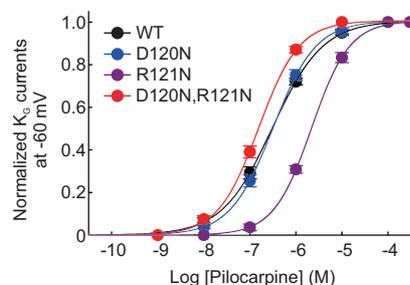


図 5.m2R DRY motif への変異導入による GIRK 活性化における pilocarpine 濃度依存性への影響

アフリカツメガエル卵母細胞に m2R の野生型もしくはその変異体、Kir3.1、Kir3.4、RGS4 を発現させ、pilocarpine により活性化される GIRK 電流を濃度依存的に測定

(5) m2R による RGS 制御の解析
 m2R による RGS 制御を調べるため、両者の相互作用の解析を目指した。G 蛋白質との相互作用に重要だとされる細胞内ループ 3 の変異体では、電位依存的な応答の定常に達するまでの速度が遅くなるが、変化する規模には影響はないという知見を得た (図 6)。m2R による RGS 制御の理解には、m2R、G 蛋白質、RGS4 の相互作用の解析が有効と考えられた。m2R と RGS4 の相互作用を生理学的に評価するため、蛍光でラベルした m2R と RGS4 間で蛍光相互相関分光法 (FCCS) や共鳴エネルギー移動 (FRET) 法による相互作用解析が可能か共同研究を行って検討した。FCCS では焦点を通過する蛍光粒子を解析するが、測定時間中、m2R は膜上でほとんど移動せず、退色が問題となった。FRET 解析では、今回我々が試したいいくつかのコンストラクトの組み合わせでは、膜電位を変化させても FRET 効率の有意な変化を認めなかった。m2R と RGS4 の相互作用を解析するためには他の解析手法が必要であることが分かった。

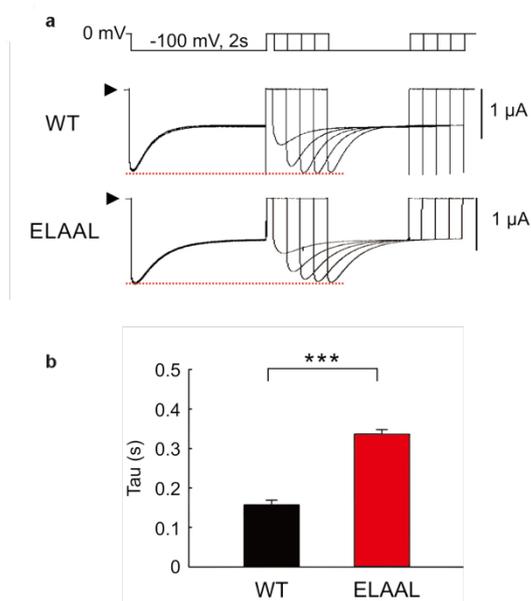


図 6. m2R C 末端側細胞内領域への変異導入による pilocarpine 惹起カリウム電流の電位依存性への影響
 アフリカツメガエル卵母細胞に m2R の野生型もしくははその変異体、Kir3.1、Kir3.4、RGS4 を発現させ、pilocarpine により活性化される GIRK 電流を測定
 (a) pilocarpine 惹起 GIRK 電流の典型例
 (b) 過分極によって引き起こされる電流の抑制を指数関数によってフィッティングし、求めた時定数 (Tau)

(6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望
 本研究によって、1) GPCR はリガンドおよび膜電位依存的に RGS を介して G 蛋白質シグナルを抑制する機能も有することが明確に示された。この成果は現在の GPCR の理解を拡張するものである。さらに、2) m2R 内の RGS 制御に関わる部位が見出された。この成果は、新しい GPCR 制御理論と G 蛋白質シグナル制御理論の基盤となる。また、3) 臨床でも重要な薬物が多い GPCR のパーシャルアゴニストの分子薬理学の理解を進め、創薬プロセスにも有益なデータを提供できた。これら 1) から 3) の成果は研究の立案時から予想されていたが、計画通りに研究は進展し、分野の発展に堅実に貢献できた。

GPCR の電位依存性は予てから関心を持たれてきたが、これまでリガンドとの結合が電位依存的に変化する現象が研究の対象であった。本研究は GPCR の下流での細胞内 G 蛋白質シグナル伝達レベルでの電位依存性を示しており、今後この研究テーマのモデル現象として更なる詳細な解析がされると期待される。本研究はこの現象の基礎的情報を提供した初めての研究として今後の研究に大きな影響を与えることが考えられる。

本研究は今後明らかにされるべきいくつかの明確な課題を提供した。膜電位が m2R の機能を変えるがその機構は十分明らかになっていない。電位依存的な m2R の構造が示唆され、DRY motif はその構造変化に影響するとみられる。膜電位は完全活性化薬と部分活性化の作用に影響する。これらの解明が今後の課題である。

RGS 依存的な G 蛋白質シグナルの制御がどのように調節されるか分かっていない。本研究から、m2R、G 蛋白質、RGS4 の相互作用がその理解に重要ではないかと考えられた。

他の GPCR でも RGS を介した膜電位依存的な G 蛋白質抑制機構が働くのかということもまだ明らかとなっていない。それを明らかにすることも今後の課題である。

本研究で解析した m2R 依存的な GIRK チャネルの活性化は心臓の拍動リズム制御の分子機構である。心筋細胞は自発的な脱分極を繰り返す、神経性の制御によってその電気生理学的な特性を変化させる。RGS を介した電位依存的な G 蛋白質シグナル伝達系の制御が、生理的、あるいは薬物投与時にどのような影響を与えるのかも今後の重要な課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

(1) Chen IS, Furutani K, Kurachi Y. Structural determinants at the M2 muscarinic receptor modulate the RGS4-GIRK response to pilocarpine by impairment of the receptor voltage sensitivity. *Sci Rep* 7(1), 6110, 2017
doi: 10.1038/s41598-017-05128-z.

(2) Furutani K, Tsumoto K, Kurachi Y. HD Physiology Project -Japanese Efforts to Promote Multilevel Integrative Systems Biology and Physiome Research-. *NPJ Syst Biol Appl* 3, 1, 2017
doi: 10.1038/s41540-016-0001-0

(3) Okamoto K, Emura N, Sato H, Fukatsu Y, Saito M, Tanaka C, Morita Y, Nishimura K, Kuramoto E, Xu Yin D, Furutani K, Okazawa M, Kurachi Y, Kaneko T, Maeda Y, Yamashiro T, Takada K, Toyoda H, Kang Y. The Possible Role of TASK Channels in Rank-Ordered Recruitment of Motoneurons in the Dorsolateral Part of the Trigeminal Motor Nucleus. *eNeuro* 3(3), e0138-16.2016 1-19, 2016
doi: 10.1523/ENEURO.0138-16.2016

(4) 古谷和春. インシリコ創薬の新展開～心臓安全性研究における基礎と応用の融合. *ファルマンシア* 50(12), 1138-1142, 2015

[学会発表] (計16件)

(1) Kazuharu Furutani. How our membrane voltage changes the ways drugs work. University of California Davis PMB Seminar. 2018年2月5日. University of California Davis (California, USA) (招待講演)

(2) Kazuharu Furutani. Multimodal Functions of the m2 Muscarinic Acetylcholine Receptor. Japanese San Francisco Bay Area Seminar 2017 Annual Joint Seminar. 2017年10月21日. University of California San Francisco (California, USA) (招待講演)

(3) 古谷和春, 津元国親, 倉智嘉久. 抗不整脈薬の hERG チャンネル阻害作用とファシリテーション作用: 分子機序と不整脈治療における意義. 第26回日本循環薬理学会. 2016年12月02日. 信州大学 (松本, 長野)

(4) Kazuharu Furutani, I-Shan Chen, Yoshihisa Kurachi. An essential role of RGS protein in partial agonism of the m2 muscarinic receptor-mediated K+ currents. ASCEPT-MPGPCR2016. 2016年11月28日. Melbourne Convention & Exhibition Centre (Melbourne, Australia)

(5) 陳以珊, 古谷和春, 倉智嘉久. m2 ムスカリン性アセチルコリン受容体を介したシグナル伝達のダイナミクスとその制御. 生理学研究所研究会「生体多元シグナルダイナミクスの計測と操作」. 2016年09月16日. 生理学研究所 (岡崎, 愛知) (招待講演)

(6) Kazuharu Furutani, Kunichika Tsumoto, I-Shan Chen, Kenichiro Handa, Yuko Yamakawa, Yoshihisa Kurachi. Effects of Class III Anti-Arrhythmic Agents that Induce Block and Facilitation of hERG Channel on Cardiac Action Potential: a Simulation Study. International and Interdisciplinary Symposium 2016. 2016年07月13日. Tokyo Medical and Dental University (東京) (招待講演)

(7) 古谷和春. 薬物-Kir チャンネル相互作用における特異性と共通性. 第一回イオンチャンネル研究会. 2016年07月07日. 福岡大学病院 (福岡, 福岡)

(8) 古谷和春, 津元国親, 倉智嘉久. 心機能障害時のシステム破綻現象. 明治大研究集会「生体と社会のシステム破綻現象」(招待講演). 2016年06月29日. 明治大中野キャンパス (東京) (招待講演)

(9) 古谷和春, 半田健一郎, 村上洋一, 木下賢吾, 倉智嘉久. 薬物による Kir1.1 チャンネル選択的阻害の構造基盤. 第129回日本薬理学会近畿部会. 2016年06月24日. 広島県医師会館 (広島, 広島)

(10) 古谷和春. 膜電位によって制御されるムスカリン M2 受容体依存的シグナル伝達. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「膜タンパク質の構造ダイナミクス」. 2016年05月13日. 大阪大学 (吹田, 大阪) (招待講演)

(11) 古谷和春, 半田健一郎, 村上洋一, 木下賢吾, 倉智嘉久. Kir1.1 チャンネルにおける小分子結合部位の構造活性相関解析. 第93回日本生理学会大会. 2016年3月24日. 札幌コンベンションセンター (札幌, 北海道)

(12) 古谷和春, 半田健一郎, 村上洋一, 木下賢吾, 倉智嘉久. 薬物による Kir1.1 チャンネル阻害の基盤. 第89回日本薬理学会年会. 2016年3月10日. パシフィコ横浜 (横浜, 神奈川県)

(13) 古谷和春, 倉智嘉久. カリウムチャネル制御 G タンパク質シグナルの電位依存性. 平成 27 年度筋生理の集い. 2015 年 12 月 19 日. 東京慈恵会医科大学 (東京) (招待講演)

(14) 古谷和春. TASK チャネルを標的とする低酸素応答機構. BMB2015 シンポジウム「低酸素バイオロジーの最前線; 細胞機能を制御する低酸素シグナル». 2015 年 12 月 4 日. 神戸国際会議場 (神戸, 兵庫) (招待講演)

(15) 古谷和春, 陳以珊, 倉智嘉久. m2 ムスカリン性アセチルコリン受容体を介したシグナル伝達の新しい制御. 日本生理学会第 108 回近畿生理学談話会. 2015 年 10 月 24 日. 近畿大学東大阪キャンパス (東大阪, 大阪)

(16) 古谷和春. TASK チャネルを標的とする低酸素応答機構に関する研究. 新学術領域研究「酸素生物学」第二回全体班会議. 2015 年 5 月 30 日. 京都大学 (京都, 京都) (招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古谷 和春 (FURUTANI, Kazuharu)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 40452437

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

倉智 嘉久 (KURACHI, Yoshihisa)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 30142011