

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18988

研究課題名(和文) パルミトイル化による β 3 アドレナリン受容体の脱感作と脂肪分解促進メカニズムの解明

研究課題名(英文) Functional roles of novel S-palmitoylation on beta 3-adrenergic receptor

研究代表者

足立 直子 (Adachi, Naoko)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・助教

研究者番号：70604510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)： β 3 アドレナリン受容体 (β 3 受容体)の活性化は脂質の代謝や熱産生を引き起こすなど重要な機能を持つにも関わらず、その活性化がどのようにオフ状態になるのかは不明な点が多い。本研究により、ヒトの β 3 受容体が新たに、パルミトイル化修飾(脂質修飾)を複数受けており、非パルミトイル化受容体では活性化レベルに減弱が見られること、また、 β 3 受容体自体の半減期が変化することが判明した。つまり β 3 受容体では、パルミトイル化状態の変化が、活性化状態を制御している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Palmitoylation is a reversible lipid modification contributing to the regulation of G-protein coupled receptor (GPCR) function. Despite its importance, palmitoylation status of the β 3-adrenergic receptor (β 3AR), a GPCR critical for lipid metabolism and thermogenesis, has never been determined. We report here that human β 3AR is palmitoylated on four cysteine residues at sites in second and third intracellular loop and at two sites in the C-terminal tail. Palmitoylation deficient mutant exhibited lowered cAMP production and ERK1/2 phosphorylation upon agonist stimulation indicating importance for downstream signaling. In addition, less palmitoylated receptor showed altered half-life. These results suggesting that multiple palmitoylations of human β 3AR regulate receptor functions.

研究分野：分子薬理学

キーワード：パルミトイル化 β 3 アドレナリン受容体 GPCR

1. 研究開始当初の背景

β_3 受容体は生体内ではノルアドレナリン・アドレナリンによって活性化される G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一種であり、脂肪細胞に強い発現が見られる。 β_3 受容体の活性化が脂肪代謝の引き金になることから、肥満や 2 型糖尿病の創薬のターゲットとして特異的なアゴニストが開発されてきた。しかしながら、これらのアゴニストはマウスの肥満モデルでは、優位に体重低下を引き起こしたが、ヒトでは有意な効果が見られず、ヒトとマウスの β_3 受容体に機能的な違いがあることが示唆されていた。

GPCR の多くはアゴニスト刺激により、細胞内領域がリン酸化され、受容体の内在化 (インターナリゼーション) を引き起こす。さらに、インターナリゼーションした受容体の一部は分解され、細胞質膜上の受容体数は減少する。これは、一般的に知られた GPCR の脱感作のメカニズムであり、さらなる受容体の活性化を遮断する。興味深いことに、 β_3 受容体はリン酸化部位を欠失しており、アゴニスト刺激による脱感作が起こらない。これまでに、アゴニスト刺激による mRNA レベルの多少の低下は報告されているが、 β_3 受容体の脱感作のメカニズムには不明な点が多い。

本研究では、多くの GPCR に見られる可逆的な脂質修飾であるパルミトイル化修飾に着目し研究を進めた。GPCR には C 末端に保存されたシステイン残基があり、1 個から数個のパルミトイル化修飾が付加されることが報告されている。 β_3 受容体ではこの保存されたシステイン残基 (ヒト; Cys361) のパルミトイル化修飾が予測されているが、実験的な報告は無く、その機能も不明である。

2. 研究の目的

今回、パルミトイル化による β_3 アドレナリン受容体 (β_3 受容体) の脱感作のメカニズムを提唱する。さらにヒトとマウス β_3 受容体のパルミトイル化修飾の違いに着目し、その機能的役割を解明する

3. 研究の方法

本研究では、N 末端側に Flag タグを融合したヒトまたは、マウス β_3 アドレナリン受容体のシステイン残基をアラニンに置換した変異体を恒常的に発現させた HEK293 細胞株を用いて、Acyl-RAC 法によりパルミトイル化修飾の同定を行った。また、受容体の活性化状態はセカンドメッセンジャーである cAMP の産生とその下流で活性化する ERK1/2 のリン酸化を指標に検討した。受容体の半減期を測定するためには、サイクロヘキサミドを 0, 2, 4, 8, 16 時間添加し、新規合成たんぱく質を停止したうえで、 β_3 AR の存在量をウエスタンブロットにより検出し、定量した。

4. 研究成果

(1) まず初めに、Flag-h β_3 AR を HEK293 細胞に発現させ、内在性のアゴニストであるアドレナリン・ノルアドレナリン、または、 β アゴニストであるイソプロテレノロール刺激を行ったところ、細胞内の cAMP 産生は引き起こされるが、受容体のインターナリゼーションは起こらず、細胞質膜上に局在したままであった。この時、コントロールとして同様に検討した β_2 受容体においてはアゴニスト依存的インターナリゼーションが確認された。一方で、アゴニスト前処置後に再刺激を行うと、 β_3 受容体は脱感作しており、cAMP の産生は見られなかった。そこで、アゴニスト前処置 16 時間後とアゴニスト処置を行っていないコントロール細胞の mRNA を回収し、DNA マイクロアレイにて解析を行った。

Gα proteins

Gene	Ratio Log2	Control	Mirabegron
GNAS	-0.06	186912	179383
GNAS	-0.02	88931	87953
GNAI1	0.21	2951	3414
GNAI2	0.25	50856	60356
GNAI3	0.32	2256	2814
GNAI3	-0.13	156	143
GNAI3	-0.47	973	702

Adenylate cyclase

Gene	Ratio Log2	Control	Mirabegron
ADCY1	-0.67	3541	2230
ADCY3	-0.26	41761	34896
ADCY4	-0.41	1059	799
ADCY6	-0.37	2446	1896
ADCY7	-0.11	213	197
ADCY9	-0.38	7261	5598

図1 DNA マイクロアレイ解析

結果、cAMP の産生に必須である GNAS にわずかな低下が見られ、また、cAMP 産生に抑制的に働く GNAI はわずかな増加が見られた。さらに、cAMP 産生酵素である ADCY においても、減少傾向が見られた。これらのデータは、確かに、アゴニスト前処置により cAMP の産生が抑制的働いていることを示しているが、cAMP の産生が全くおこらなくなっている現象についての説明はできなかった。そこで、次に GPCR では翻訳後修飾について着目した。

(2) 多くの GPCR では翻訳後修飾の一つであるリン酸化によって、受容体の脱感作が制御されているが、 β_3 受容体では、これらのリン酸化部位を欠失している。そこで、今回、可逆的な脂質修飾であるシステイン残基のパルミトイル化修飾に注目した。まず、ヒト β_3 AR にパルミトイル化阻害薬である 2-BP を処置すると、 β_3 AR の分解がリソソーム依存的に誘導された。一方で、マウス β_3 AR では 2-BP による分解誘導は起こらず、2-BP に耐性が見られた。そこで、 β_3 受容体のパルミトイル化状態を Acyl-RAC 法により検討した。結果、ヒト、マウス共に野生型 β_3 AR はヒドロキシルアミン依存的にパルミトイル化シグナルが検出され、今回初めて β_3 AR のパルミトイル化修飾を実験的に証明した。そこで、次に、修飾部位の同定を行った。結

果、マウス β_3 受容体では従来から予測されていた通り、C 末端領域の Cys 358 の一か所のパルミトイル化が検出された。一方で、ヒト β_3 受容体では、Cys153(2nd 細胞内ループ)、Cys 292(3rd 細部内ループ)、さらに、Cys 361、Cys363(C 末端領域)の合計 4 カ所にパルミトイル化修飾を持つことが分った。マウスを含め、多くの哺乳類においては、今回ヒトで同定したパルミトイル化修飾部位の内、C 末端領域以外のシステイン残基は保存されておらず、ヒト β_3 受容体では特異的にパルミトイル修飾の数が増加していることが判明した。

(3) 次に、今回同定したヒト β_3 AR の 4 つのパルミトイル化システインについて、アラニン置換変異体 (β_3 AR-C4A) を作製し細胞内の局在を免疫染色・共焦点レーザー顕微鏡を用いて野生型と比較観察した。結果、 β_3 AR-C4A は細胞質膜上の局在を示し、局在部位に大きな変化は見られなかったことから、 β_3 AR の細胞質膜局在にはパルミトイル化修飾が関与しないことが分った。また、 β_3 AR-C4A に対する 2-BP の効果を検討したところ、野生型と同様に β_3 AR-C4A の分解誘導が確認された。この結果より、2-BP による β_3 AR の分解誘導は β_3 AR 自身のパルミトイル化修飾に依存しておらず、ヒト β_3 AR 特異的な結合タンパク質のパルミトイル化制御により分解誘導を引き起こす可能性が示唆された。今後は、この結合タンパク質の探索が重要な課題として残されている。

(4) では、このパルミトイル化修飾はヒト β_3 受容体において、どのような役割をもつのだろうか？そこで、ヒト β_3 AR-C4A 変異体の、アゴニスト刺激による cAMP の産生量を測定した。結果、cAMP の産生量に有意な低下がみられ、さらに、アゴニスト刺激後の ERK1/2 のリン酸化の低下も確認された。

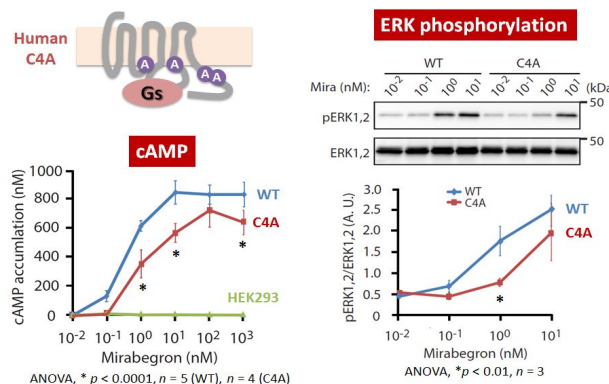


図2 パルミトイル化修飾による下流シグナルの変化

このことから、パルミトイル化修飾が、 β_3 受容体の下流シグナルに重要なことが判明した。今後は、4つのパルミトイル化修飾の内、どの部位の修飾が下流シグナルに影響を与えるのかについて検討を進めて行く必要がある。

(5) 次に、パルミトイル化修飾が β_3 受容体の半減期に及ぼす影響について検討した。ヒト β_3 受容体の半減期が 1.7 時間と比較的短いに対して、マウス β_3 受容体ではおよそ 3 時間程度を示した。そこで、ヒト β_3 受容体の 4 つのパルミトイル化修飾を 2 つに減らした変異体を作製し、半減期に対する影響を調べたところ、それぞれ、野生型と比較して、半減期が延長する傾向がみられた。

(6) パルミトイル化修飾はヒトでは 23 種の DHHC 酵素により付加されており、今回発見したヒト β_3 受容体の 4 つのパルミトイル化修飾は複数の DHHC によってそれぞれの部位に付加されている可能性がある。各 DHHC タンパク質には臓器・部位特異性があることから、 β_3 受容体のパルミトイル化状態は発現部位により異なっている可能性があり、今後は標的部位における詳細なパルミトイル化状態の解析が重要な課題である。

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 2件)

Adachi Naoko, Douglas T. Hess, Precious McLaughlin, Jonathan S. Stamler. S-Palmitoylation of a Novel Site in the β_2 -Adrenergic Receptor Associated with a Novel Intracellular Itinerary. J Biol Chem. 2016 Sep 16;291(38):20232-46. 査読有

Seiya Nakanishi, Hiromi M. Shiratori, Akari Kato, Wataru Kobayashi, Shinichi Machida, Takeshi Yasuda, Naoko Adachi, Naoaki Saito, Tsuyoshi Ikura, Hitoshi Kurumizaka, Hiroshi Kimura, Masayuki Yokoi, Wataru Sakai, Kaoru Sugawara. Xeroderma pigmentosum group C protein interacts with histones: regulation by acetylated states of histone H3. Genes Cells. 2017 Mar;22(3):310-327. 査読有

[学会発表](計 3件)

足立 直子, Douglas T. Hess, Precious McLaughlin, Jonathan S. Stamler 刺激依存的パルミトイル化修飾による β_2 アドレナリン受容体 (β_2 AR) の脱感作メカニズム、第 129 回日本薬理学会近畿部会、2016.6.24、広島医師会館(広島県)

Naoko Adachi, Douglas T. Hess, Precious McLaughlin, Jonathan S. Stamler, Agonist-induced S-palmitoylation of a novel site within the β_2 -adrenergic receptor is associated with a novel intracellular itinerary and mechanism of receptor desensitization, Biochemical Society, 2016.9.21, Oxford (UK)

足立 直子, 沼 知里、賀来 実嘉、上田 知永、上山 健彦、齋藤 尚亮、パルミトイル化修飾による β_3 アドレナリン受容体の機能制御 ヒトとマウスの違い 第 90 回日本薬理学会年会、2017.3.15 長崎ブリックスホール(長崎県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 直子 (Adachi Naoko)
神戸大学・バイオシグナル総合研究センター、
分子薬理分野・助教
研究者番号：70604510

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者 無し

(4) 研究協力者 無し