

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
研究期間：2017～2022
課題番号：16KK0181
研究課題名（和文）3アドレナリン受容体遺伝子多型が肥満・過活動膀胱に及ぼす影響と治療法の探索（国際共同研究強化）
研究課題名（英文）Exploration of the impact of beta3 adrenergic receptor gene polymorphism on overactive bladder(Fostering Joint International Research)
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） 11,200,000円
渡航期間： 1ヶ月

研究成果の概要（和文）：ベータ3アドレナリン受容体が、過活動膀胱に及ぼす影響を解析し、蓄尿/排尿時における膀胱の弛緩/収縮におけるアドレナリンと一酸化窒素（NO）に注目した。NOは、パルミトイル化修飾酵素であるDHHCタンパク質、また、脱パルミトイル化酵素を不活性化し、受容体のパルミトイル化修飾の代謝回転レベルを低下させた。その結果、受容体の細胞質膜上での発現低下と、下流で産生されるcAMPの低下を引き起こした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりヒトとマウスのベータ3アドレナリン受容体の機能的違いが、脂質翻訳後修飾であるパルミトイル化修飾によって引き起こされていることが明らかとなった。パルミトイル化修飾はヒトベータ3アドレナリン受容体の細胞質膜への発現を安定化させることで、細胞外からの応答性を増加している。この調節機構はマウスの受容体では見られず、疾患モデルを用いた研究では野生型マウスの使用は適していない。本研究ではヒトのベータ3アドレナリン受容体を発現するマウスの作製を行い、よりヒトの疾患に適した病態モデルマウスの作製を可能とすることを目指している。

研究成果の概要（英文）：The beta3 adrenergic receptor (beta3AR) was analyzed for its impact on overactive bladder, with the purpose of exploring treatment methods. Particularly, attention was focused on the role of adrenaline and nitric oxide (NO) in the relaxation/contraction of the bladder during urinary storage/voiding. NO was found to reduce the metabolic turnover of palmitoylation modification in beta3AR, through the inactivation of DHHC protein, an enzyme responsible for palmitoylation modification, as well as the de-palmitoylation enzyme. Consequently, this led to a decrease in receptor expression on the cytoplasmic membrane of beta3AR and a reduction in downstream cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production. It has been discovered that the effects of NO extend beyond vasodilation, impacting various palmitoylation-modified proteins, including human beta3AR.

研究分野：薬理学関連

キーワード：palmitoylation GPCR b3-adrenergic receptor

1. 研究開始当初の背景

β_3 アドレナリン受容体(β_3 AR)は脂肪組織に多く発現し、受容体の活性化が蓄積脂肪の放出や熱産生を引き起こすことから、肥満・ 2 型糖尿病の治療薬として多くの特異的アゴニストの開発が行われてきた。しかしながら、これらの薬剤は肥満モデルマウスでは体重減少を引き起こしたが、ヒトでの有意差が無く、ヒトとマウス β_3 AR の機能差異が示唆された。2011 年には、膀胱平滑筋 β_3 AR を標的として、ミラベグロンが過活動膀胱の治療薬として承認された。ミラベグロンはもともと抗肥満薬として開発された β_3 アゴニストで、平滑筋細胞の弛緩により蓄尿量を増大させる。さらに、ミラベグロンによるヒト褐色脂肪組織の活性上昇が報告され (Cell Metab, 2015)、これまでの β_3 アゴニストとは異なる作用機序をもつ可能性が示唆された。加えて、ヒト β_3 AR には遺伝子多型があり、64 番目のアミノ酸がトリプトファン型(W 型：野生型)とアルギニン型(R 型：多型)がある。日本人の約 20%は基礎代謝低下を引き起こすと報告された R 型を持つが、マウスはもともと R 型である。

我々は、これまでに可逆的な脂質翻訳後修飾であるパルミトイル化修飾がマウスとヒト β_3 AR で異なる部位に修飾すること、また、ミラベグロン刺激によりヒト β_3 AR は細胞質膜上での発現量が増加するが、マウス β_3 AR ではそのような応答は見られないことを見出している。これらのことからヒトとマウス β_3 AR には様々な機能差異があり、ミラベグロンはヒト β_3 AR 特異的な作用を持つ可能性がある。

2. 研究の目的

ヒト β_3 アドレナリン受容体遺伝子を持つマウスを作製し、受容体の活性化が鍵となる疾患との関連性を明らかにし、新たな治療戦略の提唱を行う

3. 研究の方法

1) ヒト化 β_3 AR 遺伝子改変マウスの作製：

β_3 AR の生理機能を研究するに当たり、疾患モデルマウスを用いた研究ではヒトには適用できない。そこで、2 ヒット 2 オリゴ法を用いて、ヒト β_3 AR 遺伝子をプロモーター領域ごと Rosa26 領域にノックインした遺伝子改変マウスを作製し、内在性 β_3 AR 遺伝子ノックアウトマウスと交配することで、マウスの β_3 AR をヒト型に置き換えたヒト化 β_3 AR マウスの作製を行う。

2) ヒトとマウス β_3 AR の機能差異の検討：

β_3 AR は様々な翻訳後修飾によって機能制御されているが、本研究では特に可逆的な脂質修飾であるパルミトイル化修飾とヒトの遺伝子多型に注目して機能差異を検討する。本実験は培養細胞レベルでの検討と、上記(1)で作製予定の遺伝子組換えマウスを用いて行う。

3) ヒト化 β_3 AR 病態マウスでの検討：

ヒト化 β_3 AR 遺伝子改変マウスを用いて、肥満・過活動膀胱などの病態モデルマウスを作製し、ミラベグロン刺激における β_3 AR の翻訳後修飾の変化・遺伝子多型の影響を検討する。

4. 研究成果

1) ヒト化 β_3 AR 遺伝子改変マウスの作製：

大阪大学大学院医学系研究科附属動物実験施設との共同研究にてマウス Rosa26 領域にヒト β_3 AR 遺伝子をヒトヒト β_3 AR プロモーター領域ごと挿入するノックインマウスの作製を行い、得られた F1 マウスのヒト β_3 AR 遺伝子の挿入は確認できた。一方で、 β_3 AR がヒトで発現している臓器である脂肪組織、膀胱、またはその他の臓器(肝臓、腎臓、肺、心臓、小腸、大腸)にてタンパク質レベルでの発現をスクリーニングした。結果は、ヒト β_3 AR 遺伝子の発現レベルが非常に低く、アゴニストに対する応答性も低かった。現在、挿入するプロモーター領域の長さを変えることで発現レベルを上昇させたマウスの作製を継続している。

2) ヒトとマウス β_3 AR の機能差異の検討：

米国 Case Western Reserve University School of Medicine の Hess 博士との共同研究にて、ヒトとマウス β_3 AR のパルミトイル化修飾の違いが受容体機能に及ぼす影響を明らかにし研究論文の発表を行った(Adachi et al, JBC, 2019)。 β_3 AR は GPCR の一種で多くの GPCR は C 末端に保存されたシステイン残基を有し、パルミトイル化修飾を受けることが知られている。予測通り、マウス β_3 AR はこのシステイン残基にパルミトイル化修飾が付加されることが判明した。一方、ヒト β_3 AR では、この部位を含めて最大で 4 か所のシステイン残基がパルミトイル化修飾を受けていた。そこで、これらのシステイン残基に変異を導入し、非パルミトイル化修飾 β_3 AR を作製し、下流シグナルへの影響を検討した。結果、ヒト β_3 AR の非パルミトイル化型では、ミラベグロン刺激後の cAMP の産生が有意に低下したが、マウス β_3 AR の非パルミトイル化型では、cAMP の産生に変化はなかった。これは、ヒト β_3 AR では 4 つのパルミトイル化修飾により細胞質膜上への局在が安定化し、細胞外からの刺激に応答するためである。一方、マウス β_3 AR のパルミトイル化修飾は一カ所のみであり、パルミトイル化修飾は細胞質膜上への局在に大きな影響を

与えなかった。

3) ヒト化 β_3 AR 病態マウスでの検討:

当初は(1)で作製しているヒト化 β_3 AR マウスを用いて病態モデルマウスを作製し検討を行う予定であったが、作製が難航したため野生型マウスと培養細胞を用いて検討を米国 Case Western Reserve University School of Medicine の Hess 博士との共同研究にて行った。本研究は現在未発表データであり、論文執筆中である。

蓄尿/排尿時における膀胱体部の弛緩/収縮と、出口部である膀胱頸部と尿道における収縮/弛緩は、様々な神経伝達物質によって調節されているが、我々はアドレナリンと一酸化窒素(NO)に注目した。興味深いことに、細胞内にNOを産生させると、 β_3 ARのPALMITOYL化レベルが低下し、それに伴い、細胞質膜上での発現低下と、下流で産生されるcAMPの低下が観察された。この現象は、膀胱平滑筋においては、 β_3 AR刺激により、NOが産生され、PALMITOYL化修飾酵素であるDHHCタンパク質と、脱PALMITOYL化酵素の不活性化を引き起し、 β_3 ARのPALMITOYL化修飾の代謝回転レベルが低下するためであることが判明した。これまでの知見より、この変化はヒト β_3 ARではより大きな影響を与えることが示唆される。既に前立腺肥大症に伴う排尿障害改善剤として、NOを誘導する薬剤の使用が行われているが、NOの作用は、血管の弛緩効果のみならず、ヒト β_3 ARを含むPALMITOYL化修飾タンパク質全般に影響を及ぼすことが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Adachi N, Hess DT, Kaku M, Ueda C, Numa C, Saito N.	4. 巻 15;294(7)
2. 論文標題 Differential S-palmitoylation of the human and rodent 3-adrenergic receptors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 2569-2578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.004978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Niki Yoko, Adachi Naoko, Fukata Masaki, Fukata Yuko, Oku Shinichiro, Makino-Okamura Chieko, Takeuchi Seiji, Wakamatsu Kazumasa, Ito Shosuke, Declercq Lieve, Yarosh Daniel B., Mammone Tomas, Nishigori Chikako, Saito Naoaki, Ueyama Takehiko	4. 巻 143
2. 論文標題 S-Palmitoylation of Tyrosinase at Cysteine500 Regulates Melanogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 317 ~ 327.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2022.08.040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Fonseca Fabio V., Raffay Thomas M., Xiao Kunhong, McLaughlin Precious J., Qian Zhaoxia, Grimmett Zachary W., Adachi Naoko, Wang Benlian, Hausladen Alfred, Cobb Brian A., Zhang Rongli, Hess Douglas T., Gaston Benjamin, Lambert Nevin A., Reynolds James D., Premont Richard T., Stamler Jonathan S.	4. 巻 82
2. 論文標題 S-nitrosylation is required for 2AR desensitization and experimental asthma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 3089 ~ 3102.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2022.06.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 足立直子, Douglas T. Hess, 上田知永, 賀来美嘉, 齋藤尚亮
2. 発表標題 S-パルミトイル化修飾による 3アドレナリン受容体の機能調節
3. 学会等名 第133日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoko Adachi, Douglas T. Hess, Izumi Koganemaru, Takehiko Ueyama, Naoaki Saito
2. 発表標題 Global Regulation of Protein S-palmitoylation by Nitric Oxide
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仁木洋子、足立直子、深田正紀、深田優子、錦織千佳子、齋藤尚亮、上山健彦
2. 発表標題 チロシナーゼのPALMITOYL化修飾によるメラニン合成制御機構
3. 学会等名 第141回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ヘス ダグラス (Hess Douglas)	米国ケースウエスタン大学・Institute for Transformative Molecular Medicine and Department of Medicine・Associate Professor	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Case Western Reserve University			
米国	Estee Lauder Companies			