

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08595

研究課題名(和文) 遺伝子多型を有するヒト化 3アドレナリン受容体マウスの作製と関連疾患の解明

研究課題名(英文) Analysis of differential S-palmitoylation of the human and rodent beta3 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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ベータ3アドレナリン受容体(3AR)が肥満・2型糖尿病・過活動膀胱に及ぼす影響を明確にするため、3ARの翻訳後修飾であるパルミトイル化に注目した。興味深いことに、ヒトとマウス3ARのパルミトイル化修飾様式は大きく異なり、特異的アゴニスト、ミラベグロンによる細胞質膜上における受容体発現量の増加機構も大きく異なる事が判明した。他の受容体と異なり、刺激依存的・リン酸化修飾依存的な内在化を起こさない代わりに、パルミトイル化修飾の状態が細胞質膜上での受容体の安定性に重要なことが判明した。また、ヒト化3AR受容体をプロモーターごとマウスにノックインしヒト3ARの解析をマウスにて行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、肥満・2型糖尿病・過活動膀胱の病態に重要な役割を持つ3アドレナリン受容体の解析の多くはマウスやラットなどげっ歯類を用いて行われていたが、本研究によりヒトとげっ歯類の3アドレナリン受容体の調節機構には大きな違いがあることが判明した。このことより、ヒトの病態を再現するために、ヒト化3アドレナリン受容体を持つマウスを作製し解析することの重要性を示した。

研究成果の概要(英文)：To clarify the functions and effects of beta-3 adrenergic receptor (3AR) on obesity, type II diabetes and overactive bladder, we focused on S-palmitoylation, a post-translational modification of 3AR. Interestingly, number and sites of palmitoylation modifications of human and mouse 3AR are distinct, and the mechanism of the increase in receptor expression on the plasma membrane by a 3AR specific agonist, mirabegron, is also distinct. Multiple S-palmitoylation of different sites differentially regulates the human 3AR, and differential S-palmitoylation distinguishes human and rodent 3ARs, potentially contributing to species-specific differences in the clinical efficacy of 3AR-directed pharmacological approaches to disease. In addition, we have generated and analyzed humanized 3AR knock-in mice to clarify the pathophysiological relevances of differential S-palmitoylation on 3AR.

研究分野：薬理学

キーワード：ベータ3アドレナリン受容体 パルミトイル化 翻訳後修飾 ADRB3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

$\beta 3$ アドレナリン受容体($\beta 3AR$)は脂肪組織に多く、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・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、ヒトでの効果が無く、ヒトとマウス $\beta 3AR$ のアゴニストに対する応答性の差異が示唆された。一方で、膀胱平滑筋に存在する $\beta 3AR$ 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 2011 年に承認された。ミラベグロンはもともと抗肥満薬として開発された $\beta 3$ 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)、他の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。

他の β 受容体が刺激依存的なリン酸化を受けて内在化(インターナリゼーション)し、脱感作するのに対して、C 末端領域・細胞内ドメイン内のリン酸化部位を欠失している。このことから、 $\beta 3AR$ はどのように細胞質膜上での受容体の発現量・活性化・脱感作を調節しているのかは不明な点が多い。

2. 研究の目的

$\beta 3$ アドレナリン受容体($\beta 3AR$)のヒト化マウスを作製し、遺伝子多型が肥満・型糖尿病・過活動膀胱に及ぼす影響を明確にする。さらに、 $\beta 3AR$ 特異的アゴニスト、ミラベグロンによる受容体発現量の増加機構と、パルミトイル化修飾阻害薬による受容体の分解機構を解明し、 $\beta 3AR$ の発現量を薬剤にてコントロール可能にし、各種疾患の新たな治療戦略の可能性を探る。

3. 研究の方法

ヒト化 $\beta 3AR$ マウスの作製

$\beta 3AR$ ヒト化マウスとして、2 ヒット 2 オリゴ法を用いて、ヒト $\beta 3AR$ 遺伝子のプロモーター・エキソン・イントロン領域をまるごとマウスの Rosa26 領域にノックインした遺伝子改変マウスの作製を行った。これは、マウスの内在性 $\beta 3AR$ 遺伝子と外来性ヒト $\beta 3AR$ 遺伝子を同一個体で比較・検討できる利点がある。また、作製したマウスを $\beta 3AR$ ノックアウトマウスと交配させることで、ヒト化 $\beta 3AR$ 遺伝子のみを発現するヒト化 $\beta 3AR$ マウスの作製が可能となる。

ヒト $\beta 3AR$ ・マウス $\beta 3AR$ の機能解析

HEK293 細胞にヒトとマウスの $\beta 3AR$ 遺伝子を恒常的に発現する細胞株をクローニングし、Acyl-RAC 法 (Forrester et al, J Lipid Res. 2011 Feb; 52(2): 393-398) を用いてパルミトイル化タンパク質を特異的に精製し、ウエスタンブロットにより解析した。ヒト $\beta 3AR$ は複数のパルミトイル化システイン残基を持っていたことから、QuikChange Mutagenesis によりシステイン残基をアラニンに置換した変異体を複数作製し解析した。 $\beta 3AR$ の活性化状態を検討するために、特異的アゴニストミラベグロン添加後 5 分後の細胞内での cAMP 産生量を cAMP Parameter Assay Kit (R&D System) を持ちいて測定した。細胞質膜上での $\beta 3AR$ の発現量は細胞を生きた状態で抗体染色することにより、 $\beta 3AR$ の細胞質外ドメインを標識し(この時、細胞内に留まっている $\beta 3AR$ は標識されない) フローサイトメーターにて定量した。

4. 研究成果

ヒト化 $\beta 3AR$ マウスの作製

2 ヒット 2 オリゴ法を用いて、ヒト $\beta 3AR$ 遺伝子をプロモーター領域ごとノックインした遺伝子改変マウスの作製を行った。遺伝子導入に用いる組換えベクターを作製し、受精卵に注入後、仮親に移植したところ、ヒト $\beta 3AR$ 遺伝子の全長が mRosa26 領域に挿入された系統が 4 ライン得られた。そこで、ヒトで $\beta 3AR$ 遺伝子発現が確認されている白色脂肪組織・褐色脂肪組織・腎臓・膀胱の各臓器における $\beta 3AR$ タンパク質発現の確認をするために、ヒト $\beta 3AR$ 特異的抗体を用いて、ウエスタンブロットを行った。結果、どのラインにおいても、ヒト $\beta 3AR$ の発現は確認できなかった。そこで、今後は次の 3 つの解析を行う必要がある。1) ヒト $\beta 3AR$ の mRNA 発現の確認を行う。2) ヒト $\beta 3AR$ 遺伝子をホモ接合体でもつ個体を作製し、各臓器での $\beta 3AR$ の発現確認を行う。3) $\beta 3AR$ 特異的アゴニストであるミラベグロンが $\beta 3AR$ のタンパク質発現量を上昇させることから、マウスにミラベグロンを経口投与後、一定時間を置いたのち、上記と同様に各臓器における $\beta 3AR$ の発現の確認を行う必要がある。

ヒト $\beta 3AR$ ・マウス $\beta 3AR$ の機能解析

培養細胞を用いてヒトとマウス $\beta 3AR$ の機能解明を進めた。以下の点について、ヒトとマウスの $\beta 3AR$ における種間の差を明らかにした。

パルミトイル化修飾の状態。ヒト 4 カ所、マウス 1 カ所。ヒトβ3AR においては、4 カ所それぞれがβ3AR の機能にどのような影響を与えるかについての解析を行った。

脱パルミトイル化による受容体への影響。ヒト：cAMP 産生能低下、マウス：cAMP 産生能に影響を与えない。ヒトにおいては C 末端部位のパルミトイル化が cAMP 産生能に特に重要であることが判明した。

細胞質膜上での受容体半減期への影響。ヒトではパルミトイル化されることで受容体の半減期が伸びるが、マウスでは影響をうけない。ヒトβ3AR において、特に C 末端部位のパルミトイル化が特に重要であることが判明した。さらに、アゴニストによる受容体の内在化を起こさないβ3AR において、どのようなメカニズムで受容体が細胞質膜上から取り除かれているのかを明らかにするために解析を行い、リソソームへの輸送経路を明らかにした。

ミラベグロンによる細胞質膜上での安定化。ヒトβ3AR 発現細胞にミラベグロンを添加すると可逆的に発現量が 2.5 倍量程度上昇した。この現象はマウスβ3AR 発現細胞では起こらず、また、内在性のアゴニストであるアドレナリン・ノルアドレナリンや、これまでに開発されてきたβ3 アゴニスト IC316243、強力なβアゴニスト Isoproterenol 添加時では、ヒトβ3AR の細胞質膜上での安定化は起こらなかったことから、ミラベグロンには、特異的にヒトβ3AR を安定化する働きがあることを確認した。この結果は、ミラベグロンがこれまで開発されたβ3 アゴニストとはことなる作用機序を持つことを示している。

結果的に、ヒトとマウスのβ3AR は翻訳後修飾であるパルミトイル化修飾の状態が大きく異なり、特にヒトβ3AR ではパルミトイル化修飾の変化により下流シグナルの活性化状態が変化することが判明した。また、既に過活動膀胱の治療薬として承認されているミラベグロンは特異的にヒトβ3AR のタンパク質量を細胞質膜上で上昇させ、他のアゴニストとは異なる作用をβ3AR に及ぼしていることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0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

〔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
研究 分 担 者	吉野 健一 (Yoshino Ken-ichi) (90280792)	神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・助教 (14501)	