

平成 21 年 5 月 21 日現在

|                     |                                                                                       |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 研究種目：基盤研究 (B)       |                                                                                       |
| 研究期間：2006 年～2008 年度 |                                                                                       |
| 課題番号：18390072       |                                                                                       |
| 研究課題名 (和文)          | エンドセリン受容体により直接活性化される新規シグナル分子群の網羅的検索                                                   |
| 研究課題名 (英文)          | Search for novel signal molecules which are directly activated by endothelin receptor |
| 研究代表者               | 三輪 聡一 (MIWA SOICHI)                                                                   |
|                     | 北海道大学・大学院医学研究科・教授                                                                     |
|                     | 研究者番号：40157706                                                                        |

## 研究成果の概要：

我々は、酵母ツーハイブリッド法を用いて成人ヒト心臓 cDNA ライブラリーから新規エンドセリン A 型受容体 C 末端領域(ET<sub>A</sub>R C-tail)結合蛋白質として Jab1 を単離・同定した。Jab1 は ET<sub>A</sub>R のユビキチン化、リソソームでの蛋白質分解を亢進させて ET<sub>A</sub>R レベルを調節していることを明らかにした。さらに、アゴニストである ET-1 で ET<sub>A</sub>R を刺激するとアゴニスト誘導性の蛋白質分解が引き起こされ、ET<sub>A</sub>R レベルは時間依存的に減少していく一方、ET<sub>A</sub>R に結合している Jab1 量が増加すること、また ET<sub>A</sub>R より代謝回転が速いエンドセリン B 型受容体 (ET<sub>B</sub>R) では、ユビキチン化が亢進し、より多くの Jab1 と結合していることが明らかになった。これらの結果より、Jab1 とエンドセリン受容体との結合様式とエンドセリン受容体の蛋白質分解に強い関連性が認められた。

## 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2006 年度 | 6,100,000  | 1,830,000 | 7,930,000  |
| 2007 年度 | 4,300,000  | 1,290,000 | 5,590,000  |
| 2008 年度 | 4,300,000  | 1,290,000 | 5,590,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 14,700,000 | 4,410,000 | 19,110,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：酵母ツーハイブリッド法、エンドセリン受容体、Jab1、蛋白質分解、ユビキチン化

## 1. 研究開始当初の背景

一般的に、GPCR (G protein-coupled receptor) を介した細胞内へのシグナル伝達はヘテロ三量体 G 蛋白質を介して行われると考えられているが、ヘテロ三量体 G 蛋白質

のみを介するという概念では説明できない現象が報告されるようになっていた。GPCR のカルボキシ末端領域 (GPCR C-tail) を欠損あるいは変異させた変異型 GPCR や細胞内動態の異なる 2 つの GPCR の C-tail を互換させた

キメラ型 GPCR を用いた研究から GPCR C-tail に結合しているヘテロ三量体 G 蛋白質以外の蛋白質群が GPCR 自身の細胞内動態やシグナル伝達を制御していることが示唆されていた。実際に酵母ツーハイブリッド法や GST pull-down アッセイを用いて幾つかの GPCR C-tail 結合蛋白質が同定され、それらにより細胞内シグナル伝達や GPCR 自身の細胞内動態が制御されていることが報告され始めていた。しかし、エンドセリン結合蛋白質に関してはほとんど報告されておらず、その細胞内シグナル伝達や細胞内動態の制御機構は全く不明であった。

## 2. 研究の目的

酵母ツーハイブリッド法を用いて、新規 ET<sub>A</sub>R C-tail および ET<sub>B</sub>R C-tail 結合蛋白質群を網羅的に単離・同定し、細胞内シグナル伝達や ET<sub>A</sub>R, ET<sub>B</sub>R 自身の細胞内動態の制御機構を解明する。

## 3. 研究の方法

酵母ツーハイブリッド法を用いて、ET<sub>A</sub>R C-tail および ET<sub>B</sub>R C-tail をベイトとした成人ヒト心臓 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行い、10 数種類のエンドセリン受容体結合蛋白質を同定した。これらの中に Jab1 を見出し、Jab1 によるエンドセリン受容体の細胞内動態の変化や細胞内シグナル伝達に対する影響について検討した。

## 4. 研究成果

エンドセリン受容体結合蛋白質である Jab1 は ET<sub>A</sub>R のユビキチン化、リソソームでの蛋白質分解を亢進させて ET<sub>A</sub>R レベルを調節していることを明らかにした。以下に具体的な研究成果を示す。

- ① ET<sub>A</sub>R と Jab1 の蛋白質間相互作用を yeast two-hybrid test、GST pull-down、免疫沈降法により確認した。
- ② 細胞膜近傍で ET<sub>A</sub>R と Jab1 は共局在していた。
- ③ Jab1 過剰発現により ET<sub>A</sub>R 発現レベルの減少、Jab1 siRNA を用いた Jab1 ノックダウンにより ET<sub>A</sub>R 発現レベルの上昇、さらに細胞膜上の ET<sub>A</sub>R 発現レベルの上昇が認められた。
- ④ ET-1 刺激による ERK1/2 リン酸化の変動は、ET<sub>A</sub>R 発現レベルの変化と挙動を共にした。

- ⑤ Jab1 過剰発現下で新規蛋白質合成阻害剤である cycloheximide で処理したところ、ET<sub>A</sub>R 蛋白質の分解速度が促進した。
- ⑥ ET<sub>A</sub>R はリソソームおよびプロテアソームで分解されており、Jab1 過剰発現により、リソソームでの ET<sub>A</sub>R の分解が促進した。
- ⑦ Jab1 により ET<sub>A</sub>R のユビキチン化が促進した。
- ⑧ アゴニストである ET-1 で ET<sub>A</sub>R を刺激するとアゴニスト誘導性の蛋白質分解が引き起こされ、ET<sub>A</sub>R レベルは時間依存的に減少していく一方、ET<sub>A</sub>R に結合している Jab1 量が増加した。
- ⑨ ET<sub>A</sub>R より代謝回転が速いエンドセリン B 型受容体 (ET<sub>B</sub>R) では、ユビキチン化が亢進し、より多くの Jab1 と結合していた。

これらの結果より、Jab1 とエンドセリン受容体との結合様式とエンドセリン受容体の蛋白質分解に強い関連性が認められた。

## 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 13 件)

1. Horinouchi T, Morishima S, Tanaka Y, Koike K, Miwa S, Muramatsu I, Pharmacological evaluation of ocular beta-adrenoceptors in rabbit by tissue segment binding method, *Life Sciences*, 84(5-6):181-187 頁、2009 年、査読有
2. Horinouchi T, Miyake Y, Nishiya T, Nishimoto A, Morishima S, Muramatsu I, Miwa S, Functional role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in Ca<sup>2+</sup> influx mediated via human endothelin type A receptor stably expressed in Chinese hamster ovary cells, *J Pharmacol Sci*, 107(4):456-459 頁、2008 年、査読有
3. 三輪聡一、ホルモンの病態異常と検査 9.血管制御因子 2)エンドセリン、臨床検査、第 52 巻、1287-1294 頁、2008 年、査読無
4. Horinouchi T, Miyake Y, Nishiya T, Nishimoto A, Yorozu S, Jinno A, Kajita E, Miwa S, Characterization of noradrenaline-induced increases in intracellular Ca<sup>2+</sup> levels in Chinese hamster ovary cells stably

- expressing human  $\alpha_{1A}$ -adrenoceptor, *J Pharmacol Sci*, 105(1)103-111 頁、2007 年、査読有
5. Nishiya T, Kajita E, Horinouchi T, Nishimoto A, Miwa S, Distinct roles of TIR and non-TIR regions in the subcellular localization and signaling properties of MyD88, *FEBS Lett*, 581(17)3223-3229 頁、2007 年、査読有
  6. Maekawa S, Mori D, Nishiya T, Takikawa O, Horinouchi T, Nishimoto A, Kajita E, Miwa S, OCTN2VT, a splice variant of OCTN2, does not transport carnitine because of the retention in the endoplasmic reticulum caused by insertion of 24 amino acids in the first extracellular loop of OCTN2, *Biochim Biophys Acta (Mol Cell Res)*, 1773(6)1000-1006 頁、2007 年、査読有
  7. Akiyama Y, Miwa S, Improvement of postischemic dopaminergic dysfunction by edaravone, a free radical scavenger, *J Pharmacol Sci*, 104(1)99-102 頁、2007 年、査読有
  8. Horinouchi T, Nishimoto A, Nishiya T, Lu L, Kajita E, Miwa S, Endothelin-1 decreases  $[Ca^{2+}]_i$  via  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger in CHO cells stably expressing endothelin ET<sub>A</sub> receptor, *Eur J Pharmacol*, 566(1-3)28-33 頁、2007 年、査読有
  9. Horinouchi T, Morishima S, Tanaka T, Suzuki F, Tanaka Y, Koike K, Miwa S, Muramatsu I, Different changes of plasma membrane  $\beta$ -adrenoceptors in rat heart after chronic administration of propranolol, atenolol and bevantolol, *Life Sci*, 81(5)399-404 頁、2007 年、査読有
  10. 三輪聡一, 堀之内孝広, 西本新, 西屋禎, 循環系調節因子としてのエンドセリンにより活性化される細胞内カルシウムシグナルとその調節系、*適応医学* 11(2)34-41頁、2007年、査読有
  11. Nagai K, Takikawa O, Kawakami N, Fukao M, Soma T, Oda A, Nishiya T, Hayashi M, Lu L, Nakano M, Kajita E, Fujita H, Miwa S, Cloning and functional characterization of a novel up-regulator, cartregulin, of carnitine transporter, OCTN2, *Arch Biochem Biophys*, 452(1)29-37 頁、2006 年
  12. Kajita E, Nishiya T, Miwa S, The transmembrane domain directs TLR9 to intracellular compartments that contain TLR3, *Biochem Biophys Res Commun*, 343(2)578-584 頁、2006 年、査読有
  13. Nishiya T, Kajita E, Miwa S, Ligand-independent oligomerization of TLR4 regulated by a short hydrophobic region adjacent to the transmembrane domain, *Biochem Biophys Res Commun*, 341(4)1128-1134 頁、2006 年、査読有
- [学会発表] (計 3 3 件)
1. 堀之内孝広, リガンド依存性に活性化される  $\beta_3$ -アドレナリン受容体シグナリングの多様性、第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 17 日、横浜
  2. 西本新, 受容体結合蛋白質によるエンドセリン受容体の発現レベル調節、第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 17 日、横浜
  3. 西本新, エンドセリンA型受容体(ET<sub>A</sub>R)結合蛋白質Jab1 は、ET<sub>A</sub>Rのユビキチン化とリソソームでの分解を促進し、その細胞膜表面のレベルと細胞内シグナル伝達を制御する、第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16 日、横浜
  4. 堀之内孝広, 心筋  $\beta$ -アドレナリン受容体発現量に対する  $\beta$ -アドレナリン受容体遮断薬長期投与の影響: 組織片を用いた受容体結合実験法による定量的解析、第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16 日、横浜
  5. 堀之内孝広, エンドセリンA型受容体により誘発される持続性  $Ca^{2+}$  流入の分子機構、第 18 回日本循環薬理学会、2008 年 11 月 21 日、千葉
  6. 西本新, 新規エンドセリンA型受容体(ET<sub>A</sub>R)結合蛋白質Jab 1 によるET<sub>A</sub>Rレベルの調節、第 18 回日本循環薬理学会、2008 年 11 月 21 日、千葉
  7. 西本新, エンドセリンA型受容体(ET<sub>A</sub>R)

結合蛋白質Jab1によるETAR蛋白質分解制御機構の解明、第59回日本薬理学会北部会、2008年9月27日、仙台市

8. 三宅由美恵、エンドセリンA型受容体を介した細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇反応に關与するシグナルカスケードの多様性、第59回日本薬理学会北部会、2008年9月27日、仙台市
9. 西本新、エンドセリンA型受容体結合蛋白質によるエンドセリンA型受容体蛋白質の分解制御機構の解明、第81回日本薬理学会年会、2008年3月、横浜
10. 堀之内孝広、Gタンパク質共役型受容体を介して引き起こされる持続性Ca<sup>2+</sup>流入の分子メカニズム、第81回日本薬理学会年会、2008年3月、横浜
11. 三宅由美恵、α<sub>1A</sub>-アドレナリン受容体を介して活性化されるCa<sup>2+</sup>シグナリングの分子メカニズム、第81回日本薬理学会年会、2008年3月、横浜
12. 西屋禎、MyD88の細胞局在とシグナル伝達におけるTIRドメインとそれ以外の領域の機能的差異、第128回日本薬学会年会、2008年3月、横浜
13. Tadashi Nishiya、Distinct roles of TIR and non-TIR regions in the subcellular localization and signaling properties of MyD88、第37回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月、東京
14. 西本新、エンドセリンA型受容体(ETAR)の蛋白質分解における新規結合蛋白質Jab1の役割、第17回日本循環薬理学会、2007年11月、大阪
15. 堀之内孝広、Gタンパク質共役型受容体を介した持続性Ca<sup>2+</sup>濃度上昇反応の分子メカニズム、第17回日本循環薬理学会、2007年11月、大阪
16. 西屋禎、MyD88の細胞局在及びシグナル伝達におけるTIRドメインとnon-TIR領域の機能的差異、第58回日本薬理学会北部会、2007年9月、札幌
17. 前川聡、有機カチオントランスポーターOCTN2のバリエーション体の単離と機能解析、第58回日本薬理学会北部会、2007年9月、札幌
18. 西本新、エンドセリンA型受容体(ETAR)の蛋白質分解における新規結合蛋白質Jab1の役割、第58回日本薬理学会北部会、2007年9月、札幌
19. 三宅由美恵、α<sub>1A</sub>-アドレナリン受容体を介した細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇反応の分子メカニズム、第58回日本薬理学会北部会、2007年9月、札幌
20. 朝野拓史、タバコ煙による細胞障害の性状解析、第58回日本薬理学会北部会、2007年9月、札幌
21. 三輪聡一、循環器系調節因子としてのエンドセリンにより活性化される細胞内カルシウムシグナルとその調節系、第11回日本適応医学会学術集会、2007年6月、札幌
22. 西本新、新規エンドセリンA型受容体結合蛋白質Jab1は、その受容体発現レベルとシグナル伝達を制御する、第11回日本適応医学会学術集会、2007年6月、札幌
23. 堀之内孝広、エンドセリンA受容体刺激によって活性化されるCa<sup>2+</sup>シグナリングにおけるNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換機構の役割、第80回日本薬理学会年会、2007年3月、名古屋
24. 西本新、新規エンドセリンA型受容体結合蛋白質Jab1は、その受容体発現レベルとシグナル伝達を制御する、第80回日本薬理学会年会、2007年3月、名古屋
25. 梶田絵美、MyD88の細胞局在、シグナル伝達、およびToll様受容体との相互作用に關与する分子内領域の解析、第80回日本薬理学会年会、2007年3月、名古屋
26. Soichi Miwa、MOLECULAR MECHANISMS FOR Ca<sup>2+</sup> SIGNALING ACTIVATED BY ENDOTHELIN-1, The 5th US/Japan Workshop on Molecular and Cellular Aspects of Vascular Smooth Muscle Function, 2007年1月、Hawaii
27. 三輪聡一、新規エンドセリン受容体結合蛋白質Jab1によるエンドセリン誘導性ERKリン酸化の調節、第16回日本循環薬理学会、2006年12月、東京
28. Takahiro Horinouchi、Tissue segment binding assay, a novel technique, for studying plasma membrane β-adrenoceptors using intact cardiac tissues、第23回国際心臓研究学会日本部会

総会、2006年12月、千葉

29. Lingyun Lu, JAB1, a novel endothelin receptor type A-interacting protein, is involved in the regulation of ET-1-induced ERK1/2 phosphorylation、第57回日本薬理学会北部会、2006年9月、弘前
30. 梶田絵美、Toll-like receptor 4 (TLR4)の多量体化と機能発現における TLR4分子内の疎水性領域(Phe<sup>652</sup>~Cys<sup>662</sup>)の重要性、第57回日本薬理学会北部会、2006年9月、弘前
31. Takahiro Horinouchi、Functional C-terminal domains of the mouse  $\beta_3$ -adrenoceptor for regulating G protein coupling、第18回日韓薬理学合同セミナー、2006年9月、福井
32. 堀之内孝広、組織片を用いた新規結合実験法による眼内 $\beta$ -アドレナリン受容体の薬理的解析、第115回日本薬理学会関東部会、2006年9月、高崎
33. 西本新、新規エンドセリン受容体会合蛋白質であるJab1のエンドセリン誘導性ERKリン酸化への関与、第34回薬物活性シンポジウム、2006年9月、高崎

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三輪 聡一 (MIWA SOICHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：40157706

### (2) 研究分担者

西屋 禎 (NISHIYA TADASHI)  
北海道大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：80399831

堀之内 孝広 (HORINOUCI TAKAHIRO)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：20307771

西本 新 (NISHIMOTO ARATA)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：90396325

### (3) 連携研究者

なし