

研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2007 ~ 2009  
 課題番号： 19591073  
 研究課題名 (和文) G蛋白質共役レセプターの自律的活性化とインバースアゴニスト

研究課題名 (英文) Autonomatous activation of GPCRs and inverse agonists

## 研究代表者

槇田 紀子 (MAKITA NORIKO)  
 東京大学・医学部附属病院・助教  
 研究者番号： 60353455

研究成果の概要 (和文) : 疾患の原因メカニズムとして必要な、G蛋白質共役レセプターのアゴニストによらない自律的活性化のメカニズムを明らかにし、またその制御機構としてのインバースアゴニスト、レセプターとG蛋白質の共役を標的とする変異体シグナル分子の遺伝子導入、機能選択的活性化の効果をシグナル分子の細胞内局在変化を指標に解析した。

研究成果の概要 (英文) : We have investigated the mechanisms of agonist-independent autonomous activation of G-protein-coupled receptors, which is known to play important roles in disease mechanisms, and its regulation by inverse agonists, gene expression of mutant signaling molecules targeting receptor-G protein interaction, functionally selective regulation of receptors based on changes in localization of signaling molecules in cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：レセプター、G蛋白質、活性化、インバースアゴニスト、局在

## 1. 研究開始当初の背景

(1) レセプター-G蛋白質共役の多様性と普遍性：数多くのホルモン、循環調節因子、神経伝達物質は、細胞膜を7回貫通する共通構造を有するG蛋白質共役レセプターに結合し、 $\alpha\beta\gamma$ の多様性から潜在的には800以上のG蛋白質に共役して作用を発揮する。普遍的な作用機構の一方、レセプターに対する多様な薬剤は創薬において重要である。

(2) アゴニストによらないレセプター活性化機構の発見と病態における重要性：レセプターの発現過剰、活性型変異レセプター、ダイマー形成、機械的刺激などが、レセプターの自律的活性化の原因となる。

(3) G蛋白質共役レセプターに対する薬剤の重要性と限界：人類が手にした薬物の約40%がG蛋白質共役レセプターに対するものであるが、レセプターの自律的活性化に

対してアンタゴニストは無効である。

(4) 待たれるレセプターシグナルの新しい制御法：レセプターの高次構造を不活性型へとシフトさせるインバースアゴニスト、レセプターとG蛋白質の相互作用を標的とする制御法が期待される。

## 2. 研究の目的

(1) レセプターの自律的活性化とそのメカニズムの解明：①レセプターの活性型変異体を作成し機能との相関を検討する。②ダイマー形成や機械的刺激と活性の相関を検討

(2) インバースアゴニストによる自律的活性化の抑制解析

(3) レセプターとG蛋白質の相互作用を標的とする遺伝子導入と薬剤解析

(4) レセプター活性化とシグナル分子の細胞内局在を解析：レセプター、G蛋白質などの細胞内局在の変化をモニターし、レセプターの活性化の解析に応用する。

## 3. 研究の方法

(1) レセプターの自律的活性化とG蛋白質の活性化メカニズムの解明：①種々のレセプターの活性型変異体を作成し、活性、局在を検討する。②レセプターの共発現により、ダイマー形成の有無と活性を検討する。③機械的刺激の効果を検討する。

(2) インバースアゴニストの解析と種々の薬剤でのスクリーニングを行う。

(3) レセプターとG蛋白質の相互作用を標的とする遺伝子導入のため、レセプターによるG蛋白質活性化機構を基盤とする変異体をデザインする。

(4) シグナル分子の細胞内局在の解析とこれを指標とする制御：①レセプター、G蛋白質、その他のシグナル分子の局在と時間経過による変化をモニターする。②これらに対する、活性型変異体、ダイマー、インバースアゴニスト、薬剤、遺伝子導入の影響を解析する。

## 4. 研究成果

(1) レセプターの自律的活性化とG蛋白質活性化メカニズムの解明：

①AT1、Ca感知受容体、V2などのレセプターの活性型変異体を作成し、活性と局在を検討した。②自律的活性化と病態における重要性が示唆されているAT1とB2レセプターを用いてダイマーの検討を行い普遍的には存在しないことを明らかにした。③疾患で発見された自律的活性化を生じるG蛋白質変異体を解析した。また、パルミチン酸化により局在と活性が制御されること、またこの現象が細胞特異的であることを明らかにした。シグナルの活性化レベルや脱感作が細胞によってことなる機構の一端が明らかとなったと

考えられる。

(2) インバースアゴニストの解析とスクリーニング：①上記レセプター群に対する薬剤のインバースアゴニスト活性を比較検討した。②さらに、下記機能選択制についても比較検討した。構造・

(3) レセプター活性の機能選択的制御：疾患で発見されたCa感知受容体に体する自己抗体の解析から、レセプターの活性制御機構では、複数の下流シグナルの活性化の特異性を変えるメカニズムが存在することを明らかにした。古典的なレセプター活性化モデルでは、複数のシグナルを活性化するレセプターに対して作動する薬剤は、レセプターの活性型と不活性型の平衡をシフトすることで作用し、複数の下流シグナルを同程度に制御すると想定されてきた。しかし、この例は、レセプターの高次構造があるシグナルだけを特異的に活性化するような特異な構造をとり得ることを示し、将来のレセプター作動薬において重要な方向性を示している。

(4) レセプターとG蛋白質の相互作用を標的とする遺伝子導入：①レセプターによるG蛋白質の活性化分子機構を基盤としてレセプターとG蛋白質の相互作用を標的とする変異シグナル分子を作成した。これは、レセプターシグナルを抑制し、シグナルに伴うレセプターの局在変化を抑制することを明らかにした。

(5) シグナル分子の細胞内局在の空間/時間的解析：①レセプターにtagあるいはGFPを加え、局在変化のモニターを行った。②自己抗体、インバースアゴニスト、変異シグナル分子による活性化制御がシグナル分子の局在変化制御と連動していることを明らかにした。

## 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7件)

- ① Makita N, Miyakawa M, Fujita T and Iiri T. Sunitinib Induces Hypothyroidism with a Markedly Reduced Vascularity. *Thyroid* (査読有) 20:323-326, 2010.
- ② Makita N and Iiri T. Functionally Selective Activation in Ca-Sensing Receptors. *J. Pharmacol. Sci.* (invited 査読無) 109:37, 2009
- ③ 飯利太朗、槇田紀子. Ca感知受容体の機能選択的活性化：まれな疾患からのヒント. *日本薬理学会雑誌* (総説 invited 査読無) 134:244-247, 2009.
- ④ Hansen JL, Hansen JT, Speerchneider T, Lyngso C, Erikstrup N, Burstein ES, Weiner DM, Walther T, Makita N, Iiri

T, Merten N, Kosteins E and Sheikh SP. Lack of Evidence for AT1R/B2R Heterodimerization in COS-7, HEK293, and NIH3T3 Cells - How Common is the AT1R/B2R Heterodimer? J. Biol. Chem. (査読有) 284: 1831-1839, 2009.

- ⑤ Makita T and Iiri T. Calcium-sensing receptor. AfCS Nature. Molecule Pages. (査読有、published online) doi: 10.1038/mp.a004001.01, 2008
- ⑥ Makita N, Sato J, Rondard P, Fukamachi H, Yasuda Y, Aldred MA, Hashimoto M, Fujita T and Iiri T. Human Gsa Mutant Causes Pseudohypoparathyroidism Type 1a/Neonatal Diarrhea, a Potential Cell-Specific Role of the Palmitoylation Cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (査読有) 104: 17424-17429, 2007.
- ⑦ Makita N, Sato J, Manaka K, Shoji Y, Oishi A, Hashimoto M, Fujita T & Iiri T. An Acquired Hypocalciuric Hypercalcemia Autoantibody Induces Allosteric Transition among Active Human Ca-sensing Receptor Conformations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (査読有) 104: 5443-5448, 2007.

[学会発表] (計20件)

- ① Makita N, Manaka K, Takahashi K, Sato J, Oishi A, Yajima Y, Hashimoto M, Sekine K, Igarashi T, Fujita T and Iiri T. Analysis of Vasopressin V2 Receptor Mutants in Partial Nephrogenic Diabetes Insipidus and their Functional Rescue by Pharmacologic Chaperones. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology. Kyoto 3/26-30, 2010.
- ② 榎田紀子、宮川めぐみ、藤田恵、和泉梢、松井、藤田敏郎、飯利太朗. Sunitinibによる甲状腺機能異常. 第52回日本甲状腺学会. 名古屋, 11/3-5, 2009.
- ③ 高橋和浩、関根孝司、久野正貴、飯田厚子、秋岡祐子、三浦健一郎、田久保憲行、間中勝則、榎田紀子、飯利太朗、藤田敏郎、五十嵐隆. 部分尿崩症患者におけるV2受容体変異とG蛋白質相互作用の解析. 第52回日本腎臓学会学術総会 6/3-5, 2009.
- ④ Taroh Iiri, Noriko Makita and Junichiro Sato. Functionally Selective Activation in Calcium Sensing Receptor: a hint from a rare disease. 第82回日本薬理学会年次総会 シンポジウム Invited talk 横

浜 3/18, 2009.

- ⑤ Noriko Makita and Taroh Iiri. Biased Agonism in class C GPCRs: a hint from a rare disease. 7<sup>th</sup> International Meeting on Metabotropic Glutamate Receptors. Invited talk. Taormina, Italy, 9/14-19, 2008.
- ⑥ Taroh Iiri and Noriko Makita. Functionally Selective Activation of a GPCR: a Hint from a Rare Disease. Keystone Symposia. G protein coupled receptors: New insights infunctional regulation and clinical application. Invited talk. Ireland 5/18-23, 2008.
- ⑦ 榎田紀子、佐藤純一郎、間中勝則、矢嶋由紀、大石篤郎、橋本真紀子、藤田敏郎、飯利太朗. Atypical PHP-1a で発見された新規 Gs $\alpha$  変異体の解析. 第81回日本内分泌学会 青森, 5/16-18, 2008.
- ⑧ 榎田紀子、佐藤純一郎、間中勝則、矢嶋由紀、大石篤郎、橋本真紀子、藤田敏郎、飯利太朗. Atypical PHP-1a で発見された新規 Gs $\alpha$  変異体の解析. 第46回日本臨床分子医学会 神戸, 7/25-26, 2008.
- ⑨ 榎田紀子、佐藤純一郎、間中勝則、矢嶋由紀、大石篤郎、橋本真紀子、藤田敏郎、飯利太朗. 後天性低カルシウム尿性高カルシウム血症で発見されたカルシウム感知受容体自己抗体の作用機構の解析. 第46回日本臨床分子医学会 神戸, 7/25-26, 2008.
- ⑩ 榎田紀子、佐藤純一郎、間中勝則、矢嶋由紀、大石篤郎、橋本真紀子、藤田敏郎、飯利太朗. 後天性低カルシウム尿性高カルシウム血症で発見されたカルシウム感知受容体自己抗体の作用機構の解析. 第80回日本内分泌学会 東京, 6/14-16, 2007.

[図書] (計4件)

- ① 榎田紀子、飯利太朗: Gタンパク質共役受容体 高血圧 (日本臨床増刊号) 67:314-319. 2009.
- ② 間中勝則、榎田紀子、飯利太朗: Gタンパク質遺伝子 高血圧 67:409-413, 2009.
- ③ 飯利太朗: 巻頭言 特集:アルドステロン研究の新展開 (飯利太朗 編) 医学のあゆみ 221:689. 2007.
- ④ 榎田紀子 アルドステロン研究の理解に必要な基礎知識 (臨床編) 医学のあゆみ 221:809-811, 2007.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~kid-endo/a-3-12.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榎田 紀子 (MAKITA NORIKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60353455

### (2) 研究分担者

飯利 太朗 (IIRI TAROH)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：90313022

### (3) 連携研究者

なし