

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790175
 研究課題名（和文） インスリンによる細胞膜セロトニン_{2A}受容体の発現制御機構の解析
 研究課題名（英文） ANALYSIS OF REGULATORY MECHANISMS FOR PLASMA MEMBRANE EXPRESSION OF 5-HT_{2A} RECEPTOR BY INSULIN
 研究代表者
 大倉 正道（OHKURA MASAMICHI）
 山形大学・医学部・講師
 研究者番号：70369172

研究成果の概要：本研究ではインスリンによる細胞膜 5-HT_{2A} 受容体の発現制御機構を解明する目的でこの受容体と複合体を形成する蛋白質を探索した結果、低分子量 G 蛋白質である ARF1 を見出した。さらに ARF1 の機能を解析した結果、ARF1 が GDP 結合型（不活性化型）から GTP 結合型（活性型）に変換されると 5-HT_{2A} 受容体の細胞内陥入（インターナリゼーション）を起こすことを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：インスリン、セロトニン、セロトニン_{2A}受容体、細胞膜発現、インターナリゼーション、ARF1

1. 研究開始当初の背景

5-HT_{2A}受容体は、血管平滑筋収縮、血小板凝集、気分・知覚の制御などの生理機能において重要な役割を果たしているGq蛋白質共役型の細胞膜受容体である。受容体の細胞膜発現量は時々刻々と変化している。5-HT_{2A}受容体の細胞膜発現が極端に亢進したり減弱したりすると、本受容体発現細胞のセロトニン反応性が変化し、上記の生理機能に異常をきたす恐れがある。そこで我々は5-HT_{2A}受容

体の細胞膜発現制御機構（ある刺激入力時にリアルタイムに、細胞内の何処で、どの蛋白質を介して、どのような細胞内情報伝達シグナルが発生し、その結果5-HT_{2A}受容体の細胞膜発現がどう影響されるのか）を解明する研究に取り組んできた。

5-HT_{2A}受容体は細胞膜に均一に分布しているのではなく、細胞内情報伝達に関わる蛋白質が多数集積する細胞膜中の部位である「カベオラ」に局在しており（Arterioscler.

Thromb. Vasc. Biol. 2002, 22:1267 ; J. Biol. Chem. 2004, 279:34614)、セロトニン刺激を受けるとカベオラ直下の「junctional space」から細胞内情報伝達シグナルを発生させる (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006, 103:13232)。その後、セロトニンによる刺激を受け続けた5-HT_{2A}受容体は、セロトニンに対して不応(脱感作)となり、インターナリゼーションする (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002, 99:14470)。

2005年我々は、カベオラに局在するが5-HT_{2A}受容体とはクロストークがないとされてきたインスリン受容体を刺激することによっても、5-HT_{2A}受容体がインターナリゼーションを示すことを証明した (Eur. J. Pharmacol. 2005, 518:18)。しかしながら、5-HT_{2A}受容体とインスリン受容体間のクロストークのメカニズムについては解明されておらず、詳細な検討が望まれていた。インスリン受容体下流の細胞内情報伝達系として、Rasを介するMAPK/ERKカスケード及びPI3-kinaseを介するAkt/PKBカスケードがよく知られている。これら両カスケード中の既知の蛋白質で、5-HT_{2A}受容体の細胞膜発現制御に関わるものは研究開始当初時点で明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、インスリン受容体刺激により活性化される下流の細胞内情報伝達系のうち5-HT_{2A}受容体と複合体を形成する蛋白質(5-HT_{2A}受容体アソシエート蛋白質)群を同定し、同定した各々の蛋白質による細胞膜5-HT_{2A}受容体の発現制御機構を明らかにすべく、次の3点を検討することを目的とした。

- (1) インスリン刺激時に5-HT_{2A}受容体と免疫共沈する蛋白質群の同定
- (2) 5-HT_{2A}受容体の細胞膜発現に対する同定した各蛋白質の効果の検討
- (3) 5-HT_{2A}受容体発現細胞のセロトニン反応性に対する同定した各蛋白質の効果の検討

3. 研究の方法

- (1) インスリン刺激時に5-HT_{2A}受容体と免疫共沈する蛋白質群の同定

まずHis6タグ及びシアン色蛍光蛋白質(CFP)を融合させた5-HT_{2A}受容体の遺伝子安定発現細胞株(HEK-5HT_{2A}-C細胞:当研究室で樹立)をインスリンで刺激し、これらの細胞より細胞破砕液を調製した。次にこれら

の細胞破砕液中の5-HT_{2A}受容体アソシエート蛋白質群を抗5-HT_{2A}受容体抗体またはNi-NTAビーズ(His6タグ付き蛋白質を吸着させるビーズ)を用いて5-HT_{2A}受容体と共沈させた。共沈した蛋白質群は、電気泳動で分離してニトロセルロース膜またはPVDF膜上に転写させた。蛋白質群の同定は、インスリン受容体下流の既知の蛋白質(Rasを介するMAPK/ERKカスケード及びPI3-kinaseを介するAkt/PKBカスケードを構成する蛋白質)に対する抗体を用いた免疫染色法により行った。

- (2) 5-HT_{2A}受容体の細胞膜発現に対する同定した蛋白質(ARF1)の効果の検討

ARF1の活性化型及び不活性化型の蛋白質をコードした遺伝子の発現プラスミドをHEK-5HT_{2A}-C細胞に導入した。プラスミド導入細胞においてCFP融合させた5-HT_{2A}受容体の細胞膜局在が量的にどのような影響を受けるか、共焦点レーザー顕微鏡下で解析した。

- (3) 5-HT_{2A}受容体発現細胞のセロトニン反応性に対する同定した各蛋白質(ARF1)の効果の検討

ARF1の活性化型及び不活性化型の発現により、5-HT_{2A}受容体のセロトニンに対する一過性Ca²⁺濃度上昇反応量(即ち、セロトニン反応性)がどのような影響を受けるか、蛍光Ca²⁺指示薬 fluo3を用いて共焦点レーザー顕微鏡下で解析した。

4. 研究成果

2007年度にはまずHEK-5HT_{2A}-C細胞をインスリン刺激後に破砕し、この細胞破砕液中の5-HT_{2A}受容体アソシエート蛋白質群を抗GFP抗体(この抗体はCFPにも結合する)を用いて5-HT_{2A}受容体と共に免疫沈降される蛋白質群を電気泳動で分離して解析した。対照実験ではインスリン刺激していない細胞を用いた。

常法に従って免疫沈降を行った結果、インスリン刺激の有無に関わらず免疫沈降物中からは5-HT_{2A}受容体だけが検出された。常法の実験条件下で5-HT_{2A}受容体アソシエート蛋白質を検出できなかった理由として、1) 5-HT_{2A}受容体とアソシエート蛋白質の分子複合体形成が生じないか極めて弱い、又は2) 分子複合体形成が一過性である、の2つの可能性が考えられる。しかしながら少なくとも、インスリン刺激は5-HT_{2A}受容体自体に何らかの機能的な修飾をしていると思われる。その修飾がユビキチン化の促進によるもので

はないことは確認できた。

2008年度には免疫沈降の実験条件の改善を図りつつ継続して5-HT_{2A}受容体アソシエート蛋白質を探索した結果、低分子量G蛋白質であるARF1を見出した。HEK-5HT_{2A}-C細胞を用いて5-HT_{2A}受容体の細胞内局在をCFP蛍光で可視化する実験を行い、5-HT_{2A}受容体のインターナリゼーションにARF1が関与していることを証明した。

GTP結合型(活性型)のARF1 (ARF1-CAM) をこの細胞に発現させると5-HT_{2A}受容体の細胞膜発現が抑制された(図1)。一方GDP結合型(不活性型)のARF1 (ARF1-DNM) では、5-HT_{2A}受容体の細胞膜発現が逆に促進され、インターナリゼーションは阻害された(図1)。

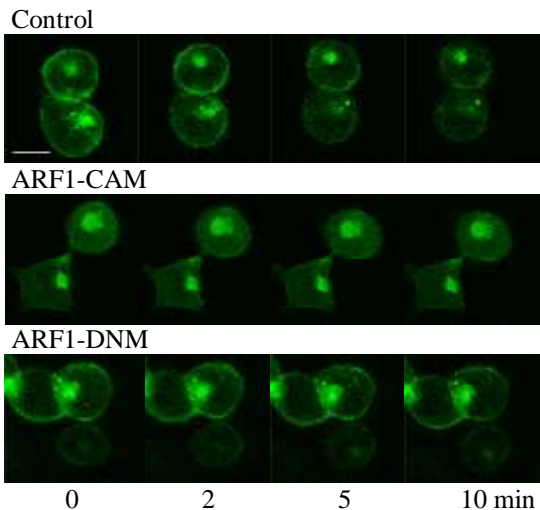


図1 5-HT_{2A}受容体の細胞膜発現及びインターナリゼーションに対するARF1-CAM及びARF1-DNMの効果

またHEK-5HT_{2A}-C細胞においてセロトニン誘発性の一過性細胞内カルシウムイオン濃度上昇(カルシウムトランジェント)を測定したところ、ARF1-CAMがそのピーク値を低下させ、ARF1-DNMが逆に増加させることが確認された(図2)。このことはARF1によるHEK-5HT_{2A}-C細胞のセロトニン応答性変化が5-HT_{2A}受容体の細胞内局在変化と対応していることを示唆する。

今後ARF1が関与する5-HT_{2A}受容体のインターナリゼーションの分子機序の全貌を明らかにするために、ARF1以外の5-HT_{2A}受容体アソシエート蛋白質についても探索が必要であると考えている。本研究成果の概要を図3に示した。

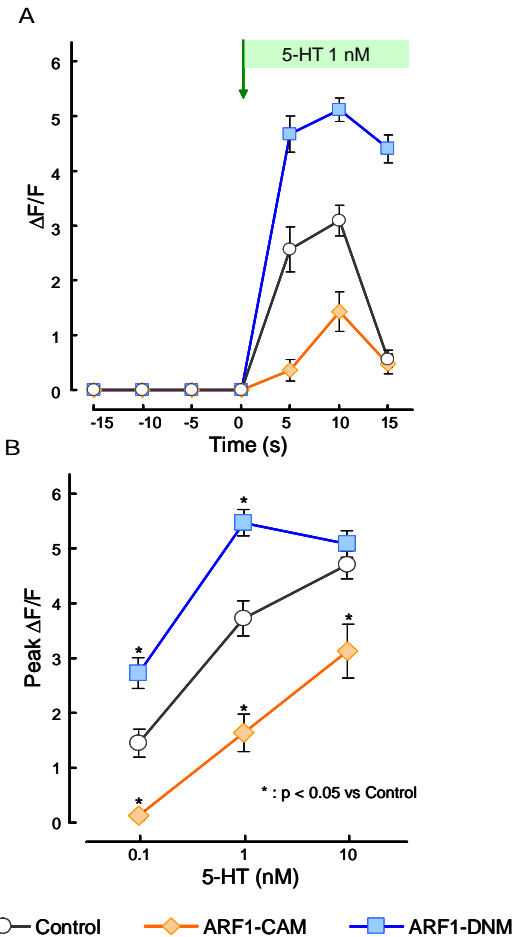


図2 セロトニン誘発性カルシウムトランジェントの経時変化(A)及びセロトニン濃度依存性(B)に対するARF1-CAM及びARF1-DNMの効果

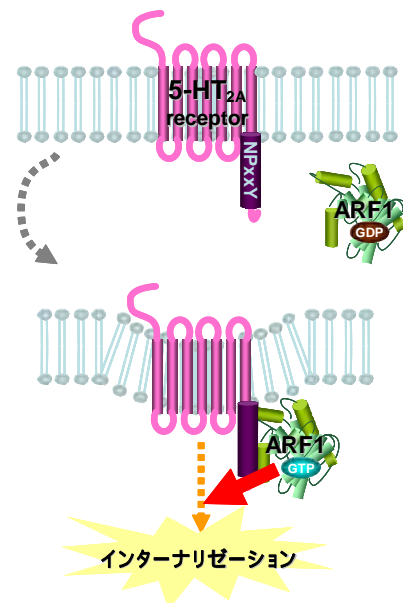


図3 5-HT_{2A}受容体のインターナリゼーションにおけるARF1の役割

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 3 件)

Ohkura, M.: The discovery of the jellyfish Aequorea green fluorescent protein (GFP) and its subsequent evolution. *Journal of Japanese Scientists* **44**, 248-255 (2009). 査読有

Okano, M., Uchikawa, Y., Tanaka, N., Mutoh, J., Ohkura, M., Hisa, H., and Yamamoto, R.: Rho-kinase, but not protein kinase C, is involved in generation of the spontaneous tone in the resting phase of the isolated pig iris sphincter muscle. *Current Eye Research* **34**, 177-183 (2009). 査読有

Tanaka, N., Nakamura, E., Ohkura, M., Kuwabara, M., Yamashita, A., Onitsuka, T., Asada, Y., Hisa, H., and Yamamoto, R.: Both 5-hydroxytryptamine 5-HT_{2A} and 5-HT_{1B} receptors are involved in the vasoconstrictor response to 5-HT in the human isolated internal thoracic artery. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **35**, 836-840 (2008). 査読有

[その他]

ホームページ

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/Pharmacology/Pharmacol-JP.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大倉 正道 (OHKURA MASAMICHI)

山形大学・医学部・講師

研究者番号 : 70369172

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者