

機関番号:15401

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2008 ~ 2010

課題番号:20500337

研究課題名(和文)摂食・うつ不安に関わる受容体の新しい調節部位の同定と創薬標的の探索

研究課題名(英文)Identification of the regulating molecules for the melanin-concentrating hormone receptor 1 that is specifically involved in feeding and depression.

研究代表者

斎藤 祐見子(SAITO YUMIKO)

広島大学・大学院総合科学研究科・教授

研究者番号:00215568

研究成果の概要(和文):

脳に高発現するMCHR1は摂食・うつ不安に関与するGタンパク質共役型受容体(GPCR)である。分子薬理学的手法により以下のことを明らかにした。I. MCHR1の新しい調節部位の同定
①MCHR1の細胞内第2ループに存在する高度保存領域DRYはGタンパク質活性化に直接関わる。
②MCHR1のHelix8領域はGq共役性が鋭敏となる機能亢進型表出に関与する。II. MCHR1結合因子の同定:GαのGDP-GTP交換反応を促進することによりMCHR1のシグナルを抑制するRGSタンパク質を3種類同定し、それぞれMCHR1における相互作用部位が異なる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文):

Melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) is a G protein-coupled receptor (GPCR) that is highly expressed in the central nervous system. Extensive studies of genetically engineered animals and selective antagonists showed an important role of MCHR1 in the regulation of many physiological functions including energy homeostasis and emotional processing. By analyzing the effect of a series of site-directed mutations of rat MCHR1 on receptor conformational changes, we found that DRY in i2 loop and Phe318 in helix 8 of MCHR1 are the structurally critical site for receptor dynamics. We further identified three RGS proteins that negatively modulated MCHR1-mediated signaling by acting as GTPase-activating manner. These results will help to better understand the complex mechanism for MCHR1 activation.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:神経化学・神経薬理学

科研費の分科・細目:神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード:G蛋白質共役型受容体 摂食 細胞内情報伝達 構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

メラニン凝集ホルモン(melanin-concentrating hormone: MCH)は、そのノックアウトにより摂食量が低下し体重が減少する「ヤセ」表

現形を示す唯一の神経ペプチドである。1999年、斎藤らはGタンパク質キメラを活用した新規ストラテジーによりオーファンGタンパク質結合型受容体(GPCR)のひとつである

SLC-1 が MCH 受容体 (MCHR1) そのものであることを同定し、創薬開発への最初の突破口を開いた。その後、多くの研究から MCHR1 はうつ不安にも関与することが判明している。しかしながら、MCHR の詳細な構造解析 (特に、不活性型から活性型への構造ダイナミクス) 及び受容体に直接結合して機能を調節する分子については未だ不明である。

2. 研究の目的

メラニン凝集ホルモン受容体(MCHR1)に対する結合蛋白質の受容体調節機能を明らかにすることで「摂食・うつ不安」に関連した新しい調節部位を同定し、創薬創出に結び付けることを目指す。本研究はMCHR1結合分子を中心としたネットワーク及びそのダイナミクスまで視野に入れた研究である。

3. 研究の方法

① HEK293細胞を用いた培養細胞実験－MCHR1の構造活性相関解析およびMCHR1結合分子群の詳細な解析

前者については様々な置換体を作成し、種々のアッセイにより各アミノ酸の機能的役割を評価する。後者については、受容体に結合する候補分子tag付加により哺乳類細胞での強制発現を確認し、MCHR1と共発現させて生化学的・細胞生物学的結合を確認後、受容体機能への影響を検討する。次に、上述の分子の発現量を調節し、受容体機能にどのような影響が現れるか検討する。機能への影響が見られた場合、当該蛋白質がMCHR1のどの部分のアミノ酸を認識するのか受容体変異体や精製蛋白質などを用いて検討する。

② 個体レベルにおける受容体結合蛋白質の生理学的意義の解析

上述した受容体結合蛋白質の特異抗体作成を行い、それぞれの脳阻組織切片における発現部位を同定し、MCHR1発現箇所と比較検討を行う。さらに、物理的ストレスによりうつ状態を呈した動物を用いて、摂食・うつ不安調節とMCHR1、各蛋白質の生理的動態(発現箇所及び発現量の変動)を解析する。

4. 研究成果

[1] MCHR1 の細胞内第2ループにおける高度保存領域 DRY の役割: クラス I の GPCR における高度保存モチーフ DRY は受容体を不活性型として維持する構造であることが広く知られている。しかし MCHR1 の DRY 領域の機能的役割はその常識とは異なり、G タンパク質の活性化に直接的に関与することがわかった。[2] MCHR1 の細胞内 C 末端に存在する Helix8 の特殊性: Helix8 を構成するアミノ酸の解析により、Gi/o 共役性は変化しない

が Gq 共役性が亢進する 1 アミノ酸置換体 F318K を見出した。また、Helix8 の C 末にある高度保存の疎水性アミノ酸ペアは受容体膜以降に関与することが知られている。しかし、MCHR1 の疎水性ペアの変異では膜輸送に対して有意な影響を示さないことがわかった。[3] MCHR1 の Gi/o 共役に関与する部位の探索: ヒト・ラット MCHR1 は Gq と Gi/o の両方に共役するが、キンギョ及びカレイ MCHR1 はともに Gq に共役することを見出した。そこでこれら4つの MCHR1 配列を比較検討することで様々な置換体を作成し、Gi/o 共役に選択的に関与するアミノ酸残基を探索した。現在までに第5膜貫通ドメインと細胞内第3ループに存在する数個のアミノ酸が有力候補である。[4] RGS タンパク質は G アルファの GDP-GTP 交換反応に関与する GPCR の負の調節因子である。30 以上ある RGS の中で MCHR1 の調節に関与するものを3種類同定し、それぞれ MCHR1 における相互作用部位が異なる可能性を見出した。そのうちの1つの RGS についてはうつ不安モデルの側座核において発現量が有意に変動する結果を得た。

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 18 件)

原著論文

1. Hamamoto A, Mizusawa K, Takahashi A, Saito Y. Signaling pathway of the goldfish melanin-concentrating hormone receptor 1 and 2. Regulatory Peptides. in press 査読あり
2. Miyamoto-Matsubara M, and Saito Y. Functional interaction of regulator of G-protein-signaling-2 with melanin concentrating hormone receptor 1. Ann NY Science. 1200, 112-119, 2010 査読あり
3. Mizusawa K, Saito Y, Wang Z, Kobayashi Y, Matsuda K, Takahashi A. Molecular cloning and expression of 2 melanin-concentrating hormone receptors in goldfish. Peptides 30, 1990-1996, 2009 査読あり
4. Aizaki Y, Nakano-Tetsuka M, Maruyama K, Saito Y. Distinct role of the DRY motif in rat melanin-concentrating hormone receptor 1 in signaling control. Peptides 30, 974-981, 2009 査読あり
5. Nagasaki H, Chung S, Dooley CT, Wang Z, Li C, Saito Y, Clark SD, Houghten RA, Civelli O. The pharmacological properties of a novel MCHR1 receptor antagonist isolated from combinatorial libraries. Eur J Pharmacol. 602, 194-202, 2009 査読あり
6. Miyamoto-Matsubara M, Saitoh O, Maruyama

- K, Aizaki Y, **Saito Y**. Regulation of melanin-concentrating hormone receptor 1 signaling by RGS8 with the receptor third intracellular loop. *Cellular Signaling* 20, 2084-2094, 2008 査読あり
- (総説)
7. 児島将康 **斎藤祐見子** 新規生理活性ペプチドの探索方法の進歩 実験医学増刊号「代謝制御と内分泌ネットワーク」29, 14-22, 2011 査読なし
 8. **斎藤祐見子** MCH の最新の話題 実験医学増刊号「代謝制御と内分泌ネットワーク」29, 54-59, 2011 査読なし
 9. **斎藤祐見子** 児島将康 日本における生理活性ペプチド研究の流れとその展開 実験医学増刊号「代謝制御と内分泌ネットワーク」29, 80-85, 2011 査読なし
 10. 長崎弘 **斎藤祐見子** MCH 「摂食制御の分子過程」生体の科学 62, 37-43, 2011 査読なし
 11. **斎藤祐見子** オーフアン GPCR 標的創薬—MCH 受容体の場合—最新・G 蛋白質共役受容体研究—疾患解明とシグナル制御の新時代 医学のあゆみ 233, 9, 687-691, 2010 査読なし
 12. **斎藤祐見子** MCH 「肥満症(第2版—基礎・臨床研究の進歩) 日本臨床 68, 125-128, 2010 査読なし
 13. 長崎弘 **斎藤祐見子** MCH (メラニン凝集ホルモン) 日本臨床増刊 血液・尿化学検査・免疫学的検査 (第7版) 4, 230-233, 2010 査読なし
 14. Chung S, **Saito Y**, Civelli O. MCH receptors/gene structure-*in vivo* expression. *Peptides* 30, 1985-1989, 2009 査読あり
 15. **斎藤祐見子** オーフアン G 蛋白質共役型受容体研究の進歩 比較内分泌 34, 24-28, 2008 査読なし
 16. **斎藤祐見子** オーフアン GPCR の使い方—これまで、そしてこれから—ファルマシア (日本薬学会誌) 44, 135-139, 2008 査読なし
 17. **Saito, Y** and Nagasaki, H. The Melanin-Concentrating Hormone System and Its Physiological Functions "Results and Problems in Cell Differentiation: Orphan G protein-coupled receptors and novel neuropeptides " 46, 159-179, Eds. Civelli/Zhou, Springer Berlin / Heidelberg, 2008 査読あり
 18. Nagasaki H, Xy Y, **Saito Y**, Civelli O. Orphan neuropeptides and the regulation of food intake "New Frontiers in Lifestyle Related Diseases" Eds. Miyazaki/Imawari, Springer-Verlag Tokyo, Inc.3-19, 2008 査読なし
- [学会発表] (計 15 件)
1. 永田麻実 **斎藤祐見子** MCHR1 の一次繊維局在に関わるアミノ酸残基の解析 日本動物学会中国四国支部広島県例会 3月5日, 2011 広島
 2. 濱本明恵 **斎藤祐見子** 哺乳類 MCHR1 における G タンパク質選択機構の探索 日本動物学会中国四国支部広島県例会 3月5日, 2011 広島
 3. 濱本明恵 水澤寛太 高橋明義 **斎藤祐見子** キンギョメラニン凝集ホルモン受容体の機能解析 第81回日本動物学会 9月23日, 2010 東京
 4. **Saito Y**, Funakoshi Y and Saho T. Identification of amino acid involved in "gain-of-function" conformational dynamics of melanin-concentrating hormone receptor. Neuro2010 9月2日, 2010 神戸
 5. 濱本明恵 水澤寛太 高橋明義 **斎藤祐見子** 魚類メラニン凝集ホルモン受容体における情報伝達解析 第7回 GPCR 研究会 5月7日, 2010 東京
 6. 永田麻実 **斎藤祐見子** 脳内摂食受容体 MCHR1 の一次繊維毛への局在化 日本動物学会中国四国支部広島県例会 3月13日, 2010 広島
 7. 濱本明恵 水澤寛太 高橋明義 **斎藤祐見子** キンギョ MCH 受容体における情報伝達系の解析 日本動物学会中国四国支部広島県例会 3月13日, 2010 広島
 8. **Saito Y** and Miyamoto-Matsubara M. Selective RGS protein regulation of melanin-concentrating hormone receptor 1. 第52回日本神経化学会 6月24日, 2009 群馬
 9. Miyamoto-Matsubara M, Saitoh O, **Saito Y**. Regulation of the melanin concentrating hormone receptor signaling by RGS. Society for Neuroscience Nov 18th, 2008 Washington D.C. USA
 10. Miyamoto-Matsubara M, **Saito Y**. RGS modulates signaling of the melanin concentrating hormone receptor through the receptor third intracellular loop. 第51回日本神経化学会 9月13日, 2008 富山
 11. **斎藤祐見子** 宮本真由美 MCH 受容体におけるシグナリング調節分子の解析 第5回 GPCR 研究会 5月9日, 2008 東京
 12. 宮本真由美 **斎藤祐見子** 摂食 GPCR の機能を調節する分子の同定 G シグナリング特定班合同若手ワークショップ 1月26日, 2008 箱根
- (招待講演)
13. **斎藤祐見子** メラニン凝集ホルモン受容体の多彩な機能 日本薬理学会主催—新薬理学セミナー「GPCR を基盤としたペプチド創薬の現状と展望」11月25日, 2010 鹿

児島

14. Miyamoto-Matsubara, M, Chung S, **Saito, Y.**
Recent advances for melanin-concentrating hormone and its receptors” Satellite symposium of the 9th international symposium on VIP, PACAP, and related peptides, Oct 2nd, 2009 Yakushima, Japan
15. **齋藤祐見子** 摂食うつ不安に関連する GPCR (メラニン凝集ホルモン受容体) の構造活性相関と結合分子 第 46 回生物物理学会シンポジウム「GPCR 型受容体を介した生物機能の物理的理解」12月4日, 2008 福岡

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/yumist/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 祐見子 (SAITO YUMIKO)

広島大学・大学院総合科学研究科・教授

研究者番号：00215568

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：