

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790066  
 研究課題名（和文） ベータブロッカーにより引き起こされるG蛋白質非依存性のシグナリングとその意義  
 研究課題名（英文） G-protein independent signaling induced by be-ta blocker and the significance of the signaling.  
 研究代表者 仲矢 道雄  
 (NAKAYA MICHIO)  
 九州大学・薬学研究院・助教  
 研究者番号：80464387

研究成果の概要（和文）：メトプロロールは $\beta$ 1アドレナリン受容体遮断薬の一つである。偶然にも我々はメトプロロールを長期間にわたりマウスに投与すると心臓の線維化が誘導されることを見出した。この線維化誘導シグナルは、 $\beta$ 1アドレナリン受容体を介するものの、G蛋白質に非依存的であり、ERKの活性化を惹起した。しかも、ノックアウトマウスを用いた実験からこの線維化のシグナル伝達はGRK5および $\beta$ アレスチン2が必要であった。

研究成果の概要（英文）：Metoprolol is one of antagonists specific for the  $\beta$ 1 adrenergic receptor. We accidentally found that long-term administration of metoprolol induced cardiac fibrosis in mice. This fibrosis signal by metoprolol is mediated by  $\beta$ 1 adrenergic receptor in a G protein-independent fashion and requires ERK activation. We also demonstrate that the signal pathway depends on  $\beta$ -arrestin2 and GRK5. Indeed, the cardiac fibrosis was not observed when the metoprolol was administered to  $\beta$ -arrestin2 or GRK5 deficient mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：薬学一般・生物系薬学

キーワード：薬理学・シグナル伝達・G蛋白質

#### 1. 研究開始当初の背景

心不全は心臓がポンプとしての機能を十分に果たせなくなった状態であり、さまざまな循環器疾患の終末像として捉えられて

いる。心不全は現在、日本人の死因の16%（平成17年度）を占め、5年生存率も50%と低い。さらに高齢化社会の到来に伴い今後はますます患者数が増加するものと考えられる。こ

のような事情から心不全に対する画期的、効果的な治療法の確立が早急に望まれている。 $\beta$ ブロッカーは受容体からのシグナルを遮断することにより心筋細胞の働きを減弱させ、結果的に心臓の負担を軽くする。この作用から $\beta$ ブロッカーは近年、心不全治療の第一選択薬として広く使用されている。現在、臨床で使用されている主たる $\beta$ ブロッカーとしてはメトプロロール、カルベジロール、ビソプロロールなどが挙げられる。このうちメトプロロールとカルベジロールに関しては両者を比較した大規模臨床試験 (COMET 試験) が行われ、カルベジロールの優位性 (メトプロロールに比して死亡リスクが 17% 減少) が報告された (Poole-Wilson PA *et al.*, LANCET, 2003)。しかし、このメトプロロールとカルベジロールの違いを説明できるメカニズムは未だ報告されていない。我々は、偶然にもメトプロロールが G タンパク質非依存性に MAP キナーゼを活性化することを見出した。しかも、この活性化には $\beta$ アレスチン 2 という分子が必要である可能性を見いだした。

## 2. 研究の目的

$\beta$ アドレナリン受容体遮断薬 ( $\beta$ ブロッカー) は心不全治療薬として使用されている。しかし、すべての $\beta$ ブロッカーが同じ程度の効果を示すわけではない。本研究では、心不全治療薬として広く使われているカルベジロールとそれより薬効の劣るメトプロロールの作用の違いを細胞内シグナリングの観点より明らかにすることを目的とした。具体的には

(1) メトプロロールが通常の $\beta$ アゴニスト刺激とは異なり G タンパク質非依存性に MAP キナーゼを活性化し、TGF- $\beta$ などの線維化促進因子の産生を誘導することを細胞および

個体レベルで明らかにする。

(2) 生細胞内のタンパク質間相互作用を蛍光的に観察できる FRET (fluorescent resonance energy transfer)法を用いて、 $\beta$ ブロッカー刺激により G タンパク質非依存的なシグナリングが活性化されうること、およびメトプロロール、カルベジロールが誘導する $\beta$ 1 アドレナリン受容体の構造変化の違いを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) メトプロロール刺激依存的な $\beta$ 1 アドレナリン受容体と $\beta$ アレスチン 2 との相互作用の検出。免疫沈降法などではメトプロロール刺激依存的な $\beta$ 1 アドレナリン受容体と $\beta$ アレスチン 2 との相互作用の検出は困難であると予想される。そこで 2 分子間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法あるいは発光共鳴エネルギー移動 (BRET) 法によりそれらの相互作用を示す。具体的には、FRET の場合は、 $\beta$ 1 アドレナリン受容体に CFP を、 $\beta$ アレスチン 2 に YFP を付加させて実験を行う。BRET の場合は、 $\beta$ 1 アドレナリン受容体に Luc を、 $\beta$ アレスチン 2 に GFP を付加させて実験を行う。

(2) メトプロロール刺激による線維化促進因子の発現上昇およびそれらの ERK 依存性、 $\beta$ アレスチン 2 依存性の検討。新生仔心室筋細胞を用い、メトプロロール刺激により TGF- $\beta$ をはじめとする線維化促進因子の mRNA 発現が亢進することを real-time PCR 法により示す。また、この発現亢進が ERK 依存性に生じることを ERK 活性化の阻害剤を用いて、 $\beta$ アレスチン 2 依存性に生じることを $\beta$ アレスチン 2 を siRNA によりノックダウンした細胞を用いることにより示す。

(3)  $\beta$ 1 アドレナリン受容体をベースにした FRET プローブ (図 1) の作成。メトプロロール、カルベジロールによる受容体の構造変化

の違いを下図の FRET プローブからのシグナルの違いにより明らかにする。

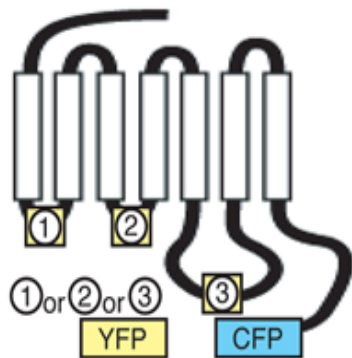


図 1

研究開始時には、 $\beta 1$  受容体はその立体構造が解明されていなかったことから刺激によってどのようなダイナミックな構造変化が誘導されるかは予測しにくい。そのため、さまざまな構造変化に対応できるように図 1 に示すような CFP は C 末端に、YFP に関しては細胞内の 3 つのループのそれぞれの部位に導入した FRET プローブ (計 3 種類) を作成することにより対応しようと考えた。

(4) メトプロロールの長期投与による  $\beta$  アレスチン 2 のノックアウトマウスの心臓の線維化の検討。  $\beta$  アレスチン 2 のノックアウトマウスにメトプロロールを長期間投与し、心臓の線維化の程度をコラーゲンを染色するピクロシリウス染色により、線維化促進因子の mRNA 発現量が増加するかを real-time PCR 法により調べる。我々はすでに野生型のマウスでは、心臓の線維化が亢進している。また、ERK の活性化についても検討を行う。

#### 4. 研究成果

(1) FRET 用に、 $\beta 1$  アドレナリン受容体に CFP を、 $\beta$  アレスチン 2 に YFP を付加させたコンストラクトを作成した。BRET 用に、 $\beta 1$  アドレナリン受容体に Luc を、 $\beta$  アレスチン 2 に GFP を付加させたコンストラクトを作成した。それらコンストラクトを用いて FRET、

および BRET を行った。その結果、FRET を用いて相互作用を検出するのは現在保有している設備条件では主としてその時間分解能の点から困難であることがわかった。そこで、BRET 法を用いて相互作用の検討を行ったところ、メトプロロール添加によって、 $\beta$  アドレナリン受容体と  $\beta$  アレスチン 2 が相互作用することが明らかとなった。さらにこの相互作用は GRK5 という分子をロックダウンすることによって、検出されなくなった。すなわち、受容体と  $\beta$  アレスチン 2 との相互作用には GRK5 が必要であることが明らかとなった。

(2) 新生仔心室筋細胞にメトプロロール刺激を行い、線維化因子の発現量を調べたところ、TGF- $\beta$ 、CTGF といった線維化促進因子の mRNA の発現量が亢進することが明らかとなった。しかも、この発現亢進は ERK 活性化の阻害剤、U0126 の前処置によってほぼ完全に抑制された。この結果から、メトプロロールによる線維化のシグナルには ERK の活性化が重要な役割を果たす可能性が考えられた。

(3) 研究方法の項目に記したような  $\beta 1$  アドレナリン受容体をベースにした 3 種の FRET プローブ (図 1) を作成した。それぞれの FRET プローブを発現させた細胞にメトプロロール、カルベジロールを添加し、FRET 値の変化を観察したが、残念ながら 3 種のいずれの FRET プローブに関しても値に変化は認められなかった。なお、 $\beta 1$  アドレナリン受容体のアゴニストである、イソプロテレノール刺激を行ったところ、③に YFP を挿入した FRET プローブのみ、FRET 値の大幅な変化が認められた。

(4)  $\beta$  アレスチン 2 のノックアウトマウスにメトプロロールを長期間にわたって投与したところ、同時に行った野生型のマウスに関しては心臓の線維化が認められたが、この

ノックアウトマウスの心臓においては線維化は認められなかった。研究成果(1)でメトプロロールによる線維化のシグナル伝達経路には GRK5 が必要であることが示唆された。そこで、GRK5 のノックアウトマウスに対しても同様の実験を行ったところ、in vitro の結果に対応し、GRK5 のノックアウトマウスの心臓においても線維化は認められなかった。これらの結果に対応し、野生型のマウスにおいてはメトプロロールの長期投与によって心臓において ERK の活性化が観察されたが、 $\beta$ アレスチン 2、GRK5 のそれぞれのノックアウトマウスでは ERK の活性化は認められなかった。以上の結果から、メトプロロールによる心臓の線維化のシグナル伝達には  $\beta$ アレスチン 2、GRK5 が必要であることが明らかとなった。

#### 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 15 件)

- ① Nakaya M, Ohba M, Nishida M & Kurose H. Determining the activation of Rho as an index of coupling to  $G_{12/13}$ . Chapter for "Receptor Signal Transduction Protocols" as part of the Humana Press "Methods in Molecular Biology" series, Vol. 83, 2010. (査読なし)
- ② Nishida M, Ohba M, Nakaya M & Kurose H. Heterotrimeric G proteins in heart failure. *Heart Failure: Symptoms, Causes and Treatment Options*. (Nova Science Publishers) in press. (査読なし)
- ③ Nishida M, Suda R, Tanabe S, Onohara N, Nakaya M, Kanaho Y, Sumimoto H, Sato Y and Kurose H. Pertussis toxin upregulates angiotensin type1 receptors through TLR4-mediated Rac activation. *J. Biol. Chem.* (in press). (査読あり)
- ④ Nishida M, Watanabe K, Sato Y, Nakaya M, Kitajima K, Ide T, Inoue R and Kurose H. Phosphorylation of TRPC6 channels at Thr<sup>69</sup> is required for anti-hypertrophic effects of phosphodiesterase 5 inhibition. *J. Biol. Chem.* 285:13244-13253 (2010). (査読あり)
- ⑤ Nakaya M, Kitano M, Matsuda M & Nagata S. Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells. *Pro Natl Acad Sci USA*. 105: 9198-9203 (2008). (査読あり)
- ⑥ Kitano M, Nakaya M, Nakamura T, Nagata S & Matsuda M. Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature* 453: 241-245 (2008). (査読あり)
- ⑦ Nishida M, Sato Y, Uemura A, Narita Y, Tozaki-Saitoh H, Nakaya M, Ide T, Suzuki K, Inoue K, Nagao T & Kurose H. P2Y<sub>6</sub> Receptor- $G_{12/13}$  Signaling in Cardiomyocytes Triggers Pressure Overload-induced Cardiac Fibrosis. *EMBO J.* 27: 3104-3115 (2008). (査読あり)
- ⑧ 西田基宏, 大場三奈, 仲矢道雄, 黒瀬等 三量体G蛋白質シグナリングを介した心不全発症の分子機構 *日本薬理学雑誌* (2010, in press). (査読なし)
- ⑨ 仲矢道雄, 大場三奈, 黒瀬等  $\beta$ アドレナリン受容体 *医学のあゆみ* Vol. 233, No. 9 (2010). (査読なし)
- ⑩ 西田基宏, 渡辺健太, 仲矢道雄, 黒瀬等 ジアシルグリセロール感受性 TRPC チャンネルを介した心肥大誘導のメカニズム *YAKUGAKU ZASSHI* Vol. 130, No. 3, 295-302 (2010). (査読なし)
- ⑪ 中村岳史, 北野正寛, 仲矢道雄, 長田重一, 松田道行 食食過程における低分子量G蛋白質 Rac1 と Rab5 の活性変化 *PNE 6 月増刊号 感染現象*, 1114-1118 (2009) (査読なし)
- ⑫ 西田基宏, 仲矢道雄, 黒瀬等  $G_{12/13}$  タンパク質による活性酸素シグナリング *実験医学 増刊* Vol. 27, No. 15 (2009). (査読なし)
- ⑬ 西田基宏, 佐藤陽治, 仲矢道雄, 黒瀬等 G タンパク質共役型受容体-TRPC チャンネルタンパク複合体形成による心肥大シグナル制御 *日本薬理学雑誌* Vol. 134, No. 3, 131-136 (2009). (査読なし)
- ⑭ 西田基宏, 上村綾, 仲矢道雄, 黒瀬等 機械的伸展刺激により活性化される G タンパク質共役型受容体の解析 *表面* Vol. 46, No. 3 (2008, 広信社) (査読なし)
- ⑮ 北野正寛, 仲矢道雄, 中村岳史, 長田重一, 松田道行 Rab5 活性のイメージングにより同定されたファゴソーム成熟に必須の制御因子 *細胞工学* 9月号, 904-905 (2008). (査読なし)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 仲矢道雄 「 $\beta$ 遮断薬の新しい薬理作用」

日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月 28 日) (岡山) シンポジウム

- ② **Nakaya M, Kitano M, Matsuda M & Nagata S.** Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells. IUPS2009 (第 36 回国際生理学会世界大会) (2009 年 7 月 29 日) (Kyoto).
- ③ **仲矢道雄**、北野正寛、松田道行、長田重一「アポトーシス細胞の貪食における Rac1 の空間的・時間的活性化」生化学会・分子生物学会合同大会 BMB2008 (2008 年 12 月 9 日) (神戸)

[その他]

ホームページ等

<http://chudoku.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

仲矢 道雄 (NAKAYA MICHIO)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：80464387