

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590267

研究課題名（和文） ヒスタミンH3受容体の細胞表面発現制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of regulatory mechanisms of cell surface expression of Histamine H3 receptor

研究代表者

助川 淳 (SUKEGAWA JUN)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30187687

研究成果の概要（和文）： ヒスタミンH3受容体は、睡眠覚醒障害や摂食障害、また学習記憶障害に対する薬剤標的分子として注目されているが、Gタンパク質共役型受容体に分類されるH3受容体が細胞において正常に機能するためには、遺伝子から転写・翻訳された後、小胞体から細胞表面に正しく輸送されなければならない。本研究では、H3受容体の細胞表面への輸送過程が、受容体のカルボキシ末端に結合する様々な細胞内タンパク質によって制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： Histamine H3 receptor has drawn much attention in research community as a potential drug target for sleep wake disorder, eating disorder, and learning-memory disorders. Histamine H3 receptor belongs to the G protein-coupled receptor family and the receptor protein should be transported correctly from ER to cell surface after transcription and translation of the receptor gene in order for the receptor to function properly. This research identified various cellular proteins that interact with carboxy-terminus of Histamine H3 receptor and showed that these proteins regulate the transport of the receptor molecule to the cell surface.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：受容体、チャンネル、輸送系、シグナル情報伝達系、細胞表面発現

1. 研究開始当初の背景

(1)ヒスタミン神経系について：ヒスタミン神経系は視床下部の細胞体から脳のほぼ全ての領域に投射されており、中枢神経系の重要な

機能を広く担っている事が示唆されてきた。事実これまでに、睡眠・覚醒、記憶・学習、摂食行動、自発運動量、侵害刺激の受容等、生体にとっての基本的な多くの神経機能に、主にH

1、及びH2受容体を介してヒスタミンが関与している事が実験的に証明されている。また、H3受容体は、ヒスタミン神経を始めとして、アセチルコリン、ノルアドレナリン、ドパミン等、の主要な神経系の神経終末に存在し、それらの神経伝達物質の遊離を抑制する事により、さらに広範な中枢神経系制御、また末梢神経系の修飾を行っている事が明らかにされている。

(2)Gタンパク質共役型受容体(GPCR)について： 現在までに、ヒスタミン受容体を始めとする多くのGPCRが薬物治療の標的分子とされ、細胞表面に局在する受容体分子自体の活性制御に研究・薬物開発の重点がおかれてきたが、近年、受容体分子の細胞内における局在調節の問題が注目されてきた。すなわち、リボソーム/小胞体(ER)において翻訳されたGPCR分子は自動的に細胞表面へ運ばれるのではなく、ER/ゴルジ体を含む細胞内の膜タンパク質輸送系において、その細胞表面への輸送(トラフィック)が動的に調節されている事が次第に明らかになってきた。つまり、細胞表面へと向かうこの受容体トラフィックの制御が、細胞が担う受容体活性発現のもっとも大きな決定因子の一つである事が明らかになってきた。さらに最近になって、この受容体トラフィックが、受容体のカルボキシ(C)末端細胞質内ドメインに結合する種々のタンパク質群によって制御されていることが明らかにされている。

(3)ヒスタミンH3受容体結合タンパク質、及びH3受容体の細胞表面発現について： 我々はこれまでに、ヒスタミンH3受容体のC末端細胞質内ドメインにCLIC4というタンパク質が特異的に結合する事、さらにCLIC4を過剰発現させると、H3受容体の細胞表面発現量が増加する事を明らかにしている。すなわち、CLIC4タンパク質は、H3受容体の細胞表面へと向かうトラフィックを促進する。また、H3受容体のCLIC4結合アミノ酸配列F...F..LLは、GPCR分子をERに残留させ、G γ サブユニットのアセンブリを促進する働きを持つとされるDRiP78タンパク質の受容体結合コンセンサス配列と類似しており、実際に我々は、DRiP78がインビトロにおいて単独でH3受容体に結合する事を観察した。さらに我々はこのアミノ酸配列には、G β のシャペロンタンパク質であるPhLPもインビトロにおいて直接結合する事を予備実験において見出ししていた。

2. 研究の目的

本研究は、薬物標的としても注目を集めているヒスタミンH3受容体が、その活性を発現させるために遺伝子から転写・翻訳された後、ERから細胞表面に輸送されるトラフィックの詳細な分子メカニズムを明らかにする事を目的とする。具体的には、H3受容体C末端細胞質内ドメインに結合することが確認されたDRiP78タンパク質の機能を、H3受容体との関連で

明らかにする事。また、H3受容体C末端に結合する新たな細胞タンパク質の探索・同定を進め、それらのタンパク質が結合する受容体のアミノ酸配列の同定、また、各タンパク質がH3受容体の細胞内トラフィックや、シグナル伝達に与える影響を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

(1)cDNAクローニング： 実験に使用した遺伝子cDNAは、H3受容体を除き、すべてラット、あるいはマウス脳由来mRNAから、逆転写酵素を利用した、いわゆるRT-PCR法によってクローニングした。

(2)インビトロ結合反応： 受容体のC末端細胞質ドメインはGST融合タンパク質として、また受容体結合タンパク質はMBP融合タンパク質として、あるいはFLAGタグを付加した形で大腸菌で産生した。各タンパク質を混合し4℃でインキュベーション後、グルタチオン担体ビーズを利用してGST融合タンパク質を精製し、精製産物中の受容体C末端結合タンパク質の有無を解析した。受容体C末端結合タンパク質の存在は、抗MBP抗体を使用したウエスタンブロット法により確認した。

(3)培養細胞でのタンパク質発現系： 培養細胞におけるタンパク質発現には、各遺伝子cDNAを含んだ発現用プラスミドDNAのトランスフェクション法による導入、あるいはアデノウイルスベクターを利用した発現系を用いた。培養細胞としては、HEK293、CHO、HeLa、PC12細胞等を利用した。

(4)特異抗体の作成： 培養細胞における発現を確認するために、各タンパク質に対する特異的抗体を作成した。また、抗H3受容体抗体については、細胞表面に局在する受容体分子のみを検出する目的で、特に細胞外に存在する受容体ドメインを認識する抗体を作成した。

(5)細胞表面H3受容体量の測定： 24ウエルプレートに播種した細胞をフォルマリン固定後、5%NFDM/0.1%BSA/PBS(-)中でブロッキングし、抗H3R抗体を反応させた。2次抗体としてHRP抱合抗Ig抗体を用い、検出にはOPD試薬を使用し、492nmにおける吸光度をプレートリーダーにて測定した。また、PC12細胞の場合には、懸濁した細胞を用いて同様の処理を行い、2次抗体としてAlexaFluor488を付加した抗Ig抗体を用い、フローサイトメーターを使用して細胞の蛍光強度を測定した。細胞中の全H3受容体量を測定する場合には、細胞固定後、0.01%TritonX-100による細胞膜透過処理を行った。

(6)タンパク質のユビキチン化測定： PC12細胞にHA-ユビキチン発現用プラスミドを導入し、48時間後に細胞溶解液を作成し、抗H3受容体抗体を使用して免疫沈降を行った。回収したタンパク質を電気泳動後、抗HA抗体を利用し

たウエスタンブロット法によって、ユビキチン化されたH3受容体タンパク質を解析した。また、プロテアソームインヒビターとしてMG132を使用した。

(7) 細胞内cAMP量測定: CHO細胞に、プロモーター領域にCRE配列を持つLuciferase発現用組み換えアデノウイルスを感染させた後、48時間後に実験を行った。H3受容体のリガンドであるRaMHと共に、アデニルサイクラーゼ活性化剤であるForskolinによって5時間細胞を刺激した後、細胞を溶解し、溶解液中に含まれるLuciferase活性を、ルミノメーターにて測定する事により、間接的に細胞内cAMP量を測定した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌で産生した融合タンパク質を利用したインビトロの実験系で、H3受容体のC末端細胞質内ドメインと結合する細胞タンパク質として、CLIC4、DRiP78の他、PhLP、及びCLIC6を新たに同定した。

(2) アミノ酸の変異体を利用した実験の結果、これらのタンパク質は、H3受容体のC末端細胞質内ドメイン上のほぼ同じ位置、すなわちHelix8と呼ばれる両親媒性の α ヘリックス構造に結合することが明らかとなった。

(3) 培養細胞においてDRiP78を過剰発現させる事により、細胞内の総H3受容体量が減少すること、さらに、その減少率以上に細胞表面の受容体が減少することが明らかになった。また、この減少によって、ヒスタミンによるH3受容体を介したシグナルが同様に減少することが確認された。

(4) DRiP78の過剰発現による細胞内の総H3受容体量減少は、通常膜タンパク質が分解されるリゾソーム系によるものではなく、タンパク質のユビキチン化を必要とするプロテアソーム系によるものである事が明らかになった。

(5) CLIC6が、H3受容体のC末端細胞質ドメインだけでなく、細胞内でH3受容体とヘテロダイマーを形成するとされているドパミンD1受容体のC末端とも結合する事が明らかになった。

(6) DRiP78とは異なり、培養細胞系においてPhLPの過剰発現によっては、細胞内の総H3受容体量、また細胞表面の受容体量に変化が見られない事を確認した。

(7) 培養細胞系において、CLIC4の過剰発現により細胞表面のH3受容体は増加するが、ヒスタミンによるシグナル伝達には、それに見合った増加は認められなかった。

以上の結果から、ヒスタミンH3受容体の細胞表面発現が、多くの細胞タンパク質との逐次的な相互反応によって制御されていること、またその制御系が単に受容体の細胞表面への輸送だけにとどまらず、受容体分子を中心としたシグナル伝達分子との複合体形成の制御メカニズムと密接に関係していることが示唆される。

また、ヒスタミンH3受容体を代表とするGPCR分子のヘテロダイマー形成に、CLIC6の様な受容体C末端結合タンパク質が関与している可能性も明らかとなった。今後、このような細胞表面受容体の細胞内トラフィッキングのメカニズム解明は、基礎生物学上の興味を超えて、ますます臨床的な応用を視野に入れた研究へと発展していく事が予想され、今後もいっそうの進展が望まれるものである。

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 23 件)

① Kuramasu A, Sukegawa J, Sato T, Sakurai E, Watanabe T, Yanagisawa T, Yanai K (2011) The hydrophobic amino acids in putative helix 8 in carboxy-terminus of histamine H(3) receptor are involved in receptor-G-protein coupling. Cellular Signalling, 23: 1843-1849. 査読有。

② Sakurai E, Kuramasu A, Watanabe T, Yanai K (2009) Multiple histamine receptor gene knockout mice and their phenotypes. Inflammation Research 58, suppl 1: 41-42. 査読有。

[学会発表] (計 31 件)

① 助川 淳, 佐藤岳哉, 柳澤輝行, 「ヒスタミン H3 受容体結合タンパク質の受容体結合コンセンサス配列の解析」、第 85 回日本薬理学会年会、平成 24 年 3 月 14 日、京都。

② 佐藤岳哉, 助川 淳, 柳澤輝行, 「PICK1 と GHRHR の相互作用は、GHRHR の細胞表面発現を制御する」、第 85 回日本薬理学会年会、平成 24 年 3 月 14 日、京都。

③ 助川 淳, 「G タンパク質共役型受容体細胞内トラフィッキング制御タンパク質の解析」、新薬理学セミナー2011、平成 23 年 9 月 30 日、仙台。

④ 佐藤岳哉, 助川 淳, 柳澤輝行, 「GHRHR の Carboxy 末端に結合する PICK1 は、受容体の細胞表面発現を調節する」、第 84 回日本薬理学会年会、平成 23 年 3 月 23 日、横浜。

⑤ 助川 淳, 佐藤岳哉, 柳澤輝行, 「DRiP78 interacts with the carboxy terminus of histamine H3 receptor and decreases the expression of the receptor」、第 61 回日本薬理学会北部会、平成 22 年 9 月 10 日、札幌。

⑥ 中畑則道, 「A1 アデノシン受容体と P2Y2 受容体のヘテロダイマー形成インターフェイスの探索」、第 61 回日本薬理学会北部会、平成 22 年 9 月 10 日、札幌。

⑦ 助川 淳, 佐藤岳哉, 柳澤輝行, 「ヒスタミン H3 受容体に結合する細胞内タンパク質の機能解析」、第 83 回日本薬理学会年会、平

成 22 年 3 月 18 日、大阪。

⑧ 中畑則道、助川 淳、柳澤輝行、「副甲状腺ホルモン受容体機能に及ぼす Tctex-1 の役割の解明」、第 83 回日本薬理学会年会、平成 22 年 3 月 16 日、大阪。

⑨ 助川 淳、「ヒスタミン H3 受容体の細胞内トラフィック制御因子の解析」、第 37 回薬物活性シンポジウム、平成 21 年 10 月 9 日、仙台。

⑩ 中畑則道、助川 淳、柳澤輝行、「副甲状腺ホルモン受容体機能に及ぼす Tctex-1 の役割の解明」、第 60 回日本薬理学会北部会、平成 21 年 9 月 26 日、富山。

⑪ 助川 淳、佐藤岳哉、柳澤輝行、「ヒスタミン H3 受容体に結合する細胞内タンパク質の機能解析」、第 60 回日本薬理学会北部会、平成 21 年 9 月 26 日、富山。

⑫ 助川 淳、佐藤岳哉、柳澤輝行、「Cell surface expression of histamine H3 receptor is regulated by proteins interacting with the carboxy terminus of the receptor」、10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilation (MOVD2009)、平成 21 年 6 月 3 日、宮城県松島。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

助川 淳 (SUKEGAWA JUN)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30187687

(2) 研究分担者

柳澤 輝行 (YANAGISAWA TERUYUKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90133941

中畑 則道 (NAKAHATA NORIMICHI)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60045804

(H21～H22)

守屋 孝洋 (MORIYA TAKAHIRO)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：80298207

倉増 敦朗 (KURAMASU ATSUO)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90302091

佐藤 岳哉 (SATO TAKEYA)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10312696