

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 7月31日現在

機関番号：13401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590273
 研究課題名（和文） G蛋白共役型受容体のホモダイマー形成によるリガンド親和性・細胞シグナルの変化に関する研究
 研究課題名（英文） Effect of homodimerization of G-protein coupled receptors on the cell signaling and the affinity to ligands
 研究代表者
 森島 繁 (MORISHIMA SHIGERU)
 福井大学・医学部・准教授
 研究者番号：50290911

研究成果の概要(和文)：G蛋白共役型受容体はダイマーで機能していると信じられている。我々は、 $\alpha 1A$ 受容体と相互作用する Snapin を発現させた細胞を用いて、研究を行った。Snapin は $\alpha 1A$ 受容体と結合するが、Snapin 自身も2量体を作る。我々は Snapin の2量体形成に伴い、 $\alpha 1A$ 受容体も2量体を形成していることを示唆するデータを得たが、Hill 係数の解析から、驚くべきことに、従来の受容体とは異なり、2量体の受容体にたいして1つのアゴニストが結合することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Functional G-protein coupled receptors are believed to be functional when dimerized. Still, in the receptor dimer, each subunit (one receptor molecule) binds to one agonist, respectively. When coexpressed with Snapin, which interacts with alpha-1A receptors, Snapin also dimerizes, and each Snapin can bind to the receptor. Thus, alpha-1A receptor can also form dimer. Interestingly, the receptor dimer with Snapin can bind only to one agonist, suggesting that the functional dimer when coexisted with Snapin may form a different structure from the dimer without Snapin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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・チャネル・輸送系・シグナル情報伝達系

1. 研究開始当初の背景

(1) GPCR がホモダイマーを形成する生理学的意義は不明でした。

GPCR は、よく知られているように

アドレナリン受容体、ムスカリン受容体などを含む最も大きな生体蛋白ファミリーの1つです。GPCR は、以前よりダイマーを形成することが示唆されています。近年は様々な受容体がヘテ

ロダイマーを形成し、新しい機能を示すことが明らかにされてきました。しかし、ホモダイマーを形成する受容体においては、図 1 に示すように、一分子それぞれ独立にリガンドが結合し、細胞内シグナルが誘導されることが予想されています。しかし、これでは、GPCR 受容体において、ホモダイマーが形成されるべき生理学的意義を説明することができません。

(2) 受容体と相互作用する様々なタンパクが同定されてきました。

私たちは、 α_{1A} 受容体に相互作用する Snapin というタンパクが α_{1A} 受容体、および TRPC チャンネルと複合体を形成することにより、受容体作動性 Ca^{2+} 流入を誘導することを、初めて明らかにしました (Suzuki, et al., 2007)。このように、受容体に密接に相互作用して、「接着剤」のような機能をもつ分子が近年いくつも発見されてきました。

(3) 受容体は、ダイマーを形成しないと Ca^{2+} シグナルを誘導することができない場合があります。

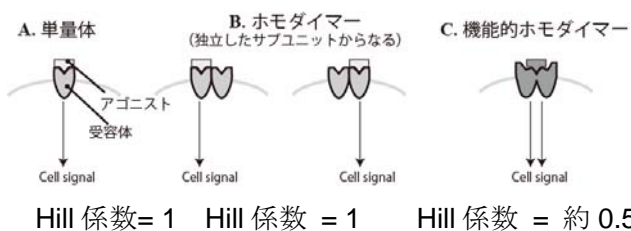


図 1 : 受容体がダイマーを形成しても、B のようにそれぞれの分子 (サブユニット) が独立にアゴニストと結合してセルシグナルを出すのであれば単量体として機能する場合 (A) と区別できない。生理学的意義があるダイマーは、C の様な 1 分子のアゴニストがダイマーに結合する時であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、受容体がホモダイマーを形成したときと、そうでないときに、受容体の性質の違いがあることを明らかにし、ホモダイマーを形成する生理学的・薬理的意義を明らかにすることです。

これを α_1 アドレナリン受容体を用いて明らかにすることがこの研究の当初の目的でした。また、研究の進行と共に受容体に結合するタンパクがあるときとないときで受容体のアゴニストとの結合様式が変化することもわかってきました。

3. 研究の方法

(1) 受容体タンパクと相互作用するタンパク質と、 α_1 受容体を共発現させ、細胞内 Ca^{2+} 濃度を Fura-2 ratiofluorometry を用いて、測定し、ダイマーを形成するかどうか濃度-作用曲線を用いて調べました。

(2) アゴニストとして、ノルアドレナリンや α_1 選択的な methoxamine を用いて調べました。また、数種類のアンタゴニストを用いました。とりわけ、 α_1A 受容体に選択的な silodosin や非選択的 α_1 受容体遮断薬である prazosin を用いて実験を行いました。

(3) Snapin や α_1 受容体のそれぞれの N 端または C 端に CFP あるいは YFP を結合させた融合タンパク質を発現させ、FRET にて相互作用を調べました。

4. 研究成果

(1) α_1A 受容体を発現させた細胞をアゴニストにより刺激すると、細胞内 Ca^{2+} は上昇します。私たちは、 α_1A 受容体を発現させた細胞に、受容体相互作用タ

ンパク **Snapin** を共発現させた細胞を用いて、アゴニストによる細胞内 Ca^{2+} 上昇を観察したところ、**Snapin** が発現していない細胞とは、アゴニストによる細胞内 Ca^{2+} 上昇の濃度-作用曲線の形が異なることに気づきました。**Snapin** を共発現させなかったとき(受容体単独)は、濃度-作用曲線の Hill 係数は 1 であったのに対して、**Snapin** を共発現させたときは、Hill 係数は 0.5 でした (図 2)。このことは、**Snapin** 非存在下においては、(たとえそれがダイマーを形成しようとも) 受容体 1 ユニットはそれぞれ独立にアゴニスト 1 分子と結合し、 Ca^{2+} シグナルを誘導するのに対し、**Snapin** 存在下においては、受容体 2 ユニット (ホモダイマー) に対してアゴニスト 1 分子が働いて初めて、 Ca^{2+} 上昇機構が機能することを意味していると考えられます。このアゴニスト 1 分子に対してホモダイマーで応答する受容体は、機能性ホモダイマーを構成するものと考えられます。

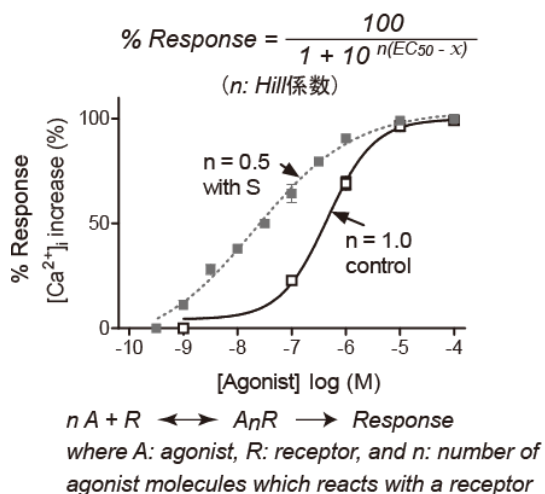


図 2 タンパク S の共発現によって、アゴニストと受容体の結合様式が変わったと思われるプレリミナリーな実験データ。S により Hill 係数は 0.5 となり、受容体が機能的ホモダイマーを形成していることが示唆される。

(2) **Snapin** 存在下においては、受容体 2 ユニット (ホモダイマー) に対してアゴニスト 1 分子が働いているかどうかを、さらに確認するために、いくつかのアンタゴニストを用いて、**Snapin** 存在下・非存在下における濃度-抑制作用を調べました。この結果、**Snapin** 発現細胞でノルアドレナリン 10^{-5} M 存在下では多くのアンタゴニストは (アゴニストの時と同様) Hill 係数 0.5 にて受容体に結合しました。

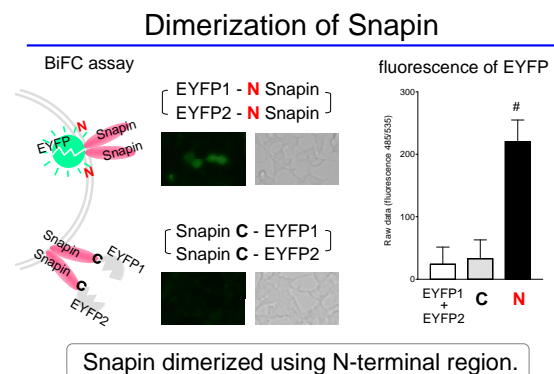


図 3 BiFC 法による **Snapin** 2 量体形成

(3) BiFC 法を用いた解析で **Snapin** がその N 端で結合して 2 量体を作ることが明らかになりました。FRET を用いた解析にて、**Snapin** の C 端と $\alpha 1A$ 受容体が結合することが明らかになりました。また、**Snapin** 同士は、N 端で互いに結合することは FRET 法でも確認されました。

以上のことから、**Snapin** 存在下では **Snapin** の 2 量体を介して、 $\alpha 1A$ 受容体は 2 量体を作ることがわかりました。その 2 量体は、**Snapin** のないときに存在すると考えられている (おそらく弱い結合をしている) 2 量体と比べて、agonist や antagonist の結合様式が異なることや、その後の細胞内シグナルの活性化が

異なることが示唆されました。

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. Morishima S., Suzuki F., Nishimune A., Yoshiki H., Akino H., Yokoyama O., Muramatsu I. Visualization and tissue distribution of the α_{1L} adrenoceptor in prostate by a fluorescence-labeled ligand, Alexa-488-silodosin. *J. Urol.* 183:812-9, 2010.
2. Nishimune A., Suzuki S., Yoshiki H., Morishima S., Muramatsu I. α_1 -Adrenoceptor pharmacome: α_{1L} -adrenoceptor and α_{1A} -adrenoceptor in the lower urinary tract. *Inter. J. Urol.* 17:31-37, 2010.
3. Nishimune A., Suzuki F., Yoshiki H., Morishima S., Muramatsu I. Identification of Cysteine-Rich Epidermal Growth Factor-Like Domain 1a(CRELD1a) as a Novel α_{1A} -Adrenoceptor-Down-Regulating Protein and Establishment of an α_{1L} -Adrenoceptor-Expressing Cell Line. *J. Pharmacol. Sci.* 113:169-181, 2010.
4. Yoshiki H., Nishimune A., Suzuki F., Morishima S., Ikeda T., Sasaki M., Audigane LM., Gauthier C., Muramatsu I. Evaluation of β_{1L} -adrenoceptors in rabbit heart by tissue segment binding assay. *J. Pharmacol. Sci.* 110:389-396, 2009.
5. Muramatsu I., Suzuki F., Nishimune A., Anisuzzaman ASM., Yoshiki H., Su TH., Chang CK., Morishima S. Expression of distinct α_1 -adrenoceptor phenotypes in the iris of pigmented and albino rabbits. *Br. J. Pharmacol.* 158:354-360, 2009.
6. Horinouchi T., Asano H., Higa T., Nishimoto A., Nishiya T., Muramatsu I., Miwa S. Differential Coupling of Human Endothelin Type A Receptor to Gq/11 and G12 Proteins: the Functional Significance of Receptor Expression Level in Generating Multiple Receptor Signaling. *J. Pharmacol. Sci.* 111:338-51, 2009.
7. Horinouchi T., Morishima S., Tanaka Y., Koike K., Miwa S., Muramatsu I. Pharmacological evaluation of ocular α -adrenoceptors in rabbit by tissue segment binding method. *Life Sci.* 84:181-187, 2009.

[学会発表] (計 5 件)

1. 西宗 敦史, 鈴木 史子, 吉木はつみ, 森島 繁, 村松 郁延, α_1A と CRELD1 の共発現による α_1L アドレナリン受容体安定発現株の樹立, 第 33 回日本神経科学大会, 神戸,

2010 年 9 月 2 日 (一般口演)

2. Atsushi Nishimune, F Suzuki, H Yoshiki, S Morishima, I Muramatsu, Identification of CRELD1 α , as a novel receptor-interacting protein that modulates α_{1A} and α_{1L} -adrenoceptor expression. 16th World Congress of Basic Clinical Pharmacology, Denmark, July 18th, 2010.(poster)
3. 鈴木史子, 西宗敦史, 吉木はつみ, 森島繁, 村松郁延: α_1L アドレナリン受容体の表現型の、 α_1A アドレナリン受容体および新規結合蛋白質 ARIP の共発現による再構成, 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪国際会議場, 2010 年 3 月 18 日 (一般講演)
4. 森島繁, 吉木はつみ, 西宗敦史, 鈴木史子, 秋野裕信, 横山修, 村松郁延: 蛍光リガンド Alexa-488-silodosin の α_1 アドレナリン受容体に対する選択性, 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪国際会議場, 2010 年 3 月 18 日 (poster)
5. Morishima, S., Suzuki, F., Muramatsu, I. The molecular mechanism of the α_{1A} -adrenoceptor-operated Ca^{2+} INFLUX. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sci., July 29th, 2009, Kyoto Japan (Poster)

[図書] (計 4 件)

1. Morishima, S., James, A. F. "Digital Recording of Patch-Clamp Data." In Patch Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols (ed. Y. Okada) pp 403-414, 2012, Springer, Japan
2. Sabirov, R. Z., Morishima, S. "Solutions for Patch-Clamp Experiments." In Patch Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols (ed. Y. Okada) pp 415-431, 2012, Springer, Japan
3. 森島 繁 (2011) コンピュータによるパッチクランプデータ記録法, "最新パッチクランプ実験技術法" (岡田泰伸編), pp. 294 - 311, 吉岡書店, 京都
4. サビロブ ラブシャン, 森島 繁 (2011) パッチクランプ法の実験溶液. "最新パッチクランプ実験技術法" (岡田泰伸編), pp. 294 - 311, 吉岡書店, 京都

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者

森島 繁 (ROMISHIMA SHIGERU)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：50290911

(2) 研究分担者

村松 郁延 (MURAMATSU IKUNOBU)
福井大学・医学部・教授
研究者番号：10111965
鈴木 史子 (SUZUKI FUMIKO)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：80291376

(H21のみ)

西宗 敦史 (NISHIMUNE ATSUSHI)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：40311310

(3) 連携研究者

なし