

機関番号：10101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790237

研究課題名 (和文) エンドセリン A 型受容体分解誘導分子 Jab1 の心血管系疾患における病態的意義の解明

研究課題名 (英文) Elucidation for pathophysiological significance of Jab1 as an inducer of endothelin type A receptor degradation in cardiovascular diseases

研究代表者

西本 新 (NISHIMOTO ARATA)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90396325

研究成果の概要 (和文)：私は、新規エンドセリン A 型受容体(ET_AR) 結合蛋白質として Jab1 を同定し、Jab1 は ET_AR のユビキチン化、蛋白質分解を亢進させることを明らかにした。さらに、アゴニストである ET-1 で ET_AR を刺激するとアゴニスト誘導性の蛋白質分解が引き起こされ、ET_AR レベルは時間依存的に減少していく一方、ET_AR に結合している Jab1 量が増加すること、また ET_AR より代謝回転が速いエンドセリン B 型受容体 (ET_BR) では、ET_AR に比べて、ユビキチン化が亢進しているとともに、より多くの Jab1 と結合していることを明らかにした (Nishimoto A. et al., Biochem Biophys Res Commun., 391, p1616-22, 2010)。

研究成果の概要 (英文)：I identified Jun activation domain-binding protein 1 (Jab1) as an endothelin type A receptor (ET_AR)-interacting protein. Jab1 overexpression accelerated ubiquitination and degradation of ET_AR. Long-term ET-1 stimulation markedly accelerated the rate of ET_AR degradation and increased the amount of Jab1 bound to ET_AR. The degradation rate of ET_BR was markedly faster than that of ET_AR. Notably, the amount of Jab1 bound to ET_BR and ubiquitination level of ET_BR were markedly higher than those for ET_AR (Nishimoto A. et al., Biochem Biophys Res Commun., 391, p1616-22, 2010).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：酵母ツーハイブリッド法・エンドセリン受容体・Jab1・蛋白質分解・ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

私は、酵母ツーハイブリッド法を用いて、成人ヒト心臓cDNAライブラリーから新規エンドセリンA型受容体C末端領域 (ET_AR C-tail) 結合蛋白質として Jab1 を単離・同定し、ET_AR と Jab1 の結合を GST pull-down assay や免疫沈降によって確認した。また両者は細胞膜上に共局在しており、Jab1 過剰発現により ET_AR のユビキチン化レベルや ET_AR 蛋白質の分解が亢進していることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

エンドセリン受容体 (ETR) 結合蛋白質として同定された Jab1 による ETR 分解制御機構を詳細に解析し、ETR の過剰発現が認められる心血管疾患における Jab1 の病態的意義を解明する。

3. 研究の方法

私は、エンドセリン B 型受容体 C 末端領域 (ET_BR C-tail) 結合蛋白質としても Jab1 を単離しており、蛋白質分解における ET_AR と ET_BR の Jab1 に対する反応性やユビキチン化レベルを比較し、Jab1 による ETR 分解制御機構を解析した。また、分解速度の速い ET_BR に焦点を当て、ET_BR に存在する Y-X-X-Φ モチーフやユビキチン化の蛋白質分解における働きや Jab1 とそれらの関わりを検討した。

4. 研究成果

私は、これまで酵母ツーハイブリッド法を用いて成人ヒト心臓cDNAライブラリーから新規エンドセリンA型受容体C末端領域 (ET_AR

C-tail) 結合蛋白質として Jab1 を単離し、Jab1 は ET_AR のユビキチン化、リソソームでの蛋白質分解を亢進させて ET_AR レベルを調節していることを明らかにしていた。本研究において、さらにアゴニストである ET-1 で ET_AR を刺激するとアゴニスト誘導性の蛋白質分解が引き起こされ、ET_AR レベルは時間依存的に減少していく一方、ET_AR に結合している Jab1 量が増加すること、また ET_AR より代謝回転が速いエンドセリン B 型受容体 (ET_BR) では、ET_AR に比べて、ユビキチン化が亢進しているとともに、より多くの Jab1 と結合していることを明らかにした。これらの結果より、Jab1 の ET 受容体への結合量が ET 受容体のユビキチン化レベルを変動させ、ET 受容体の蛋白質分解速度を制御し、その結果、ET 受容体レベルが変動することが明らかになった (Nishimoto A. et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 391, p1616-22, 2010)。さらに、より詳細に ETR 分解制御機構を解明するため、分解速度が速い ET_BR に焦点を当て、エンドサイトーシスや蛋白質分解が起こりにくくなる変異体を用いて、それらの細胞内動態を調べるとともに Jab1 との関わり合いを検討した。ET_BR C-tail のパルミトイルレーション部位以降に存在する 5 個のリジンをアルギニンに変異させた変異体 (ET_BR C-tail 5K/R)、エンドサイトーシスやリソソームでの蛋白質分解に関わる Y-X-X-Φ (Y; チロシン, X; 任意のアミノ酸, Φ; 疎水性アミノ酸) モチーフ内のチロシンをアラニンに変異させた変異体 (ET_BR C-tail Y/A) を作製し、それらのユビキチン化レベルや蛋白質分解速度を調べたところ、ET_BR C-tail 5K/R では野生型 ET_BR と比較してユビキチン化が著しく阻害されたが、ET_BR C-tail Y/A では、野生型

ET_BRと同等レベルであった。また、ET_BR C-tail 5K/R, ET_BR C-tail Y/Aの両方とも野生型ET_BRに比べて蛋白質分解速度が遅くなった。さらに、これらの変異体にJab1を過剰発現させると、どちらの変異体にもJab1は結合し、蛋白質分解速度の亢進が認められた。このことから、Jab1による蛋白質分解の促進は、ユビキチン化やY-X-X-Φによる蛋白質分解に非依存性であると考えられた (unpublished data)。今後、これらの変異体を用いてエンドサイトーシスの変化を調べるとともにJab1との関わり合いを検討し、ETRの過剰発現が認められる心血管疾患におけるJab1の病態的意義を解明する予定である。

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 2件)

1. Nishimoto A, Lu L, Hayashi M, Nishiya T, Horinouchi T, Miwa S. (2010) Jab1 regulates levels of endothelin type A and B receptors by promoting ubiquitination and degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 391 (4) 1616-22 査読有.
2. Higa T, Horinouchi T, Aoyagi H, Asano H, Nishiya T, Nishimoto A, Muramatsu I, Miwa S. (2010) Endothelin type B receptor-induced sustained Ca²⁺ influx involves G(q/11)/phospholipase C-independent, p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of Na⁺/H⁺ exchanger. *J Pharmacol Sci.* 113 (3) 276-80 査読有.

[学会発表] (計 5件)

1. 西本 新, Lu lingyun, 林 美里, 西屋 禎、

堀之内 孝広, 三輪 聡一 Regulation of endothelin receptor levels by receptor binding protein, Jab1 第 83 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月 16 日~18 日、大阪国際会議場 (大阪市)

2. 西本 新, Lu lingyun, 林 美里, 西屋 禎, 堀之内 孝広, 三輪 聡一 Jab1, an ETAR-interacting protein, regulates ETAR level by promoting its degradation 第 26 回国際心臓研究学会日本部会、2009 年 12 月 4 日~5 日、北海道大学学術交流会館 (札幌市)
3. 西本 新, Lu lingyun, 林 美里, 西屋 禎, 堀之内 孝広, 三輪 聡一 受容体結合蛋白質 Jab1 によるエンドセリン受容体の発現レベル調節機構 第 19 回日本循環薬理学会、2009 年 11 月 27 日、京都大学百周年時計台記念館 (京都市)
4. 西本 新, Lu lingyun, 林 美里, 西屋 禎, 堀之内 孝広, 三輪 聡一 受容体結合蛋白質 Jab1 によるエンドセリン受容体の発現レベル調節機構 第 60 回日本薬理学会北部会、2009 年 9 月 26 日、富山国際会議場 (富山市)
5. 西本 新, Lu lingyun, 林 美里, 西屋 禎, 堀之内 孝広, 三輪 聡一 Regulation of cell surface endothelin type A receptor level by a novel receptor-interacting protein, Jab1. 第 36 回国際生理学会世界大会、2009 年 7 月 27 日~8 月 1 日、京都国際会議場 (京都市)
6. 研究組織

(1) 研究代表者

西本 新 (NISHIMOTO ARATA)

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90396325

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし