

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460326

研究課題名(和文) Gタンパク質共役型受容体結合蛋白質による受容体シグナル制御の多様性と普遍性の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of trafficking regulation of G protein-coupled receptor

研究代表者

寺田 晃士(Terada, Koji)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70342722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：エンドセリン-1(ET-1)の2種類の受容体であるETARとETBRは、ET-1による刺激後の運命が異なる。本研究では、ユビキチン化が両受容体の運命の選択に重要な役割を果たすことを見出した。すなわち、ET-1の刺激ではETBRのみがユビキチン化され、細胞内移行および分解の速度はETARよりETBRのほうが早かった。C末端領域の5つのリシン残基のアルギニン置換変異型ETBR(ETBR 5KR)は、ET-1刺激によるユビキチン化を受けず、細胞内移行の速度が低下し、さらに、細胞内移行した後にはETBRのように分解されないで、ETARのように細胞膜にリサイクルされた。

研究成果の概要(英文)：Two types of G protein-coupled receptors for endothelin-1 (ET-1), ET type A receptor (ETAR) and ETBR, resemble each other, but upon ET-1 stimulation, they follow different intracellular trafficking pathways. In this study, we showed that ETBR but not ETAR was ubiquitinated upon ET-1 stimulation, and that ETBR was internalized and degraded in lysosome more rapidly than ETAR. The mutant ETBR (designated "5KR mutant") in which 5 lysine residues in C-tail were substituted to arginine was not ubiquitinated, and its rates of internalization and degradation after ET-1 stimulation became slower. Confocal microscopic study showed that following ET-1 stimulation, ETAR and 5KR mutant of ETBR were co-localized mainly with Rab11, a marker of recycling endosome, whereas ETBR was with Rab7, a marker of late endosome/lysosome. These results demonstrate that agonist-induced ubiquitination in C-tail of ETBR switches intracellular trafficking from recycling to plasma membrane to targeting to lysosome.

研究分野：生化学、分子薬理学

キーワード：エンドセリン ユビキチン エンドサイトーシス リサイクリング

1. 研究開始当初の背景

エンドセリン-1 (Endothelin-1: ET-1) は、1988年に柳沢らによって、血管収縮を引き起こす生理活性ペプチドとして単離された。その後 ET-1 は、血管の収縮および弛緩の制御だけでなく、細胞増殖の亢進などの生理作用を有すること、一方で、高血圧症、動脈硬化症、心不全、脳血管攣縮、肺高血圧症などの心血管系病態の発症・進展においても重要な役割を果たすことなどが示されている。ET-1 の作用を細胞に伝達する ET 受容体 (Endothelin receptor: ETR) には A 型受容体 (Endothelin type A receptor: ET_AR) と B 型受容体 (ET_BR) の 2 種類があり、どちらも細胞膜上に存在する。それら ETR は、G protein-coupled receptor (GPCR) ファミリーに属し、ET-1 が結合すると、G タンパク質をはじめとする細胞内シグナル伝達分子を活性化して、細胞応答を引き起こす。ET_AR は主に血管平滑筋細胞に発現し、ET-1 による ETAR の活性化は血管平滑筋細胞の細胞内カルシウム濃度の上昇を誘発して血管平滑筋の収縮をきたし、血管の収縮を誘発する。一方 ET_BR は主に血管内皮細胞に発現し、ET-1 の刺激による ET_BR の活性化は一酸化窒素の合成および分泌を介して血管平滑筋の収縮を抑制して、血管の弛緩を誘発する。ET_BR は、ET-1 のクリアランス受容体としても知られ、血管中を循環している ET-1 と結合して一緒に細胞内に取り込まれることにより、ET-1 の血中濃度を低下させる役割を担うと考えられている。

ET-1 のラットへの投与では、一時的に血圧が低下するがその後血圧の上昇が認められ、上昇した状態が 1 時間以上持続した。このことから、ET-1 は相反する 2 つの作用をもつことと、それら 2 つの作用は持続時間が異なることが示された。今日、この相反する作用は、ET_AR (血管平滑筋細胞に発現して血圧の上昇に寄与) と ET_BR (血管内皮細胞に発現して血圧の下降に寄与) という 2 種類の受容体によるものであることが知られている。一方、持続時間の違いは、それら受容体の脱感作に対する感受性の違いであると考えられる。脱感作に対する ET_AR と ET_BR の感受性の違いは、それぞれの受容体の、刺激後の細胞内トラフィッキング経路の違いを反映する (細胞内移行や細胞内の決められた標的小器官への輸送を細胞内トラフィッキングという)。リガンドである ET-1 の結合後、どちらの受容体とも細胞内移行し、初期エンドソームに到達する。しかし、その後に辿るトラフィッキング経路は異なっている。初期エンドソームから、ET_AR は細胞膜へリサイクルされるのに対し、ET_BR は、後期エンドソーム、リソソームへと輸送され、分解される。すなわち、ET-1 による刺激後、ET_AR の細胞膜上の受容体量の減少速度は、ET_BR のそれと比べて遅いため、作用が持続する。ET_AR と ET_BR との間でアミノ酸レベルでは、全体で約 55%、膜貫通ドメインで約 77% の同一性がある。このような比較的高

い同一性をもちながら、異なる経路の選択に関わるメカニズムの詳細は明らかにされていない。

一般的に GPCR では、細胞質側にある C 末端領域が細胞内トラフィッキング経路の選択において重要な役割をもつことが知られている。ETR でも、C 末端領域が ET_AR と ET_BR のそれぞれの細胞内トラフィッキング経路を決定することが示されている。すなわち、C 末端領域を ET_AR のそれと入れ替えた ET_BR は、細胞内移行の後に ET_AR のように細胞膜へリサイクルされ、逆に、C 末端領域を ET_BR のそれと入れ替えた ET_AR は、細胞内移行の後に ET_BR のように後期エンドソーム、リソソームへと輸送され、分解される。しかし、C 末端領域のどのような違いがこのような細胞内トラフィッキング経路の違いを生み出すのかは明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

エンドセリン-1 (ET-1) は血管収縮、細胞増殖などの作用を有し、高血圧、動脈硬化症、心不全、脳血管攣縮、肺高血圧症などの心血管系病態の発症・進展において重要な役割を果たしている。ET の作用は ET 受容体 (ETR) を介して発現し、細胞膜上の受容体レベルの調節は、ET の生理・病態学的に重要である。しかし、ETR レベルの調節機構は、細胞内 C 末端領域が重要な役割をもつこと以外は不明である。そのため、C 末端領域のユビキチン (Ub) 化が、受容体レベルの調節に重要な役割をもつ可能性について検討した。

3. 研究の方法

HA 標識化した ET_AR (HA-ET_AR) あるいは HA-ET_BR を発現する HEK293T 細胞に、myc 標識化した Ub を発現させた。Ub 化された受容体は、抗 HA 抗体により免疫沈降後、抗 myc 抗体により検出した。受容体の分解速度は、シクロヘキシミド処理後の受容体の経時変化量により求めた。細胞表面の受容体は、ビオチン-ストレプトアビジン法により精製後、抗 HA 抗体により測定した。受容体のリサイクリングは、共焦点顕微鏡を用いて、受容体と、リサイクリング小胞の分子マーカー (Rab11) との細胞内での共局在を観察して確認した。細胞内 Ca²⁺濃度の測定には、Fura2 を用いた。

4. 研究成果

(1) ET_BR のユビキチン化

ET_AR と ET_BR が ET-1 刺激によりユビキチン化されるかどうか検討した。その結果、ET_AR ではユビキチン化が認められなかったが、ET_BR は、ユビキチン化された。すなわち、ET_BR は ET-1 刺激前から弱くユビキチン化が認められ、そのユビキチン化は ET-1 刺激により増強され、少なくとも 20 分間は持続した (5. 主な発表論文等 参照)。

(2) ユビキチン化の ET_BR トラフィッキングに

おける役割

ET_BR の細胞内トラフィッキングにおける ET-1 の刺激誘発的なユビキチン化の役割を、ET_BR の細胞内移行と分解という点について検討した。細胞表面上の ET_BR 量は ET-1 による刺激後に約 15 分間の半減期で減少した。ユビキチン化されない変異体である ET_BR 5KR は、細胞表面からの減少速度が減少した。次に、ユビキチン化の受容体分解における役割を検討した。タンパク質合成阻害剤存在下で新たな受容体の合成を抑制した状態で、ET-1 刺激後の受容体の消失速度を測定した。ET_BR の受容体量は、ET-1 刺激後 30 分間の間に時間と共に減少したが、ET_BR 5KR は、ET_BR WT と比較してゆっくりと減少した (5. 主な発表論文等 参照)。

(3) ETR のリサイクリングとユビキチン化の関係

次に、ET_AR、ET_BR と ET_BR 5KR の細胞内トラフィッキングの経路を共焦点顕微鏡を用いて解析した。トラフィッキング経路の解析のために、ET-1 による刺激後に、ETR と Rab7 (後期エンドソームおよびリソソームのマーカー) あるいは Rab11 (リサイクリングエンドソームのマーカー) との局在が一致するかどうかについて検討した。そのために、HEK293T 細胞に、GFP と融合させた ETR のいずれかひとつ (ET_AR-GFP、ET_BR-GFP あるいは ET_BR 5KR-GFP) と tdTomato と融合させた Rab7 (Rab7-tdTomato) あるいは Rab11-tdTomato を発現させ、ET-1 刺激 30 分後に、GFP と tdTomato のシグナルを示す画像を取得して解析した。ET-1 刺激前では受容体はほぼ細胞膜上に存在したが、刺激後は細胞内に移行して細胞内小胞に局在した。ET_AR は、主に Rab11 の局在する小胞 (リサイクリングエンドソーム) に局在し、ET_BR は、主に Rab7 の局在する小胞 (後期エンドソーム/リソソーム) に局在した。そして、ユビキチン化されない変異体である ET_BR 5KR は、主に、リサイクリングエンドソームに局在が認められた。これらのことから、ET-1 による刺激後に細胞内移行した ET_BR 5KR は、主に細胞膜にリサイクリングされると考えられた (5. 主な発表論文等 参照)。

(4) ET_BR シグナル伝達におけるユビキチン化の役割

受容体のユビキチン化が ET_BR のシグナル伝達系にどのような影響を与えるのか、Extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化レベルを指標にして検討した。ET-1 による ET_BR の活性化によって ERK のリン酸化が引き起こされることが知られている。細胞を ET-1 で 30 分間刺激して受容体の細胞内移行を誘発した後、ET-1 を含まない培地に交換して、さらに 15 分間培養した後に再び ET-1 で刺激した (2 回目の刺激)。1 回目の刺激による ERK のリン酸化レベルの上

昇は、ET_BR WT と ET_BR 5KR とでほぼ同様であった。2 回目の刺激では、1 回目の刺激と比較するとどちらの受容体でも ERK のリン酸化レベルは弱くなった。しかし、2 回目刺激による ERK のリン酸化レベルは、ET_BR 5KR において ET_BR WT よりも 2~3 倍高かった。次に、ET-1 刺激によるカルシウム反応に関しても同様に検討した。ET_BR は Gq を活性化することにより、細胞内カルシウム濃度を上昇させる。細胞内カルシウム濃度を測定すると、ET-1 の 1 回目の刺激に対しては ET_BR WT と ET_BR 5KR は同程度に細胞内カルシウム濃度の上昇を誘発した。2 回目の刺激に対してもカルシウム濃度の上昇を誘発したが、どちらも 1 回目の反応より弱くなった。しかし、2 回目の刺激に対しては、約 60%ほど、ET_BR 5KR のほうが ET_BR WT よりも大きいカルシウム反応を誘発した (5. 主な発表論文等 参照)。

(5) まとめ

ET_BR はユビキチン化されるが ET_AR されず、ET_BR は ET-1 の刺激によりユビキチン化されると後期エンドソーム/リソソームの分解経路を辿り、ユビキチン化されない変異型 ET_BR (ET_BR 5KR) は、ET_AR と同様に、リサイクリングの経路を辿った。以上のことから、ユビキチン化の有無が ETR の異なる受容体運命の選択に重要な役割を果たすことが示された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 8 件)

Horinouchi T., Hoshi A., Harada T., Higa T., Sarita K., Terada K., Higashi T., Mai Y., Nepal P., Mazaki Y. and Miwa S. Endothelin-1 suppresses insulin-stimulated Akt phosphorylation and glucose uptake via G protein-coupled receptor kinase 2 in skeletal muscle cells. **Br. J. Pharmacol.** 2016. (査読有), DOI: 10.1111/bph.13406

Horinouchi T., Terada K., Higashi T. and Miwa S. Using Phos-Tag in Western Blotting Analysis to Evaluate Protein Phosphorylation. **Methods Mol. Biol.** 1397, 267-77. 2016. (査読有), DOI: 10.1007/978-1-4939-3353-2_18

Terada K., Horinouchi T., Fujioka Y., Higashi T., Nepal P., Horiguchi M., Sarita K., Hatate C., Hoshi A., Harada T., Mai Y., Ohba Y. and Miwa S. Agonist-promoted ubiquitination differentially regulates receptor trafficking of endothelin type A and type B receptors. **J. Biol. Chem.** 289, 35283-35295. 2014. (査読有), DOI: 10.1074/jbc.M113.544171

Higashi T., Mai Y., Noya Y., Horinouchi T., Terada K., Hoshi A., Nepal P., Harada T., Horiguchi M., Hatate C., Kuge Y. and Miwa S. A simple and rapid method for standard

preparation of gas phase extract of cigarette smoke. **PLoS ONE** 9, e107856. 2014. (査読有), DOI: 10.1371/journal.pone.0107856

Harada T., Horinouchi T., Higa T., Hoshi A., Higashi T., Terada K., Mai Y., Nepal P., Horiguchi M., Hatate C. and Miwa S. Endothelin-1 activates extracellular signal-regulated kinases 1/2 via transactivation of platelet-derived growth factor receptor in rat L6 myoblasts. **Life Sci.** 104, 24-31. 2014. (査読有), DOI: 10.1016/j.lfs.2014.04.002

Mizunashi K., Kanamoto T., Moriishi T., Muranishi Y., Miyazaki T., Terada K., Omori Y., Ito M., Komori T. and Furukawa T. Filamin-interacting proteins, Cfm1 and Cfm2, are essential for the formation of cartilaginous skeletal elements. **Hum. Mol. Genet.** 23, 2953-2967. 2014. (査読有), DOI: 10.1093/hmg/ddu007

Noya Y., Seki K., Asano H., Mai Y., Horinouchi T., Higashi T., Terada K., Hatate C., Hoshi A., Nepal P., Horiguchi M., Kuge Y. and Miwa S. Identification of stable cytotoxic factors in the gas phase extract of cigarette smoke and pharmacological characterization of their cytotoxicity. **Toxicology** 314, 1-10. 2013. (査読有), DOI: 10.1016/j.tox.2013.08.015

Horinouchi T., Terada K., Higashi T. and Miwa S. Endothelin receptor signaling: new insight into its regulatory mechanisms. **J. Pharmacol. Sci.** 123, 85-101, 2013. (査読有), URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/123/2/123_13R02CR/_article

〔学会発表〕(計2件)

堀之内孝広、寺田晃土、東恒仁、星暁壮、Sarita Karki、三輪聡二、肺高血圧症治療薬の最近の進歩：エンドセリンシステムからみた作用機序、第88回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(名古屋)、2015年3月20日

堀之内孝広、星暁壮、原田拓弥、Sarita Karki、東恒仁、寺田晃土、眞井洋輔、Prabha Nepal、堀口美香、三輪聡二、ラット骨格筋細胞においてエンドセリン-1によって惹起されるインスリン抵抗性の分子メカニズムの解明、第88回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(名古屋)2015年3月20日

東恒仁、眞井洋輔、Enas Elmeligy、堀之内孝広、寺田晃土、星暁壮、堀口美香、Prabha Nepal、Sarita Karki、旗手千鶴、三輪聡二、グルタチオン・N-アセチルシステイン・システインはタバコ煙ガス相抽出物による保護

作用を有する、第88回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(名古屋)、2015年3月20日

Tsunehito Higashi, Yosuke Mai, Takahiro Horinouchi, Koji Terada, Enas Elmeligy, Akimasa Hoshi, Peabha Nepal, Takuya Harada, Sarita Karki, Mika Horiguchi, Chizuru Hatate, Soichi Miwa. Gas phase extract of cigarette smoke and its cytotoxic components induce cell death via protein kinase C and NADPH oxidase. The 2014 ascbs/ifcb meeting. Philadelphia (U.S.A), December 6-10, 2014.

堀之内孝広、星暁壮、原田拓弥、Karki Sarita、寺田晃土、東恒仁、比嘉綱己、眞井洋輔、Prabha Nepal、堀口美香、旗手千鶴、三輪聡二、骨格筋細胞におけるインスリン誘発性グルコース取り込み促進に対するエンドセリン-1の抑制作用機序の解明、第65回日本薬理学会北部会、コラッセ福島(福島市)、2014年9月27日

寺田晃土、堀之内孝広、東恒仁、堀口美香、Prabha Nepal、Sarita Karki、旗手千鶴、原田拓弥、眞井洋輔、星暁壮、三輪聡二、エンドセリンB型受容体の細胞内動態制御におけるユビキチン化の役割、第65回日本薬理学会北部会、コラッセ福島(福島市)、2014年9月26日

旗手千鶴、東恒仁、Enas Elmeligy、眞井洋輔、堀之内孝広、寺田晃土、星暁壮、Prabha Nepal、Sarita Karki、堀口美香、原田拓弥、三輪聡二、タバコ煙による細胞傷害の定量的検出方法の確立と細胞傷害抑制因子の探索、第65回日本薬理学会北部会、コラッセ福島(福島市)、2014年9月26日

Prabha Nepal, Koji Terada, Takahiro Horinouchi, Mika Horiguchi, Tsunehito Higashi, Chizuru Hatate, Akimasa Hoshi, Sarita Karki, Takuya Harada, Yosuke Mai, Soichi Miwa. Role of phosphorylation in cytoplasmic carboxyl-terminal tail of endothelin type B receptor in ET-1 induced receptor desensitization. 第28回北海道薬物作用談話会、北海道大学(札幌)、2014年7月19日

東恒仁、眞井洋輔、堀之内孝広、寺田晃土、星暁壮、堀口美香、Prabha Nepal、原田拓弥、旗手千鶴、三輪聡二、タバコ煙ガス相中の細胞傷害成分の同定と細胞傷害メカニズムの解析、第87回日本薬理学会年会、仙台国際センター(仙台)、2014年3月21日

寺田晃土、堀之内孝広、東恒仁、Prabha Nepal、堀口美香、旗手千鶴、星暁壮、眞井洋輔、原田拓弥、三輪聡二、エンドセリンB型受容体のトラフィックにおける受容

体ユビキチン化の役割、第 87 回日本薬理学会年会、仙台国際センター（仙台）、2014 年 3 月 20 日

三輪聡一、寺田晃士、東恒仁、Nepal Prabha、堀之内孝広、ユビキチン化によるエンドセリン受容体の細胞内トラフィッキング制御、第 87 回日本薬理学会年会、仙台国際センター（仙台）、2014 年 3 月 19 日

星暁壮、堀之内孝広、原田拓弥、比嘉綱己、東恒仁、寺田晃士、眞井洋輔、ネパールプラハ、堀口美香、旗手千鶴、三輪聡一、ラット骨格筋細胞においてエンドセリン-1 により活性化されるシグナル伝達機構の解明、第 87 回日本薬理学会年会、仙台国際センター（仙台）、2014 年 3 月 19 日

堀之内孝広、寺田晃士、東恒仁、星暁壮、三輪聡一、エンドセリン受容体シグナルソーム形成からみた治療戦略、第 87 回日本薬理学会年会、仙台国際センター（仙台）、2014 年 3 月 19 日

堀之内孝広、原田拓弥、星暁壮、東恒仁、寺田晃士、比嘉綱己、眞井洋輔、Nepal Prabha、堀口美香、旗手千鶴、三輪聡一、エンドセリン-1 によるインスリン-Akt シグナル伝達の抑制性制御における G タンパク質共役型受容体キナーゼ 2 の関与、第 23 回日本循環薬理学会、福岡大学メディカルホール（福岡）、2013 年 12 月 6 日

寺田晃士、堀之内孝広、東恒仁、Nepal Prabha、堀口美香、旗手千鶴、星暁壮、三輪聡一、エンドセリン B 型受容体の ET-1 刺激誘発的な細胞内移行とシグナルの制御におけるユビキチン修飾の役割、第 64 回日本薬理学会北部会、大雪クリスタルホール（旭川）、2013 年 9 月 13 日

東恒仁、眞井洋輔、堀之内孝広、寺田晃士、旗手千鶴、星暁壮、Prabha Nepal、堀口美香、三輪聡一、ニコチン及びタール除去タバコ煙抽出物に含まれる細胞傷害因子の性状解析、第 64 回日本薬理学会北部会、大雪クリスタルホール（旭川）、2013 年 9 月 13 日

堀之内孝広、原田拓弥、東恒仁、寺田晃士、比嘉綱己、眞井洋輔、星暁壮、Nepal Prabha、堀口美香、旗手千鶴、三輪聡一、骨格筋細胞におけるエンドセリン受容体を介したインスリン・シグナリングの抑制性制御機構の解明、第 64 回日本薬理学会北部会、大雪クリスタルホール（旭川）、2013 年 9 月 13 日

Takahiro Horinouchi, Tsunaki Higa, Tsunehito Higashi, Koji Terada, Yosuke Mai, Takuya Harada, Akimasa Hoshi, Mika Horiguchi,

Prabha Nepal, Chizuru Hatate, Soichi Miwa. Negative regulation of endothelin type A receptor-operated TRPC6 channel by adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A signaling pathway. Thirteen International Conference on Endothelin. University of Tsukuba, Tokyo Campus, September 8-11, 2013.

Koji Terada, Takahiro Horinouchi, Tsunehito Higashi, Prabha Nepal, Mika Horiguchi, Chizuru Hatate, Akimasa Hoshi, Yosuke Mai, Soichi Miwa. Ubiquitin modification plays an important role in ET-1-dependent endothelin type B receptor signaling. Thirteen International Conference on Endothelin. University of Tsukuba, Tokyo Campus, September 8-11, 2013

Tsunehito Higashi, Takahiro Horinouchi, Takuya Harada, Tsunaki Higa, Koji Terada, Akimasa Hoshi, Yosuke Mai, Mika Horiguchi, Prabha Nepal, Chizuru Hatate, Soichi Miwa. Endothelin-1 activates extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 through transactivation of platelet-derived growth factor receptor in skeletal muscle cells. Thirteen International Conference on Endothelin. University of Tsukuba, Tokyo Campus, September 8-11, 2013

② Takahiro Horinouchi, Takuya Harada, Tsunaki Higa, Tsunehito Higashi, Koji Terada, Akimasa Hoshi, Yosuke Mai, Mika Horiguchi, Prabha Nepal, Chizuru Hatate, Soichi Miwa. Molecular mechanism for suppression of insulin signaling by endothelin-1 in skeletal muscle cells. Thirteen International Conference on Endothelin. University of Tsukuba, Tokyo Campus, September 8-11, 2013.

② 原田拓弥、堀之内孝広、東恒仁、寺田晃士、比嘉綱己、眞井洋輔、星暁壮、Nepal Prabha、堀口美香、旗手千鶴、三輪聡一、エンドセリン-1 による骨格筋インスリン・シグナルの抑制性制御機構の解明、第 27 回北海道薬物作用談話会、酪農学園大学（江別）、2013 年 7 月 20 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 晃士 (TERADA, Koji)
滋賀医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70342722

(2) 連携研究者

三輪 聡一 (MIWA, Soichi)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40157706