

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670040

研究課題名(和文) 受容体キナーゼを介した新規貪食経路に関わる受容体の同定と病態時での役割解明

研究課題名(英文) Attempt of G protein-coupled receptor kinase-interacting proteins involved in engulfment of apoptotic cells and role of the receptor kinase in heart disease

研究代表者

黒瀬 等 (KUROSE, HITOSHI)

九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10183039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体キナーゼ(GRK)ファミリーに属するGRK6は、アポトーシス細胞の貪食を仲介している。GRK6の上流あるいは下流の分子を同定することを試みた。GRK6のコンフォメーションを検出するFRETおよびBRETプローブは感度が低くスクリーニングに使えなかった。しかしながら、BRETプローブを用い腫瘍壊死因子- α (TNF- α)刺激によるGRK6のコンフォメーション変化を検出でき、GRK6がI κ Bと結合しリン酸化することでNF- κ B活性化の仲介分子として働いていることを見出し報告した。

研究成果の概要(英文)：G protein-coupled receptor kinase 6 (GRK6) is a member of GRK family. GRK6 mediates engulfment of apoptotic cells. In this proposal, molecules upstream or downstream of GRK6 were tried to be identified. FRET or BRET probes to detect conformational changes of GRK6 were made. It would facilitate screening of GRK6-interacting proteins. However, the sensitivities of these probes were too low to detect the interaction with putative GRK6-interacting molecules. Using BRET probe, GRK6 was found to be a mediator of TNF- α -stimulated NF- κ B activation. Conformation of GRK6 was changed by TNF- α stimulation, and GRK6 bound and phosphorylated I κ B leading to NF- κ B activation. Thus, GRK6 works as a mediator of TNF- α -induced inflammation.

研究分野：循環薬理学

キーワード：受容体 G蛋白質 受容体キナーゼ 貪食 アポトーシス 心疾患

1. 研究開始当初の背景

生体内では常にアポトーシス(プログラム化された細胞死)を起こした細胞が生じており、これら細胞が迅速に処理されない場合、炎症応答を引き起こす。したがって、生体にはアポトーシスを起こした細胞を速やかに取り除くメカニズム(貪食経路)が備わっている。貪食経路として、これまでに CrkII/ELMO/DOCK180、Abl/Abi、GULP を介した 3 つの経路が報告されている。我々は、G タンパク質共役型受容体を選択的にリン酸化するキナーゼ(GRK)がアポトーシス細胞の貪食を仲介することを見出した。しかしながら、GRK の上流および下流の分子群については明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、GRK を介したアポトーシス細胞の貪食に関わる上流あるいは下流の分子を同定することを試みた。また、GRK による貪食の重要性を示すために、心臓がストレス(心筋梗塞や心肥大処置)にさらされた時に生じる死細胞の除去に、GRK を介する貪食がどのような役割についても検討した。

3. 研究の方法

GRK6 と相互作用する分子をクローニングするための GRK6 のプローブを作成した。GRK6 がシグナリング分子と相互作用すると、GRK6 のコンフォメーションが変化することを予想し、コンフォメーション変化を検出するプローブを作成した。GRK6 のアミノ末端に CFP、カルボキシル末端に YFP を付加させた FRET プローブを作成した。通常の FRET プローブは下図のように GRK6 のリン酸化基質をリンカーで結び、GRK6 と基質との相互作用を検出する。



しかしながら、GRK6 の基質が未知である場合、このプローブは使えない。作成した FRET プローブは、基質との相互作用とは無関係に、GRK6 のコンフォメーションを検出するため、キナーゼ活性とは関係なく相互作用する分子を同定できるはずであった。また、FRET プローブはバックグラウンドが高くなるという欠点があるため、バックグラウンドの低下を狙った split-GFP を用いたプローブも作成した(下図参照)。



このプローブでは、GFP を 2 つに分けた split GFP を作成し、アミノ末端側およびカルボキシル末端側を GRK6 のアミノ末端およびカルボキシル末端に付加させた。

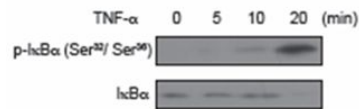
はじめに、これら作成した各種プローブの

シグナルの大きさ、ノイズの大きさ(何ら刺激を加えなくても、自発的な GRK6 のコンフォメーション変化が起きるため、ある程度のシグナルが発生する)を検討した。

4. 研究成果

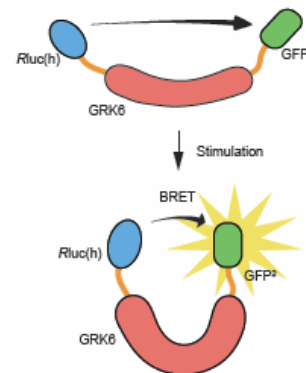
文献を検索し、GRK6 と相互作用すると報告されている分子群(アドレナリン受容体、アレステチンなど)をこれらプローブと共に発現させ、FRET あるいは GFP のシグナルを検出した。しかしながら、相互作用することが報告されている分子との結合によるシグナルは検出できるものの、その大きさが小さくノイズを考慮すると未知のシグナル分子との相互作用を検出するのは無理があることが明らかになった。スクリーニングでは、多くの分子との相互作用を評価するため、シグナルとノイズの比が十分に離れていないと使えない。

各種の相互作用を検討する過程で、GRK6 が I B と結合し、リン酸化することで NF B シグナルを制御していることを見出した(下図参照)。



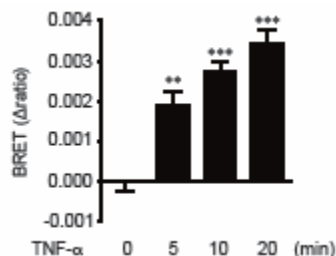
そこで、TNF-α 刺激によって GRK6 のコンフォメーション変化が起き、I B と相互作用するのではと予想し、GRK6 のコンフォメーション変化を検出するプローブを作成した。作成したプローブは FRET や split-GFP を用いたのとは異なり、BRET を用いたプローブとした。BRET プローブでは、Luciferase (Rluc(h)) をアミノ末端に、GFP (GFP2) をカルボキシル末端に付加させた(下図参照)。

このプローブでは基質(ルシフェリン)を加えたときに生じるルシフェラーゼの蛍光波長が GFP を活性化することを利用している。



基質を加えるために、多くのサンプルをスクリーニングすると非常にコストがかかることから、スクリーニングには用いることができないという欠点がある。しかし、シグナルとノイズの比が、FRET プローブや split プロ

ープに比べて優れているため、GRK6 のコンフォメーション変化をより鋭敏に評価できるとされている。GRK6 の BRET プローブを発現させ、TNF- α 刺激を行うと、時間依存性にシグナルが増加した(下図参照)。



この結果、TNF- α 受容体の下流に GRK6 が存在し、I B のリン酸化を介して NF- κ B シグナルによる炎症応答を制御していることが明らかになった。本成果は、Biochemical and Biophysical Research Communications 461 (2015) 307-313 に報告した。GRK6 を介したアポトーシス細胞を除去する経路の心疾患での役割を検討した。GRK6-KO マウスを用いて、心筋梗塞時に生じるアポトーシスの数に KO マウスと野生型マウスで違いがみられるか検討したところ、アポトーシス細胞の数は KO マウスと野生型で有意な差を認めなかった。また、心筋梗塞処置後のマウスの生存率についても差はなかった。

GRK6 の構造変化を検出するプローブを作成したもの、クローニングに使えるほど感度の良いものを作成することができなかった。しかしながら、GRK6 と特定のシグナリング分子との相互作用を検出には十分な感度を持っていた。このプローブを用い、副次的に TNF- α 刺激の下流に GRK6 が存在し、NF- κ B の活性制御にかかわっていることを見出した。当初の目的は達成できなかったものの、作成したプローブを用い新たな GRK6 の役割を明らかにできた点は評価できると考えている。

心筋梗塞時のアポトーシス細胞の除去に GRK6 を関与は認められなかった。これまで、心筋梗塞時に生じるアポトーシスを起こした細胞の除去は、マクロファージなどの貪食細胞が行うと考えられてきた。しかし、予備的な検討でマクロファージ以外の細胞が死細胞の除去に大きく関わっていることを見出している。マクロファージにおいて、GRK6 を介さない貪食経路もアポトーシス細胞の除去に関わっていること、またマクロファージ以外の細胞による貪食では GRK6 を介さない経路の役割が大きい可能性などにより、GRK6 の関与が認められなかったのではと考えている。今後、GRK6 を介する経路と介さない経路が、細胞ごとで異なっている理由を明らかにする必要がある。

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 3 件)

Watari K, Nakaya M, Kurose H.: Multiple functions of G protein-coupled receptor kinases. Journal of Molecular Signaling 9(1), 1-9 (2014) (doi:10.1186/1750-2187-9-1)

Gasser A, Brogi S, Urayama K, Nishi T, Kurose H., Tafi A, Ribeiro N, Désaubry L, Nebigil CG.: Discovery and cardioprotective effects of the first non-Peptide agonists of the G protein-coupled prokineticin receptor-1. PLoS One 10(4):e0121027 (2015) (doi: 10.1371/journal.pone.0121027)

Ohba Y, Nakaya M, Watari K, Nagasaka A, Kurose H.: GRK6 phosphorylates I B at Ser32/Ser36 and enhances TNF- α -induced inflammation via the activation of NF- κ B signaling. Biochem Biophys Res Commun. 461: 307-313 (2015)

〔学会発表〕(計 4 件)

Hitoshi Kurose: 'GRK6 and heart disease' in FASEB Science Research Conference ~G protein-coupled receptor kinases (invited speaker) 2014/06/09~06/12 (presentation: 06/09), Steamboat Spring, Colorado, USA

黒瀬等、西原弘朗、大原広貴、長坂明臣、仲矢道雄:「ロイコトリエン B4 受容体の心筋梗塞での役割」、第 13 回生命科学研究会、2014 年 6 月 20(金)~21 日(土)(発表日:6 月 20 日)、JR タワーホテル日航札幌、札幌

大原広貴、仲矢道雄、西原弘朗、渡健治、長坂明臣、黒瀬等:「心筋梗塞におけるロイコトリエン B4 受容体の役割」、生体機能と創薬シンポジウム 2014、2014 年 8 月 28 日、近畿大学東大阪キャンパス 39 号館(薬学部)

大原広貴、仲矢道雄、西原弘朗、渡健治、長坂明臣、黒瀬等:「心筋梗塞におけるロイコトリエン B4 受容体の機能解析及びその受容体拮抗薬を用いた新規心筋梗塞治療法の開発」、第 13 回次世代を担う若手ファーマバイオフォーラム 2014、2014 年 9 月 20 日、富山国際会議場

〔図書〕(計 1 件)

著者: 黒瀬等
標準薬理学(医学書院:今井正、宮本英七 監修、飯野正光、鈴木秀典 編集)第 4 章 G タンパク質共役型受容体、62-85 ページ、第 5

章サイクリックヌクレオチドとタンパク質
リン酸化、86-95 ページ (2 0 1 5 年)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 : TREATMENT OF MYOCARDIAL INFARCTION
USING MFG-E8

発明者 : Nakaya M, Kuroda M, Kurose H

権利者 : Nakaya M, Kuroda M, Kurose H

種類 : 物質特許

番号 : 61/868599

出願年月日 : 2013 年 8 月 22 日

国内外の別 : 国際

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

研究室のホームページ

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

黒瀬 等 (九州大学大学院薬学研究院・教授、
59 歳)

研究者番号 : 1 0 1 8 3 0 3 9

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号 :