

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 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：25670120

研究課題名(和文)生物時計の分子メカニズムにおける受容体キナーゼの役割解明

研究課題名(英文)Elucidation of the role of GRK in molecular mechanisms of circadian clock

研究代表者

仲矢 道雄(Nakaya, Michio)

九州大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80464387

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蛋白質共役7回膜貫通型受容体キナーゼ(GRK)は、G蛋白質共役7回膜貫通型受容体(GPCR)をリン酸化することによりGPCRを脱感作へと導くキナーゼとして知られてきた。我々はGRK5のノックアウトマウスの心臓においていくつかの時計遺伝子の発現量が変化していることを見出した。そこで、GRK5と生物時計の分子メカニズムとの関連を調べたところ、GRK5が時計タンパク質、PER1, 2, 3およびCRY1,2と相互作用することを見出した。また、生物時計の中枢を司る視交叉上核においてGRK5のmRNAが日周リズムを示す事を見出した。

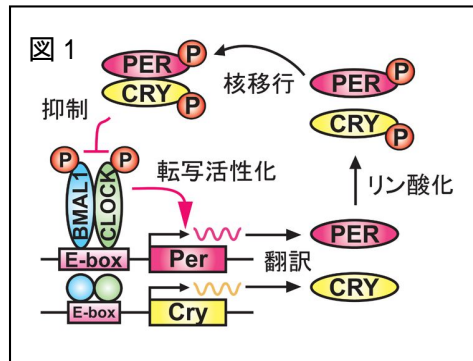
研究成果の概要(英文)：G protein-coupled receptor kinases (GRKs) have been known as kinases that phosphorylate G protein-coupled receptors (GPCRs) and lead to desensitization of the receptors. We found that the expression levels of several genes involved in the molecular mechanisms of circadian clock are altered in the hearts of GRK5 KO mice. To investigate the contribution of GRK5 to the circadian clock machinery, we examined whether GRK5 bind to circadian clock proteins. By immunoprecipitation assay, we found that GRK5 interacts with clock proteins, PER1/2/3 and CRY1/2. We also found that mRNA level of GRK5 displays circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus that is located in the hypothalamus and is responsible for controlling circadian rhythms of our whole body.

研究分野：GRK

キーワード：GRK リン酸化

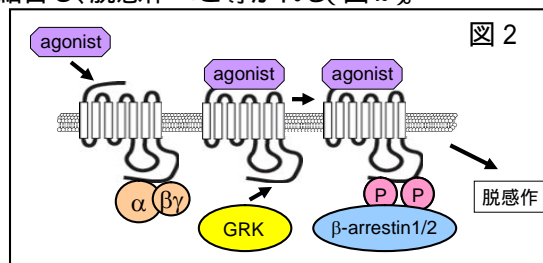
1. 研究開始当初の背景

私達の睡眠・覚醒のように、約一日の周期をもつ生物リズムは概日リズムと呼ばれ、体内に存在する概日時計によって支配されている。この概日時計は、恒常条件下においても約 24 時間の周期で自律的に時を刻むと共に、光などの環境因子によって周期を補正することができる。概日時計の生成は、PERIOD (PER) や CRYPTOCHROME (CRY) など、種々の時計タンパク質による Negative feedback loop によって制御されている (図 1)。時計タンパク質のリン酸化は、この



制御において、そのタンパク質の核内移行や分解などに関して重要な役割を果たしているが、依然として不明な点が多い。

GRK は、アゴニストが結合して活性化した種々の GPCR の C 末端部をリン酸化するキナーゼとして知られてきた。GRK によってリン酸化された受容体は アレスチンと結合し、脱感作へと導かれる (図 2)。



現在、哺乳類において GRK ファミリー分子は 7 種、アレスチンは 2 種存在する。GRK は長い間、GPCR をリン酸化するキナーゼとしてのみ知られてきた。しかし、最近になって GRK が GPCR 以外のタンパク質をリン酸化することが報告され、脱感作以外の機能も有する事が明らかとなりつつある。実際、我々は最近、GRK6 が GPCR 以外のタンパク質を介してマクロファージによる死細胞の貪食に関与することを見出した。(Nakaya et al., *Nature Communications* 2013)

私は主な研究テーマの一つとして心臓の病態時におけるシグナル伝達の研究を行っている (Nakaya et al., *JBC*, 2012)。その研究の過程で偶然にもいくつかの時計遺伝子の発現量が通常時の GRK5 ノックアウト (KO) マウスの心臓において野生型 (WT) マウスに比して顕著に変化していることを見出し

た。この結果から GRK5 が生物時計の分子メカニズムに關与する可能性が考えられた。そこで、GRK5 と生物時計の分子メカニズムの接点を調べるために、GRK5 と 15 種の時計タンパク質との相互作用を免疫沈降法により検討した。その結果、驚いた事に GRK5 と PER1,2,3 および CRY1,2 が相互作用する事を見出した。

2. 研究の目的

これまで生物時計の分子メカニズムにおける GRK の役割に関する研究は国内外を問わず、全くない。そこで本研究では、上述の研究背景をもとに、生物時計の分子メカニズムにおける GRK5 の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) GST-PER2 および GST-CRY2 の精製。

Per2、Cry2 遺伝子をタカラバイオ社の pColdII vector に組み込んだ。これら DNA を用いて大腸菌 BL21(DE3) を形質転換した。その後、コロニーをそれぞれピックアップし、37、LB+Amp 培地中で OD595=0.4~0.6 になるまで培養した。その後、IPTG を最終濃度が 100µM になるように添加し、15 で 24 時間、培養した。遠心により大腸菌を回収し、リゾチームと TritonX-100 を用いて蛋白質を抽出した。抽出したタンパク質は、グルタチオンセファロースビーズを用いて精製した。精製後は、4、100mM Tris-HCl(pH8.0) 溶液中で透析し、最終濃度 0.1µg/ml に調製した。

(2) マウス脳切片を用いた in situ hybridization。

WT マウスあるいは GRK5KO マウスを明期 12 時間、暗期 12 時間の明暗周期下で飼育し、4 時間おきにマウス脳をサンプリングした。視床下部の視交叉上核を含む脳切片を作成した後、放射性標識された GRK5 のプローブを反応させ、各時刻の視交叉上核に発現する GRK5 mRNA 量を測定した。

4. 研究成果

(1) GRK5 による PER (PER1,2,3) および CRY (CRY1,2) のリン酸化の検討。

GRK5 によって PER (PER1,2,3) および CRY (CRY1,2) がリン酸化されるかについて検討を行うため、まずは、基質となる (GST-時計タンパク質) の精製を行うことにした。PER (PER1,2,3) および CRY (CRY1,2) の 5 種類の時計タンパク質のうち、まずは GST-PER2、GST-CRY2 について大腸菌を用

いて精製した。PER2 の分子量が非常に大きいことを考慮し、タンパク質が効率よく発現可能な、コールドショックベクター（タカラバイオ社）を用いてコンストラクトを作成した。タンパク質誘導に関しての条件検討（IPTG の濃度、および低温誘導の時間）を行い、GST-PER2、GST-CRY2 に関して発現誘導の至適条件を定めた。その後、引き続き、これら融合タンパク質の可溶性に関する条件検討を行い、可溶性のための至適条件を定めた。しかしながら、GST-PER2 については、分子量が非常に大きく、可溶性タンパク質として回収出来る量が極めて少なかった。そこで培養する大量の大腸菌を増やして、in vitro kinase assay に必要なタンパク質量を回収した。現在、 $[^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{-ATP}$ を用いた in vitro kinase assay を行い、これら GST-時計タンパク質が GRK5 によって直接リン酸化されるかどうかを検討している。

(2) GRK5 の発現が各種臓器、組織等において概日リズムを示すかについての検討。

我々は GRK5 の mRNA 発現量が心臓および脳、肝臓において明確な概日リズムを示す事を見出している（脳と肝臓についてはデータベースによる）。これらの結果からマウスの概日リズムの中核である視床下部の視交叉上核においても GRK5 の発現が概日リズムを示す可能性がある。そこで、視交叉上核部を含んだマウス脳切片を用いた in situ hybridization 法によりその可能性を検討した。その結果、GRK5 の発現は暗期にピーク、明期にトラフを示す概日リズムを示す事が明らかとなった。Negative control となる GRK5KO マウスの視交叉上核においては、シグナルは観察されなかった。

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 4 件)

1. Yuki Ohba, Michio Nakaya^{*}, Kenji Watari, Akiomi Nagasaka, & Hitoshi Kurose. GRK6 phosphorylates I B at Ser³²/Ser³⁶ and enhances TNF- α -induced inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 461, 307-313 (2015)
doi:10.1016/j.bbrc.2015.04.027
^{*} **corresponding author**
2. Riris Jenie, Motoki Nishimura, Mika Fujino, Michio Nakaya, Norikazu Mizuno, Kenji Tago, Hitoshi Kurose & Hiroshi Itoh. Increased ubiquitination and the crosstalk of G protein signaling in cardiac myocytes: Involvement of Ric-8B in Gs suppression by Gq signal. *Genes to Cells* 18, 1095-1106 (2013) doi:

10.1111/gtc.12099.

3. Kenji Watari#, Michio Nakaya#, Motohiro Nishida, Kyeong-Man Kim & Hitoshi Kurose. β -arrestin2 in infiltrated macrophages inhibits excessive inflammation after myocardial infarction *PLoS ONE* 8(7): e68351. (2013) #: These authors contributed equally to this work.
4. Islam A.A.E-H. Ibrahim, Michio Nakaya, & Hitoshi Kurose. Ezrin, Radixin, and Moesin Phosphorylation in NIH3T3 Cells Revealed Angiotensin II Type 1 Receptor Cell-Type-Dependent Biased Signaling. *J. Pharmacol. Sci.* 122, 1-9 (2013)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 仲矢道雄、黒瀬等
心筋梗塞時におけるロイコトリエン B4 受容体の役割解明 日本薬理学会、第 88 年会
2015 年 3 月 19 日（シンポジウム）

2. 仲矢道雄
死細胞の貪食と心筋梗塞
日本薬学会、第 134 年会
2014 年 3 月 29 日（シンポジウム）

3. 仲矢道雄
アポトーシス細胞の貪食の分子メカニズムに関する研究
日本薬学会、第 134 年会
2014 年 3 月 28 日（日本薬学会奨励賞受賞講演）

4. 仲矢道雄
アポトーシス細胞の貪食における GRK6 の関与
第 87 回日本薬理学会年会、
2014 年 3 月 19 日（シンポジウム）

5. 仲矢道雄
死細胞の貪食と心筋梗塞
第 23 回日本循環薬理学会、
2013 年 12 月 2 日（シンポジウム）

6. 仲矢道雄
死細胞の貪食と心筋梗塞
生体機能と創薬シンポジウム（日本薬学会薬理系部会主催）、
2013 年 8 月 30 日（シンポジウム）

〔図書〕(計 5 件)

1. 仲矢道雄、黒瀬等
「生体内で死んだ細胞の除去を促進する新たな分子の同定
～アポトーシス細胞の貪食における GRK6 の

役割～」

日本薬理学会雑誌、vol.145、No.1 (2015),
14-20 doi: 10.1254/fpj.145.14.

2. 渡健治、大場悠生、仲矢道雄

「G タンパク質共役型受容体キナーゼの新たな基質および生理機能」

日本応用酵素協会誌 No.49 (2014), 29-36

3. 仲矢道雄

「アポトーシス細胞の貪食に分子メカニズムに関する研究」

薬事日報、3月24日 第11401号(2014)

4. 仲矢道雄

「eat-me シグナル」

分子消化器病(先端医学社) vol.11、No. 1 (2014), 71-75

5. 仲矢道雄、黒瀬等

「アポトーシス細胞の貪食における GRK6 の役割解明」(Current Topics)

実験医学、vol.31、No. 9 (2013), 1415-1419

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

仲矢道雄(NAKAYA MICHIO)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：80464387