

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670125

研究課題名(和文) RGSのウロテンシン受容体シグナル調節機構の解析と応用—抗動脈硬化薬創出の試み

研究課題名(英文) A study on inhibitory regulation of urotensin II receptor signaling by RGS proteins: an attempt to find potential novel anti-arteriosclerotic agents

研究代表者

西山 真理子(Nishiyama, Mariko)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00092081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：心血管系において、ウロテンシンIIとその受容体シグナルの異常亢進状態は、動脈硬化性疾患の発症進展の重要な要因となるので、そのシグナルの抑制因子は動脈硬化を抑制すると考えられる。ウロテンシンII受容体はGタンパク質共役型受容体(GPCR)であるので、本研究では細胞内GPCRシグナル調節因子であるRGS蛋白質の効果について検討し、RGS2、RGS3およびRGS8がウロテンシンIIアンジオテンシンIIシグナルに対して強い抑制効果を持つことを明らかにした。また、その抑制効果を担う分子内領域を特定した。これらのRGSの細胞内発現量を増加させる薬物は抗動脈硬化薬として働くことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In the cardiovascular system, it is known that activation of urotensin II / urotensin II receptor signaling may serve as one of pathologically important mechanisms that may lead to cause or deteriorate various arteriosclerotic diseases. Factors that can suppress urotensin II receptor signaling may have anti-arteriosclerotic effects.

Urotensin II receptor is a G protein-coupled receptor (GPCR), and RGS proteins are intracellular negative regulators of GPCR signaling. In the present study, some particular R4/B family RGS proteins, such as RGS2, RGS3 and RGS8, were shown to have potent inhibitory effects on both urotensin II and angiotensin II signaling. Furthermore, important regions in these RGS molecules were specified. In particular, a C-terminal region of RGS8 was indicated to be crucial in the potent inhibitory activity. Agents that can increase intracellular amount of these RGS protein species are expected to become novel therapeutics in many types of arteriosclerotic diseases.

研究分野：薬理学

キーワード：RGSタンパク質 ウロテンシンII アンジオテンシンII

1. 研究開始当初の背景

ウロテンシン II は、オーファン受容体 GPR14 のリガンド探索の過程で、非常に強力な心血管収縮作用を持つ内在性リガンドとして 1999 年に発見され、近年ではその強い動脈硬化促進作用が循環器学や創薬領域で注目されている生理活性ペプチドである。(GPR14 は G 蛋白質共役型受容体(GPCR)で、現在ウロテンシン受容体(UT 受容体)と命名されている。) UT 受容体シグナルの異常な亢進状態は、種々の動脈硬化性疾患の発症進展の重要な要因となり得ることが示されている。すなわち、高血圧・動脈硬化・虚血性心疾患・心不全・腎疾患・糖尿病等、様々な疾患の発症進展におけるウロテンシン II / UT 受容体の深い関わりは国内外の多くの報告があり、臨床例の解析からも、疾患モデル動物や *in vitro* の実験系からも、いろいろな観点から明らかにされてきている。従って、ウロテンシン II の作用の調節機構を明らかにし、そのシグナル伝達制御の治療応用の可能性を探ることは重要と考えられる。

GPCR に作用する多くのホルモン・神経伝達物質の機能調節には、リガンド側の調節と共に GPCR 情報伝達の細胞内調節機構も同等に重要であり、GPCR のリン酸化やインターナリゼーションに加えて、RGS 蛋白質による調節の重要性が明らかになりつつある。RGS 蛋白質は、GPCR 情報伝達を抑制する細胞内調節因子ファミリーで、その RGS ドメインと Gα との相互作用により、Gα サブユニットの GTP 加水分解を促進して不活性化を促すことにより、GPCR 情報伝達を抑制する。RGS 蛋白質のうち、R4/B サブファミリーの RGS 蛋白質は、一つの RGS ドメインのみを持ち N 末側と C 末側に短い領域がある短い RGS 蛋白質の一群で、心血管系には、複数の分子種が発現している。我々は、心血管系に多く発現する RGS のなかで、以前から RGS5 について研究を進め、RGS5 の GAP としての特性解析や、C キナーゼによるリン酸化と機能調節、腫瘍血管での発現亢進、酸素センサー分子としての特性などを報告してきた (Life Sciences 2001, 2003, 2007; Proc Natl Acad Sci 2005)。近年、RGS5 ノックアウトマウスは低血圧になることが報告された。一方 RGS2 のノックアウトマウスは強度の高血圧になること、その高血圧症はアンジオテンシン受容体拮抗薬で抑えられることが報告された (Heximer et al, J Clin Invest 2003)。同じ血管平滑筋に存在する、RGS2 と RGS5 の各ノックアウトマウスの特徴が大きく異なることに着想を得て、我々は、アンジオテンシン AT₁ 受容体の情報伝達に対し、RGS2 が選択的に強い抑制効果を持つことを見出した。そして、RGS2 の強い活性には、N 末端後半部の GPCR 認識部位のサブドメインが特に重要な役割を持つことを明らかにした (Cell Signal, 23(6), 1041-1049, 2011)。

一方、UT 受容体シグナルの細胞内での RGS

による制御様式についての解析はほとんど報告がない。

2. 研究の目的

ウロテンシン II も、非常に強力な心血管収縮作用を持つ生理活性ペプチドであり、種々の動脈硬化性疾患の発症進展の重要な要因となり得ることが指摘されており、UT 受容体は GPCR のひとつであるにもかかわらず、UT 受容体シグナルの細胞内での RGS による制御様式についての解析はほとんど報告されていない。しかし、病態の鍵になる生理活性ペプチドの情報伝達を特異的に調節する RGS タンパク質の解明は、RGS2 とアンジオテンシン受容体の関わる高血圧の知見からもわかるように、臨床的にも重要な意味を持つ。そこで、ウロテンシン II / UT 受容体シグナルを抑制的に調節する R4 ファミリー RGS タンパク質の分子種とその特性を明らかにするために、本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) UTR の機能調節に重要な役割を担う RGS 分子種の推定とその抑制活性の強さの検討

R4/B ファミリーの各種 RGS 蛋白質を、UT 受容体安定発現細胞に一過性に発現させ、ウロテンシン II に対する細胞内 Ca²⁺ 応答を指標として、それぞれの RGS の UT 受容体シグナル抑制効果の強さを比較した。同様の実験を、アンジオテンシン AT₁ 受容体およびエンドセリン-1 ETA 受容体安定発現細胞を用いて、アンジオテンシン II やエンドセリン-1 に対する Ca²⁺ 応答についても同様の解析を行った。抑制効果の違いを正確に鋭敏に検出するために、種々の濃度のリガンド刺激に対する、種々の発現量の RGS 蛋白質の効果の詳細に検討した。RGS 発現量はウェスタン解析により半定量的にモニターし、常にそれぞれほぼ同等の細胞内発現量の時の各 RGS の抑制効果を比較するように配慮した。

(2) 各 RGS の N 末端部サブドメイン部分と RGS ドメイン部分の機能的役割の検討

RGS2、RGS3、および RGS8 が、UT 受容体シグナルに対しても、AT₁ 受容体シグナルおよび ETA 受容体シグナルに対しても強い抑制効果を示すことが明らかになったので、それぞれの全長 RGS タンパク質と N 末端部サブドメインを欠く RGS ドメイン部分のみの変異体の効果を、上記と同様の方法で検討した。

(3) RGS8 タンパク質の強い GPCR シグナル抑制活性を担う RGS ドメイン中の分子内領域の検討

RGS2 については強い抑制活性は N 末端部サブドメインの機能に依存していることが明らかになった。RGS3 と RGS8 については RGS ドメイン自体で GPCR シグナルを強く抑制することが明らかになった。そこで、活性の弱い RGS5 の RGS ドメインと活性の強い RGS8 の

RGS ドメインとを組み合わせて、様々なキメラ変異体を作製し、上記と同様の手法を用いて、RGS8 の強い抑制活性を担う分子内領域を特定することを試みた。

(4)C末端部は保存されているがRGS活性を持たないRGS8 変異体を用いた検討。

RGS ドメインの立体構造の解析から、一般に、RGS ドメインは3カ所で活性化状態または遷移状態の $G\alpha$ サブユニットと結合するとされている。第1番目の結合部位に存在するグルタミン酸残基とアスパラギン残基は、すべての R4/B ファミリーに保存されていて、RGS2 や RGS4 の EN AA 置換体は活性を失うことが知られている。

本研究で重要性が示された C 末端エクソン部分が独自に、RGS 機能とは別の何らかの抑制効果を現している可能性も考えられたので、この可能性を検討するために、RGS8 のこの第1番目の結合部位に相当する部位、すなわち E81 と N82 を両方ともアラニンに置換した変異体 (以下 RGS8EN 変異体) を作製した。(この変異体の C 末端部分は正常の配列が保存されている。)RGS2 と RGS3 の対応する部分の EN 変異体同様に作製してそれらの抑制効果を検討した。

4. 研究成果

(1)UT 受容体、AT₁ 受容体、および ETA 受容体を介する情報伝達に対する各種 RGS タンパク質の抑制効果

ヒト UT 受容体、マウス AT_{1a} 受容体、およびヒト ETA 受容体を安定発現させた 293T 細胞に、RGS1、RGS2、RGS3、RGS4、RGS5、RGS8、RGS16 を一過性に様々な発現量で発現させ、Fura-2 を用いて、ウロテンシン II、アンジオテンシン II、エンドセリン-1 刺激による細胞内 Ca^{2+} 応答を測定し、UT 受容体、AT₁ 受容体、および ETA 受容体を介する情報伝達に対する各 RGS タンパク質の抑制効果について比較検討した。上記3種類のどの受容体についても、RGS2、RGS3、RGS8 が各リガンドの全濃度において強い抑制効果を示した。RGS1、RGS4、RGS5、および RGS16 の抑制効果はそれよりも弱く、特に、高濃度リガンド刺激の場合に、その差が顕著に認められた (図1)。

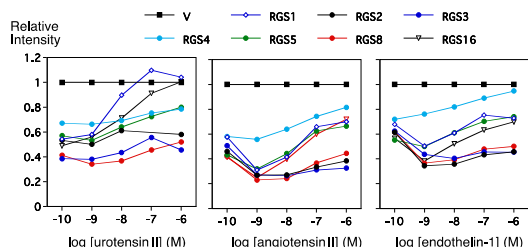


図1. UT 受容体、AT₁ 受容体、および ETA 受容体を介する細胞内 Ca^{2+} 応答に対する各種 RGS タンパク質の抑制効果

本実験においては、この RGS 分子種による抑制効果の違いは、AT₁ 受容体で一番明確に認められ、UT 受容体ではやや明確さに欠ける傾向があった。しかしこの点については、RGS の発現量は同等であっても、それぞれの安定発現細胞における受容体の発現密度や、リガンド刺激時の受容体と G タンパク質との共役の質と程度の差により、見かけの抑制の強さが異なることも考えられるので、慎重に判断する必要がある。

(2)各 RGS の N 末端部サブドメイン部分と RGS ドメイン部分の機能的役割の検討

UT、AT_{1a}、ETA 受容体シグナル抑制効果の強かった RGS2、RGS3、および RGS8 について、それぞれの全長 RGS タンパク質と N 末端部サブドメインを欠く RGS ドメイン部分のみの変異体の効果を、上記と同様の方法で検討した。RGS2 は N 末端部サブドメインを欠くと抑制効果が著明に減弱したので、RGS2 の N 末端部サブドメインには、その RGS 効果を増強させる役割があると考えられた。これに対して、RGS3 と RGS8 の場合は、N 末端部を欠く RGS ドメイン部分のみでも全長とほぼ同等の強い効果がみられた。従って、RGS3 と RGS8 の強い抑制活性はそのドメイン部分の特性に依存していることが知られた (図2)。

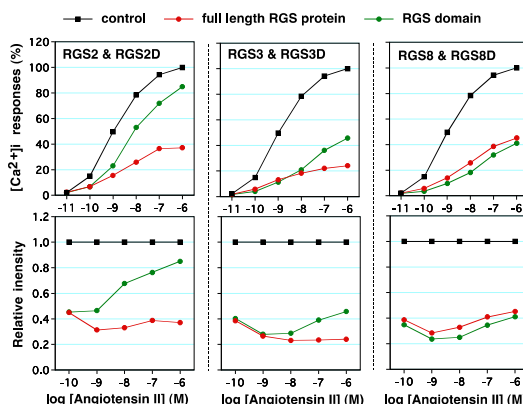


図2. RGS2、RGS3、および RGS8 の全長 RGS タンパク質と N 末端部サブドメインを欠く RGS ドメイン部分のみの変異体の効果。AT₁ 受容体発現細胞を用いた検討。

(3)RGS8 タンパク質の強い GPCR シグナル抑制活性を担う RGS ドメイン中の分子内領域の検討

RGS3 と RGS8 は RGS ドメイン自体で GPCR シグナルを強く抑制することが明らかになったので、活性の弱い RGS5 の RGS ドメインと活性の強い RGS8 の RGS ドメインとの様々なキメラ変異体を作製した。R4/B ファミリーの RGS ドメインは共通して3個のエクソンからなっている。そこで、エクソンは一つのモジュールとして機能することがありうる (Go, 1981, 1983) との考えを取り入れて、一つの RGS ドメインをエクソンごとに3部分に分けてその一部分ごとに置換した RGS8 ドメイン/RGS5 ドメインのキメラを作製した (図3、

R588D, R858D, R885D, R558D)。

Chimeric RGS5/8 domains

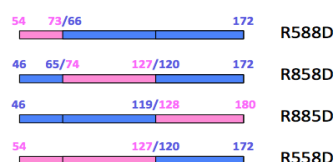


図3. 作製したRGS8とRGS5のRGSドメインのキメラ変異体

以下の実験では抑制効果の強弱がはっきり現れるAT₁受容体発現細胞を用いて、それぞれのキメラのGPCRシグナル抑制活性を検討したところ、R588D, R858D, R558Dは抑制活性を保持していたが、RGS8のC末端部のエクソン部分をRGS5の対応する部分と置換したキメラR885Dは、抑制活性が極めて弱かった。従って、RGS8の強いGPCRシグナル抑制活性には、そのRGSドメインのC末端エクソン部分が非常に重要な役割を担っていると考えられた(図4)。

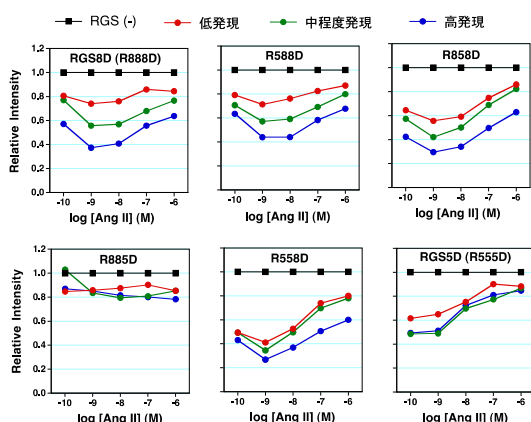


図4. RGS8とRGS5のRGSドメインのキメラ変異体の効果。AT₁受容体発現細胞に、それぞれのRGSドメインの発現量を3段階に変えて発現させ、その発現量依存的な抑制活性の強さを検討した。

(4)RGS8のEN変異体を用いた実験: Gタンパク質のG α サブユニットとRGSドメインとの結合の必要性に関する検討

RGS8のRGSドメインのC末端エクソン部分がどのような機能的役割を担っているのかは上記の結果からは不明である。RGSドメインの立体構造の解析から、一般に、RGSドメインは3カ所で活性化状態または遷移状態のG α サブユニットと結合するとされている。本研究で重要性が示されたC末端エクソン部分は3番目の結合部位を含んでいるので、この部位の結合性に関わっている可能性が考えられる。しかし、C末端エクソン部分が独自に、RGS機能とは別の何らかの抑制効果を現している可能性も否定できない。そこで、第1番目の結合部位とされているRGS8のENをAAに置換した変異体を作製して、その抑制効

果を検討した。その結果、このEN変異体ではC末端エクソン部分は完全に保存されているにもかかわらず抑制活性が激減した。RGS2とRGS3のEN変異体でも結果は同様であった。従って、少なくともC末端エクソン部分が独自に新たな強い抑制活性を持つものではなく、RGSとしての機能を増強するという役割を担っていると考えるのが妥当であろうと思われた。

ウロテンシンIIは比較的新しく発見された心血管作動性ペプチドで、報告によっては、アンジオテンシンやエンドセリンを超える、最強ともいわれる血管収縮作用を示し、さらに、動脈硬化性病変の発症進展に重要な役割を持っていることが明らかになってきている。UT受容体拮抗薬も開発されているが、RGSのUT受容体シグナル抑制効果は、受容体以降の細胞内情報伝達抑制であり、RGSは新しい重要な薬物標的となる可能性がある。

心臓や血管を含めて、一般に細胞には複数種のRGSタンパク質が発現しているので、個々のRGSタンパク質の生理的・病態生理的意義を把握することには困難が付きまとう。それに対する一つのアプローチは、目的とする系で特に強い活性をあらわすRGS分子種を特定することであろう。

本研究の結果では、UT受容体、AT₁受容体、ETA受容体とも、同様に、RGS2、RGS3、RGS8が強い抑制活性を持っていた。ウロテンシンII、アンジオテンシンII、エンドセリン-1は3者とも、血管収縮のみならず、動脈硬化、心筋のリモデリングなど病態生理学的に重要な作用をもつものである。本研究では、これらに対してRGS2、RGS3、RGS8が強い抑制活性を持つことが明らかになった。RGS2はアンジオテンシンの関与する血圧調節機構に重要な役割を果たしていることが示されているが、高血圧のみならず、動脈硬化・虚血性心疾患・心不全・腎疾患・糖尿病等、様々な疾患の発症進展に、これら3つの血管作動性ペプチドは非常に重要であることから、RGS2、RGS3、あるいはRGS8の細胞内存在量を増加させる薬物、あるいはそのRGS活性を増強する薬物が開発されれば、これらの病態の改善に有用と考えられる。実際、RGS2については、その細胞内存在量を増加させる薬物が報告されるなど、RGSをターゲットとする治療応用が視野に入ってきている。本研究で得られた結果を土台として、RGS2、RGS3、あるいはRGS8をターゲットとする新しい治療薬の開発のために、さらなる研究を進めることが望まれる。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Mariko Nishiyama, Sayaka Sumimiya, Sadao Kimura: Potent inhibitory effects of RGS8 on intracellular calcium responses to vasoactive peptides: importance of the C-terminal part of its RGS domain. (第87回日本薬理学会年会、2014年3月20日、仙台国際センター(宮城県・仙台市))

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 真理子 (Mariko Nishiyama)
千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教
研究者番号: 00092081

(2) 研究分担者

木村 定雄 (Sadao Kimura)
千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号: 40134225
削除 平成26年3月26日