

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460331

研究課題名(和文) ヒスタミンH3受容体の細胞内輸送と機能的シグナロソーム形成の分子基盤解析

研究課題名(英文) Molecular bases for intracellular trafficking and functional signalosome formation mediated through histamine H3 receptor

研究代表者

助川 淳 (Sukegawa, Jun)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30187687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体には種々のタンパク質が直接相互作用し、シグナロソームを形成することでその細胞内局在やシグナル伝達を制御する。本研究では、ヒスタミンH3受容体のカルボキシル末端に直接結合するシグナロソーム構成分子としてDRiP78およびRab8に注目した。そして、DRiP78およびRab8が、H3Rの細胞膜分布の減少および増加にそれぞれ関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Through direct interactions with G protein-coupled receptors, various proteins regulate cellular distribution and signal transduction of the receptors. The protein complex is so called "signalosome". In the present study, we investigated roles of DRiP78 and Rab8, as examples of signalosome molecules, in functions of histamine H3 receptor with the central focus on the receptor's cellular distribution. We found that DRiP78 and Rab8 are involved in reduction and increase in plasma membrane distribution of the receptor, respectively.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Gタンパク質共役型受容体 ヒスタミンH3受容体 カルボキシル末端 シグナロソーム 膜輸送 ユビキチン化

## 1. 研究開始当初の背景

現在までに、多くの G タンパク質共役型受容体 (GPCR) が薬物治療の標的分子とされ、細胞表面に局在する受容体分子自体の活性制御、あるいは受容体の内在化やリサイクリング過程に研究・薬物開発の重点がおかれてきた。ところが最近になって、受容体分子の細胞内局在に関する新しい問題が注目されている。すなわち一つには、リボソーム/小胞体 (ER) において新規に翻訳された GPCR 分子が細胞表面へ輸送される細胞内トラフィッキングの分子制御の問題であり、もう一つはその GPCR 分子が細胞表面で効率的に機能を果たすために必要なシグナロソーム複合体形成の分子基盤の問題である。

これらの問題に答えるため、研究代表者はヒスタミン H3 受容体のカルボキシル (C) 末端に結合するタンパク質の探索を行い、CLIC4 を同定し、このタンパク質が H3 受容体の細胞表面へ向かうトラフィッキングを促進する事を明らかにした。また、H3 受容体の C 末端には、ER に局在し G サブユニットと GPCR のアセンブリーを促進する DRiP78 タンパク質や、G サブユニットのシャペロンタンパク質とされる PhLP が結合する事、さらに膜タンパク質のゴルジ体から細胞表面膜への輸送を制御しているとされる Rab8 タンパク質も H3 受容体 C 末端と直接相互作用する事を見だしている。これらの事実は、H3 受容体と G および G が ER において既にプリアセンブリーされており、Rab8 タンパク質がこのプリアセンブリーされた受容体 G タンパク質複合体を細胞表面に運ぶトラフィッキングを制御している可能性を示唆している。

さらに研究代表者らは、ラット脳抽出物を材料とし、アフィニティークロマトグラフィー法と質量分析法により、H3 受容体の C 末端に結合する新規タンパク質の探索を進めた結果、Synaptotagmin、Munc18、さらに CaM KinaseII 等の、シナプス小胞からの神経伝達物質放出に関わる膜融合 SNARE タンパク質を制御するタンパク質群が新たに同定された (未発表)。さらに SNARE タンパク質そのものである Syntaxin や SNAP25、また神経伝達物質の放出を直接制御するとされる Rab3 タンパク質までもが、インビトロで H3 受容体と直接結合する活性を持っている事を明らかにしている (未発表)。これらのタンパク質はすべて H3 受容体シグナロソームの構成分子と考えられる。

## 2. 研究の目的

本申請研究は、上記のさまざまな H3 受容体結合タンパク質の解析を通して、受容体 G タンパク質複合体のプリアセンブリーとその細胞表面への輸送メカニズム、さらに、細胞表面における H3 受容体を中心とした機能的シグナロソームの存在確認と、そのアセンブリーを可能にする分子基盤の解明を目的

とするものである。

## 3. 研究の方法

(1) cDNA クローニング: 実験に使用した遺伝子 cDNA は、H3 受容体を除き、すべてラットあるいはマウス脳由来 mRNA から RT-PCR 法によってクローニングした。

(2) Short hairpin RNA (shRNA) plasmid の作製: Li ら [1] の方法に従い、shRNA 配列を U6-pCAGIG ベクターに挿入した。

(3) *in vitro* pull-down assay: 受容体の C 末端部位はグルタチオン S-転移酵素 (GST) 融合タンパク質として、またシグナロソームタンパク質はマルトース結合タンパク質 (MBP) あるいは FLAG タグ付加タンパク質として、それぞれ大腸菌で産生した。各タンパク質を混合し 4°C でインキュベーション後、グルタチオン担体ビーズにて GST 融合タンパク質を精製した。精製産物中のシグナロソームタンパク質の有無は、抗 MBP 抗体を使用したウェスタンブロット法にて解析した。

(4) 培養細胞におけるタンパク質発現およびノックダウン: 培養細胞におけるタンパク質発現には、各遺伝子 cDNA を含んだ発現用プラスミドのトランスフェクション法による導入、あるいはアデノウイルスベクターを利用した発現系を用いた。ノックダウンには、U6-pCAGIG ベクターをトランスフェクション法にて導入した。培養細胞としては、HEK293 細胞、CHO 細胞、HeLa 細胞や PC12 細胞等を使用した。

(5) 安定発現細胞の樹立: 各遺伝子 cDNA を導入された細胞を G418 存在下に培養し、目的タンパク質を安定発現する細胞のみを選別した。

(6) 免疫染色法: 目的タンパク質を発現した細胞をカバーガラス上に播種し、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間 (室温) 固定した。その細胞を 0.1% BSA 含有 PBS で 30 分間 (室温) ブロッキングした後、1 次抗体および蛍光標識 2 次抗体でそれぞれ 60 分間 (室温) および 45 分間 (室温) インキュベートした。最後に、DAPI 含有封入剤を用いてスライドガラス上にマウンティングした。観察には共焦点蛍光顕微鏡 LSM-780 (Zeiss) を用い、ZEN2011 ソフトウェア (Zeiss) にて解析した。

(7) 細胞表面 H3 受容体量の測定 (Cell-based ELISA 法): 24 ウェルプレートに播種した細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 10 分間 (室温) 固定した。その細胞を 5%スキムミルク/0.1% BSA/PBS 中でブロッキングし、抗 H3R 抗体をインキュベートした。2 次抗体として DyLight800 標識抗ウサギ IgG を用い、また細胞量の指標として細胞核を DRAQ5 で染色した。Infrared イメージングシステム Odyssey (LI-COR) を用いて 800 および 700 nm の蛍光強度を測定し、800 nm の蛍光強度を 700 nm の蛍光強度で補正してデータとした。

(8) 細胞内サイクリック AMP (cAMP) 産生量測定 (AlphaScreen 法): H3 受容体を安定発現

した HEK293 細胞を、ホスフォジエステラーゼ阻害薬 IBMX 存在下、H3 受容体アゴニスト immethridine とアデニル酸シクラーゼ活性化薬 forskolin で 10 分間同時刺激した。2.5% 過塩素酸に置き換えることで反応を停止し、細胞上清に含まれる cAMP 量は AlphaScreen 法 (PerkinElmer) にて測定し、検出には PHERAstar (BMG Labtech) を用いた。

#### <引用文献>

[1] Li A, Saito M, Chuang J-Z, Tseng Y-Y, Dedesma C, Tomizawa K, Kaitsuka T, Sung C-H, Ciliary transition zone activation of phospho-Tctex-1 controls ciliary resorption, S-phase re-entry and fate of neural progenitors, *Nat. Cell Biol.*, 13 (2011) 402-11

#### 4. 研究成果

##### <DRiP78>

(1) 研究代表者は、H3 受容体の C 末端に DRiP78 が結合することを見出していた。そこで、C 末端中に DRiP78 との結合に関わるアミノ酸配列を探索した結果、F419, R421, K425, K426 および K431 が DRiP78 との結合に関わることが見出された。

(2) DRiP78 を細胞内に発現したところ、DRiP78 の発現量依存的に H3 受容体の細胞表面量が減少した。また、その細胞表面量の減少はプロテアソーム阻害薬によって回復した。

(3) H3 受容体は DRiP78 発現下でユビキチン化されたことより、H3 受容体に DRiP78 が結合すると、ユビキチン-プロテアソーム系による H3 受容体の分解が亢進することが見出された。

以上のことから、DRiP78 は H3 受容体の C 末端と直接結合し、H3 受容体を小胞体に局在させ分解系に導くだけでなく、H3 受容体の細胞表面へのトラフィッキングを特異的に抑制することが明らかになった。

##### <Rab8>

(4) 研究代表者は、H3 受容体の C 末端に Rab8 が結合することを見出していた。そこで、C 末端中に Rab8 との結合に関わるアミノ酸配列を探索した結果、F419, K425, および K426 が Rab8 との結合に関わることが見出された。これらのアミノ酸は、ヘリックス 8 の疎水性側に分布する。

(5) 緑色蛍光色素アザミグリーン融合 H3 受容体を安定発現する CHO 細胞を樹立した。H3 受容体は主に細胞膜に分布することが、共焦点蛍光顕微鏡観察によって示された。しかし、野生型および活性化変異体 (Q67L) の Rab8 を過剰発現すると、H3 受容体の細胞膜分布は減少し、主に細胞内の小胞上に分布した。一方、不活性化変異体 (T22N) の過剰発現をしても、H3 受容体の細胞膜分布は減少しなかった。

(6) H3 受容体を安定発現する HEK293 細胞 (H3R/293) を樹立した。Rab8 をロックダウン

すると、細胞表面 H3 受容体量の増加することが Cell-based ELISA 法により示された。

(7) Rab8 は一般的に、ゴルジ体および細胞内小胞から細胞膜へのリサイクリングに関わる。そこで、リサイクリング阻害薬 monensin を前処理したところ、H3 受容体の細胞表面量は時間依存的に減少した。すなわち、Rab8 のロックダウンとは反対の結果が得られた。

(8) H3 受容体は三量体 G タンパク質 Gi と共役する。H3 受容体を介したアデニル酸シクラーゼ活性の減弱を解析するため、H3R/293 細胞を H3 受容体アゴニスト immethridine とアデニル酸シクラーゼ活性化薬 forskolin で同時刺激した。その結果、immethridine 処置によって cAMP 産生量が減少することが見出された。

以上のことから、H3 受容体は C 末端の helix8 を介して Rab8 と直接結合し、細胞内に分布するために Gi シグナルが減弱することが示された。また、この Rab8 による制御機構は、一般的に考えられている Rab8 の膜輸送機構とは異なる機構であることが考えられた。

今後、受容体の細胞内局在とシグナル伝達におけるシグナルソームの役割を解明することは、基礎生物学上の興味を超えて、ますます臨床的な応用を視野に入れた研究へと発展していくことが予想される。将来、いっそうの進展が望まれる。

#### 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 8 件)

Arashiki A\*, Saito M\*, Koshino I, Kamata K, Hale J, Mohandas N, Manno S, Takakuwa Y, An unrecognized function of cholesterol: regulating the mechanism controlling membrane phospholipid asymmetry, *Biochemistry*, 査読有, 55 (2016) 3504-13 (\*; equal contribution)

DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00407

Suzuki T, Yamaguchi H, Kikusato M, Sato T, Yanagisawa T, Osaka H, Hayashi K, Abe T, ほか 33 名, Mitochondrial Acid 5 Binds Mitochondria and Ameliorates Renal Tubular and Cardiac Myocyte Damage, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 査読有, 27 (2016) 1925-32

DOI: 10.1681/ASN.2015060623

Sato T, Neschadim A, Nakagawa R, Yanagisawa T, Medin JA, Evaluation of Bystander Cell Killing Effects in Suicide Gene Therapy of Cancer: Engineered Thymidylate Kinase (TMPK)/AZT Enzyme-Prodrug Axis, *Methods Mol. Biol.*, 査読有, 1317 (2015) 55-67

DOI: 10.1007/978-1-4939-2727-2\_4

Suzuki T, Yamaguchi H, Kikusato M, Sato T,

Yanagisawa T, Osaka H, Hayashi K, Abe T,ほか 23 名, Mitochonic Acid 5 (MA-5), a Derivative of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid, Improves Survival of Fibroblasts from Patients with Mitochondrial Diseases, *Tohoku J. Exp. Med.*, 査読有, 236 (2015) 225-32  
DOI: 10.1620/tjem.236.225

〔学会発表〕(計 23 件)

Masaki Saito, Marina Hirano, Jun Sukegawa, Takeya Sato, Teruyuki Yanagisawa, “Membrane scaffold protein 4.1G promotes osteoblast differentiation through formation of a primary cilium”, 第 90 回日本薬理学会年会、平成 29 年 3 月 16 日、長崎ブリックホール、長崎新聞分化ホール (長崎県長崎市)

佐藤岳哉, 野村亮介, 久志本成樹, 柳澤輝行, 阿部高明,「新規ミトコンドリア病治療薬 mitochonic acid-5 は、azidothymidine により障害されたミトコンドリア品質管理機構を回復させる」, 第 90 回日本薬理学会年会、平成 29 年 3 月 16 日、長崎ブリックホール、長崎新聞分化ホール (長崎県長崎市)

Masaki Saito, Takeya Sato, Teruyuki Yanagisawa, “Actin dynamics and endosome formation are essential for transduction of primary cilium-derived signaling” The 2017 Japan-NIH joint Symposium, 2017, February 15-17, Seiryu Auditorium, Tohoku University (宮城県仙台市)

斎藤将樹, 平野毬菜, 助川淳, 佐藤岳哉, 柳澤輝行,「細胞膜裏打ちタンパク質 4.1G は骨芽細胞分化を促進する」, 第 67 回日本薬理学会北部会、平成 28 年 9 月 30 日、北海道大学学術交流会館 (北海道札幌市)

佐藤岳哉, 松橋徹郎, 阿部高明, 柳澤輝行,「新規ミトコンドリア病治療薬 Mitochonic acid-5 の薬理学的プロファイル」, 第 89 回日本薬理学会年会、平成 27 年 3 月 11 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

斎藤将樹, 平野毬菜, 崔林然, 助川淳, 佐藤岳哉, 柳澤輝行,「細胞膜裏打ちタンパク質 4.1G の直接結合によるアデニル酸シクラーゼ活性の抑制機構」, 第 89 回日本生化学会本会、平成 28 年 9 月 26 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)

佐藤岳哉, 戸田法子, 山内正憲, 柳澤輝行,「ドキシソルピシンによる Autophagic Flux 障害は SNARE 分子の発現減少により誘導される」, 第 89 回日本薬理学会年会、平成 27 年 3 月 9 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

平野毬菜, 斎藤将樹, 崔林然, 助川淳, 柳澤輝行,「骨芽細胞のアデニル酸シクラー

ゼ活性における膜裏打ちタンパク質 4.1G の抑制作用」, 第 89 回日本薬理学会年会、平成 27 年 3 月 9 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

斎藤将樹, 崔林然, 平野毬菜, 助川淳, 柳澤輝行,「PTH を用いた骨粗鬆症治療に関わる分子基盤研究 (西宮機能系基礎医学研究助成基金授賞演題)」, 第 66 回日本薬理学会北部会、平成 27 年 9 月 18 日、富山国際会議場 (富山県富山市)

斎藤将樹, 千葉彩乃, 助川淳, 柳澤輝行, 守屋孝洋, 中畑則道,「細胞質ダイニン軽鎖 Tctex-1 によるアデニル酸シクラーゼ活性の増強作用」, 第 88 回日本薬理学会年会、平成 27 年 3 月 20 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

崔林然, 斎藤将樹, 佐藤岳哉, 柳澤輝行, 助川淳,「アデニル酸シクラーゼはサブタイプ特異的に膜裏打ちタンパク質 4.1G と結合する」, 第 88 回日本薬理学会年会、平成 27 年 3 月 20 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

斎藤将樹, 千葉彩乃, 助川淳, 柳澤輝行, 守屋孝洋, 中畑則道,「細胞質ダイニン軽鎖 Tctex-1 によるアデニル酸シクラーゼ/cAMP シグナルの増強作用」, 第 65 回日本薬理学会北部会、平成 26 年 9 月 27 日、福島コンベンションセンター (福島県福島市)

斎藤将樹, 後藤俊宏, 千葉彩乃, 崔林然, 柳澤輝行, 助川淳, 中畑則道,「アデニル酸シクラーゼを介したサイクリック AMP 産生における膜裏打ちタンパク質 4.1G の役割」, 第 13 回生命科学研究会、2014 年 6 月 20-21 日、JR タワーホテル 日航札幌 (北海道札幌市)

〔図書〕(計 1 件)

柳澤輝行, 中外医学社、ここが知りたい強心薬のさじ加減 北風政史編著、2016、456

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

助川 淳 (SUKEGAWA, Jun)  
東北大学・医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：30187687

### (2) 研究分担者

柳澤 輝行 (YANAGISAWA, Teruyuki)  
東北福祉大学・健康科学科・教授  
研究者番号：90133941

佐藤 岳哉 (SATO, Takeya)  
東北大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：10312696

斎藤 将樹 (SAITO, Masaki)  
東北大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：50400271

倉増 敦朗 (KURAMASU, Atsuo)  
山口大学・医学(系)研究科・准教授  
研究者番号：90302091  
(平成26年4月～平成27年3月)

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )