

平成 21 年 6 月 24 日現在

研究種目：特定領域研究（計画）

研究期間：2003～2008

課題番号：15083207

研究課題名（和文） 細胞センサーとしてのGタンパク質共役受容体

研究課題名（英文） G Protein-Coupled Receptors as Cell Sensors

研究代表者

芳賀 達也 (HAGA TATSUYA)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：30011646

## 研究成果の概要

ムスカリン性アセチルコリン受容体M2サブタイプ変異体の結晶化・高次構造の解明を主目的とした。約 8Å の回折点を示す結晶が再現的に得られる条件を見いだしたが、原子構造の解明には至らなかった。副次的課題として、ムスカリン受容体の細胞内第3ループがフレキシブルな構造を取ること、ムスカリン M4 受容体の細胞内移行には2つ以上の機構が併存すること、ムスカリン受容体のリサイクリングに関わるモチーフの同定、などの結果を得た。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	62,000,000	0	62,000,000
平成 16 年度	16,000,000	0	16,000,000
平成 17 年度	15,500,000	0	15,500,000
平成 18 年度	16,000,000	0	16,000,000
平成 19 年度	16,000,000	0	16,000,000
平成 20 年度	16,000,000	0	16,000,000
総計	141,500,000	0	141,500,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：ムスカリン性アセチルコリン受容体、Gタンパク質共役受容体、膜タンパク質、結晶構造、細胞内移行、リサイクリング、オーファン受容体、高親和性コリントランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役受容体の立体構造としては、ロドプシンの構造のみが知られていた。Gタンパク質共役受容体の構造の解明は、細胞外情報を細胞内に伝える分子機構を知るために必須の課題であると同時に、薬の作用機構を知るためにも重要な情報を提供すると考えられた。ロドプシンだけの構造では、ロドプシンに特異的な構造と、Gタ

ンパク質共役受容体に共通な構造との区別がつかない。少なくとも、2、3種類のGタンパク質共役受容体の構造が分かれば、特定のGタンパク質共役受容体の一次構造からその立体構造を推測することも可能になると予測された。

## 2. 研究の目的

Gi、Gq と共役する受容体のモデルとしてムスカリン性アセチルコリン受容体を選び、その大量発現・精製系の確立、結晶化条件の検索、原子構造の決定を目的とした。同時に、ムスカリン受容体の脱感受性機構、特にアゴニスト依存性細胞内移行の分子機構を明らかにすることをもう一つの目的とした。また、将来の研究の準備段階として、ムスカリン受容体・Galpha 融合タンパク質の特性の解明、これを用いたリガンド検索系の開発、高親和性コリントランスポーターの分子特性の解明も平行して行った。

### 3. 研究の方法

ムスカリン受容体 M2 サブタイプの変異体を結晶化の対象とした。糖鎖結合の除去、タンパク質分解を受けやすい細胞内第3ループ中央部分の除去、を行ったものである。この変異体がアセチルコリンで活性化され、Gタンパク質 Gi を活性化することは調べてある。バキュロウイルスを用いて昆虫細胞 Sf9 に大量発現させ、われわれが開発したアフィニティークロマトグラフィー法で精製し、結晶化を試みた。

種々の溶媒(界面活性剤、他の溶媒条件、沈殿剤)、結晶化条件(アニーリング、シーディング法など)を検討した。本格的な検討を開始して約1年後に約10Åの回折像を示す結晶が得られたが、その後分解能の改善には成功しなかった。最後の1年間は単クローン抗体との複合体の結晶化およびバイセル存在下での結晶化に挑戦したが、現在のところ高分解能の結晶は得られていない。抗体との複合体およびキュービックフェーズ法を利用した結晶化の試みを継続している。

### 4. 研究成果

(1)ムスカリン受容体 M2 サブタイプ変異体(糖鎖を結合せず、細胞内第3ループ(I3)の大部分を削除したもの)の結晶化の試みを行った。再現的に結晶化する条件が見つかったが、回折点の分解能は8Åにとどまり、原子構造の解析に至らなかった。

(2)ムスカリン受容体は細胞内第3ループ(i3)が長い(160-240残基)。他の多くのGPCRのi3は短く、M<sub>2</sub>-i3の根元以外の大部分を削除してもアセチルコリン結合能やGタンパク質活性化能は変わらない。M<sub>2</sub>-i3は独立したサブドメインで、一定の構造を取る可能性が考えられた。M<sub>2</sub>-i3を大腸菌で発現させ円2色性を測定したところ、予想に反して2次構造は認められなかった。1次元NMR測定の結果も、rigidな構造を作らないことを示した。野生型M<sub>2</sub>受容体とi3を欠損させたM<sub>2</sub>受容体の円2色性の差を調べると、i3が2次構造を作らないことが示された。これらの結果より、M<sub>2</sub>受容体の長いi3はフレキシブルな構造として存在すると推測した。

(3)培養細胞(HEK293)に発現させたムスカリンM4受容体はアゴニスト依存性に細胞内移行し、

アゴニスト除去で細胞表面にリサイクリングされる。M4受容体I3の部分的切除変異体を網羅的に検索し、リサイクリングに関わる領域を推測した。この部位をリサイクリング能が低いM2受容体I3部分に加えると、リサイクリング能が著明に増大することを見いだした。

(4)I3の殆どを削除したM4変異体でも、Gタンパク質共役受容体キナーゼ2(GRK2)を共発現させると細胞内移行が増加し、GRK2の効果はドミナントネガティブGRK2の共発現で抑制された。ところがI3欠損M4受容体の細胞内Ser/Thr10個をAlaに替えた変異体いずれでも、GRK2による細胞移行促進効果が見られた。複数のリン酸化部位の何れかがGRK2によってリン酸化されれば細胞内移行が促進されるという可能性が考えられる。

(5)容体・Gα融合タンパク質は化学センサーとして有効であると同時に、オーファン受容体のリガンド検索にも利用可能である。この方法で同定した5-oxo-eicosaenoic acid(5-oxo-EETE)の受容体hGPCR48が、実際5-oxo-EETEへ向けての顆粒球の走化性に関与していることを、hGPCR48に対する抗体を用いて明らかにした。

(6)高親和性コリントランスポーター(CHT1)の構造と機能の関係を部位特異的な変異体を用いて調べた。細胞膜貫通部分の荷電アミノ酸の変異体の活性測定から、コリンの認識に関わる領域を推定した。また、CHT1が細胞膜貫通セグメントを13個持つ構造であることを実験的に示した。

### 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15件)

1. Yurugi-Kobayashi T, Asada H, Shiroishi M, Shimamura T, Funamoto S, Katsuta N, Ito K, Sugawara T, Tokuda N, Tsujimoto H, Murata T, Nomura N, Haga K, Haga T, Iwata S, Kobayashi T, Comparison of functional non-glycosylated GPCRs expression in *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380: 271-276 (2009).
2. Nakamura T, Sakai M, Sadakane Y,

- Haga T., Goto Y, Kinouchi T, Saito T, Fujii N., Differential rate constants of racemization of aspartyl and asparaginyl residues in human alpha A-crystallin mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* 1784:1192-1199 (2008)
3. Hashimoto Y., Morisawa K, Saito H, Jojima E, Yoshida N, Haga T., Muscarinic M4 receptor recycling requires a motif in the third intracellular loop. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325: 947-953 (2008)
  4. Ichiyama S., Oka, Y., Haga, K., Kojima, S., Tateichi, Y., Shirakawa, M., and Haga T., The structure of the third intracellular loop of the muscarinic acetylcholine receptor M<sub>2</sub> subtype, *FEBS Letters*, 580, 23-26 (2006)
  5. Koike, D., Obinata, H., Yamamoto, A., Takeda S., Komori, H., Nara, F., Izumi, T. and Haga T. 5-oxo-eicosatetraenoic acid-induced chemotaxis: identification of a responsible receptor hGPCR48 and negative regulation by G protein G<sub>12/13</sub>, *J. Biochem.* 139, 543-549 (2006)
  6. Nakamura, H.\*, Kuroda, H., Saito, H., Suzuki, R., Yamori, T., Maruyama, K. and Haga T. Synthesis and Biological Evaluation of Boronic Acid Containing *cis*-Stilbenes as Apoptotic Tubulin Polymerization Inhibitors, *Chem. Med. Chem.* 1, 729-740 (2006).
  7. Mangmool,S., Haga T., Kobayashi,H., Kim,K.-M., Nakatya,H., Nishida,M.m and Kurose,H.\* , Clathrin requirement for phosphorylation and internalization of beta2-adrenergic receptor by G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2), *J. Biol. Chem.* 281, 31940-31949 (2006)
  8. Terashima, Y., Onai, N., Murai, M., Enomoto, M., Poonpiriya, V., Hamada, T., Motomura, K., Suwa, M., Ezaki, T., Haga T., Kanegasaki, S., and Matsushima, K., Pivotal function for cytoplasmic protein FROUNT in CCR2-mediated monocyte chemotaxis, *Nature Immunology* 6: 827-835 (2005)
  9. Oka-Kira, E., Tateno, K., Miura, K., Haga T., Hayashi, M., Harada, K., Sato, S., Tabata, S., Shikazono, N., Tanaka, A., Watanabe, Y., Fukuhara, I., Nagata, T., and \*Kawaguchi, M., Klavier (klv), a novel hypernodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in vascular tissue organization and floral induction, *The Plant Journal* 44: 505-515 (2005)
  10. Hashimoto Y., Matsuda, T., Matsuura, Y., Haga T., and Fukada, Y. Production of N-lauroylated G protein  $\alpha$ -subunit in Sf9 insect cells: the type of N-acyl group of G  $\alpha$  influences G protein-mediated signal transduction, *J. Biochem* 135: 319-329 (2004)
  11. Zhang, Q., Okamura, M., Guo, Z-D., Niwa, S., and Haga T. Effects of partial agonists and Mg<sup>2+</sup> ions on the interaction of M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptor and G protein G  $\alpha$  i1 subunit in the M<sub>2</sub> - G  $\alpha$  i1 fusion protein, *J. Biochem*, 135: 589-596 (2004)
  12. Takeda, S., Okada, T., Okamura, N., Haga T., Isoyama-Tanaka, J., Kuwahara, H., Minamino, N. The receptor-G  $\alpha$  fusion protein as a tool for ligand screening: a model study using nociceptin receptor-G  $\alpha$  i<sub>2</sub> fusion protein. *J. Biochem.*, 135: 597-604 (2004)

13. Suga, H., Takeda, S., Haga, T., Okamura, M., Takao, K., and Tatemoto, K. Stimulation of increases in intracellular calcium and prostaglandin E<sub>2</sub> generation in Chinese hamster ovary cells expressing receptor-G  $\alpha_{16}$  fusion proteins. *J. Biochem.*, 135: 605-613 (2004).
14. Sugiura, H., Iwata, K., Matsuoka, M., Hayashi, H., Takemiya, T., Yasuda, S., Ichikawa, M., Yamauchi, T., Mehlen, P., Haga, T., and Yamagata, K., Inhibitory role of endophilin 3 in receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.*, 279: 23343-23348 (2004).
15. Motizuki, M., Takei, T., Tasaka, K., Yokota, S., Kojima, S., Haga, T., and Tsurugi, K., Low pH facilitates uptake of proteins by cells through a non-endocytic pathway. *J. Biochem.* 135:713-719 (2004)
- [学会発表] (計 34 件)
1. Saito, K., Kakegai, R., Hashimoto, Y., Haga, T.: The role of G protein-coupled receptor kinase 2 in internalization of muscarinic acetylcholine receptor M4 subtype 第81回日本薬理学会 (2008年3月17日-19日、パシフィコ横浜)
2. Watanabae, T., Ichiyama, S., Haga, T. Regulator of G-protein Signaling (RGS) 2 may bind to the third intracellular loop of the M2 muscarinic acetylcholine receptor. 日本農芸化学会(名古屋/名城大学天白キャンパス2008年3月26日-29日)
3. Urashima, K., Kubo, Y., Nishikawa, S., Nakamura, T., Hayashi, K., Yamada, H., Osawa, C., Okuda, T., Haga, T. The high affinity choline transporter: topology and choline binding site as studied by site-directed mutagenesis. *Experimental Biology 2008* (April 4 - 9, 2008, San Diego, California, USA)
4. Yamada, H., Imajoh-Ohmi, S. and Haga, T. Regulation of the high affinity choline transporter (CHT1) by ubiquitin ligase Nedd4-2. *Experimental Biology 2008* (April 4 - 9, 2008, San Diego, California, USA)
5. 西川静枝、大澤千恵子、松田弘子、奥田隆志、芳賀達也. 高親和性コリントランスポーターの負電荷アミノ酸の変異解析、第80回日本薬理学会年会 (2007年3月14日-16日、名古屋国際会議場)
6. Urashima, K., Kubo, Y., Yamada, H., Okuda, T., Haga, T. Experimental evidence for topology of the high affinity choline transporter (CHT1) 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 (2007年12月11日-15日、パシフィコ横浜)
7. 中村徹、酒井美世、定金豊、芳賀達也、後藤祐児、藤井紀子、ヒト $\alpha$ B-クリスタリン変異体中のAsp, Asn 残基のラセミ化反応速度定数の解析と構造活性相関 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 (2007年12月11日-15日、パシフィコ横浜)
8. Mangmool, S., 芳賀達也、西田基宏、黒瀬等: クラスリンはGタンパク質共役受容体キナーゼ2(GRK)の活性化に必須である、第79回日本薬理学会年会 (2006年3月8日-10日、パシフィコ横浜)
9. Hashimoto, Y., Morisawa, K., Saito, H., Jojima, E., Yoshida, N., and Haga, T. Dynamin-dependent internalization and recycling of M4 muscarinic acetylcholine receptors: the role of the third intracellular loop. 12th International Conference on

Retinal Proteins (June 4 –8, 2006, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan)

10. Ichiyama, S., Nemoto, R., Haga, T.: Interaction of muscarinic M2 receptor with G protein Gai 1 subunit in their fusion protein expressed in Escherichia coli: the effect of expression level: 12th International Conference on Retinal Proteins第12回レチナルタンパク質国際会議 (Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan, June 4 – 8, 2006))

11. Ichiyama, S., Nemoto, R., Tanabe, H., Okamura, M., Furukawa, H., and Haga, T.: Effect of G protein  $\beta\gamma$  subunits on the interaction of the muscarinic acetylcholine receptor M2 or M4 subtype with G protein  $G\alpha_{i1}$  subunit : 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOB Congress (June 18-23, 2006, Kyoto International Conference Hall, Kyoto, Japan)

12. Hashimoto, Y., Morisawa, K., Saito, H., Jojima, E., Yoshida, N., and Haga, T.: A region in the third intracellular loop is involved in the recycling of internalized muscarinic acetylcholine receptor M4 subtype : 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (June 18 - 23, 2006, Kyoto International Conference Hall, Kyoto, Japan)

13. Haga, T., Okuda, T., Kaitsuka, C., Osawa, C., Nishiyama, N., Yamada, H., Nakamura, T., Hayashi, K., Ito, S., Hamano, T., Sato, M., Ushio, T., Nishikawa, S., Kubo, Y., Matsuda, H. Molecular characterization by mutagenesis of the high affinity choline transporter (CHT1) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (June 18 -23, 2006, Kyoto International Conference Hall, Kyoto, Japan)

14. Nakamura T., Sadakane Y., Haga, T., Fujii, N.: Kinetic study of racemization at Asp58 and Asp151 residues in recombinant human  $\alpha$ A-crystallin 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and

Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (June 18 - 23, 2006, Kyoto International Conference Hall, Kyoto, Japan)

15. Kubo, Y., Yamada, H., Okuda, T., Haga, T. Topology model for the high-affinity choline transporter by site-directed chemical labeling、第28回日本生物学的精神医学会、第36回日本神経精神薬理学会、第49回日本神経化学会大会合同年会 (2006年9月14日-16日、名古屋国際会議場)

16. 市山進、岡良彰、小島修一、芳賀達也 : 大腸菌で発現させたムスカリン性アセチルコリン受容体細胞内第3ループの精製と構造機能解析 : 2005年度日本農芸化学会大会 (2005年3月28日-30日、札幌コンベンションセンター)

17. Ichiyama, S., Oka, Y., Haga, K., Kojima, S., Tateishi, Y., Shirakawa, M., and Haga, T.: Does the third intracellular loop of the muscarinic acetylcholine receptor have a rigid tertiary structure?: Gordon Research Conference (Second Messengers & Protein Phosphorylation): (June 12 -19, 2005, Biddeford, U.S. A.)

18. Hashimoto, Y., Yoshida, N., Jojima, E., Saito, H., Morisawa, K., and Haga, T.: Internalization and Recycling of Muscarinic Acetylcholine Receptor M2 and M4 Subtypes. : Gordon Research Conference (Second Messengers & Protein Phosphorylation): (June 12 - 19, 2005, Biddeford, U.S. A.)

19. 中村徹、酒井美世、定金豊、芳賀達也、後藤祐児、木野内忠稔、藤井紀子 : ヒト-クリスタリンにおけるラセミ化部位の役割 : 第78回日本生化学会大会

(2005年10月19日-22日、神戸国際会議場)

20. 森澤加乃子、橋本祐一、斉藤宏幸、城島依里、吉田典弘、芳賀達也：ムスカリン性アセチルコリン受容体M4サブタイプのダイナミン依存的細胞内移行：第78回日本生化学会大会 (2005年10月19日-22日、神戸国際会議場)

[図書] (計 5 件)

1. Ichiyama, S., and Haga, T., Muscarinic acetylcholine receptor, in “Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, 3<sup>rd</sup> ed., edited by Mikoshiba, K., Springer Publishers, New York (2008)
2. 佐藤元康、芳賀達也、生物物理学ハンドブック IV. 細胞の情報、4.14. 膜の受容体、石渡信一、桂勲、桐野豊、美宅成樹編、朝倉書店、pp 236 - 239 (2007)
3. Suga, H., and Haga, T., Ligand screening system using fusion proteins of G protein-coupled receptors with G protein subunits, Neurochemistry International, 51: 140 -164 (2007)
4. Haga, T. and Takeda, S., Screening of ligands for human GPCRs by the use of receptor-G  $\alpha$  fusion proteins, in “G protein-coupled receptors: structure, function, and ligand screening”, edited by Haga, T. and Takeda, S., CRC Press, Taylor & Francis Group, 37-66 (2006)
5. Furukawa, H., Hamada, T., Hirota, H., Ishigur, M., and Haga, T., Determination of steric structure of muscarinic ligands bound to muscarinic acetylcholine receptors: approaches by TRNOE (transferred nuclear overhauser effect), in “G protein-coupled receptors: structure, function, and ligand screening”, edited by Haga, T. and Takeda, S.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳賀 達也 (HAGA TATSUYA)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：30011646

(2) 研究分担者

市山 進 (ICHIYAMA SUSUMU)

学習院大学・理学部・助教 (当時)

研究者番号：333336

(平成 15～19 年度)

橋本 祐一 (HASHIMOTO YUICHI)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：00448953

(平成 20 年度)

(3) 連携研究者