

平成22年 5月 7日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17079005

研究課題名（和文） RGS 蛋白質による G 蛋白質シグナルの生理的制御機構の解明

研究課題名（英文） Physiological regulation of G protein signaling by RGS proteins

研究代表者

倉智 嘉久 (KURACHI YOSHIHISA)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30142011

研究成果の概要（和文）： ホルモンを始めとする細胞外シグナルは膜受容体に結合し、三量体 G 蛋白質を介して様々な効果器の活性を制御する。この時空間的制御は細胞の生理応答に密接に関連する。本研究では、G 蛋白質シグナルを修飾する RGS 蛋白質の作用様式、G 蛋白質シグナルの数理モデル、効果器であるカリウムチャネルの構造—機能相関を解明することによって、G 蛋白質シグナルの生理的調節機構を統一的に解析した。

研究成果の概要（英文）： Trimeric G proteins transmit extracellular signals to regulate the intracellular effectors. The spatiotemporal regulation of this signal closely links to the cellular responses. In this study, we addressed the regulation of G protein signaling by RGS proteins, the mathematical models of G protein signaling and the structure-function relationship of K⁺ channel to analyze the physiological regulation of G protein signaling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	8,900,000	0	8,900,000
2006 年度	23,100,000	0	23,100,000
2007 年度	16,000,000	0	16,000,000
2008 年度	16,000,000	0	16,000,000
2009 年度	8,900,000	0	8,900,000
総計	72,900,000	0	72,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：G 蛋白質、RGS 蛋白質、細胞内シグナル、カルシウムシグナル、カリウムチャネル、数理モデル

1. 研究開始当初の背景

三量体 G 蛋白質は、ホルモン・神経伝達物質などの膜受容体とアデニル酸シクラーゼやイオンチャネルなどの種々の効果器を連関し、細胞外からのシグナルを細胞内へ伝達する。三量体 G 蛋白質は α , β , γ の 3

つのサブユニットから構成されており、受容体刺激に応答した $G\alpha$ 上の GDP-GTP 交換が $G\alpha$ と $G\beta\gamma$ に解離を促し、様々な効果器を活性化する。その後、 $G\alpha$ サブユニットの持つ内因性 GTP 加水分解活性により、GTP が加水分解されると不活性化される。一般に G 蛋白質

シグナルが活性化されている時間は GTP がいかに迅速に加水分解されるかに依存しているが、 $G\alpha$ サブユニットの内因性 GTP 加水分解活性は不完全なものであり、それ単独では加水分解を行うのに数分を要する。しかしながら、実際の生細胞において、加水分解は秒のオーダーで行われている。これは RGS(Regulators of G protein signaling)蛋白質と呼ばれる制御因子が $G\alpha$ サブユニットの内因性 GTP 加水分解活性を促進しているからである。現在約 20 種類にも及ぶ RGS 蛋白質が同定されており、それらの重要性が示唆されているが、RGS 蛋白質が具体的に如何にして G 蛋白質シグナルの生理的調節を行っているのかについては意外と明らかにされてこなかった。例えば、RGS 蛋白質を異所性発現系において過剰発現させると、G 蛋白質シグナルを完全に抑制してしまうが、これは RGS 蛋白質の作用(GTP 加水分解の促進)を考えると自明である。従って、RGS 蛋白質による G 蛋白質シグナルの生理的調節機構の解明には、RGS 蛋白質の作用様式(その調節因子を含む)を理解することが必要不可欠である。

2. 研究の目的

近年、我々は心筋細胞に発現する G 蛋白質制御カリウムチャンネル(以下 K_G チャンネル)の生理的性質を詳細に検討する中で、膜上のホスホリン脂質の1つであるホスファチジルイノシトール 3 リン酸($PI(3,4,5)P_3$)とカルモデュリン(CaM)による RGS 蛋白質の生理的調節機構を世界で初めて明らかにした。すなわち、 PIP_3 による RGS 蛋白質の機能の抑制と、 Ca^{2+}/CaM の競合的な結合による RGS 蛋白質の機能の脱抑制である。しかしながら、RGS 蛋白質には種々の組織・臓器においてこの他にも様々な生理的活性制御機構が存在することが予想されるが、この観点からのアプローチはこれまで殆どなされてこなかった。我々は $PI(3,4,5)P_3/CaM$ による RGS 蛋白質の機能制御についてその詳細を検討すると共に、網羅的なスクリーニングにより新規の RGS 蛋白質制御因子を同定し、RGS 蛋白質による生理的な三量体 G 蛋白質シグナル伝達についての統合的な解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 心筋における RGS 蛋白質の生理的活性制御機構の解明 $PI(3,4,5)P_3/CaM$ による RGS 蛋白質の機能制御の分子基盤を明らかにするために、生化学・分子生物学的手法によって RGS 蛋白質と脂質との相互作用部位の同定を行い、さらに NMR や CD などの分析化学的手法により相互作用の構造的解明を目指す。

(2) 脂質ラフトによる RGS 蛋白質の機能制御 $PI(3,4,5)P_3$ は細胞膜に広汎に存在するわけではなく、脂質ラフトと呼ばれる特定の部位に集積していることが知られている。従って、RGS 蛋白質・G 蛋白質シグナル系の脂質ラフトによる調節機構について検討を行う。具体的には脂質ラフトの構成に必要なコレステロールを除去し、脂質マイクロドメインを破壊する M β CD 処理のシグナル調節に対する影響や、RNAi を用いて脂質ラフト集積分子の G 蛋白質シグナルに対する作用を評価する。

(3) RGS 蛋白質による G 蛋白質サイクル制御の数理モデルの構築 三量体 G 蛋白質の効果器である K_G チャンネルの性質を計測することによって、G 蛋白質サイクルを高時間分解能で把握することができる。そのため、RGS 蛋白質・G 蛋白質サイクル系の数理モデル構築に必要なパラメータを高精度で同定することが可能である。このモデルを心筋活動電位モデル等の組織・細胞モデルに組み込むことによって、G 蛋白質シグナル制御の生理的意義を統合的に明らかにする。

(4) K_G チャンネルの結晶構造に基づくチャンネル機能調節機構の解明 三量体 G 蛋白質は K_G チャンネルのリン脂質 PIP_2 に対する感受性を向上させることによってチャンネルを活性化させている。つまり、チャンネル分子内にチャンネルの活性化を抑制する機構が備わっていると予想される。この機構を明らかにするために、神経組織内にホモメリックに存在する Kir3.2 の細胞質領域の結晶構造を活性化因子存在下、非存在下で明らかにすることによって、その分子機構を解明する。

4. 研究成果

(1) 脂質ラフトによる RGS 蛋白質の機能制御 脂質 2 重膜上に、脂質ラフトと呼ばれるコレステロールが集積した直径数百 nm 以下のマイクロドメインが存在する。この脂質ラフトには受容体、G 蛋白質、イオンチャンネル等の機能蛋白質のみならず、リン脂質 PIP_3 が集積する。本年度、我々は PIP_3 と RGS 蛋白質の相互作用の知見に基づき、生細胞における RGS 蛋白質と脂質ラフトとの関係について検討した。蛍光蛋白質 ECFP の蛍光波長は、Venus の励起波長と重なるため、両者が近接すると、ECFP を励起することにより、Venus の蛍光強度の増加が観察される(FRET(fluorescent resonance energy transfer))。そこで、ECFP と Venus をそれぞれ CaM と RGS4 に融合させ、これらの融合蛋白質を HEK293 細胞に共発現させ、両者の結合を生細胞で観察した(図 1)。その結果、両者を共発現した細胞から ionomycin による FRET のシグナルが検出されるが、CaM や PIP_3 に結合できない RGS 変異体ではシグナルが検出されなかった。そのため、

両者が生細胞において特異的に結合していることが判った。さらに、脂質ラフトを壊すメチル-β-サイクロデキストリン処理や、RGS4 のパルミチン酸化阻害変異体でも FRET のシグナルは検出されなかった。パルミチン酸化阻害変異体は、脂質ラフトに集積できないことから、パルミチン酸化が RGS4 の脂質ラフトへの集積に重要であることが明らかとなった。

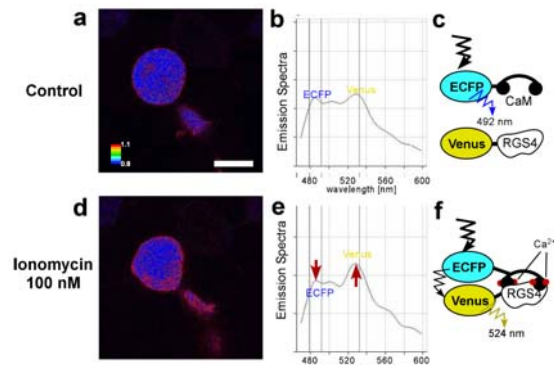


図1 生細胞中での RGS 蛋白質 RGS4 と CaM との相互作用の FRET による検出

(2) RGS 蛋白質・G 蛋白質サイクル系の数理モデル

G 蛋白質の効果器である K_G チャネルの生理的動態を再現する G 蛋白質サイクルの数理モデルを構築した。本数理モデルは、 m_2 アセチルコリン受容体と G 蛋白質間の相互作用と、G 蛋白質 $G\beta\gamma$ と K_G チャネルの相互作用の 2 つの過程をそれぞれモデル化し、統合した。前者は Thomsen 等のモデルを改良し、RGS 蛋白質による細胞膜電位依存性の G 蛋白質活性調節機構をモデルに組み入れた。後者は Monod-Wyman-Changeux のアロステリックモデルを用いた。さらに、Corey と Clapham による $G\beta\gamma$ と K_G チャネルの生化学的結合特性や、我々の研究室で計測したリラクゼーション等のチャネル電流の時間依存性、GTP 濃度依存性、アセチルコリン濃度依存性、膜電位依存性などの異なる電気生理学的特性を同時に満たす速度定数を最適化した。その結果、迅速な受容体依存性のチャネル活性化等の、電気生理実験で観察される結果を再現する G 蛋白質サイクル系の数理モデルの作成に成功した。

(3) K_G チャネルの構造・活性相関

① K_G チャネルを非活性型に維持する分子内結合の同定

活性化因子の存在下、非存在下における K_G チャネル分子 Kir3.2 の細胞質領域の X 線立体構造を明らかにした。両者の構造の差異を検討すると、活性化因子非存在下において、分子内にイオン結合が存在することが判った。こ

の結合を切断する変異は PIP_2 に対する感受性を増加させたことから、分子内結合はチャネルの活性化を抑制していると考えられた (図 2)。さらに、このイオン結合を形成するアミノ酸は Na^+ 依存性、G 蛋白質依存性の活性化に関与していることが知られている。そのため、分子内結合の切断が 2 つの異なる活性化因子によるチャネル活性化機構において共通していると推定された。

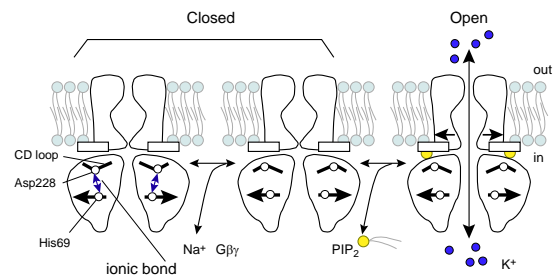


図2 Kir3.2 の活性化機構における分子内結合の役割

② K_G チャネルと陽イオンの相互作用

K_G チャネルは細胞膜における K^+ を通すポアである。そのため、イオン透過系路の制御はこのチャネルの生理機能の本質である。Kir チャネルのイオン透過系路は細胞内 Mg^{2+} や polyamine による電位依存性のブロックや物理的な開閉によって制御される。Kir チャネルは 4 つのサブユニットから構成され、各サブユニットは構造的、機能的に異なる 2 つのドメイン (膜貫通領域、細胞質領域) を形成する。イオン透過系路は集合体の中央部分に位置し、2 つのドメインを貫いている。これまで、複数の Kir チャネルの全体、部分構造が報告されている。これらの構造では、膜貫通領域のイオン透過系路は閉じているために、イオン非透過型の構造を反映していると推定されている。一方、細胞質領域におけるイオン透過系路 (cytoplasmic pore) は水和したイオンが動ける内径を有しているため、開状態であると予想されているが、機能状態との対応は不明であった。

G 蛋白質制御 Kir チャネル Kir3.2 の細胞質領域の結晶構造を解析すると、cytoplasmic pore に蛋白質由来でない強い電子密度が存在していた (図 3)。この電子密度は陽イオンであると考えられたが、その原子種は不明であった。そこで、原子が特定波長の X 線を異常分散する性質を利用し、様々な陽イオンを含む溶液に浸潤させた結晶から、結晶構造内の陽イオン由来の異常分散シグナルの分布を検出した。その結果、二価の陽イオン Ba^{2+} は結晶中の強い電子密度と置換したが、一価の陽イオン Rb^+ や Cs^+ はそれと置換せず、cytoplasmic pore 内の他の部位に局在した。これらのことは、強い電子密度は結晶化剤に含まれた Mg^{2+}

であることを示唆するだけでなく、cytoplasmic poreは陽イオンが自由に移動できる形状をしていながら、 Mg^{2+} を結合することによって、 K^+ の動きを制限できる構造であることを示唆する。

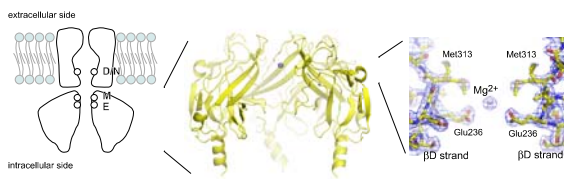


図2 Kir3.2の細胞質ポア中に局在する陽イオンの分布

Mg^{2+} は各サブユニットからcytoplasmic poreに露出したGlu236とMet313によって挟まれていた。 Mg^{2+} を挟んでGlu236は細胞質側に、Met313は細胞膜側に位置する。そこで、SCAM (substituted cysteine accessibility method)を用いて、2つのアミノ酸に対する化学修飾剤(MTSET)の細胞質側からのaccessibilityを検討した。すると、活性化因子存在下において、MTSETは両残基に同程度のaccessibilityを示した。一方、活性化因子非存在下で且つ、 Mg^{2+} 存在下でMTSETは緩慢にMet313を修飾したが、MTSETによるGlu236の修飾は Mg^{2+} の有無を問わず、同程度であった。

以上の構造及び機能解析から、現在報告されているKirチャネルの細胞質領域の構造は生理的条件下におけるチャネルの閉状態を反映していると考えられる。

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 28 件)

1. Murakami S, Suzuki S, Ishii M, Inanobe A, Kurachi Y. Cellular modeling: experiments and simulation to develop a physiological model of G-protein control of muscarinic K^+ channels in mammalian atrial cells. *Phil Trans Roy Soc A*. 査読有, 2010, in press.
2. Ait-Haddou R, Kurachi Y, Nomura T. On calcium-buffer dynamics within the excess buffer regime. *J. Theor. Biol.* 査読有 Vol 264, 2010, 55-65
3. Suzuki Y, Kurachi Y, Nomura T. (10 名省略, 8 番目) A platform for in silico modeling of physiological systems III. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 査読有 Vol 2009, 2009, 2803-2806
4. Yokoe M, Kurachi Y, Sakoda S. (3 名省略, 4 番目) Opening velocity, a novel parameter, for finger tapping test in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 査読有

Vol 15, 2009, 440-444

5. Ogawa S, Kurachi Y, Mitamura H. (21 名省略, 13 番目) Optimal treatment strategy for patients with paroxysmal atrial fibrillation: J-RHYTHM Study. *Circ. J.* 査読有 Vol xxxxxxx, 2009, 242-248.
6. Inanobe A, Kamiya N, Murakami S, Fukunishi Y, Nakamura H, Kurachi Y. In silico prediction of the chemical block and human ether-a-go-go-related gene (hERG) K^+ current. *J Physiol Sci.* 査読有 Vol 58, 2008, 459-470
7. Asai Y, Kurachi Y, Nomura T. (7 名省略, 9 番目) Specifications of insilicoML 1.0: A multilevel biophysical model description language. *J Physiol Sci.* 査読有 Vol 58, 2008, 447-458
8. Kawazu T, Murakami S, Adachi-Akahane S, Findlay I, Ait-Haddou R, Kurachi Y, Nomura T. Microstructure-based monte carlo simulation of Ca^{2+} dynamics evoking cardiac calcium channel inactivation. *J Physiol Sci.* 査読有 Vol 58, 2008, 471-480
9. Hunter P, Kurachi Y, Nobel D, Viceconti M. Meeting report on the 2nd MEI international symposium – the worldwide challenge to physiome and systems biology and Osaka accord –. *J Physiol Sci.* 査読有 Vol 58, 2008, 425-431
10. Suzuki Y, Kurachi Y, Nomura T. (6 名省略, 8 番目) A platform for in silico modeling of physiological systems II. CellML compatibility and other extended capabilities. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 査読有 Vol 2008, 2008, 573-576
11. Hasegawa Y, Kurachi Y, Hatazawa J. (5 名省略, 7 番目) Evaluation of brain and whole-body pharmacokinetics of ^{11}C -labeled diphenylhydantoin in rats by means of planar positron imaging system. *Ann Nucl Med.* 査読有 Vol 22, 2008, 301-307
12. Suzuki S, Murakami S, Tsujimae K, Findlay I, Kurachi Y. In silico risk assessment for drug-induction of cardiac arrhythmia. *Prog Biophys Mol Biol.* 査読有 Vol 98, 2008, 52-60
13. Tsujimae K, Murakami S, Kurachi Y. In silico study on the effects of IKur block kinetics on prolongation of human action potential after atrial fibrillation-induced electrical remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 査読有 Vol 294, 2008, H793-H800
14. Hosaka Y, Inanobe A, (9 名省略, 10 番目) Kurachi Y. (12 番目) Mutational analysis of block and facilitation of HERG current by a class III anti-arrhythmic agent, nifekalant. *Channels* 査読有 Vol 1, 2007, 198-208
15. Shieh C-C, Kurachi Y, Gopalakrishnan M. (11 名省略, 13 番目) Characterization of a novel ATP-sensitive K^+ channel opener, 4-methyl-N-(2,2,2-trichloro-1-(3-pyridin-3-ylthio

ureido)ethyl) benzamide (A-251179) on urinary bladder relaxation and cystometric parameters. *Br J Pharmacol*. 査読有 Vol 151, 2007, 467-475

16. Tsujimae K, Suzuki S, Murakami S, Kurachi Y. Frequency dependent effects of various IKr blockers on cardiac action potential duration in a human atrial model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 査読有 Vol 297, 2007, H660-H669

17. Nakamura K, Kurachi Y, Ohe T. (12 名省略, 14 番目) Anti-KCNH2 antibody-induced long QT syndrome: novel acquired form of long QT syndrome. *J. Am. Coll. Cardiol*. 査読有 Vol 50, 2007, 1808-1809

18. Inanobe A, Matsuura T, Nakagawa A, Kurachi Y. Structural diversity in the cytoplasmic region of G protein-gated inward rectifier K⁺ channels. *Channels* 査読有 Vol 1, 2007, 39-45

19. Iwashita M, Kurachi Y, Kondo S. (5 名省略, 6 番目) Pigment pattern in jaguar/obelix zebrafish is caused by a Kir7.1 mutation: implications for the regulation of melanosome movement. *PLoS Genet*. 査読有 Vol 2, 2006, e197

20. Ishii M, Kurachi Y. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des*. 査読有 Vol 12, 2006, 3573-3581

21. Yamashita T, Kurachi Y, Watanabe E. (21 名省略, 12 番目) Randomized study of angiotensin II type 1 receptor blocker vs dihydropyridine calcium antagonist for the treatment of paroxysmal atrial fibrillation in patients with hypertension. *Circ J*. 査読有 Vol 70, 2006, 1318-1321

22. Watanabe M, Iwashita M, Ishii M, Kurachi Y, Kawakami A, Kondo A, Okada N. Spot pattern of leopard Danio is caused by mutation in the zebrafish connexin41.8 gene. *EMBO Rep*. 査読有 Vol 7, 2006, 893-897

23. Kikuta J, Ishii M, Kishimoto K, Kurachi Y. Carvedilol blocks cardiac K_{ATP} and K_G but not I_{K1} channels by acting at the bundle-crossing regions. *Eur J Pharmacol*. 査読有 Vol 529, 2006, 47-54

24. Koyrakh I, Kurachi Y, Wickman K. (4 名省略, 5 番目) Molecular and cellular diversity of neuronal G-protein-gated potassium channels. *J Neurosci*. 査読有 Vol 25, 2005, 11468-11478

25. Ishii M, Ikushima M, Kurachi Y. In vivo interaction between RGS4 and calmodulin visualized with FRET techniques: possible involvement of lipid raft. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 Vol 338, 2005, 839-846

26. Sawada K, Kurachi Y. (5 名省略, 7 番目) Gestational change of K⁺ channel opener effect is correlated with the expression of uterine K_{ATP} channel subunits. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 査読有 Vol 122, 2005, 49-56

27. Yamada M, Kurachi Y. A functional role of the C-terminal 42 amino acids of SUR2A and SUR2B in the physiology and pharmacology of cardiovascular ATP-sensitive K⁺ channels. *J Mol Cell Cardiol*. 査読有 Vol 39, 2005, 1-6

28. Ishii M, Fujita S, Yamada M, Hosaka Y, Kurachi Y. Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and Ca²⁺/calmodulin competitively bind to the regulators of G-protein-signalling (RGS) domain of RGS4 and reciprocally regulate its action. *Biochem J*. 査読有 Vol 385, 2005, 65-73

[学会発表] (計 1 件)

1. Inanobe A. Structural Insights into the Function of Cytoplasmic Region of G Protein-Gated Inward Rectifier K⁺ channel. International Congress of Physiological Sciences. 2009 年 7 月 30 日 京都

[図書] (計 4 件)

1. 稲野辺 厚, 倉智 嘉久 医歯薬出版、別冊・医学の歩み (イオンチャネルの構造と機能)、2005 年、13-26

2. 保坂 幸男, 倉智 嘉久 医歯薬出版、別冊・医学の歩み (イオンチャネルの構造と機能)、2005 年、82-87

3. 石井 優, 倉智 嘉久 医歯薬出版、別冊・医学の歩み (HERG チャネルと KCNQ1/KCNE1 チャネル)、2005 年、94-100

4. 稲野辺 厚 秀潤社、細胞工学 (NMDA 受容体の動的構造変化: 結晶構造解析によるアプローチ)、2006 年、242-246

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉智 嘉久 (KURACHI YOSHIHISA)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 30142011

(2) 研究分担者

稲野辺 厚 (INANOBÉ ATSUSHI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 00270851

村上 慎吾 (MURAKAMI SHINGO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 40437314
(2006-2009)

古谷 和春 (FURUTANI KAZUHARU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 40452437
(2008-2009)

石井 優 (ISHII MASARU)
大阪南医療センター (臨床研究部)・免疫異常疾患研究所・研究員

研究者番号：10324758
(2005)

(3) 連携研究者
()

研究者番号：