

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19370055

研究課題名(和文) 新しいタイプのGタンパク質共役受容体の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a novel type of G protein-coupled receptor

研究代表者

伊東 広 (ITO HOROSHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：101883005

研究成果の概要：Gタンパク質共役受容体(G protein-coupled receptor, GPCR)の中には、そのリガンドが不明のオーファン受容体が未だ数多く存在する。Adhesion GPCRに属するGPR56もオーファン受容体であり、ヒト大脳皮質形成および細胞のがん化に関与することが示唆されているが、その機能やシグナル伝達はほとんど不明であり、その解析を行った。その結果、アゴニスト様に働く抗GPR56抗体の作成に成功し、その抗体を用いてGPR56がGタンパク質のG12/13からRhoを介する経路を活性化して、神経前駆細胞の遊走に対して抑制的に働くことを明らかとした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構、受容体、Gタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役受容体(GPCR)は哺乳動物において1,000種類ほど存在する最も数が多い細胞膜受容体ファミリーを形成し、神経伝達系、内分泌調節系、生体防御系など様々な生体システムを形作る上で大事な役割を果たしている。現在、使用されている薬の4割近くがGPCRを標的としたものであり、その重要性は益々高まっている。近年、ゲノム

解析からリガンド不明で機能未知のオーファン受容体が200種類以上見いだされ、盛んにリガンドの探索や生理機能の解析が行われている。その結果、オレキシンやグレリンなどオーファン受容体のリガンドとして新たな生理活性ペプチドのいくつかが発見され、その受容体システムの新規生体調節機構も判明した。また、オーファン受容体の中には細胞外ドメインが長く最初の膜貫通領域

の直前にある GPS で切断される Adhesion GPCR ファミリーが存在する。GPR56 は、そのファミリーに属するオーファン GPCR であるが、最近ヒトの脳皮質形成異常を示す患者においていくつもの変異が見いだされた。また、メラノーマ細胞やがん化細胞において GPR56 の発現量とがん細胞の悪性度の間に相関があることが報告された。しかしながら、神経発生時のどの部位のどの細胞で GPR56 タンパク質が発現しており、またどのようなシグナル伝達系を動かしてどのような働きをしているか、あるいはがん細胞の増殖、接着、運動性にどのように関わっているかは判っていなかった。一方、私どもは長年 G タンパク質シグナルの研究を続け、神経前駆細胞やがん細胞における G タンパク質シグナルの解析を行い、その分子機構や生理的な役割を明らかにして来た。そこで、Adhesion GPCR の中でも特に GPR56 に着目し、その解析を進めることとした。

## 2. 研究の目的

GPR56 はリガンドが判らないオーファン受容体であったため、その機能を調べるのは困難であった。また、mRNA の発現を *in situ hybridization* で解析した結果は報告されていたが、タンパク質レベルでの発現解析は行われていなかった。これらの状況から、まずは GPR56 の細胞外ドメインからなるリコンビナントタンパク質を調製し、それを抗原としてウサギ、マウスに免疫して特異的な抗体を作製して、GPR56 の発現および機能の解析を進めることとした。

また、GPR56 を発現している細胞を用いて、その下流のシグナル伝達経路の解明を目指した。抗体を用いて内在的に発現している細胞を選び出すとともに、一過性の過剰発現系を用いて外来的に GPR56 を発現した細胞を作製し、それらの細胞でのシグナル伝達機構の解析を行った。GPR56 が Gq や tetraspanin 分子 CD81 と複合体を形成することが報告されていたが、実際のシグナル伝達機構はまったく調べられておらず、その生理機能の解明もなされていなかった。

本研究の目的は短期的には GPR56 の機能解析であるが、長期的には GPR56 が属し、そのほとんどがオーファン受容体である Adhesion GPCR の機能解析に結びつく研究開発手法を確立することである。

## 3. 研究の方法

ヒトおよびマウス GPR56 の全長あるいは細胞外ドメイン (GPR56ECD) をコードする cDNA を大腸菌、バキュロウイルス、哺乳動物細胞発現用のそれぞれのベクターに挿

入し、発現用プラスミドを構築した。大腸菌の種々の発現系で GPR56ECD の発現を試みたところ、不溶性画分での発現は確認できたが可溶性画分への回収は出来なかった。そこでバキュロウイルス Sf9 昆虫細胞発現系を用いて GPR56ECD の発現・調製を試みた。その結果、ウイルスを感染させた Sf9 細胞の培養液に分泌された GPR56ECD をエドマン分解法により確認し、その培養液 4L を出発材料として、SP-Sepharose, Ni-NTA-Agarose カラムを用いて 4 mg 強のリコンビナント GPR56ECD タンパク質を調製した。ついで、このリコンビナントタンパク質をウサギ、マウスに免疫して抗体を作成した。ELISA 法と Western blot 法によりウサギポリクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体の抗原認識の特異性および力価を検討した。

GPR56 により引き起こされる細胞内の応答を検討するために、SRE など各種外部刺激応答配列を有するホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現誘導測定、NIH3T3 細胞内のアクチンフィラメント再構築の蛍光顕微鏡を用いた観察、mDia の RBD を用いた細胞内 GTP 結合活性型 Rho の pull-down、Fura2 を用いた細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の測定、リン酸化された MAP キナーゼを抗体で検出する MAP キナーゼ活性化測定、などを行った。

神経前駆細胞は胎生 11.5 日のマウス胎児終脳より分離した細胞を浮遊状態で sphere を形成させて継代培養することにより調製した。また神経前駆細胞の遊走は sphere をポリエチレンイミンコートしたディッシュに撒いた後、接着した sphere から遊走する細胞の移動を観察することにより評価した。

ヒト脳皮質形成不全症 (両側性前頭頭頂多少脳回症 BFPP) の患者において見いだされた変異の導入はオーバーラップ PCR 法により行った。マウス GPR56 を過剰発現させるためのアデノウイルス、およびノックダウンさせるための shRNA を発現するアデノウイルスは目的とする DNA を 293 細胞に導入して組換え後に産生してくるウイルスを何度も 293 細胞に感染させることにより増幅し、高力価のウイルス溶液を作成して使用した。調製したアデノウイルスを神経前駆細胞に感染させたのち、1 日後に同時に発現してくる GFP の蛍光および GPR56 の発現量を Western blot 法により確認して実験に使用した。

## 4. 研究成果

マウスおよびヒト GPR56 の細胞外ドメイン GPR56ECD をバキュロウイルス昆虫細胞発現系を用いて調製し、それを抗原としてそれぞれを認識する抗体を作製した。そのうちマウス GPR56 を特異的に高感度で検出する

ウサギポリクローナル抗体を抗原をレジンを結合させたアフィニティカラムを用いて精製し種々の解析に用いた。まずマウス脳の成長に伴う GPR56 の発現を調べたところ、GPR56 は胎生期の脳に高発現し成体脳ではごく僅かしか発現していないことが判明した。次に胎児脳の切片での発現を免疫染色法にて検討した結果、GPR56 は脳室付近の神経幹細胞や前駆細胞が豊富に存在する部位にのみ発現していることが明らかとなった。さらに調製した神経前駆細胞においても高発現しており、その細胞膜に局在していることを共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察により確認した。

GPR56 のシグナル伝達機構を調べるために、種々の応答配列を含むルシフェラーゼ遺伝子を GPR56 と共発現させてルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、SRE および NF- $\kappa$ B 応答配列を介した遺伝子発現が観察された。さらに、細胞培養液にアフィニティ精製抗 GPR56 抗体を添加すると、この遺伝子発現誘導が促進されること、その促進効果は抗原の添加により抑制されることを見出した。一方、GPR56 を NIH3T3 細胞に発現させると活性型 Rho あるいは G $\alpha$ 13 を発現させた時と同じように顕著なアクチンフィラメントの形成が観察された。また GPR56 によるアクチンフィラメントの形成は G12/13 を特異的に阻害する p115RGS や Rho を阻害するボツリヌス菌酵素 C3 の共発現により阻害されたことから、GPR56 は G12/13 および Rho を介するシグナルを活性化することが示唆された。

抗 GPR56 抗体がアゴニスト様に働くことが示唆されたために、その抗体で細胞を処理した時の種々の細胞応答を検討した。その結果、活性型 Rho の増加が見られたが、細胞内カルシウムの上昇や MAP キナーゼの活性化は見られなかった。

次に神経前駆細胞における GPR56 の機能を調べるために GPR56 の過剰発現、ノックダウンおよび抗体の効果を検討した。過剰発現により神経前駆細胞の遊走の抑制が、また抗 GPR56 抗体によっても同様の抑制が観察され、その抗体の作用は GPR56 をノックダウンされることでキャンセルされた。また p115RGS および C3 の共発現によっても同様に遊走阻害が抑制された。

また BFPP で見出された GPR56 変異体を細胞内で発現させたところ変異体は細胞膜に行かずに細胞内に貯留することが判明した。

以上の結果から、GPR56 が神経前駆細胞の細胞膜に発現しており、G12/13 という G タンパク質を介して低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho を活性化することにより神経前駆細胞の遊走を負に制御していることが明らかとなった。

また、これまでのオーファン受容体の研究はリガンドが不明なためその解析が遅れていたが、Adhesion GPCR の場合には甲状腺刺激ホルモン受容体と同様に受容体を認識する抗体がアゴニスト様に働き、その機能の解析に有用であることが判明した。

今後、種々の部位を認識するモノクローナル抗体を作成し、その作用機構を詳細に解析することにより Adhesion GPCR の活性機構が明らかになることが大いに期待されるとともに、それぞれの生理機能の解析が飛躍的に進展することが予想される。また、いくつかのがん細胞において GPR56 が増殖や接着に関与することを示唆する結果を得ているので、抗 GPR56 抗体が抗がん剤となる可能性を追求して研究を進めている。

## 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 7 件)

1. Nakata A, Urano D, Fujii-Kuriyama Y, Mizuno N, Tago K, and Itoh H. G-protein signalling negatively regulates the stability of aryl hydrocarbon receptor. *EMBO Rep.* 2009 10: 622-628, 査読有
2. Mizuno N, and Itoh H. Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *Neurosignals.* 2009; 17: 42-54. 査読有
3. Funakoshi-Tago M, Shimizu T, Tago K, Nakamura M, Itoh H, Sonoda Y, and Kasahara T. Celecoxib potently inhibits TNF $\alpha$ -induced nuclear translocation and activation of NF- $\kappa$ B. *Biochem Pharmacol.* 2008 76: 662-671. 査読有
4. Urano D, Nakata A, Mizuno N, Tago K, and Itoh H. Domain-domain interaction of P-Rex1 is essential for the activation and inhibition by G protein  $\beta\gamma$  subunits and PKA. *Cell Signal.* 2008 20: 1545-1554. 査読有
5. Iguchi T, Sakata K, Yoshizaki K, Tago K, Mizuno N, and Itoh H. Orphan G protein-coupled receptor GPR56 regulates neural progenitor cell migration via a G $\alpha$ 12/13 and Rho pathway. *J Biol Chem.* 2008 283: 14469-14478. 査読有
6. Urano D, and Itoh H. Heterotrimeric G protein. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2008 132: 121-123. 査読有
7. Sugawara Y, Nishii H, Takahashi T, Yamauchi J, Mizuno N, Tago K, and Itoh H. The lipid raft proteins

flotillins/reggies interact with Gαq and are involved in Gq-mediated p38 mitogen-activated protein kinase activation through tyrosine kinase. *Cell Signal*. 2007 19: 1301-1308, 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. 伊東 広, 3 量体 G タンパク質を標的とした薬剤の作用機構, 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 2009. 6. 22, 熊本
2. 浦野大輔, 中田飛鳥, 水野憲一, 多胡憲治, 伊東 広, 活性酸素産生を司る Rac-GEF である P-Rex1 の PKA による抑制機構, 第 31 回 日本分子生物学会・第 81 回 日本生化学会合同大会, 2008. 12. 9, 神戸
3. 永井裕介, 西村明幸, 多胡憲治, 水野憲一, 伊東 広, G タンパク質結合分子 Ric-8B は Gαs の分解を抑制し Gs シグナルを正に制御する, 第 31 回 日本分子生物学会・第 81 回 日本生化学会合同大会, 2008. 12. 9, 神戸
4. 加戸美奈, 西村明幸, 永井裕介, 多胡憲治, 水野憲一, 伊東 広, NF-κB シグナルに対する哺乳動物の 2 種類の Ric-8 の作用, 第 31 回 日本分子生物学会・第 81 回 日本生化学会合同大会, 2008. 12. 9, 神戸
5. 向縄昌輝, 多胡憲治, 水野憲一, 伊東 広, NF-κB 活性化に対する低分子量 GTP 結合タンパク質 kB-Ras の抑制機構, 第 31 回 日本分子生物学会・第 81 回 日本生化学会合同大会, 2008. 12. 9, 神戸
6. Tago K, Tago-Funakoshi M, Mizuno N, Kasahara T, Tominaga S, Itoh H, Dynamic subcellular localization of atypical small GTPase kappaB-Ras and its possible contribution to oncogenic signals, 第 80 回日本生化学会第 30 回日本分子生物学会合同年会, 2007. 12. 13, 横浜
7. 中田飛鳥, 浦野大輔, 水野憲一, 多胡憲治, 伊東 広, G タンパク質シグナルによるダイオキシン受容体シグナル抑制機構の解析, 第 80 回日本生化学会第 30 回日本分子生物学会合同年会, 2007. 12. 13, 横浜
8. Iguchi T, Sakata K, Yoshizaki K, Tago K, Mizuno N, Itoh H, GPR56 regulates neural progenitor cell migration through G12/13 and Rho, 第 80 回日本生化学会第 30 回日本分子生物学会合同年会, 2007. 12. 13, 横浜
9. Nagai Y, Nishimura A, Hayashi A, Tago K, Mizuno N, Itoh H, Ric-8B, a novel heterotrimeric G protein-binding protein, regulates Gs protein levels via modulating the ubiquitin-

proteasome pathways, 第 80 回日本生化学会第 30 回日本分子生物学会合同年会, 2007. 12. 13, 横浜

10. Iguchi T, Sakata K, Yoshizaki K, Tago K, Mizuno N, Itoh H, GPR56 Regulates Neural Progenitor Cell Migration through G12/13 and Rho Axis, 47th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2007. 11. 22, Washington DC
11. Nishimura, A., Sugawara, Y., Takasaki, J., Taniguchi, M., Mizuno, N. and Itoh, H. A novel type of G protein inhibitor, YM-254890, acts as a Gq-specific guanine nucleotide dissociation inhibitor via the switch 1 region of Gα subunit, Experimental Biology Annual Meeting, 2007. 4. 29, Washington DC

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: G タンパク質共役受容体に対する機能抗体およびその応用. 発明者: 伊東 広, 水野憲一, 多胡憲治, 猪口徳一, 永野孝典. 権利者: 国立大学法人 奈良先端科学技術大学院大学. 種類・番号: 特願 2007-284829. 出願年月日: 平成 19 年 11 月 1 日. 国内

[その他]

ホームページアドレス

<http://bsw3.naist.jp/itoh/home/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 広 (ITOH HOROSHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号: 101883005

(2) 研究分担者

水野 憲一 (MIZINO NORIKAZU)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号: 90212232

多胡 憲治 (TAGO KENJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号: 20306111

(3) 連携研究者

なし