

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 B

研究期間：2009～2011

課題番号：21390068

研究課題名（和文）受容体結合蛋白によるエンドセリン A 型および
B 型受容体発現レベル調節と病態的意義研究課題名（英文）Study of the regulatory mechanism of ET_AR and ET_BR level by receptor
binding protein and the relevance between clinical significance and
endothelin receptor level.

研究代表者

三輪 聡一 (MIWA SOICHI)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40157706

研究成果の概要（和文）：エンドセリン受容体（ET_AR および ET_BR）の C 末端領域に結合する蛋白質として Jab1 を同定し、Jab1 がエンドセリン（ET）刺激のない状態でユビキチン化を介して受容体の代謝回転を調節することを見出した。さらに、ET 刺激により ET_BR のユビキチン化レベルが上昇すること、その上昇が ET 刺激による ET_BR の急速な細胞内移行に必要であることを明らかにした。以上のことより、エンドセリン受容体レベルの調節にはユビキチン化が重要な役割をもつことが示された。

研究成果の概要（英文）：We identified Jab1 as a C-tail binding protein of endothelin receptors (ETRs), including ET_AR and ET_BR and showed that Jab1 regulates receptor levels via ubiquitination of ETRs. We also found that ubiquitination level of ET_BR was increased upon endothelin-1 (ET-1) stimulation. Moreover, we indicated that the ubiquitination was required for ET-1-induced ET_BR internalization. Thus, we have demonstrated that ubiquitination has an important role in the regulation of trafficking of ETRs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：エンドセリン受容体、ユビキチン化、受容体結合タンパク質、タンパク質分解、trafficking

1. 研究開始当初の背景

エンドセリン-1 (ET-1) は血管収縮、細胞増殖など多彩な作用を有し、高血圧、動脈硬化症、心不全、脳血管攣縮、肺高血圧症などの心

管系病態の発症・進展において重要な役割を果たしている。ET の有する生理的・病態的作用は、ET 受容体を介して発現する。ET 受容体には ET_AR と ET_BR の 2 種類があり、いずれ

も G タンパク質共役受容体 (GPCR) である。ET 受容体をはじめとする GPCR は多くのホルモンや神経伝達物質の受容体であるとともに、多くの治療薬の分子標的となっており、その発現レベルの調節は生理・病態学的に極めて重要である。上述の病態においては ET 受容体レベルの増加が報告されており、また、薬物治療中に観察される薬物効果の減弱 (脱感作・耐性) や薬物投与を急に中止した時に見られる病状の悪化 (リバウンド現象) の原因としても、GPCR の発現レベルの変動が関与している。GPCR の発現レベルの調節には、受容体の細胞内移行や trafficking (細胞内で決められた標的小器官に輸送されることを trafficking という) などの受容体動態制御が重要であると考えられている。GPCR の動態制御には、GPCR の C 末端が重要な機能を果たすと考えられ、ET 受容体の動態制御にも C 末端が重要な役割をもつことは知られていたが、ET 受容体レベルを調節する分子機構は明らかにされていなかった。我々は以前、酵母ツーハイブリッド法により、ET_AR と ET_BR の C 末端と結合する分子を網羅的に探索して、E3 ユビキチン連結酵素の活性調節因子である Jab1 を同定し、Jab1 が ET_AR の受容体レベルを制御することを見出していた。

2. 研究の目的

ET_AR および ET_BR の受容体レベル調節機構を分子レベルで明らかにすること。

3. 研究の方法

HEK293 細胞に安定的に ET_AR あるいは ET_BR を発現させ、それらに Jab1 を強制発現させて、受容体分解速度、受容体のユビキチン化について解析した。また、ET_BR について、ET 刺激依存的な受容体の細胞内移行を、ET 刺激前と ET 刺激後の細胞表面上の ET_BR の量を比較す

ることにより解析した。

4. 研究成果

エンドセリン受容体に結合する蛋白質である Jab1 は ET 非刺激下においてユビキチン化を介して受容体レベルを調節することを見出した。一方、ET 刺激による ET_BR の細胞内移行がユビキチン化により制御されていることを明らかにした。以下に具体的な研究成果を示す。

- (1) ET_AR および ET_BR と Jab1 のタンパク質相互作用を酵母ツーハイブリッドテスト、GST pull-down 免疫沈降法により確認した。
- (2) Jab1 により ET_AR および ET_BR のユビキチン化が促進された。
- (3) Jab1 過剰発現下でタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドで処理したところ、ET_AR および ET_BR の分解速度の上昇が認められた。
- (4) アゴニストである ET-1 で ET_AR を刺激するとアゴニスト誘導性のタンパク質分解がひきおこされ、ET_AR レベルは時間依存的に減少していく一方、ET_AR に結合している Jab1 量が増加した。
- (5) ET_BR が ET 刺激依存的にユビキチン化された。
- (6) ET_BR の C 末端のリジン残基を置換した変異 ET_BR ではユビキチン化が起こらなかった。
- (7) ユビキチン化の起こらない変異 ET_BR は、ET-1 刺激依存的な細胞内移行が正常に起こらなかった。

これらの結果より、エンドセリン受容体レベルの調節には C 末端を介した制御機構、特にユビキチン化が重要な役割をも

つことが示された。

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 11 件)

1. Horinouchi T., Higa T., Aoyagi H., Nishiya T., Terada K. and Miwa S. Adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A signaling pathway inhibits endothelin type A receptor-operated Ca²⁺ entry mediated via TRPC6 channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 340, 143-151. 2012 (査読有り)
2. Horinouchi T., Terada K., Higa T., Aoyagi H., Nishiya T., Suzuki H. and Miwa S. Function and regulation of endothelin type A receptor-operated TRPC channels. *J. Pharmacol. Sci.* 340, 143-151. 2012 (査読有り)
3. Asano H., Horinouchi T., Mai Y., Sawada O., Fujii S., Nishiya T., Minami M., Katayama T., Iwanaga T., Terada K. and Miwa S. Nicotine- and tar-free cigarette smoke induces cell damage through reactive oxygen species newly generated by PKC-dependent activation of NADPH oxidase. *J. Pharmacol. Sci.* 118, 275-287. 2012 (査読有り)
4. Matsumoto K., Nishiya T., Maekawa S., Horinouchi T., Ogasawara K., Uehara T. and Miwa S. The ECS (SPSB) E3 ubiquitin ligase is the master regulator of the lifetime of inducible nitric-oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409, 46-51. 2011 (査読有り)
5. Yoshiyama S., Horinouchi T., Miwa S., Wang H.H., Kohama K. and Nakamura A. Effect of cigarette smoke components on vascular smooth muscle cell migration toward platelet-derived growth factor BB. *J. Pharmacol. Sci.* 115, 532-535. 2011 (査読有り)
6. Nishiya T., Matsumoto K., Maekawa S., Kajita E., Horinouchi T., Fujimuro M., Ogasawara K., Uehara T. and Miwa S. Regulation of inducible nitric-oxide synthase by the SPRY domain- and SOCS box-containing proteins. *J. Biol. Chem.* 286, 9009-9019. 2011 (査読有り)
7. Matsuzaki H., Izumi T., Horinouchi T., Boku S., Inoue T., Yamaguchi T., Yoshida T., Matsumoto M., Togashi H., Miwa S., Koyama T. and Yoshioka M. Juvenile stress attenuates the dorsal hippocampal postsynaptic 5-HT1A receptor function in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)* 214, 329-337. 2011 (査読有り)
8. Higa T., Horinouchi T., Aoyagi H., Asano H., Nishiya T., Nishimoto A., Muramatsu I. and Miwa S. Endothelin type B

receptor-induced sustained Ca²⁺ influx involves G(q/11)/phospholipase C-independent, p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Pharmacol. Sci.* 113, 276-280. 2010 (査読有り)

9. Nishimoto A., Lu L., Hayashi M., Nishiya T., Horinouchi T. and Miwa S. Jab1 regulates levels of endothelin type A and B receptors by promoting ubiquitination and degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1616-1622. 2010 (査読有り)
10. Horinouchi T., Asano H., Higa T., Nishimoto A., Nishiya T., Muramatsu I. and Miwa S. Differential coupling of human endothelin type A receptor to G(q/11) and G(12) proteins: the functional significance of receptor expression level in generating multiple receptor signaling. *J. Pharmacol. Sci.* 111, 338-351. 2009 (査読有り)
11. Horinouchi T., Morishima S., Tanaka Y., Koike K., Miwa S. and Muramatsu I. Pharmacological evaluation of ocular beta-adrenoceptors in rabbit by tissue segment binding method. *Life Sci.* 84, 181-187. 2009 (査読有り)

[学会発表] (計 26 件)

1. 堀之内孝広、PKAリン酸化によるエンドセリンA型受容体作動性TRPC6チャネルの抑制性制御機構、第85回日本薬理学会年会、2012年3月15日、国立京都国際会館(京都府)
2. 比嘉綱己、エンドセリンA型受容体刺激によって誘発されるTRPC3及びTRPC6チャネルを介した受容体作動性Ca²⁺流入の抑制性制御機構、第85回日本薬理学会年会、2012年3月15日、国立京都国際会館(京都府)
3. 寺田晃士、エンドセリン受容体の動態制御におけるユビキチン修飾の役割、第85回日本薬理学会年会、2012年3月15日、国立京都国際会館(京都府)
4. 眞井洋輔、ニコチン・タール除去タバコ煙水抽出液によるNADPHオキシダーゼ依存性細胞傷害の分子メカニズム、第85回日本薬理学会年会、2012年3月15日、国立京都国際会館(京都府)
5. 比嘉綱己、プロテインキナーゼAによるTRPC6チャネルを介したエンドセリンA型受容体作動性Ca²⁺流入の抑制性制御の分子機構、第21回日本循環薬理学会、2011年12月2日、岡山大学創立五十周年記念館(岡山市)
6. 堀之内孝広、エンドセリンA型受容体作動性TRPC6チャネルの抑制性機能制御に関するPKAリン酸化部位の同定、第39回薬物活性シンポジウム、2011年11月21日、福岡大学福大メディカルホール(福岡市)

7. 堀之内孝広、Phos-tag™ biotinを用いたエンドセリンA型受容体作動性TRPC6チャネルのPKAによるリン酸化部位の同定、第62回日本薬理学会北部会、2011年9月29日、江陽グランドホテル（宮城県）
8. 松本一馬、誘導型NO合成酵素のエピキチン・プロテアソーム依存的分解制御機構、第25回北海道薬物作用談話会、2011年7月23日、酪農学園大学中央館学生ホール（北海道）
9. 堀之内孝広、アデニル酸シクラーゼ/cAMP/PKA系によるエンドセリンA型受容体作動性TRPC6チャネルの負の制御機構、第84回日本薬理学会年会、2011年3月24日、震災のため、誌上開催
10. 西屋 禎、SPRY domainとSOCS boxタンパク質による誘導型一酸化窒素合成酵素の分解制御機構、第84回日本薬理学会年会、2011年3月23日、震災のため、誌上開催
11. 堀之内孝広、エンドセリンA型受容体作動性TRPC6チャネルの多様な機能制御機構、第40回日本心臓血管作動物質学会、2011年2月4日、かがわ国際会議場・サンポートホール高松（香川県）
12. 堀之内孝広、cAMP/PKA系によるエンドセリンA型受容体作動性TRPC6チャネルの抑制性機能制御、第61回日本薬理学会北部会、2010年9月10日、札幌コンベンションセンター（北海道）
13. 堀之内孝広、Molecular mechanism of $E_{TA}R$ -operated Ca^{2+} entry via TRPC channels and visualization of homo- and heteromeric TRPC3/6 interaction in living cells using BiFC., 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2010年7月19日、Bella Center（デンマーク）
14. Horinouchi T., Visualization of homo- and heteromeric TRPC3/6 interaction in living cells using bimolecular fluorescence complementation analysis, 第83回日本薬理学会年会、2010年3月16~18日、大阪国際会議場（大阪府）
15. Horinouchi T., Molecular mechanisms for endothelin type A receptor-operated Ca^{2+} entry via TRPC3 and TRPC6, 第83回日本薬理学会年会、2010年3月16~18日、大阪国際会議場（大阪府）
16. Nishimoto A., Regulation of endothelin receptor levels by receptor binding protein, Jab1, 第83回日本薬理学会年会、2010年3月16~18日、大阪国際会議場（大阪府）
17. Horinouchi T., Molecular analysis of $E_{TA}R$ -operated Ca^{2+} entry via TRPC channels and visualization of homo- and heterophilic TRPC3/6 interaction in living cells using BiFC, 第26回国際心臓研究学会日本部会、2009年12月4~5日、北海道大学学術交流会館（北海道）
18. Nishimoto A., Jab1, a ETAR-interacting protein, regulates ETAR level by promoting its degradation, 第26回国際心臓研究学会日本部会、2009年12月4~5日、北海道大学学術交流会館（北海道）
19. 西本 新、受容体結合蛋白質 Jab1 によるエンドセリン受容体の発現レベル調節機構、第19回日本循環薬理学会、2009年11月27日、京都大学百周年時計台記念館（京都府）
20. 堀之内孝広、エンドセリンA受容体作動性 Ca^{2+} 流入に関与する TRPC チャネルの活性化機構、第19回日本循環薬理学会、2009年11月27日、京都大学百周年時計台記念館（京都府）
21. 堀之内孝広、エンドセリンA型受容体作動性 TRPCチャネルの活性制御機構、37回薬物活性シンポジウム、2009年10月9~10日、東北薬科大学（宮城県）
22. 三輪聡一、受容体結合蛋白質 Jab1 によるエンドセリンA型受容体の発現レベル調節機構とその病態的意義、第37回薬物活性シンポジウム、2009年10月9~10日、東北薬科大学（宮城県）
23. 堀之内孝広、蛍光タンパク質構成法を用いたエンドセリンA型受容体作動性 TRPCチャネルの分子間相互作用の可視化、第60回日本薬理学会北部会、2009年9月26日、富山国際会議場（富山県）
24. 西本 新、受容体結合蛋白質 Jab1 によるエンドセリン受容体の発現レベル調節機構、第60回日本薬理学会北部会、2009年9月26日、富山国際会議場（富山県）
25. 西本 新、Regulation of cell surface endothelin type A receptor level by a novel receptor-interacting protein, Jab1, 第36回国際生理学会世界大会、2009年7月27日~8月1日、京都国際会議場（京都府）
26. 比嘉綱己、エンドセリンA型受容体作動性 Ca^{2+} 流入に関与する TRPCチャネルの同定、第23回北海道薬物作用談話会、2009年7月11日、北海道大学（北海道）

【その他】

ホームページ等

<http://saibo-yakuri.med.hokudai.ac.jp/i>

ndex.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 聡一 (MIWA SOICHI)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40157706

(2) 研究分担者

西屋 禎 (NISHIYA TADASHI)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：80399831

堀之内 孝広 (HORINOUCI TAKAHIRO)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：20307771

寺田 晃士 (TERADA KOJI)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70342722

西本 新 (NISHIMOTO ARATA)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：90396325

(3) 連携研究者

()

研究者番号：