

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590119

研究課題名(和文) Gq蛋白質共役型受容体の細胞内選別輸送機構に関する研究

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of intracellular trafficking of Gq protein-coupled receptors

研究代表者

菱沼 滋 (Hishinuma, Shigeru)

明治薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70211505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外N末端及び細胞内C末端を変異させたGq蛋白質共役型ヒト・ヒスタミンH1受容体をCHO細胞に強制発現させ、アゴニスト刺激に伴うH1受容体の細胞内輸送機構を解析した。その結果、細胞外N末端をヘマグルチニンで標識したH1受容体は、ヒスタミン刺激に伴いクラスリン依存性機構によって細胞内に輸送されたが、細胞内C末端のセリン487残基を切除したH1受容体は、ヒスタミン刺激をしても細胞内に輸送されなかった。以上の結果から、H1受容体のC末端は、H1受容体の細胞内輸送に極めて重要な役割を果たしていることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：We evaluated regulatory mechanisms of agonist-induced internalization of Gq protein-coupled human histamine H1 receptors by mutation analyses of the N- and C-terminals of receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. H1 receptors tagged with hemagglutinin at the N-terminal internalized via clathrin-dependent mechanisms upon stimulation with histamine. In contrast, H1 receptors failed to internalize by truncation of the serine 487 residue of the C-terminal. These results suggest that the C-terminal of H1 receptors plays a crucial role in agonist-induced and clathrin-dependent internalization.

研究分野：受容体薬理学

キーワード：ヒスタミンH1受容体 Gq蛋白質共役型受容体 C末端 細胞内輸送 クラスリン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アゴニスト刺激に伴い、細胞表面受容体が細胞内に移行する現象は、受容体の細胞内輸送と呼ばれ、細胞の刺激感受性制御機構の一つと考えられている。Gq 蛋白質共役型ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体は、中枢から末梢に至るまで広範囲に分布し、覚醒レベル調節や即時型アレルギーなどの各種生理・病態に関与するとともに、抗ヒスタミン薬の標的分子として、薬物治療にも密接に関与している。従って、H<sub>1</sub> 受容体の細胞内輸送機構の解明は重要な課題である。しかしながら、H<sub>1</sub> 受容体の細胞内輸送機構に関する研究は、ほとんど進んでいないのが現状である。

(2) 一般に、アゴニスト刺激に伴う G 蛋白質共役型受容体の細胞内輸送には、G 蛋白質共役型受容体キナーゼ/アレスチン/クラスリンを介した小胞輸送(エンドサイトーシス)が関与することが知られている(図 1):まず、G 蛋白質共役型受容体がアゴニストで刺激されると、アゴニスト結合型(活性型)受容体を認識する G 蛋白質共役型受容体キナーゼによって、受容体の細胞内第 3 ループあるいは細胞内 C 末端のセリン・スレオニン残基がリン酸化される。引き続き、このリン酸化受容体にアレスチンが結合することにより、クラスリン被覆小胞の形成が誘導されると考えられている。

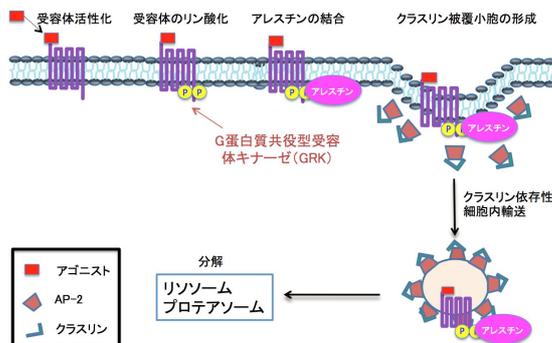


図 1. G 蛋白質共役型受容体の細胞内輸送

(3) 既に我々は、アゴニスト刺激に伴い、H<sub>1</sub> 受容体がクラスリン依存性機構によって細胞内に輸送されることを明らかにしている(引用文献、)。しかしながら、H<sub>1</sub> 受容体の活性化からクラスリン被覆小胞の形成に至る機構の詳細は不明である。特に、H<sub>1</sub> 受容体の細胞内 C 末端は、他の G 蛋白質共役型受容体に比べて極端に短く(17 アミノ酸残基)。このように短い細胞内 C 末端が、H<sub>1</sub> 受容体の細胞内輸送に果たす役割は不明である。そこで、H<sub>1</sub> 受容体の細胞内輸送における細胞内 C 末端の役割に着目して研究を開始した。

## 2. 研究の目的

アゴニスト刺激に伴うヒト・ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の細胞内輸送機構における H<sub>1</sub> 受容体 C 末端の役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 変異 H<sub>1</sub> 受容体の作製

受容体を可視化する目的で細胞外 N 末端をヘマグルチニン (HA) で標識したヒト・ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体及びその細胞内 C 末端を変異させた H<sub>1</sub> 受容体を作製し、それぞれを CHO 細胞に強制発現させた。作製した変異 H<sub>1</sub> 受容体は、以下の通りである(図 2)。

[HA-WT] N 末端をヘマグルチニン (HA) で標識した H<sub>1</sub> 受容体

[HA-T478A] N 末端をヘマグルチニン (HA) で標識し、C 末端スレオニン 478 残基をアラニンに置換した H<sub>1</sub> 受容体

[HA-S487A] N 末端をヘマグルチニン (HA) で標識し、C 末端セリン 487 残基をアラニンに置換した H<sub>1</sub> 受容体

[HA-S487TR] N 末端をヘマグルチニン (HA) で標識し、C 末端セリン 487 残基を切除した H<sub>1</sub> 受容体

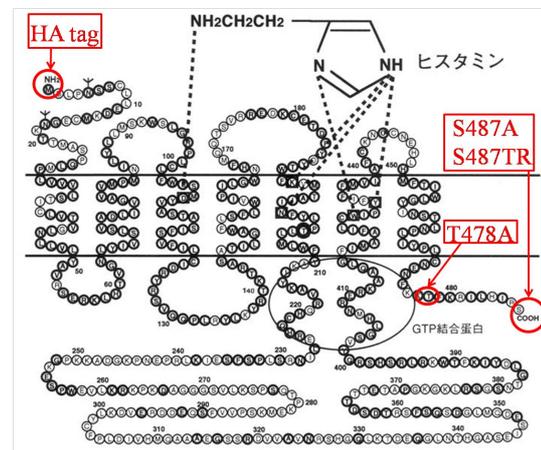


図 2. 作製した変異ヒト・ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体

### (2) 受容体結合実験による細胞表面 H<sub>1</sub> 受容体及び全 H<sub>1</sub> 受容体の定量的検出

H<sub>1</sub> 受容体に対する放射性リガンド [<sup>3</sup>H]メピラミンは、細胞表面 H<sub>1</sub> 受容体に結合するだけでなく、細胞膜を通過して細胞内に分布する H<sub>1</sub> 受容体にも結合する。一方、ピルドニウムは、細胞膜非透過性 4 級アンモニウム誘導体の H<sub>1</sub> 受容体遮断薬であり、細胞表面 H<sub>1</sub> 受容体に選択的に結合する。そこで、ピルドニウムで遮断される [<sup>3</sup>H]メピラミン結合(ピルドニウム感受性 [<sup>3</sup>H]メピラミン結合)の最大結合量 (B<sub>max</sub> 値) から、細胞表面 H<sub>1</sub> 受容体数を算出した。一方、細胞に存在する全 H<sub>1</sub> 受容体数は、過剰量の非放射性メピラミンによって遮断される [<sup>3</sup>H]メピラミン結合(メピラミン感受性 [<sup>3</sup>H]メピラミン結合)の B<sub>max</sub> 値から算出した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒスタミン刺激に伴う HA-WT 受容体の細胞内輸送

0.1 mM ヒスタミン 30 分間刺激に伴い、細胞表面 HA-WT 受容体数(ピルドニウム感受性 [<sup>3</sup>H]メピラミン結合の B<sub>max</sub> 値)は約 7 割に減少、即ち、細胞表面 HA-WT 受容体の約 3 割

が消失したが、細胞に存在する全 HA-WT 受容体数 (メピラミン感受性 [ $^3$ H]メピラミン結合の Bmax 値) には変化は認められなかった (図 3 & 図 4 : HA-WT)。また、ヒスタミン刺激に伴う細胞表面 HA-WT 受容体の消失は、クラスリン被覆小胞の形成を阻害する高張条件下で阻害された。従って、N 末端を HA で標識した HA-WT 受容体は、野生型  $H_1$  受容体と同様にクラスリン依存性機構によって細胞内に輸送されたと考えられた。

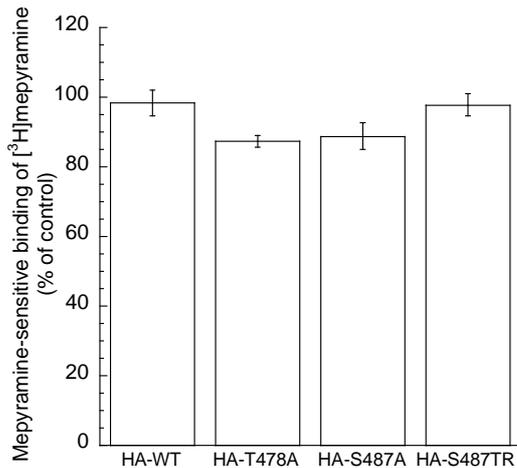


図 3. ヒスタミン刺激に伴う全  $H_1$  受容体数の変化

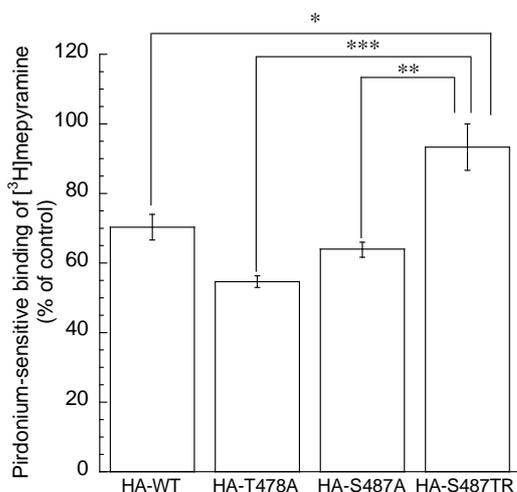


図 4. ヒスタミン刺激に伴う細胞表面  $H_1$  受容体数の変化 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

(2) ヒスタミン刺激に伴う HA-T478A、HA-S487A、HA-S487TR 受容体の細胞内輸送

細胞表面 HA-T478A 及び HA-S487A 受容体は、ヒスタミン刺激に伴い約 6 割に減少したが、細胞に存在する全受容体数には変化は認められなかった (図 3 & 図 4 : HA-T478A、HA-S487A)。また、このヒスタミン刺激に伴う細胞表面受容体の消失は、クラスリン被覆小胞の形成を阻害する高張条件下で阻害された。従って、HA-T478A 受容体及び HA-S487A 受容体は、野生型  $H_1$  受容体と同様にアゴニスト刺激に伴いクラスリン被覆小胞を介して細胞内に輸送されたと考えられた。また同時

に、C 末端 T478 残基及び S487 残基のリン酸化が、 $H_1$  受容体の細胞内輸送の引き金になる可能性は少ないと考えられた。

一方、HA-S487TR 受容体においては、ヒスタミンで刺激しても、細胞表面受容体数及び全受容体数ともに変化が認められなかった (図 3 & 図 4 : HA-S487TR)。即ち、 $H_1$  受容体の C 末端 S487 残基 1 残基が切除されると、 $H_1$  受容体の細胞内輸送が起こらないことが明らかとなった。

以上の結果から、 $H_1$  受容体 C 末端は、 $H_1$  受容体の細胞内輸送に極めて重要な役割を果たしていると考えられる。

(3) 免疫組織染色による  $H_1$  受容体の細胞内輸送の検出

ヒスタミン刺激に伴う  $H_1$  受容体の細胞内輸送を、抗 HA 抗体を用いた免疫組織染色 (共焦点顕微鏡) によって解析した。その結果、 $H_1$  受容体は、刺激初期に細胞表面から細胞質に拡散した後、次第に細胞内局所に凝集することが明らかとなった (図 5)。また、これらの変化は、クラスリン被覆小胞の形成を阻害する高張条件下及び C 末端 S487 残基切除によって阻害された。

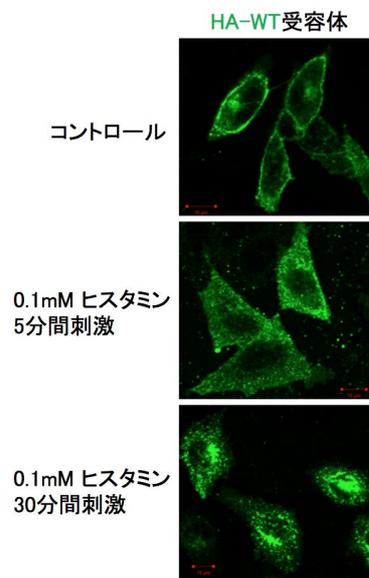


図 5. ヒスタミン刺激に伴う  $H_1$  受容体の分布変化 (免疫組織染色)

そこで次に、細胞内に輸送された受容体が、トランス・ゴルジ・ネットワークを介してゴルジ装置に運ばれる可能性を明らかにする目的で、抗 syntaxin-6 抗体 (ゴルジ・マーカー) を用いた免疫組織染色によって、 $H_1$  受容体の細胞内局在化部位を解析した。その結果、細胞内に輸送された  $H_1$  受容体は、次第に抗 syntaxin-6 抗体と共局在する様子が観察された。従って、 $H_1$  受容体は、細胞内に輸送された後、ゴルジ装置に局在化すると考えられた。

#### (4) 総括

アゴニスト刺激に伴い、ヒト・ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体は、クラスリン被覆小胞を介して細胞内に輸送された後、トランス・ゴルジ・ネットワークを介してゴルジ装置に輸送されること、また、H<sub>1</sub> 受容体の細胞内 C 末端は、その短さとは対照的に、クラスリン被覆小胞を介した H<sub>1</sub> 受容体の細胞内輸送に決定的役割を果たしていることが明らかとなった。

本研究は、これまで不明な点が多かったヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の制御機構に新たな知見を提供するものである。

#### <引用文献>

**Hishinuma S**, Naiki A, Tsuga H, Young JM. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-mediated regulation of agonist-induced sequestration of Gq protein-coupled histamine H<sub>1</sub> receptors in human U373 MG astrocytoma cells. *J Neurochem*. 1998; 71: 2626-2633.

**Hishinuma S**, Komazaki H, **Fukui H**, Shoji M. Ubiquitin/proteasome-dependent down-regulation following clathrin-mediated internalization of histamine H<sub>1</sub>-receptors in Chinese hamster ovary cells. *J Neurochem*. 2010; 113: 990-1001.

#### 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5件)

**Hishinuma S**, Sugawara K, Uesawa Y, **Fukui H**, Shoji M. Differential thermodynamic driving force of first- and second-generation antihistamines to determine their binding affinity for human H<sub>1</sub> receptors. *Biochem Pharmacol*. 2014; 91: 231-241. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bcp.2014.07.015.

Uesawa Y, **Hishinuma S**, Shoji M. Molecular determinants responsible for sedative and non-sedative properties of histamine H<sub>1</sub>-receptor antagonists. *J Pharmacol Sci*. 2014; 124: 160-168. 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24476926>

**Hishinuma S**, Sato Y, Akatsu C, Shoji M. The affinity of histamine for Gq protein-coupled histamine H<sub>1</sub>-receptors is predominantly regulated by their internalization in human astrocytoma cells. *J Pharmacol Sci*. 2012; 119: 233-242. 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22786583>

#### [学会発表](計12件)

野澤大樹、赤津ちづる、**菱沼 滋**、庄司 優. ヒスタミン刺激に伴うヒト・ヒスタミン H<sub>1</sub> 受容体の細胞内輸送は H<sub>1</sub> 受容体の C 末端により制御される. 第 87 回日本薬理学会年会、2014/3/19、仙台国際センター (宮城・仙台)

赤津ちづる、佐藤祐子、**菱沼 滋**、庄司 優. ヒト・U373MG アストロサイトーマ細胞におけるヒスタミン刺激に伴う H<sub>1</sub> 受容体のヒスタミン親和性制御機構の解析. 日本薬学会第 133 年会、2013/3/29、パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)

赤津ちづる、佐藤祐子、**菱沼 滋**、庄司 優. ヒスタミン刺激に伴う H<sub>1</sub> 受容体のヒスタミン親和性変化は、GRK/クラスリン経路を介した H<sub>1</sub> 受容体の細胞内移行による. 第 85 回日本薬理学会年会、2012/3/16、国立京都国際会館 (京都・京都)

#### [その他]

ホームページ等

[http://www.my-pharm.ac.jp/g\\_lps/lifescience.html#labo29](http://www.my-pharm.ac.jp/g_lps/lifescience.html#labo29)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

**菱沼 滋** (HISHINUMA, Shigeru)  
明治薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号：70211505

##### (2) 連携研究者

福井 裕行 (FUKUI, Hiroyuki)  
徳島大学大学院・HBS 研究部・教授  
研究者番号：90112052