

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：24790252

研究課題名(和文) シス테인翻訳後修飾がGPCR機能調節に与える影響の検討

研究課題名(英文) Analysis of protein Cysteine modification in G protein-coupled receptor

研究代表者

足立 直子 (Adachi, Naoko)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・助教

研究者番号：70604510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、新規にベータ3受容体の脂質修飾(パルミトイル化修飾)を3か所同定した。これらのパルミトイル化修飾は受容体の安定性に重要であり、パルミトイル化阻害薬を用いて、受容体がパルミトイル化されない状態にすると、受容体は分解を受け、数が減少した。ベータ3受容体の活性化は脂肪の代謝・燃焼に重要なことから、パルミトイル化修飾を調節することで、ベータ3受容体の数を増加させる可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：We have identified three palmitoylation sites of the human beta3-adrenergic receptor. Palmitoylation deficient mutants showed neither altered cAMP production nor receptor mislocalization. However, an irreversible palmitoylation inhibitor, 2-bromopalmitate greatly reduced receptor number on the plasma membrane. This result indicates that these palmitoylation are important for receptor stability. Since activation of beta3-adrenergic receptor facilitates lipid metabolism in fat cells therefore, protection of palmitoylated receptors might be a potential drug target against obesity.

研究分野：分子薬理学

キーワード：パルミトイル化 ベータ3アドレナリン受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) Gタンパク質共役受容体(GPCR)は、多岐に渡る細胞外刺激を三量体Gタンパク質を介して細胞内シグナルと変換する重要な役割を担っている。これまでに、1000種近くのGPCRが同定されており、GPCRを標的とする様々な薬剤の開発が行われている。GPCRの中でも多くのロドプシン型受容体では、7つ目の膜貫通領域のC末端側近傍の1つまたは複数個のシステイン残基がパルミトイル化修飾を受け、この脂質修飾により細胞質膜への4つ目のループを作り出しC末端部位の構造を変化させる。このパルミトイル化は受容体の輸送や分解、シグナル伝達等を制御していることが報告されている。

(2) タンパク質のシステイン残基は側鎖に反応性の高いチオール基(-SH)を持つことから、パルミトイル化のみならず、可逆的・不可逆的に様々な翻訳後修飾を受け、生体内での重要なシグナル伝達機構を担っている。中でも、一酸化窒素(NO)の付加によるS-ニトロシル化修飾(-SNO)はタンパク質の立体構造を局所的に変化させることで、タンパク質に機能変化をもたらすシグナル伝達因子の一つである。NOは細胞内では一酸化窒素合成酵素(NOS)により産生され過剰なNO産生は細胞毒性をもつため、通常、細胞外刺激に応答して厳密に調節されている。

(3) これまで、ベータ2アドレナリン受容体においてはGPCRで保存されているC末端領域のパルミトイル化が同定されており、NOにより、パルミトイル化受容体が減少し細胞内情報伝達が変化することが報告されている。そこで申請者は、GPCRにおいて、通常パルミトイル化されているシステイン残基が、NOによりS-ニトロシル化されることで、下流シグナルを変化させることを予測した。

2. 研究の目的

タンパク質のパルミトイル化とニトロシル化がGタンパク質共役型受容体において、同一システイン残基を修飾する可能性に着目し、ニトロシル化修飾がパルミトイル化修飾を直接阻害することで受容体の機能制御を調節し、下流の細胞内情報伝達を変化させることを仮定し検証する。

3. 研究の方法

各種培養細胞にGPCR、NOSを恒常的に発現させリガンド刺激を行い、NO存在下でパルミトイル化レベルの低下が見られるGPCRを抽出する。これらのGPCRに対してパルミトイル化・ニトロシル化修飾を受けるシステイン残基を質量分析法で同定し、S-ニトロシル化によるS-パルミトイル化の直接的な阻害効果について検討する。さらに、各翻訳後修飾がGPCRに与える機能・局在変化を検討すること

で下流シグナルに与える影響を調べる。

4. 研究成果

(1) 当初はGPCRのシステイン翻訳後修飾を網羅的に解析し、パルミトイル化、ニトロシル化修飾の相互作用を理解し、受容体の機能解析を予定していたが、パルミトイル化GPCRの解析中にベータ3受容体のパルミトイル化修飾の重要性を発見した。そこで、本研究では、ベータ3受容体のパルミトイル化解析を中心に研究を行った。

(2) 3種のベータアドレナリン受容体の内、ベータ3受容体のパルミトイル化修飾は実験的に証明されておらず、またその機能も不明であった。そこで、ベータ3受容体のパルミトイル化部位の検出を行ったところ、驚くべきことに、GPCRで保存されているC末端領域に加えて、他の細胞内領域に少なくとも2か所のパルミトイル化部位が同定された(Fig.1)。新たに同定されたCys153とCys292は共に、膜貫通領域近傍に位置するシステイン残基であった。膜近傍領域のパルミトイル化はこれまでの他のタンパク質の報告では、膜貫通領域の脂質二重膜に対する傾きを固定化することが考えられており、受容体の構造を変化させる可能性が考えられる。

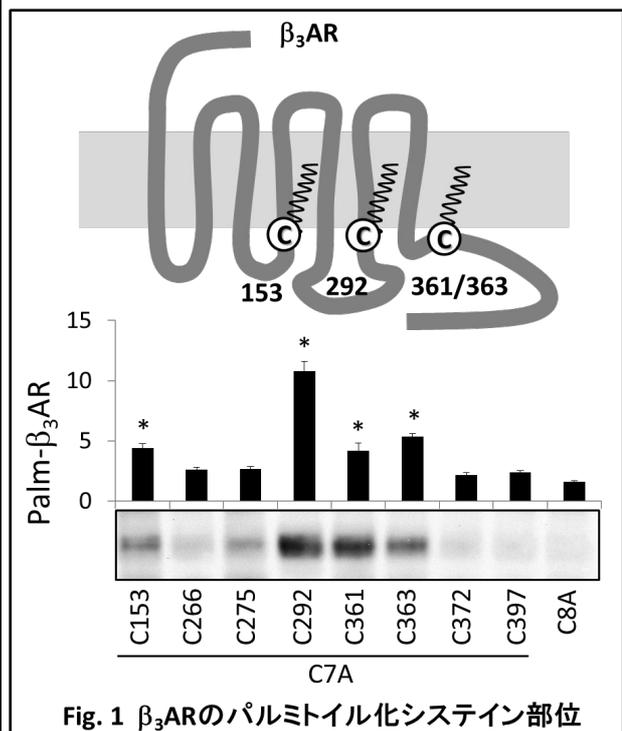


Fig. 1 β₃ARのパルミトイル化システイン部位

次に、これらのパルミトイル化部位に変異を加え、受容体の機能解析を行ったところ、

細胞質膜への発現は野生型と同様(細胞質膜への受容体の輸送にパルミトイル化は関与しない)

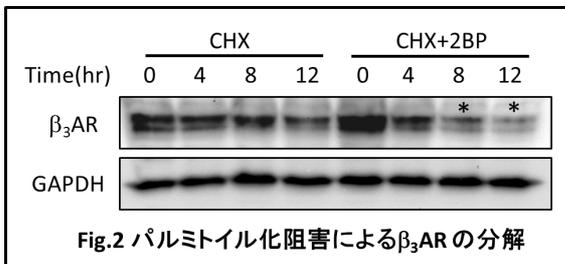
cAMP の産生は野生型と同等(G protein との結合能、また、下流シグナルには影響しない) であり、非パルミトイル化受容体はその機能を野生型と同様に維持していることが判明した。

(3) 一方で、パルミトイル化阻害、2-bromopalmitate (2-BP) の添加によりその受容体の安定性は、著しく減少し、発現量の低下をひきおこした。そこで、シクロヘキサミド (CHX) を加えて、新規に合成されるたんぱく質を止めることで、現状のパルミトイル化受容体における 2-BP の影響を検討した (Fig. 3)。結果、

ベータ 3 受容体の半減期は 1.7 時間程度と非常に短いことが判明した。

成熟ベータ 3 受容体の発現量が減少した。

これらのことより、タンパク質合成段階で、パルミトイル化修飾を受けたベータ 3 受容体はその後、パルミトイル化・脱パルミトイル化のサイクルを繰り返しており、2-BP により再パルミトイル化が阻害されたことにより、受容体の安定性が低下し、分解されたものだと思われた。そこで、MG132 添加して、受容体の挙動を確認したところ、通常より上部バンドが現れたことより、非パルミトイル化受容体はユビキチン化され分解されていることが示唆された。また、リソソーム阻害薬であるロイペプチンやペプスタチン A により受容体の存在量が増したことにより、ベータ 3 受容体は、脱パルミトイル化されるとユビキチン化修飾を受け、リソソームにて分解される可能性が示唆された。この、ユビキチン・リソソームの分解経路はベータ 2 受容体にて確認されており、同様の分解経路を辿るものと考えられる。

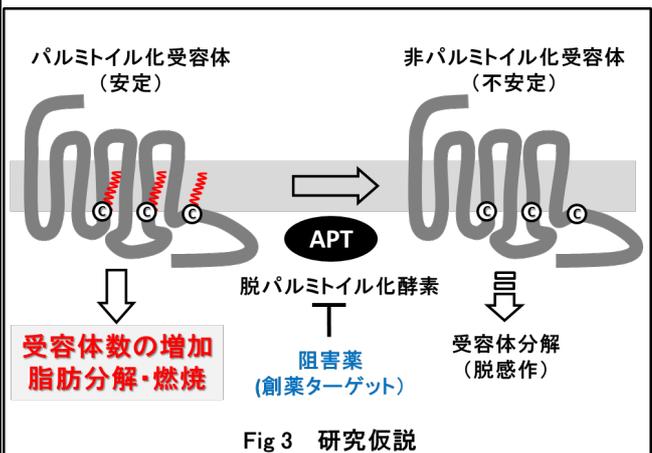


(4) ベータ 3 受容体は脂肪細胞に強い発現が見られ、受容体の活性化が脂肪代謝の引き金になることから、肥満や 2 型糖尿病の創薬のターゲットとして特異的なアゴニストが開発されてきた。これまで開発されたアゴニストの多くは、マウスモデルでは優位に脂肪の代謝を促し、体重の低下を引き起こしたが、ヒトでは優位な体重低下が見られず、現在まで、治療薬として承認されるには至っていない。興味深いことに、ベータ 3 受容体は細胞

内領域のリン酸化部位を欠失しており、他の多くの GPCR のように受容体を活性化してもインターナリゼーションをおこさず、脱感作のメカニズムは知られていない。今回得られた結果により、ベータ 3 受容体は脱パルミトイル化により不安化し、分解経路へ進む可能性が示唆され、このメカニズムにより、細胞質膜上の受容体数が調節されているとかがえられた。

(5) 一方で、ベータ 3 受容体は通常、パルミトイル化修飾を受けることにより細胞質膜上に安定化され、アゴニストに応答して脂肪の分解・燃焼を引き起こすと考えられる。これまで、ベータ 3 受容体のアゴニストがヒトで、強い効果を示さなかった原因に、白色脂肪細胞における発現量の少なさが考えられている(マウスではベータ 3 受容体は白色脂肪細胞に多く発現している)。そこで受容体の脱パルミトイル化を抑制することで細胞質膜上のベータ 3 受容体の存在量を増加させることが可能であれば、ベータ 3 アゴニスト刺激により、脂質の分解・燃焼において、優位な効果が得られる可能性が考えられる。

(6) 今後の展望としては、Fig. 3 に示すように、脱パルミトイル化酵素(APT1/2)の機能阻害を行い、また同時に、過活動膀胱の治療薬として承認されているベータ 3 受容体アゴニスト、ミラベグロンを併用することで、受容体量を増加させ、活性化量を増やし、遊離脂肪酸量の増加を見込んでいる。この新規機構を利用して、脱パルミトイル化阻害を標的とした創薬を目指しており、新たな、抗肥満薬の開発につながると考えられる (Fig. 3)。



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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

足立直子 他、化学同人、分子脳科学
分子から脳機能と心に迫る 三品昌美編
2015、291 (151-156)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
特になし

6. 研究組織

(1)研究代表者

足立 直子 (ADACHI, Naoko)
神戸大学バイオシグナル研究センター
助教
研究者番号：70605410

(2)連携研究者

齋藤 尚亮 (SAITO, Naoaki)
神戸大学バイオシグナル研究センター
教授
研究者番号：60178499

(3)研究協力者

賀来 美嘉 (KAKU, Mika)
神戸大学大学院 医学研究科 M2

上田 知永 (UEDA, Chie)
神戸大学バイオシグナル研究センター
技術補佐員