

平成 21年 5月 29 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2008

課題番号：19036036

研究課題名（和文） オリゴマー形成による G タンパク質共役受容体の機能調節機構

研究課題名（英文） Mechanism of G protein-coupled receptor oligomerization

研究代表者

中田 裕康 (NAKATA HIROYASU)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

研究者番号：00041830

研究成果の概要：アデノシン受容体のサブタイプであるA₁アデノシン受容体のホモダイマー形成に関与する部位（インターフェイス）の検索をおこなう目的でTM4 とTM5 に存在する特定のアミノ酸残基を変異させ、BRET法により解析したところ、これらのアミノ酸はダイマー形成には関与せず受容体活性そのものに重要であることを偶然に見いだした。このアミノ酸はGPCR間にて保存性の高い132番目のTrpであり、分子モデリングからもリガンド結合に関与するTM3 とTM5 の4つの残基と近接しており、リガンド結合活性に重要な役割を果たしていることが推測された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,100,000	0	3,100,000
2008年度	3,200,000	0	3,200,000
年度			
年度			
年度			
総計	6,300,000	0	6,300,000

研究分野：分子神経薬理学

科研費の分科・細目：

キーワード：Gタンパク質共役受容体、アデノシン受容体、P2受容体、ダイマー、BRET、免疫沈降

1. 研究開始当初の背景

(1) Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) は生物において最も基本的なシグナル伝達機構である。ヒトでは少なくとも800以上のGPCR遺伝子が存在しており、神経伝達物質やホルモン、さらに多くの臨床薬の標的となっている。したがって、このようなGPCRを介するシグナルの調節機構の解明は生理

的に重要であり、GPCRアゴニストの交差性、多様なGタンパク質の存在と共役性、細胞内エフェクター間のクロストーク、細胞内局在性などが研究されている。いっぽう、これまでGPCRはモノマーとしてGタンパク質と1:1で共役して機能すると考えられてきた。しかし最近、同種もしくは異なるGPCR間で直接「複合体（ホモダイマー、ヘテロ

ダイマー)」を細胞膜上で形成することが見
出されてきた。たとえば、GABA_B受容体、ア
ドレナリン受容体、ドーパミン受容体など
多くのGPCRについて報告され、GPCRの機能
調節、多様性発現機構として大きな関心
を集めるようになった。まさしく生体膜に
おけるソフトな分子間相互作用が細胞内シ
グナル伝達を調節する例と考えられる

(2) 細胞間情報伝達物質の一つであるア
デノシンやATPなどのプリン化合物は、細
胞膜上のプリン受容体を介し、神経情報
伝達、神経細胞保護、痛み、などに深く関
わっている。我々は、GPCR型プリン受容体
(アデノシン受容体およびP2Y受容体)にお
いても細胞膜上において受容体ダイマーが
形成され、薬理学的特異性が変化すること、
とりわけA₁アデノシン受容体とP2Y₁受容
体間でのヘテロダイマー形成がP2Y₁受容
体の特異性を変換するという興味ある事
実を発見して米国科学アカデミー紀要
(2001)に発表した。この受容体ヘテロ
ダイマー形成の仕事は高く評価され、こ
れまで数多く引用されている。このヘテ
ロダイマー形成は当初培養細胞系での受
容体発現系で示されたが、ラット脳で実
存することも明らかにした。

(3) このようなGPCR活性調節機構とし
てのGPCRオリゴマー形成の機構、生理
的意義、パートナー受容体の特異性など
はプリン受容体のみならず多くの受容体
系で研究されているが、その詳細はまだ
十分に明らかでなく、早急の解明が望ま
れている。

2. 研究の目的

アデノシン受容体と複合体を形成するこ
とが可能な神経系のGPCRを網羅的に探
索する。さらに、アデノシン受容体活性
のdiversityとの関連性を、それぞれのオリ
ゴマー形成細胞におけるシグナル伝達
の変化を中心に明らかにする。

また、オリゴマー形成の分子機構を明
らかにするために重要なオリゴマー形成
部位(インターフェイス)もしくは関与す
る部位を明らかにするため、ロドプシ
ンの構造をもとにした分子モデリング
から予想する予想インターフェイス(受
容体膜貫通ドメイン)のミュータント受
容体を発現させた培養細胞系でのオリ
ゴマー形成の解析を免疫沈降、免疫組
織染色、さらにBRETなどの

生物物理学的測定法やバイオイメージ
ング技術などを駆使しておこない、オリ
ゴマー形成の機構に迫る。

3. 研究の方法

(1) 目的受容体共発現細胞系の最適化:
トランジェントにプリン受容体(A₁アデ
ノシン受容体やP2Y₂受容体)を培養細胞
に発現させ、生化学的に再現性や十分
なSN比を得られるように実験条件を最
適化する。とりわけ、ホスト細胞とし
て、HEK293Tや1321N1細胞などの都合
の良い細胞を選択したり、発現効率の
良いトランスフェクション条件など、
生化学的に分析するのに十分な受容
体を培養細胞から得る点に留意して
最適な実験条件の探索をおこなう。

(2) プリン受容体のダイマー形成率の
検証: A₁アデノシン受容体と種々の
P2Y受容体を共発現させた細胞にお
ける受容体のオリゴマー形成の検証
をおこなう。コンフォカル蛍光免疫
染色顕微鏡観察によるco-localization、
生化学的免疫共沈降、放射性リガ
ンドに対する結合活性、2ndメッセ
ンジャー系の解析、などをおこない、
目的受容体のオリゴマー発現様式
や機能変化を調べる。また、GFP
およびRlucを付加した受容体の
ペアにおける共発現細胞をもちいた
Bioluminescence resonance energy
transfer (BRET)実験により、生細胞
における受容体同士の相互作用も
明らかにする。さらに、オリゴマー
形成を直接的に観察する手段とし
て、免疫電子顕微鏡観察もおこな
う。

(3) ロドプシンの結晶構造をもとにA₃
アデノシン受容体ではTM(transmembrane
domain)4とTM5がダイマーインター
フェイスであるというモデルが提唱
されている。そこで、本研究でも
ロドプシンの結晶構造をもとに
バイオインフォマティクスから
想定される受容体表面を検索して
タンパクタンパクインターフェイス
として予想される部位を予想する。
可能性が示唆されたTM4とTM5
の4ヶ所のアミノ酸残基全てをAla
に置換した変異体cDNAをsite-
directed mutagenesis法により作成
して、上記の方法にて培養細胞で
発現させる。発現細胞膜を詳細に
分析(免疫沈降、リガンド結合活
性、BRET)することで、オリゴ
マー形成能力に変化が現れるか
否か、そしてこれらのアミノ

酸がオリゴマー形成のインターフェイスになりうるのかを調べる。加えて、これらのミュータントの受容体活性も調べることで、変異アミノ酸と受容体のリガンド結合部位（活性中心）との関連性も検討する。

4. 研究成果

(1) アデノシン受容体とP2Y受容体の相互作用を検討した。A₁アデノシン受容体とP2Y₂受容体間のヘテロダイマー形成の可能性を共発現培養細胞やラット脳組織を用いて分析したところ、両者はヘテロダイマーを形成するとともにA₁アデノシン受容体のリガンド特異性の変化、P2Y₂受容体活性のA₁受容体活性化に依存した増強、加えてP2Y₂受容体の活性化によるA₁受容体活性の抑制など、すでに報告したP2Y₁/A₁受容体間のダイマーとは異なる受容体機能調節を観察した。

また、血小板凝固や免疫機能と関連するプリン受容体であるA_{2A}アデノシン受容体とP2Y₁、P2Y₁₂受容体を共発現させた培養細胞もしくはA₃アデノシン受容体とP2Y₂受容体を共発現させた培養細胞を用いて解析したところ、これらのプリン受容体間でダイマー形成が生ずることが観察された。

A₃/P2Y₂受容体のダイマー形成によりリガンド特異性や細胞内シグナルの抑制的調節が生ずることが明らかになったが、A_{2A}アデノシン受容体とP2Y₁₂やP2Y₁受容体間のダイマー形成による受容体特異性やシグナル伝達の著しい変化は見られなかった。

(2) 受容体ダイマーの分析に利用される免疫共沈降やBRET、FRETなど間接的な解析ではダイマー形成の定量的な分析が難しい。そこで受容体間のダイマー形成を直接的に観察するため、各受容体に対してそれぞれ大きさの異なる金粒子をラベルした抗体を用いた免疫電子顕微鏡にてA₁アデノシン受容体とP2Y₂受容体の発現様式を観察した。

共発現培養細胞や脳組織において、これらの受容体の発現が観察されモノマーに加えてホモダイマー、ヘテロダイマー、さらにテトラマーなど種々の組み合わせによるオリゴマーが存在すること、さらに細胞質よりも細胞膜上にダイマーが多く局在することなどが見いだされた。このような免疫電子顕微鏡観察により受容体オリゴマーの定性的のみならず、定量的な解析が可能であることから、この手法が受容体オリゴマ

ー解析手段として有用であることが示された。

(3) A₁アデノシン受容体のホモダイマー形成に関与するアミノ酸残基を明らかにするために受容体のTM4 とTM5 のアミノ酸の中で受容体分子の外側に露出していると思われるものをそれぞれ2個選び、計4個のアミノ酸のsite-directed mutagenesis をおこなった。

それら4残基全てをAlaに置換したmutantは野生型と同様に細胞膜に発現してホモダイマー形成率は免疫沈降による分析では野生型に比べて減少しないことが明らかになった。したがって、これらのアミノ酸は予想とは異なってダイマー形成のインターフェイスの可能性は少ない。ところが変異により受容体リガンド結合活性は、アゴニストおよびアンタゴニストに対して両方とも失われていた。さらに検討を重ね、リガンド結合に重要なのはTM4で最も保存性の高いTrp132であることが明らかになった。分子モデリングによりTrp132は結合リガンドに近いTM3とTM5の4つの残基と近接しており、互いに直接結合している可能性が示唆された。Trp132をAlaに置換させると、それらの残基との距離が遠くなり結合できなくなると考えられる。

つまり、Trp132はリガンド結合部位のあるTM3とTM5を支える役割があり、変異させるとTM3とTM5の位置がゆらぎ、リガンド結合が妨げられたものと考えられた。本研究によりTM4に存在する保存性の高いTrpの重要性が明らかにされた。

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 4件)

- ① Suzuki, T., Namba, K., Yamagishi, R., Kaneko, H., Haga, T., Nakata, H., A highly conserved tryptophan residue in the fourth transmembrane domain of the A₁ adenosine receptor is essential for ligand binding, but not receptor homodimerization, *J. Neurochem.* (in press) 査読あり
- ② Ishiyama, H., Ohshita, K., Abe, T., Nakata, H., Kobayashi, J. (2008) Synthesis of eudistomin D analogues and its effects on adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem.*

16:3825-3830, 査読あり

③ Nakata, H. (2007) Mitogen-activated protein kinase signaling is involved in suramin-induced neurite outgrowth in a neuronal cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* **355**:842-848
査読あり

④ Ohshita, K., Ishiyama, H., Oyanagi, K., Nakata, H., Kobayashi, J. (2007) Synthesis of hybrid molecules of caffeine and eudistomin D and its effects on adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem.* **15**:3235-3240 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

① 小林涼子、ヒト濃縮型ヌクレオシドトランスポーター (hCNT2) の複合体形成についての研究、トランスポーター研究会第 2 回関東部会、2008 年 12 月 6 日、東京大学武田ホール

② 鈴木登紀子、Highly-conserved tryptophan residue in the fourth transmembrane domain of A1 adenosine receptor is critical for ligand binding but not for dimerization、第 80 回日本生化学会大会、2007 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 裕康 (NAKATA HIROYASU)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・研究員

研究者番号：00041830

(2) 研究分担者

水野 一也 (MIZUNO KAZUYA)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：00219643

(3) 連携研究者 なし