

平成 21 年 4 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580123

研究課題名（和文）フェノールアミンレセプターファミリーの同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of the phenolamine receptor family

研究代表者

尾添 嘉久（OZOE YOSHIHISA）

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80112118

研究成果の概要：フェノールアミンは、無脊椎動物の嗅覚、視覚、ストレス応答、記憶・学習など、様々な生理現象に関わる情報伝達物質である。フェノールアミンレセプターは、フェノールアミンを結合して、環境情報を細胞外から細胞内に伝える細胞膜タンパク質である。本研究では、レセプター遺伝子 4 種をカイコ (*Bombyx mori*) 幼虫の神経組織から単離し、培養細胞に発現させて、個々のレセプターの機能と性質を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：フェノールアミン、オクトパミン、チラミン、生体アミン、G タンパク質共役型レセプター、クローニング、カイコ、*Bombyx mori*

1. 研究開始当初の背景

オクトパミンとチラミンは、フェニルアラニンから合成されるフェノールアミンであり、無脊椎動物において情報伝達物質として重要な生理機能を担っている。環境変化に応じて放出されるフェノールアミンのシグナルは、細胞膜タンパク質であるレセプターを通じて細胞内に伝えられる。従来、フェノールアミンレセプターの機能や薬理学は、組織から抽出した標品を用いて研究されていた。しかしその後、多くのレセプターにおいて複

数のサブタイプが存在が明らかになり、無脊椎動物のフェノールアミンレセプターにおいても、個々のサブタイプの機能や性質を明らかにする必要があった。特に、フェノールアミンレセプターは殺虫剤のターゲットとしても重要であり、各サブタイプの薬理的性質を解明する必要があった。

2. 研究の目的

最近、種々の生物のゲノム解析プロジェ

クトが進行し、そのデータが公開されている。そこで我々は、日本で進められたカイコゲノム解析のデータを利用して、フェノールアミンレセプター遺伝子の探索、単離、発現、およびレセプター機能解析を行い、生体アミンの生理学研究や薬理学研究に資することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) クローニング

カイコゲノムプロジェクトによって公開されている遺伝子配列データを既知の遺伝子の配列を使って検索し、カイコに存在するフェノールアミンレセプターの探索を行った。カイコ (*Bombyx mori*) 幼虫神経組織から抽出した RNA を用いて RT-PCR によって目的の cDNA をクローニングし、動物培養細胞発現用プラスミドベクター pcDNA3 に挿入した。そのプラスミドをヒト胎児腎臓由来細胞 HEK-293 細胞に導入し、抗生物質 G418 存在下で生存する遺伝子組込み細胞をクローニングした。個々のクローン細胞について、RT-PCR や免疫染色法を用いてレセプター安定発現の確認とクローンの選抜を行った。

(2) 解析

レセプターの機能解析は、結合タンパク質に対する生成 cAMP と [³H]cAMP の競合を原理とする cAMP アッセイと Ca²⁺インディケーター Fura 2 を用いる Ca²⁺アッセイによって行った。また、リガンドのレセプター親和性は、トリチウム標識リガンドを用いるレセプター結合アッセイによって測定した。

4. 研究成果

カイコゲノムデータベース (KAIKObase) を探索することにより、カイコには少なくとも 4 種のフェノールアミンレセプターが存在することが分かった。そのうちの 2 つはオクトパミンを優先的に結合し、残りの 2 つは、オクトパミンの生合成前駆体であるチラミンを優先的に結合した。いずれも 7 回膜貫通の G タンパク質共役型レセプター (GPCR) であり、それぞれのレセプターを BmOAR1、BmOAR2、BmTAR1、および BmTAR2 と命名した。

(1) α₁-アドレナリン様オクトパミンレセプター BmOAR1

このレセプターは、ヒトの α₁-アドレナリンレセプターと類似したアミノ酸配列と機能を持っている。オクトパミンと反応して、主に細胞内 Ca²⁺濃度を高めたが、同時に(高濃度オクトパミンにより)細胞内サイクリック AMP (cAMP) 濃度も上昇させた。これらのいわゆるセカンドメッセンジャーが細胞内生

理変化の引き金になる。従って、昆虫組織でのレセプターの発現部位の解明とともに、どのセカンドメッセンジャーと連結されているかを明確にすることは重要である。

まず、オクトパミン結合に関わる BmOAR1 のアミノ酸残基の同定とレセプター活性化機構の解明を行った。細胞内 Ca²⁺と cAMP はそれぞれ G_q と G_s タンパク質を介して生成される(図 1C)。この 2 種類のセカンドメッセンジャー濃度を上昇させる機構について、アミノ酸変異をもつレセプターを数種作製してシグナル伝達経路を調べたところ、第 6 膜貫通領域 (TM VI) におけるひとつのアミノ酸残基(チロシン 412)が経路選択に関わっていることが分かった。つまり、レセプターの活性化は 2 段階から成り、オクトパミン分子の両末端官能基が TM III のアスパラギン酸 103 および TM V のセリン 198 と相互作用すると Ca²⁺濃度の上昇が引き起こされ、これにさらに β-水酸基とチロシン 412 との相互作用が加わると、cAMP 濃度上昇が起こることが分かった(図 1, 2)。これらの結果の詳細は、学会発表②と③、および論文①-③で報告した。昆虫生体アミンレセプターの活性化機構を報告したのはこれが初めてである。

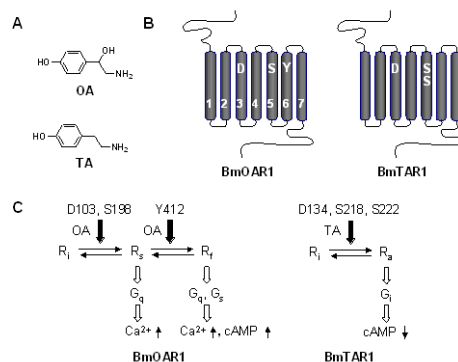


図 1. オクトパミン, チラミン, およびそのレセプターの構造と活性化機構. A, オクトパミン(OA)とチラミン(TA)の構造. B, BmOAR1と BmTAR1 の構造とアゴニスト相互作用アミノ酸. C, BmOAR1 と BmTAR1 のシグナル伝達機構. R_i=不活性化レセプター. R_s=半活性化レセプター. R_f=完全活性化レセプター. R_a=活性化レセプター. (論文①より転載)

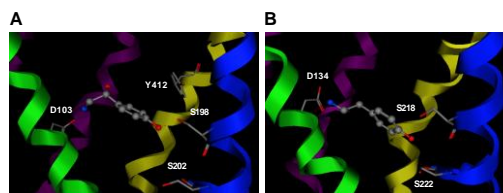


図 2. BmOAR1 (A) と BmTAR1 (B) ホモロジーモデルへのオクトパミン (A) とチラミン (B) のドッキング. (論文①より転載)

次に、BmOAR1 の薬理的性質を調べた。その結果、3 種の合成アゴニストが Ca^{2+} 上昇活性を誘起し、活性はクロニジン>ナファゾリン>トラゾリンの順となった。殺虫剤クロロジメホルムの活性化体である DMCDM は、高い cAMP 生成活性を示したが、 Ca^{2+} 上昇活性は低かった。一方、別の殺虫性化合物 NC-5 は両活性ともに高かった。DMCDM は、BmOAR1 が連結している二つのシグナル伝達経路のうち一つだけにシグナルを伝達するという点で、いわゆる機能的選択性 (Functional Selectivity) を示す化合物として殺虫活性発現機構との関連で注目される。アンタゴニストについては、二つの化合物が活性を示し、オクトパミンによる Ca^{2+} 生成を抑制した。活性順は、クロロプロマジン>ヨヒンビンであった。この活性順は、クロロプロマジンとヨヒンビンに関しては、オクトパミンによって誘起される cAMP 生成に対する抑制活性と同じであったが、cAMP 抑制活性を指標とした場合は、ミアンセリンもアンタゴニスト活性を示した点が異なっている。これらの薬理的性質については、学会発表③と⑤において報告し、現在、論文投稿中である。

(2) β -アドレナリン様オクトパミンレセプター BmOAR2

KAIKObase に存在する 393 アミノ酸をコードする GPCR 遺伝子をクローニングし、HEK-293 細胞に発現させてレセプターの機能解析を行った。また、このレセプターのバリエーションと思われる遺伝子もクローニングしたが、翻訳領域内の 5' 末端側に停止コドンが挿入されており、この遺伝子は、機能タンパク質をコードしない偽遺伝子と考えられた。BmOAR2 は、0.1 nM のオクトパミンに対して応答を示し、100 nM において最大の cAMP 生成を引き起こした。G_s タンパク質と共役していると考えられる (図 3)。しかし、これより高濃度のオクトパミンでは cAMP 生成が低下した。合成アゴニストである DMCDM も同様の二相性の応答を示したが、最大応答はオクトパミンより低い 1 nM で起こった。オクトパミン類似生体アミンであるチラミンとドーパミンはほとんど反応しなかった。レセプターに対する親和性はオクトパミン>チラミン>ドーパミンの順となった。アンタゴニストの試験を行ったところ、クロロプロマジンがオクトパミンによる cAMP 生成を阻害した。細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は引き起こさなかった。この成果は、学会発表④で報告し、詳細は現在、論文投稿中である。

(3) α_2 -アドレナリンレセプター様チラミンレセプター BmTAR1

アミノ酸配列と機能に関して α_2 -アドレナ

リンレセプターに類似性を示すフェノールアミンレセプターをクローニングし、機能解析した。このレセプターは G_i タンパク質と共役し、チラミンの作用によって活性化されると、アデニル酸シクラーゼによる cAMP 生成を抑制した (図 1C)。 Ca^{2+} 濃度上昇は惹起しなかった。チラミンは、オクトパミンより 100-1000 倍高活性、高親和性であった。アンタゴニスト活性は、ヨヒンビン=クロロプロマジン>メトクロプラミドの順であった。チラミン結合には、TM III のアスパラギン酸 134、TM V のセリン 218 およびセリン 222 の 3 アミノ酸残基が関わるのが、アミノ酸置換変異体を用いた実験から分かった (図 1, 2)。リガンド結合機構については、BmOAR1 との関連で論文①で解説した。

(4) 新規チラミンレセプター BmTAR2

KAIKObase に存在する新規チラミンレセプターのクローニングと機能解析を行った。BmTAR2 は、452 アミノ酸からなる GPCR をコードしていた。機能的には α_1 -アドレナリンレセプターに類似しているが、系統樹解析の結果、アドレナリンレセプターのどのサブタイプのグループにも属さないことが明らかになった。チラミンに対しては nM オーダーで特異的に応答し、細胞内 Ca^{2+} レベルを上昇させた (図 3)。これに対してオクトパミンの場合は、100 μ M 以上でのみ Ca^{2+} 上昇を惹起したので、明らかにチラミン選択性である。³H] チラミンを用いた競合実験においても、BmTAR2 はチラミンに対しては nM オーダーの親和性を示したが、オクトパミンに対しては μ M オーダーであった。細胞内 cAMP 生産とは共役していなかった。オクトパミンレセプターにおいてアゴニスト活性を示した化合物は、BmTAR2 に対してはいずれも活性を示さなかった。3 化合物がアンタゴニスト活性を示し、その活性順はヨヒンビン>クロロプロマジン>ミアンセリンであった。この成果は、学会発表①で報告し、現在、論文投稿中である。

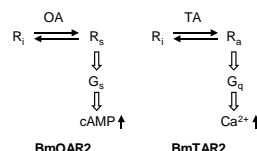


図 3. BmOAR2 と BmTAR2 の活性化機構。

本研究では、カイコゲノムデータベースを利用して、カイコ幼虫神経組織から 4 種のフェノールアミンレセプター遺伝子を単離し、培養細胞に発現させて、機能と薬理的性質を明らかにした。4 種のうち 2 種はオクトパミンレセプター、残りの 2 種はチラミンレセプターと同定した。クローニングしたレセプ

ターのうち3種はアミノ酸配列と機能の類似性の観点から脊椎動物のアドレナリンレセプターと関連付けることができた。残りのひとつは、明確にアドレナリンレセプターと関連付けることはできなかった。同一昆虫種から4種のファミリー構成レセプターをクローニングし、比較解析したのは、本研究が初めてである。今後、本研究で構築した発現系を使って各レセプターに特異的に作用するリガンドを同定し、さらにそれぞれの生理学的役割を明確にする研究が発展することが期待される。

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3件)

- ① Y. Ozoe and J. Huang, *Bombyx mori* phenolamine receptors: a comparative molecular biological study, *J. Pestic. Sci.*, 33, 24-27, 2008. 査読有.
- ② J. Huang, T. Hamasaki, F. Ozoe, and Y. Ozoe, Single amino acid of an octopamine receptor as a molecular switch for distinct G protein couplings, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 371, 610-614, 2008. 査読有.
- ③ J. Huang, T. Hamasaki, F. Ozoe, H. Ohta, K. Enomoto, H. Kataoka, Y. Sawa, A. Hirota, and Y. Ozoe, Identification of critical structural determinants responsible for octopamine binding to the α -adrenergic-like *Bombyx mori* octopamine receptor, *Biochemistry*, 46, 5896-5903, 2007. 査読有.

[学会発表] (計5件)

- ① 太田広人、黄佳、井上典子、尾添富美代、尾添嘉久、カルシウム動員型カイコチラミン受容体のクローニングとその薬理学的特性、日本農芸化学会 2009 年度大会、3P1048B、p. 297、2009.
- ② Y. Ozoe and J. Huang, Mechanism of multiple functional coupling of a *Bombyx mori* octopamine receptor, XXIII International Congress of Entomology, No. 1405, 2008.
- ③ J. Huang and Y. Ozoe, Molecular pharmacological characterizations of insect biogenic amine receptors, Proceedings of 3rd International Symposium on Pesticide and Environmental Safety and 7th International Workshop on Crop Protection Chemistry and Regulatory

Harmonization, III-005, pp.151-153, 2007.

- ④ X. Chen, H. Ohta, F. Ozoe, and Y. Ozoe, Cloning and molecular characterization of a *Bombyx mori* β -adrenergic-like octopamine receptor, 日本農薬学会第 32 回大会講演要旨集、B308、p. 70、2007.
- ⑤ 濱崎智浩、黄佳、太田広人、尾添嘉久、カイコから単離したオクトパミン受容体 (BmOAR1) とチラミン受容体 (BmTAR1) のリガンド応答、日本農薬学会第 32 回大会講演要旨集、B307、p. 69、2007.

6. 研究組織

研究代表者

尾添 嘉久 (OZOE YOSHIHISA)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80112118