

機関番号：36301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790086

研究課題名（和文）キナーゼによるエンドセリンA受容体とG蛋白質との共役制御機構の解明

研究課題名（英文）The role of kinases on multiple G proteins activation by endothelin A receptor

研究代表者

波多江 典之 (HATAE NORIYUKI)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号：30449912

研究成果の概要（和文）：エンドセリンA受容体をはじめとする7回膜貫通型受容体は、外界からの情報を伝達する生体分子であり、多くの医薬品の標的分子とされている。これら受容体が活性化されると、様々なG蛋白質を活性化することで種々の生理作用を惹起する。1種類の受容体は複数種のG蛋白質を活性化することが知られているが、その詳細な機構は未だ不明である。今回の解析により、複数種のG蛋白質の選択的活性化機構における、キナーゼおよび脂質ラフトの重要性を明らかとした。

研究成果の概要（英文）：G protein coupled receptors, like as endothelin A receptor, are the transmembrane spanning receptors, and the most commonly targeted receptor class for medicinal therapeutics. Agonist binding to the receptor causes them to adopt a conformation that results in the activations of associated multiple heterotrimeric G proteins, but it is still unknown how to selective activated the various G proteins by single receptor. It was clarified the role of protein kinases and lipid rafts on the selective activation of multiple G proteins mediated by receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：受容体科学

科研費の分科・細目：生物系薬学・生化学

キーワード：プロテインキナーゼC, エンドセリンA受容体, プロスタグランジン受容体, G蛋白質, 細胞内情報伝達, 脂質ラフト

1. 研究開始当初の背景

現在市販されている医薬品の標的生体分子としては、受容体、酵素などがある。2002年の報告では、細胞膜受容体群の一部であるG蛋白質共役型受容体が市販医薬品の約30%を占めており (Andrew, L., Hopkins, A. L., Groom, C. R. (2002) *Nat. Rev. Drug Discov.* Vol.1, 727-730.)、創薬における標的

生体分子として本受容体は期待されている。

細胞膜上に存在するG蛋白質共役型受容体は、外界からの刺激により、共役するG蛋白質を活性化することで、細胞内情報伝達を惹起し、種々の生理応答を誘導する。活性化されるG蛋白質の種類としては、G_s蛋白質群、G_i蛋白質群、G_q蛋白質群およびG₁₂蛋白質群とがあり、それぞれのG蛋白質によ

り異なる固有の効果基が活性化されることで、種々のプロテインキナーゼや低分子量G蛋白質などが活性化される。G蛋白質共役型受容体における生化学的な解析により、各受容体は複数種のG蛋白質を活性化できることが報告されてきているが、それらの選択的活性化の有無、およびその制御機構については未だ不明である。

生命科学の設計図とも言えるヒトゲノムの解読が終了した近年、推論値として約32,000種の構造遺伝子が存在するとされている。ゲノム基盤型の網羅的 two hybrid 法、およびモチーフ解析などの bioinformatics により各種細胞内情報伝達経路の全容が解明されつつある (Colland, F., Daviet, L. (2004) *Biochimie* Vol.86, 625-632.)。これらのモチーフ解析の結果、複数種の蛋白質同士が互いに複合体を形成し、ある1種類の蛋白質から複数種の情報伝達が惹起されることが予測されている。また生体における情報伝達においても、1つの生体分子は1種類の情報伝達経路のみを活性化するのではなく、多種類の情報伝達経路を活性化できることが近年報告されてきている (Friedman, A., Perrimon, N. (2007) *Cell* Vol.128, 225-231.)。ヒトの高次機能の維持において、構造遺伝子の全機能の解明とともに、複数種の情報伝達経路の時空間的制御機構の解明が、ポストゲノム時代の創薬において重要な課題であると考えられる。

これらの背景をもとに、G蛋白質共役型受容体によるG蛋白質の選択的活性化機構の解析は、受容体による情報伝達機構の解明のみならず、ポストゲノム創薬において重要な課題であると考えられる。

2. 研究の目的

下垂体は、成長ホルモンやプロラクチン、黄体形成ホルモンといった多くのホルモンを分泌する神経内分泌器官であり、脳下垂体が腫瘍化すると下垂体腺腫となる。下垂体腺腫の症状としては、ホルモンの分泌亢進によるホルモン異常症候群となる。現在その治療法としては、外科的および放射線による治療法のみであり、医療現場においてその治療薬の創薬は必要な課題である。

血管よりクローニングされたエンドセリンA受容体は、近年前立腺癌の治療に有効な標的分子とされてきている受容体である。下垂体ホルモンの分泌においては、エンドセリンA受容体により、分泌の亢進と抑制の両方の作用を担うと考えられている (Bertram, R., Tabak, J., Toporikova, N., Freeman, M. E. (2006) *Sci. STKE* Vol.319, pe4.)。下垂体からのプロラクチンの放出において、エンドセリンA受容体を活性化すると、Gq蛋白質

の活性化に伴う脱顆粒反応が亢進され、プロラクチンの放出が促進される。しかし、本受容体の活性化によるGi蛋白質由来のβγサブユニットにより、プロラクチンの放出は阻害され、さらにGz蛋白質が活性化されることで、その放出は完全に抑制される。これらのことは、下垂体においてエンドセリンA受容体がGq, Gi, およびGzといった複数種のG蛋白質を活性化することを示唆しているが、未だその選択的活性化の制御機構については不明である。

さらにエンドセリンA受容体は、下垂体での発現とともに血管での発現が顕著であり、血管収縮に関与する受容体であるとされている。エンドセリンA受容体とG蛋白質との共役において、GqとGs蛋白質との共役、およびそれらの活性化が血管収縮に関与すると考えられている。Gq蛋白質の活性化は、細胞内カルシウム濃度の上昇により、血管等における平滑筋の収縮を惹起する。これに対してGs蛋白質の活性化は、細胞内cAMPの産生を促進することにより、内皮細胞における弛緩作用を誘導するとされている。これらのことより、血管においてエンドセリンA受容体が活性化されると、GqおよびGs蛋白質の両方の活性化を誘導するため、血管の収縮とともに弛緩も惹起されると考えられるが、実際には血管収縮にのみ作用している。このため血管において、エンドセリンA受容体は、G蛋白質を選択的に活性化していることが示唆されるが、その詳細については未だ不明である。

以上のことより、G蛋白質共役型受容体のなかでもエンドセリンA受容体に着目し、本受容体におけるGq, およびGs蛋白質の選択的活性化制御機構の解明に着手した。

3. 研究の方法

エンドセリンA受容体の発現量は、受容体と放射標識された [¹²⁵I]ET-1 との結合量より算出した。エンドセリンA受容体が発現した HEK-293 細胞もしくは CHO 細胞を、 [¹²⁵I]ET-1 と1時間反応させた。受容体と結合した [¹²⁵I]ET-1 を回収し、その放射量を測定することで、エンドセリンA受容体の発現量を算出した。

Gs蛋白質の活性化の評価には、細胞内cAMPの産生を指標として、ラジオイムノアッセイ法により測定した。エンドセリンA受容体が発現した HEK-293 細胞もしくは CHO 細胞を、cAMPの加水分解酵素であるフォスホジエステラーゼ阻害剤で前処理した後、アゴニストであるET-1と20分間反応させた。ラジオイムノアッセイ法により細胞内cAMP濃度を測定することで、Gs蛋白質の活性化を評価した。

Gq蛋白質の活性化の評価には、細胞内カルシウム濃度の変化を指標として、Fura-2/AMを用いたカルシウムイメージング法により測定した。エンドセリンA受容体が発現した HEK-293 細胞もしくは CHO 細胞にカルシウム指示薬である Fura-2 を取り込ませた後、アゴニストである ET-1 で刺激した際の蛍光の変化を、カルシウム顕微鏡を用いて解析した。Fura-2 は、カルシウムと結合することにより 340nm の、またカルシウムと結合していない状態では 380nm の波長の光で励起されるため、両波長による励起光による 500nm の蛍光を各々測定し、その比を算出することで細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。

プロスタグランジンEP3受容体の脂質ラフトへの局在化は、ウェスタンブロッティング法により解析した。プロスタグランジンEP3受容体が発現した COS-7 細胞を 0.1% triton X-100 を用いて可溶化し、可溶性画分と不溶性画分に含まれる受容体をそれぞれウェスタンブロッティング法により解析した。また 0.1% triton X-100 不溶性画分のみカベオリン-1が発現していることより、本画分は脂質ラフトである。

4. 研究成果

(1) エンドセリンA受容体によるGq蛋白質の脱感作機構

エンドセリン受容体を介した生理作用の複雑性により、異なるエンドセリン受容体の存在が示唆されてきており、エンドセリンA受容体の受容体サブタイプとしてエンドセリンB受容体がクローニングされた。しかし、下垂体でのG蛋白質の活性化様式、および脱感作様式の違いにより、我々はエンドセリンA受容体の新規スプライシングバリエーションのクローニングに成功している (Hatae, N., Aksentijevich, N., Zemkova, H. W., Kretschmannova, K., Tomic, M., Stojilkovic, S. S. (2007) *Mol. Endocrinol.* Vol.21, 1192-1204.)。このスプライシングバリエーションは、互いにC末端鎖のみが異なるにも関わらず、Gq蛋白質における脱感作能が異なることが明らかとなった。

そこで、エンドセリンA受容体によるGq蛋白質の脱感作機構について解析した。モチーフ解析の結果、エンドセリンA受容体は、全部で6箇所のプロテインキナーゼCによってリン酸化される部位を有する。このうち2箇所は細胞外ドメインに存在し、残りの4箇所は289, 373, 416, および420位に存在しており、本受容体には少なくとも4箇所のリン酸化サイトが存在することとなる。これら4箇所のうち289位を除く3箇所は、

現在報告のある哺乳動物のエンドセリンA受容体に保存されていたため、その機能的意義が推測された。そこで、これら4箇所のドミナント・ネガティブ体を作成し、その機能について解析することとした。

4種類の変異受容体におけるアゴニスト感受性について解析したところ、いずれも細胞膜上での発現、およびリガンド結合能に変化はなかった。また、エンドセリン-1によるGq蛋白質の活性化能について検討したが、どの変異受容体も、野生型と同じGq活性化能を有していた。これらることより、4種類のリン酸化サイトは、受容体の発現状態および活性化に影響しないことが示唆された。アゴニストによる長時間刺激により、エンドセリンA受容体によるGq蛋白質の活性化は脱感作することが知られている。そこで、これら変異受容体によるGq蛋白質の脱感作について解析した。373位のドミナント・ネガティブ体において、エンドセリン-1で連続刺激したところ、野生型では繰り返し刺激によるGq蛋白質の活性化が消失したのに対し、本変異受容体ではGq蛋白質の連続的活性化は消失しなかった。これらことは、受容体の373位のリン酸化により、Gq蛋白質と受容体との共役が遮断され、結果Gq蛋白質の脱感作に繋がるものと考えられる。さらに、プロテインキナーゼCの活性化剤であるホルボールエステルで受容体を全処理することにより、野生型受容体によるGq蛋白質の活性化は完全に遮断されたのに対し、373位のドミナント・ネガティブ体は、その遮断から回避されたことから、プロテインキナーゼCの活性化により、エンドセリンA受容体とGq蛋白質との共役が阻害されることが明らかとなった。

(2) エンドセリンA受容体によるGs蛋白質の活性化機構

エンドセリンA受容体は、Gq蛋白質とともにGs蛋白質とも共役し、活性化する受容体である。エンドセリンA受容体によるGs蛋白質の活性化を介した細胞内cAMP産生の経時変化について解析したところ、エンドセリン-1刺激後、約20分間Gs蛋白質の活性化が継続する。先の解析により、Gq蛋白質は持続的活性化が起こらないため、エンドセリンA受容体によるGs蛋白質の活性化機構は、Gq蛋白質のそれと異なる機構によるものと考えられる。そこで、本受容体を介したGs蛋白質の活性化機序について詳細に解析した。プロテインキナーゼCによる4箇所のリン酸化サイトのうち、373位のドミナント・ネガティブ体において、Gs蛋白質の活性化がほぼ完全に抑制された。このことは、受容体の373位がリン酸化を受けるこ

とで、G_s 蛋白質が活性化されることを示唆している。そこで、各種プロテインキナーゼ C の阻害剤で前処理した細胞を用いて、エンドセリン A 受容体を介した G_s 蛋白質の活性化について検討したところ、阻害剤により G_s 活性はほぼ完全に抑制された。G_q 蛋白質によりプロテインキナーゼ C は活性化されることより、エンドセリン A 受容体による G_s 蛋白質の活性化は、自身の受容体による G_q 蛋白質の活性化の後に引き起こされることが示唆された。

(3) プロスタグランジン E₂ 受容体による G_q 蛋白質の活性化機構

先の検討により、G 蛋白質共役型受容体の中でも、エンドセリン A 受容体における G_q 蛋白質と G_s 蛋白質の選択的活性化制御機構について解明した。そこで、さらに他の G 蛋白質共役型受容体においても、G 蛋白質の選択的活性化制御機構が存在するかについて、プロスタグランジン E₂ 受容体における制御機構についても解析することとした。

プロスタグランジン E₂ 受容体は、受容体欠損マウスを用いた解析により、発熱に関与する受容体とされており、解熱・鎮痛薬の創薬において標的とされる G 蛋白質共役型受容体である。マウスにおいてこれら受容体は、スプライシングの違いにより C 末端鎖の異なる 3 種のスプライシングバリエーションがクローニングされている。これらプロスタグランジン E₂ 受容体は、主に G_i 蛋白質と共役することが報告されているが、一部のスプライシングバリエーションには G_q 蛋白質の活性化が報告されており、その G 蛋白質の選択的活性化制御機構については、未だ不明である。

プロスタグランジン E₂ 受容体には、4 種の受容体サブタイプが存在するが、そのうちプロスタグランジン E₂ EP2 と EP4 は G_s 蛋白質と共役するため、これら受容体と G_i 蛋白質共役型プロスタグランジン E₂ EP3 受容体を共発現する肥満細胞などの免疫担当細胞においては、細胞内情報伝達が拮抗する関係となる。このため、互いの受容体間で細胞内情報伝達はクロストークしていることが考えられ、プロスタグランジン受容体群の共発現時における G 蛋白質の共役制御機構について解析したところ、プロスタグランジン E₂ EP2 と EP3 受容体を共発現させた COS-7 細胞において、EP3 受容体は G_i 蛋白質非依存的に EP2 受容体による cAMP 産生の増強を示した (Hatae, N., Yamaoka, K., Sugimoto, Y., Negishi, M., Ichikawa, A. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* Vol.290, 162-168.)。

プロスタグランジン E₂ 受容体による

G_i 蛋白質非依存的な cAMP 産生の増強作用は、ホスホリパーゼ C 阻害剤の全処理により阻害された。このことは、本受容体が G_q 蛋白質の活性化を介して、cAMP 産生の増強に寄与していることを示唆している。実際に COS-7 細胞において、プロスタグランジン E₂ EP3 受容体は、アゴニスト依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇を示したことより、通常の細胞で観られる G_i 蛋白質の活性化ではなく、G_q 蛋白質の活性化を惹起していることが明らかとなった。COS-7 細胞におけるプロスタグランジン E₂ EP3 受容体による G 蛋白質の共役変化は、他の G_i 共役型 κ オピオイド受容体を用いた場合には認められなかったことより、EP3 受容体に特異的な現象であることが示唆された。そこで、この G 蛋白質の共役変化の機構について、詳細に解明することとした。

近年、オピオイド受容体における脱感作機構の 1 つとして、細胞膜局在性の変化を伴うシグナル分子のアンカッピングが報告されてきている (Bayewitch, M. L., Nevo, I., Avidor-Reiss, T., Levy, R., Simonds, W. F., Vogel, Z. (2000) *Mol. Pharmacol.* Vol.57, 820-825.)。そこで、プロスタグランジン E₂ EP3 受容体においても、脂質ラフトにおける細胞膜局在性が、共役する G 蛋白質の選択性を制御しているかについて検討した。プロスタグランジン E₂ EP3 受容体による G_q 蛋白質依存的な cAMP 産生増強作用および細胞内カルシウム濃度の上昇は、ともに脂質ラフトの阻害剤である MβCD の添加により阻害された。さらにプロスタグランジン E₂ EP3 受容体の細胞膜における局在性を解析したところ、本受容体は脂質ラフトに特異的に存在するカベオリン-1 との共発現が確認された。これらることより、COS-7 細胞におけるプロスタグランジン E₂ EP3 受容体による G_q 蛋白質の選択的活性化は、本受容体が脂質ラフトに局在することによって引き起こされることが明らかとなった。

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 1 件)

Yamaoka, K., Yano, A., Kuroiwa, K., Morimoto, K., Inazumi, T., Hatae, N., Tabata, H., Segi-Nishida, E., Tanaka, S., Ichikawa, A., Sugimoto, Y. Prostaglandin EP3 receptor superactivates adenylyl cyclase via the Gq/PLC/Ca²⁺ pathway in a lipid raft-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有 (2009) 389(4), 678-682.

〔学会発表〕(計7件)

波多江典之, 岩村樹憲, Stojilkovic S. Stanko, エンドセリンA受容体における PKC 依存的な Gs 蛋白質の活性化機構の解明, 日本薬学会第130年会, 2010年3月28-30日, 岡山

波多江典之, 中村純, 奥島鉄雄, 山田容子, 岩村樹憲, フェナントロリンジオンによる抗腫瘍活性の解析, 第39回複素環化学討論会, 2009年10月14-16日, 千葉

波多江典之, アレニルエーテルの分子内スイッチング反応制御, 第25回若手研究者のための化学道場(師範講演), 2009年9月7-8日, 愛媛

Hatae, N., Iwamura, T., Tandem reaction to naphtho[1,8-*bc*]furan ring via intramolecular Diels-Alder reaction., 22nd International Congress on Heterocyclic Chemistry, Aug. 2-7 2009, Canada

波多江典之, 山田容子, 岩村樹憲, ヒト大腸癌由来 HCT-116 細胞に対するピレン-4,5-ジオンの抗腫瘍活性の解析, 日本薬学会第129年会, 2009年3月26-28日, 京都

波多江典之, 江寄啓祥, 兼松顯, 岩村樹憲, アレニルエーテルの分子内 Diels-Alder 反応を利用した naphtho[1,8-*bc*]furan 環骨格の構築, 第38回複素環化学討論会, 2008年11月21-23日, 広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波多江 典之 (HATAE NORIYUKI)

松山大学・薬学部・准教授

研究者番号: 30449912