

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：11301  
 研究種目：新学術領域研究  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21200007  
 研究課題名（和文） Gタンパク質共役型受容体シグナル複合体の細胞表面発現調節メカニ  
 ズムの解析  
 研究課題名（英文） Analysis of regulatory mechanism  
 s of cell surface expression of G protein-  
 coupled receptor signaling complex  
 研究代表者  
 助川 淳 (SUKEGAWA JUN)  
 東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
 研究者番号：30187687

研究成果の概要（和文）：多くの主要薬剤の分子標的として知られているGタンパク質共役型受容体(GPCR)分子が、細胞表面において正常に機能するためには、GPCRがリボソームで合成された後、受容体シグナル伝達分子複合体として細胞表面に効率的に輸送・発現されなければならない。本研究では、このGPCRの細胞表面への輸送過程が、GPCR分子のカルボキシ末端と相互作用する様々な細胞内タンパク質によって制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：G protein-coupled receptors (GPCRs) have been well known as molecular targets for many clinically important drugs. In order to function properly at cell surface, the receptors have to be transported efficiently as receptor-signaling molecule complexes to the cell surface after the GPCRs are synthesized at ribosomes. This research identified several cellular proteins that interact with carboxy-termini of GPCRs and showed that these interacting proteins regulate the transport and the cell surface expression of the cognate GPCRs.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2010年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2011年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
年度			
年度			
総計	23,200,000	6,960,000	30,160,000

研究分野：総合領域、複合新領域

科研費の分科・細目：神経科学、生物分子科学・神経化学・神経薬理学、生物分子科学

キーワード：神経伝達物質・受容体、活性発現の分子機構、受容体細胞表面発現

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Gタンパク質共役型受容体(GPCR)について：GPCRは、その活性異常がヒトの多くの病態の原因になっており、それらの疾病の薬物治療標的として最も注目されてきた分子群である。GPCRの活性を制御する試みは一部の薬剤において歴史的に大きな成功を

収めているが、大多数の他の薬剤においては標的GPCRへの特異性や効果の不完全さなど、種々の問題や制限を抱えている。一方、GPCRの活性については、従来、受容体分子そのものの活性、あるいはその制御が問題にされる事が一般的であったが、近年、受容体分子の細胞内における局在制御の問題が

注目されている。すなわち、多くの膜タンパク質で既に明らかになってきているように、リボソーム/小胞体(ER)においてmRNAから翻訳されたGPCR分子も自動的(デフォルト)に細胞表面へ輸送されるのではなく、ER/ゴルジ体を含む細胞内の膜タンパク質輸送系において、その細胞表面輸送が動的に制御されている事が明らかにされつつある。しかも、細胞表面へと向かう受容体輸送(トラフィッキング)の制御が、多くの受容体活性の最も大きな決定因子の一つである事が明らかになっている。さらに最近になって、この受容体分子トラフィッキングが、受容体のカルボキシ(C)末端細胞質内ドメインに結合する種々の細胞内タンパク質群によって制御されていることが明らかにされている。

(2)ヒスタミンH3受容体結合タンパク質、及びH3受容体の細胞表面発現について: 我々はこれまでに、ヒスタミンH3受容体のC末端細胞質内ドメインにCLIC4というタンパク質が特異的に結合する事、さらにCLIC4を過剰発現させると、H3受容体の細胞表面発現量が増加する事を明らかにしている。すなわち、CLIC4タンパク質は、H3受容体の細胞表面へと向かうトラフィッキングを促進する。また、H3受容体のCLIC4結合アミノ酸配列F...F..LLは、GPCR分子をERに残留させ、シグナルGタンパク質複合体のG $\gamma$ サブユニットのアセンブリーを促進する働きを持つとされるDRiP78タンパク質の受容体結合コンセンサス配列と類似しており、実際に我々は、DRiP78がインビトロにおいて単独でH3受容体に結合する事を確認した。さらに我々はこのアミノ酸配列には、同様にシグナルGタンパク質複合体のG $\beta$ サブユニットのシャペロンタンパク質であるPhLPもインビトロにおいて直接結合する事を予備実験において見出ししていた。

(3)GPCRのC末端細胞質内ドメインの共通アミノ酸配列について: H3受容体C末端の細胞質内ドメインに存在する、CLIC4/DRiP78/PhLP結合アミノ酸配列F...F..LLは、多くのGPCR分子に共通して保存されているものである。特に、アルツハイマー病の治療標的としても重要な意味を持っているムスカリン性アセチルコリン受容体M1、M2受容体にも存在し、これらの他の受容体にもCLIC4や、DRiP78、PhLPタンパク質が結合する可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、薬物治療標的として最も重要とされるGタンパク質共役型受容体(GPCR)、あるいは受容体活性発現のためのシグナルエフェクター分子であるヘテロ三量体Gタンパク質と会合したGPCRシグナル伝達分子複合体が、ERから細胞表面に輸送される分子メカニ

ズムを明らかにする事を目的とする。特に、ヒスタミンH3受容体を例にして、受容体C末端細胞質内ドメインに結合することが確認されたDRiP78タンパク質の機能を、受容体トラフィッキングとの関連において明らかにする。また、H3受容体C末端に結合する新たな細胞内タンパク質の探索・同定を進め、それらのタンパク質が結合する受容体のアミノ酸配列の同定、また、各タンパク質がH3受容体の細胞内トラフィッキングや、シグナル伝達に与える影響を明らかにする。さらにこれらのH3受容体結合タンパク質が、臨床的にも重要な意味を持っているムスカリン性アセチルコリン受容体M1、及びM2にも結合活性を持つ事を確認する。

## 3. 研究の方法

(1)cDNAクローニング: 実験に使用した遺伝子cDNAは、H3受容体を除き、すべてラット、あるいはマウス脳由来mRNAから、逆転写酵素を利用した、所謂RT-PCR法によってクローニングした。

(2)インビトロ結合反応: 受容体のC末端細胞質ドメインはGST融合タンパク質として、また受容体結合タンパク質はMBP融合タンパク質、あるいはFLAGタグを付加した形として大腸菌で産生した。各タンパク質を混合し4°Cでインキュベーション後、グルタチオン担体ビーズを利用してGST融合タンパク質を精製し、精製産物中の受容体C末端結合タンパク質の有無を解析した。受容体C末端結合タンパク質の存在は、抗MBP抗体を使用したウエスタンブロット法により確認した。

(3)培養細胞でのタンパク質発現系: 培養細胞におけるタンパク質発現には、各遺伝子cDNAを含んだ発現用プラスミドDNAのトランスフェクション法による導入、あるいはアデノウイルスベクターを利用した発現系を用いた。培養細胞としては、HEK293、CHO、HeLa、PC12細胞等を利用した。

(4)特異抗体の作成: 培養細胞における発現を確認するために、各タンパク質に対する特異的抗体を作成した。また、抗H3受容体抗体については、細胞表面に局在する受容体分子のみを検出する目的で、特に細胞外に存在する受容体ドメインを認識する抗体を作成した。

(5)細胞表面H3受容体量の測定: 24ウェルプレートに播種した細胞をフォルマリン固定後、5%NFD/0.1%BSA/PBS(-)中でブロッキングし、抗H3R抗体を反応させた。2次抗体としてHRP結合抗Ig抗体を用い、検出にはOPD試薬を使用し、492nmにおける吸光度をプレートリーダーにて測定した。また、PC12細胞の場合には、懸濁した細胞を用いて同様の処理を行い、2次抗体としてAlexaFluor488を付加した抗Ig抗体を用い、フローサイトメーターを使用して細胞の蛍光強度を測定した。細胞中の全H

3受容体量を測定する場合には、細胞固定後、0.01% TritonX-100による細胞膜透過処理を行った。

(6) タンパク質のユビキチン化測定: PC12細胞にHA-ユビキチン発現用プラスミドを導入し、48時間後に細胞溶解液を作成し、抗H3受容体抗体を使用して免疫沈降を行った。回収したタンパク質を電気泳動後、抗HA抗体を利用したウエスタンブロット法によって、ユビキチン化されたH3受容体タンパク質を解析した。また、プロテアソームインヒビターとしてMG132を使用した。

(7) 細胞内cAMP量測定: CHO細胞に、プロモーター領域にCRE配列を持つLuciferase発現用組み換えアデノウイルスを感染させた後、48時間後に実験を行った。H3受容体のリガンドであるRaMHと共に、アデニルサイクラーゼ活性化剤であるForskolinによって5時間細胞を刺激した後、細胞を溶解し、溶解液中に含まれるLuciferase活性を、ルミノメーターにて測定する事により、間接的に細胞内cAMP量を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 大腸菌で産生した融合タンパク質を利用したインビトロの実験系で、H3受容体のC末端細胞質内ドメインと結合する細胞タンパク質として、CLIC4、DRiP78の他、PhLP、及びCLIC6を新たに同定した。

(2) アミノ酸の変異体を利用した実験の結果、これらのタンパク質は、H3受容体のC末端細胞質内ドメイン上のほぼ同じ位置、すなわちHelix8と呼ばれる両親媒性の $\alpha$ ヘリックス構造に結合することが明らかとなった。

(3) 培養細胞においてDRiP78を過剰発現させる事により、細胞内の総H3受容体量が減少すること、さらに、その減少率以上に細胞表面の受容体が減少することが明らかになった。また、この減少によって、ヒスタミンによるH3受容体を介したシグナルが同様に減少することが確認された。

(4) DRiP78の過剰発現による細胞内の総H3受容体量減少は、通常膜タンパク質が分解されるリゾソーム系によるものではなく、タンパク質のユビキチン化を必要とするプロテアソーム系によるものである事が明らかになった。

(5) CLIC6が、H3受容体のC末端細胞質ドメインだけでなく、細胞内でH3受容体とヘテロダイマーを形成するとされているドパミンD1受容体のC末端とも結合する事が明らかになった。

(6) DRiP78とは異なり、培養細胞系においてPhLPの過剰発現によっては、細胞内の総H3受容体量、また細胞表面の受容体量に変化が見られない事を確認した。

(7) 培養細胞系において、CLIC4の過剰発現

により細胞表面のH3受容体は増加するが、ヒスタミンによるシグナル伝達には、それに見合った増加は認められなかった。

(8) CLIC6、DRiP78、およびPhLPのムスカリン性アセチルコリン受容体M1、及びM2に対する結合活性をインビトロで確認した所、すべて、野生型のM1、M2受容体のC末端に結合活性を有する事が明らかになった。

(9) M1、M2受容体のC末端アミノ酸配列の変異体を作成して調べてみると、M2受容体の結合様式は、H3受容体のそれと比較的良く似ている事が明らかになった。

以上の結果から、ヒスタミンH3受容体の細胞表面発現が、多くの細胞タンパク質との逐次的な相互反応によって制御されていること、またその制御系が単に受容体の細胞表面への輸送だけにとどまらず、受容体分子を中心としたシグナル伝達分子との複合体形成の制御メカニズムと密接に関係していることが示唆される。また、ヒスタミンH3受容体を代表とするGPCR分子のヘテロダイマー形成に、CLIC6の様な受容体C末端結合タンパク質が関与している可能性も明らかとなった。さらに、このようなGPCRのC末端結合タンパク質が、ムスカリン性アセチルコリン受容体M1、及びM2分子を始めとして、多くの臨床的にも重要な受容体の活性制御に関与している可能性が示された。今後、このような細胞表面受容体の細胞内トラフィッキングのメカニズム解明は、基礎生物学上の興味を超えて、ますます臨床的な応用を視野に入れた研究へと発展していく事が予想され、今後もしょうの進展が望まれるものである。

#### 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14件)

① Kuramasu A, Sukegawa J, Sato T, Sakurai E, Watanabe T, Yanagisawa T, Yanai K (2011) The hydrophobic amino acids in putative helix 8 in carboxy-terminus of histamine H(3) receptor are involved in receptor-G-protein coupling. Cellular Signalling, 23: 1843-1849. 査読有.

② Sakurai E, Kuramasu A, Watanabe T, Yanai K. (2009) Multiple histamine receptor gene knockout mice and their phenotypes. Inflammation Research 58, suppl 1: 41-42. 査読有.

[学会発表] (計26件)

① 助川 淳, 佐藤岳哉, 柳澤輝行, 「ヒスタミン H3 受容体結合タンパク質の受容体結合コンセンサス配列の解析」、第85回日本薬理学会年会、平成24年3月14日、京都。

- ② 佐藤岳哉、助川 淳、柳澤輝行、「PICK1 と GHRHR の相互作用は、GHRHR の細胞表面発現を制御する」、第 85 回日本薬理学会年会、平成 24 年 3 月 14 日、京都。
- ③ 倉増敦朗、「ヒスタミン H4 受容体を介するケモタキシスにおける低分子量 G タンパク質 Rac の関与」、第 85 回日本薬理学会年会、平成 24 年 3 月 14 日、京都。
- ④ 助川 淳、「G タンパク質共役型受容体細胞内トラフィック制御タンパク質の解析」、新薬理学セミナー2011、平成 23 年 9 月 30 日、仙台。
- ⑤ 佐藤岳哉、助川 淳、柳澤輝行、「GHRHR の Carboxy 末端に結合する PICK1 は、受容体の細胞表面発現を調節する」、第 84 回日本薬理学会年会、平成 23 年 3 月 23 日、横浜。
- ⑥ 助川 淳、佐藤岳哉、柳澤輝行、「DRiP78 interacts with the carboxy-terminus of histamine H3 receptor and decreases the expression of the receptor」、第 61 回日本薬理学会北部会、平成 22 年 9 月 10 日、札幌。
- ⑦ 助川 淳、佐藤岳哉、柳澤輝行、「ヒスタミン H3 受容体に結合する細胞内タンパク質の機能解析」、第 83 回日本薬理学会年会、平成 22 年 3 月 18 日、大阪。
- ⑧ 斎藤将樹、助川 淳、柳澤輝行、「副甲状腺ホルモン受容体機能に及ぼす Tctex-1 の役割の解明」、第 83 回日本薬理学会年会、平成 22 年 3 月 16 日、大阪。
- ⑨ 助川 淳、「ヒスタミン H3 受容体の細胞内トラフィック制御因子の解析」、第 37 回薬物活性シンポジウム、平成 21 年 10 月 9 日、仙台。
- ⑩ 斎藤将樹、「トロンボキサン A2 受容体における糖鎖修飾の生理的意義の解明」、第 60 回日本薬理学会北部会、平成 21 年 9 月 26 日、富山。
- ⑪ 斎藤将樹、「トロンボキサン A2 受容体を介したシグナル伝達に対する脂質ラフトの関与」、第 60 回日本薬理学会北部会、平成 21 年 9 月 26 日、富山。
- ⑫ 斎藤将樹、柳澤輝行、助川 淳、「副甲状腺ホルモン受容体機能に及ぼす Tctex-1 の役割の解明」、第 60 回日本薬理学会北部会、平成 21 年 9 月 26 日、富山。
- ⑬ 助川 淳、佐藤岳哉、柳澤輝行、「ヒスタミン H3 受容体に結合する細胞内タンパク質の機能解析」、第 60 回日本薬理学会北部会、平成 21 年 9 月 26 日、富山。
- ⑭ 助川 淳、佐藤岳哉、柳澤輝行、「Cell surface expression of histamine H3 receptor is regulated by proteins interacting with the carboxy terminus of the receptor」、10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilation (MOVD2009)、平成 21 年 6 月 3 日、宮城県松島。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

助川 淳 (SUKEGAWA JUN)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30187687

### (2) 研究分担者

佐藤 岳哉 (SATO TAKEYA)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10312696

倉増 敦朗 (KURAMASU ATSUO)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90302091

斎藤 将樹 (SAITO MASAKI)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50400271

### (3) 連携研究者

柳澤 輝行 (YANAGISAWA TERUYUKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90133941