

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590069

研究課題名（和文） シグナル伝達可視化によるアドレナリン β3 受容体特異的アゴニスト探索系の開発

研究課題名（英文） Visualization of β3 adrenoceptor signaling for development of ligand screening.

研究代表者

藤本 康之(FUJIMOTO YASUYUKI)

岩手医科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60317724

研究成果の概要（和文）：

アドレナリン β3 受容体は脂肪細胞に発現するアドレナリン受容体の 1 つであり、アドレナリン刺激を介した細胞内貯蔵中性脂質の代謝分解を担っている。このような観点から、アドレナリン β3 受容体を介したシグナルを可視的に検出するための系の構築をこころみた。アドレナリン β3 受容体、β arrestin2、perilipin 等の蛋白質を蛍光蛋白質との融合蛋白質として哺乳動物細胞に発現させ、蛍光の細胞内分布を観察することで受容体を介したシグナルの検出が可能となることが期待されたため、これらの遺伝子を培養細胞に導入した。

研究成果の概要（英文）：

β3 adrenergic receptor acts for transmission of adrenergic signaling on the cell surface of adipocytes activating hydrolysis of neutral lipids stored in the cells. In this study, I tried visualization of signaling mediated by β3 adrenoceptor. For this purpose, β3 adrenergic receptor, β arrestin2 and perilipin were fused with fluorescent proteins and expressed in mammalian cells. Distributions of fluorescence of these proteins were observed with microscopes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：アドレナリン受容体、蛍光、脂肪滴

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織は動物における主要な脂質貯蔵組織であり、脂肪細胞内では脂肪滴と呼ばれるオルガネラに中性脂質が蓄えられている。アドレナリン β3 受容体は脂肪細胞に発現する主要なアドレナリン受容体の 1 つであり、

アドレナリン等のアゴニストがこの受容体に作用すると、脂肪滴の中性脂質の代謝分解が促進される。したがって、アドレナリン β3 受容体のアゴニストは肥満等の生活習慣病の改善に役立つ可能性がある。このような観点から、本研究ではアドレナリン β3 受容体

を介したシグナルを視覚的に検出するための系の構築をこころみた。

アドレナリン β 受容体、perilipin、 β arrestin 等の蛋白質はアドレナリン刺激受容の際に特徴的な細胞内挙動を示すことが知られている。アドレナリン β 受容体は G_s 型の G protein-coupled receptor (GPCR) であるが、GPCR のいくつかについては、リガンドの結合に際して受容体が細胞表面から小胞へと移動する receptor internalization が生じることが知られていた。 β arrestin は GPCR に対する介在蛋白質であり、GPCR の受容体刺激に応じて細胞質から小胞表面に移動することが知られていた。perilipin は脂肪滴表面に局在する蛋白質であり、アドレナリン刺激によってリン酸化されて脂肪滴表面から解離することが知られていた。

このような事実に基づき、これらの蛋白質を蛍光蛋白質との融合蛋白質として細胞に発現させ、蛋白質の発する蛍光の細胞内分布を観察することで、生細胞におけるアドレナリン受容体シグナルを顕微鏡下で可視的に観察することができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

脂肪組織は生体内における主要な脂質貯蔵組織であり、体内の余剰なエネルギーをトリアシルグリセロールやコレステロールエステルなどの中性脂質として蓄えている。現代社会においては、食習慣の欧米化等の諸原因による生活習慣病が問題となっているが、肥満や高脂血症などの脂質異常症の発症メカニズムを明らかにするためには、脂肪細胞や肝細胞における脂質代謝の仕組みを理解することが重要である。

アドレナリン β 受容体は脂肪組織に発現するアドレナリン受容体であり、この受容体の刺激によって脂肪細胞に貯蔵された中性脂質分子が加水分解され、エネルギーが放出される。本研究では蛍光標識された蛋白質の細胞内動態を観察することによって、生細胞におけるアドレナリン刺激受容時のシグナルを可視的に検出する系を開発することを目標としている。このような系が開発できれば、アドレナリン β 受容体アゴニストの効率的な探索が可能となり、生活習慣病の解消に役立つ医薬品の開発への応用も期待される。

3. 研究の方法

human $\beta 3$ adrenergic receptor - RFP (red fluorescent protein) および human β arrestin2 - EGFP (enhanced green fluorescent protein) 等の融合遺伝子を哺乳動物細胞で発現させるための plasmid vector をチャイニーズハムスター由来の CHO 細胞

にリポフェクション法によって transfection し、発現された蛍光蛋白質の細胞内分布を蛍光顕微鏡を用いて観察した(緑色蛍光は β 励起を、赤色蛍光は G 励起を使用して観察)。

安定発現株の樹立のためには、G418 等の薬剤を培地に添加し、限界希釈して 96well plate で培養することによって細胞のクローニングを行い、蛍光顕微鏡観察によって蛍光陽性のクローンを選別した。得られた蛍光陽性クローンを培養して増やし、目的の安定発現株とした。

4. 研究成果

(1) $\beta 3$ adrenergic receptor 発現細胞の作成

生細胞における $\beta 3$ adrenergic receptor の細胞内分布の変化を追跡する目的で、human $\beta 3$ adrenergic receptor - EGFP を発現する細胞を作成した。そのために、発現用 plasmid をチャイニーズハムスター由来の培養細胞株である CHO 細胞に導入した。その結果、少なくとも一部の細胞に持続的に蛍光が観察されたので、安定発現株の単離をめざすことにした。これらの細胞について選択用抗生物質 G418 を培地に添加した状態で培養を継続し、適宜限界希釈を行うことで細胞のクローニングを行い、結果的に $\beta 3$ adrenergic receptor - EGFP を安定発現する細胞株を得た。樹立後の細胞では、細胞が適度に伸展した状態において細胞表面に緑色蛍光が確認されたことから、目的とする細胞が得られたと判断した(図 1C)。

(2) $\beta 3$ adrenergic receptor 及び β arrestin2 の細胞内分布

細胞内での $\beta 3$ adrenergic receptor と β arrestin2 の同時観察を目的として、human $\beta 3$ adrenergic receptor - RFP と human β arrestin2 - EGFP を発現させる plasmid を CHO 細胞に導入した。これらの遺伝子を一過的に発現させた際、蛍光顕微鏡で観察すると、RFP 融合蛋白質由来の赤色蛍光は細胞の周縁部に分布しており、この融合蛋白質が主に細胞膜に存在していることを示唆していた。これは、 $\beta 3$ adrenergic receptor 蛋白質に期待される細胞内分布と一致する結果であった。

一方、 β arrestin2 - EGFP 由来の緑色蛍光は細胞全体にわたって滑らかに分布しているのが観察され、この融合蛋白質が細胞質に存在しているものと考えられた。この点についても、 β arrestin2 の細胞内分布について報告されている結果と一致していた。一部の細胞では、2 色の蛍光がそれぞれ細胞表面と細胞内部とに分布しており、2 種類の蛋白質を同時に検出できていた(図 2)。

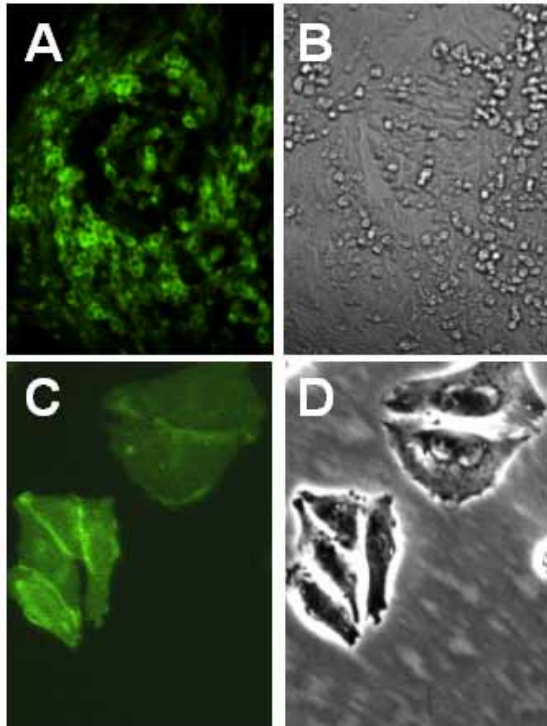


図 1 3 adrenergic receptor - EGFP 安定発現株の樹立

(A) human 3 adrenergic receptor - EGFP を発現する細胞のコロニーの 1 例、(B) A に対応した位相差像、(C) クローニング終了後の安定発現細胞における human 3 adrenergic receptor - EGFP の細胞内分布、(D) C に対応した位相差像。(C) では、細胞の境界付近に強い蛍光が認められる。

さらに、安定発現株を単離する目的で、上記のように一過的発現を行った細胞の培養を継続したが、時間経過にしたがって蛍光陽性細胞は次第に失われていき、1 週間程で蛍光陽性の細胞は見られなくなった。1 遺伝子の場合については、これまでに同様の手法によって、蛍光蛋白質融合遺伝子の安定発現株を多数樹立できていることから、リポフェクション法等の遺伝子導入方法に問題がある可能性は低く、今回デザインした融合蛋白質が細胞毒性等の有害作用を有しており、そのために細胞の生存に対して悪影響が生じたのではないかと考えた。

図 2 に示した実験の場合、human $\beta 3$ adrenergic receptor - RFP と human β arrestin2 - EGFP をそれぞれ EF1 promoter と CMV promoter を用いて同一の plasmid から発現させていたのだが、この場合、両方の遺伝子を同時に確実に細胞に導入できるメリットがあった。さらに、いずれの遺伝子の産物にも毒性等の問題が無ければ、

2 つの遺伝子の両方を発現する安定共発現株を 1 回のクローニング操作のみによって樹立できる期待もあった。しかしながら、このような同一 plasmid から発現させる場合には、2 つの遺伝子のうちのいずれか一方の産物に毒性等の問題が生じると、結果的に両方の遺伝子の発現が同時に失われてしまう（正確には、遺伝子発現細胞が死滅してしまう）リスクも有しており、この点が今回安定共発現株が得られなかった原因の 1 つとも考えられる。

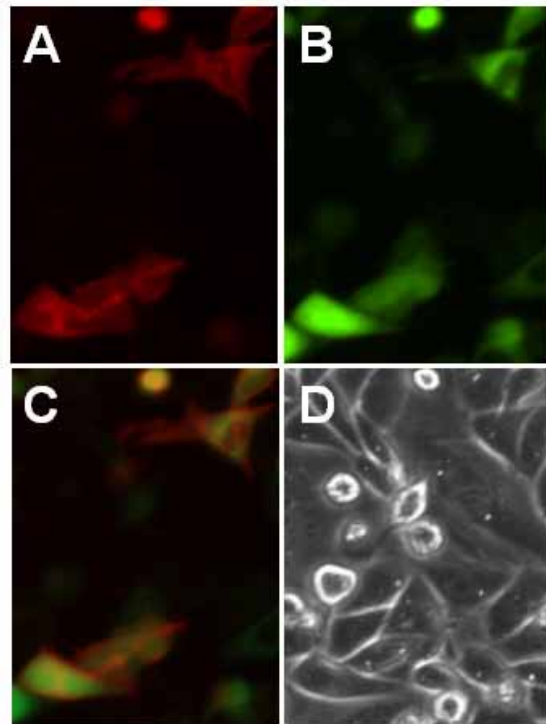


図 2 3 adrenergic receptor および arrestin2 の細胞内分布（一過的発現）

EGFP 由来の緑色蛍光、RFP 由来の赤色蛍光を蛍光顕微鏡によって検出した。(A) human 3 adrenergic receptor - RFP、(B) human β arrestin2 - EGFP、(C) A および B の重ね合わせ、(D) 位相差像。(C) では、緑色の蛍光の周囲を覆うように赤色蛍光が検出されており、3 adrenergic receptor が細胞表面に分布していることを示唆している。

図 1 に示したように、human $\beta 3$ adrenergic receptor - EGFP の安定発現細胞が既に得られていることから、今後の改善策としては、この安定発現株に β arrestin2 遺伝子を導入していくことが安定共発現株の樹立に有効なのではないかと考えている。ただし、 β arrestin2 との融合蛋白質として用いるべき蛍光蛋白質については、毒性の生じにくいものを見出す必要がある。

perilipin についても蛍光蛋白質との融合遺伝子の発現を検討したが、蛍光蛋白質に由来する蛍光は観察できなかった。原因は今のところ不明である。

岩手医科大学・薬学部・准教授
研究者番号：60317724

(2)研究分担者

(3)連携研究者

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2件)

Kojima N., Morioka T., Urabe D., Yano M, Suga Y., Maezaki N., Ohashi-Kobayashi A., Fujimoto Y., Maeda M., Yamori T., Yoshimitsu T. and Tanaka T. Convergent synthesis of fluorescence-labeled probes of Annonaceous acetogenins and visualization of their cell distribution. (2010) Bioorg. Med. Chem. 18 (24), 8630-8641. 査読有り DOI : 10.1016/j.bmc.2010.10.004

Fujimoto Y., Kamakura A., Motohashi Y., Ohashi-Kobayashi A. and Maeda M. Transporter associated with antigen processing-like (ABCB9) stably expressed in Chinese hamster ovary-K1 cells is sorted to the microdomains of lysosomal membranes. (2011) Biol. Pharm. Bull. 34 (1), 36-40. 査読有り DOI : 10.1248/bpb.34.36

[学会発表](計4件)

藤本康之、前田正知 ABC 輸送体 TAPL (ABCB9) の lysosome 局在化における N 末端領域の寄与 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月 8 日 神戸市

Maeda M. and Fujimoto Y. Lysosomal targeting of ABC transporter TAPL (Transporter Associated with Antigen Processing Like) 招待公演 BIT's 4th Annual Protein and Peptide Conference March 24, 2011, Beijing China

藤本康之、前田正知 ABC 輸送体 TAPL (ABCB9) の lysosome 局在化における N 末端領域膜貫通ドメインの寄与 第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 22 日 京都市

高橋翔太、荒木信、藤本康之、前田正知 *Escherichia coli* ATP 合成酵素変異型 c サブユニットの抑圧変異の解析 第 51 回日本薬学会東北支部大会 2012 年 10 月 7 日 青森市

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤本 康之(FUJIMOTO YASUYUKI)