

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 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010 年度～ 2012 年度

課題番号：22591008

研究課題名（和文） G タンパク質共役受容体の機能選択的活性化と疾患・制御

研究課題名（英文） G-protein coupled receptors: functional selectivity and disease

研究代表者

榎田 紀子 (MAKITA NORIKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60353455

研究成果の概要（和文）：今後の薬剤開発において重要となる GPCR シグナルにおける機能選択性について、疾患の解析と受容体作動薬の作用から検討した。具体的には、生体内で機能選択的に作動する Ca 感知受容体に対する自己抗体の作用、部分尿崩症の原因となる V2 受容体変異体に対する受容体作動薬の特異な作用、GPCR シグナルにおける機能選択的不活性化をターゲットとする薬剤や、クロストークの制御機構の解析をおこなった。

研究成果の概要（英文）：We examined functional selectivity of GPCR signalings, focusing on analysis of disease and ligand action against GPCRs: action of autoantibody working selectively against calcium-sensing receptor, unique action of ligands against novel V2 receptor mutants causing partial nephrogenic diabetes insipidus, drugs targeting selective inactivation, and cross-talk of GPCR signalings.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：受容体、G タンパク質、機能選択性、疾患、制御、G タンパク質共役受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 受容体シグナルの多様性と特異性の調節機構解明の重要性：多くのホルモン、循環調節因子、神経伝達物質は、細胞膜を 7 回貫通する共通構造を持つ、G タンパク質共役受容体に結合し、 $\alpha\beta\gamma$ 各サブユニットの多様性から潜在的には約 1000 種の異なる G タンパク質を活性化して作用を発揮する。作用機構の普遍性の一方で、受容体と G タンパク質の相互作用の特異性

決定とその調節機構は依然として明らかでない。

(2) G タンパク質共役受容体の Functionally Selective なシグナル調節：最近、レセプターの高次構造には多くの活性型が存在することが示され、レセプターの活性化サイクルの概念は大きく変貌している。

古典的モデルでは、レセプターの活性化→共役する複数の G 蛋白質/相互作用する

シグナル分子の同程度の活性化→脱感作が想定されてきた。対して、Multiple State Model では活性型も複数あるとする。その重要な支持データとして、本来活性化されるはずの複数のシグナル系の中である系のみが選択的に活性化されるデータが集積しつつある。これは、本来複数のシグナル系を活性化するレセプターを介して、選択的な活性化が可能であることを意味している（機能選択性：functional selectivity）。この制御は新しいG蛋白質シグナルの調節機構として注目されている。

2. 研究の目的

(1) 受容体の機能選択的 (Functionally selective な) 活性化の解析：

- ①Ca 感知受容体をモデルとする自己抗体の解析：後天性低カルシウム尿性高カルシウム血症において発見した Ca 感知受容体に対して機能選択性を示す自己抗体をモデルに、(a)ユニークな機能選択的活性化の分子メカニズムの解明をめざす。さらに、(b)この新規疾患において自己抗体のさらなる検索を行う。
- ②V2 バソプレッシン受容体変異体と作動薬の機能選択的調節：V2 受容体の活性型／不活性型変異は、SIADH 様疾患と尿崩症の原因となる。我々の発見した V2 受容体の新規遺伝子異常を解析する (S333 変異など)。(a)疾患メカニズムを解明し、V2 受容体をモデルに GPCR 活性化機構への示唆を得る。(b)GPCR の活性型変異体／不活性型変異体シグナルと V2 受容体作動薬の機能選択性を検討する。
- ③GPCR の分子間相互作用によるアロステリックな制御と機能選択性：種々の GPCR 分子間相互作用は、GPCR の高次構造の変化を介して、機能選択性に関連する可能性が想定されており、これを検証する。

(2) レセプターの活性化とシグナル分子の細胞内局在のイメージング：

種々のシグナルの機能選択的活性化は、シグナル分子の局在によって調節・決定されている可能性もある。受容体やGタンパク質の局在をイメージングし、作動シグナルの特異性との関連を検討する。

(3) GPCR 作動薬による機能選択的活性化／不活性化の検討：

Gタンパク質共役受容体作動薬における

機能選択性の検討は、今後の薬剤開発において重要な方向性となると考えられる。本来、複数のシグナルを作動させる受容体を介して、ある特定のシグナルを作動させることが可能になれば、好ましい作用をオンにし、副作用に関連するシグナルをオフに維持することができる。

3. 研究の方法

(1) 受容体の機能選択的 (Functionally selective な) 活性化の解析：

- ① Ca 感知受容体をモデルとする自己抗体の解析：(a)抗体の作用部位を、合成 Ca 感知受容体部分ペプチド、Ca 感知受容体変異体などを用いて検討する。(b)抗体の作用部位・作用機構の解明を目的とし、クローニングを行う。(c)後天性の高 Ca 血症 (尿中 Ca との乖離例) において、類似の自己抗体のスクリーニングを行う。
- ② V2 バソプレッシン受容体変異体と作動薬の機能選択的調節：(a)新規に発見した複数 V2 受容体変異体を作成、細胞に過剰発現することにより、過去の未解析変異体も合わせて下流のシグナルを解析する。(b)V2 受容体作動薬の機能選択性と変異体との特異的相互作用を、変異体の細胞膜への発現量、下流のシグナルを指標に検討する。

(2) レセプターの活性化とシグナル分子の細胞内局在のイメージング

機能選択性が GPCR の局在調節によるかを検討するため、受容体・Gタンパク質、arrestin 1,2 の細胞内局在とその変化の基礎検討を行い、病態と薬剤作用を視覚化することをめざす。

(3) GPCR 作動薬による機能選択的活性化／不活性化の検討：

受容体作動薬を複数のシグナルの中で特異なシグナルだけを選択的に作動させる機能選択性の視点で再評価する。

4. 研究成果

(1) 受容体の機能選択的 (Functionally selective な) 活性化の解析：

- ①Ca 感知受容体をモデルとする自己抗体の解析：(a)新たな後天性低 Ca 尿性高 Ca 血症症例で自己抗体の解析をおこなったところ、いずれも細胞外ドメインに作用し、カルシウム感知受容体の下流の Gq/PI turnover 経路は増強し、Gi/ERK 経路は減弱する biased allosteric modulator であることが分かった。本自己抗体が呈する biased な作用は、病態においてはあ

生体内において作動していることを示した世界で初めての例である(学会発表①②④)。(b)本自己抗体は力価によって重症の高カルシウム血症の原因となり、また同一症例においても、力価の変動に伴って病態が fluctuate することが確認された(学会発表①②③④)。

②V2バソプレッシン受容体変異体と作動薬の機能選択的調節:(a)新規に発見した部分尿崩症でのV2受容体変異(Y128S, S333del)は、partial defectを示し、V2受容体作動薬はpharmacochaperone作用でこれをrescueした(文献3)。(b)V2受容体作動薬は機能喪失性変異をrescueする一方、野生型を抑制した(文献3)。(c)V2受容体作動薬はprotean agonistとして作用することが明らかとなった(文献3)。

(2)レセプターの活性化とシグナル分子の細胞内局在のイメージング:

V2受容体作動薬の効果を検討する手法として、細胞膜特異的な受容体の発現とその機能を定量化するアッセイ(cAMP、cell surface ELISA)を確立した(文献3)。

(3)GPCR作動薬による機能選択的活性化/不活性化の検討:(a)臓器障害シグナルのスイッチオフの仕組みの1つであるRhoAシグナルとcAMPのクロストークのメカニズムとして、GDIのリン酸化の関与が明らかとなった(文献4)。(b) β アドレナリンシグナルの脱感作シグナルにおけるkeyであるGRK2がニトロシル化によって制御されていることを明らかにした(文献1)。

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11件)

1. Makita N, Kabasawa Y, Otani Y, Firman, Sato J, Hashimoto M, Nakaya M, Nishihara H, Nangaku M, Kurose H, Ohwada T, Iiri T. Attenuated desensitization of β -adrenergic receptor by water-soluble N-nitrosamines that induce S-nitrosylation without NO release. *Circ Res.* (査読有) 112:327-34, 2013
2. Makita N and Tiiri T. Tyrosine kinase induced thyroid disorder-review and hypothesis *Thyroid* (査読有) 23:151-9, 2013
3. Takahashi K, Makita N (equally contributed), Manaka K, Hisano M, Akioka Y, Miura K, Takubo N, Iida A, Ueda N, Hashimoto M, Fujita T, Igarashi T, Sekine T, Iiri T. V2 vasopressin receptor (V2R) mutations in partial nephrogenic diabetes insipidus highlight protean agonism of V2R antagonists. *J Biol Chem.* (査読有) 287: 2099-106, 2012
4. Oishi A, Makita N, Sato J, Iiri T Regulation of RhoA signaling by the cAMP-dependent phosphorylation of RhoGDIa *J Biol Chem.* (査読有) 287:38705-15, 2012
10.1074/jbc.M112.401547
5. Ueda K, Makita N, Kawarazaki H, Fujiwara T, Unuma S, Monkawa T, Hayashi M, Fujita T. A novel compound heterozygous mutation of Gitelman's syndrome in Japan, as diagnosed by an extraordinary response of the fractional excretion rate of chloride in the trichlormethiazide loading test. *Intern Med.* (査読有) 51: 1549-53, 2012
6. Makita N, Isojima T, Hiwatari M, Kitanaka S, Ida K and Iiri T. Painful thyroiditis and subsequent atrophic hypothyroidism after cord blood transfusion. *Thyroid* (査読有) 21: 1157-8, 2011
7. Manaka K, Makita N, Iiri T Angiotensin receptor 1b *AfCS Nature* The signaling gateway Molecule Pages. (doi: 10.1038/mp.a000276.01) 2011
8. Makita N, Miyakawa M, Fujita T, Iiri T. Sunitinib induces hypothyroidism with a markedly reduced vascularity. *Thyroid* (査読有) 20: 323-6, 2010
9. Horii M, Makita N, Andoh T, Takiyama H, Yajima Y, Sakatani T, Fukumoto S, Iiri T, Fujita T. Long-term clinical course of IgG4-related systemic disease accompanied by hypophysitis. *Endocr J.* (査読有) 57: 485-92, 2010
10. Suzuki HI, Hosoya N, Miyagawa K, Ota S, Nakashima H, Makita N, Kurokawa M. Erdheim-Chester disease: multisystem involvement and management with interferon-alpha. *Leuk Res.* (査読有) 34: e21-4, 2010

〔学会発表〕（計 18 件）

- ① 榎田紀子、受容体シグナル調節機構とその分子異常を基盤とする疾患メカニズムの解明、第 86 回日本内分泌学会学術総会（招待講演）、仙台、4/26、2013
- ② 飯利太朗、榎田紀子、佐藤潤一郎：カルシウム感知受容体と自己抗体-biased signaling and allostery、第 85 回日本生化学会（招待講演）、福岡、12/15、2012
- ③ 榎田紀子、安藤隆雄、佐藤潤一郎、間中勝則、村上聡子、堀江一郎、大石篤郎、矢嶋由紀、橋本真紀子、川上純、藤田敏郎、飯利太朗：著明な高カルシウム血症を呈した後天性低カルシウム尿性高カルシウム血症（AHH）において発見された自己抗体の解析と治療、第 85 回日本内分泌学会学術総会、名古屋、4/21、2012
- ④ 飯利太朗：G タンパク質共役受容体の新しいパラダイム-Biased signaling and allostery、第 85 回日本薬理学会年次総会（招待講演）、京都、3/14、2012
- ⑤ 榎田紀子、間中勝則、佐藤潤一郎、大石篤郎、矢嶋由紀、橋本真紀子、関根孝司、藤田敏郎、飯利太朗：部分腎性尿崩症と V2 受容体変異-リガンドの新規作用機構と治療への展望、第 84 回日本内分泌学会学術総会、神戸、4/22、2011
- ⑥ Iiri T, Makita N. Vasopressin V2 receptor mutants in partial nephrogenic diabetes insipidus, Gordon Research Conference, Ventura (USA), 1/10, 2011

〔図書〕（計 8 件）

- ① 榎田紀子：西村書店、最新内科学-甲状腺総論、2012、1181-1184
- ② 榎田紀子、飯利太朗：西村書店、最新内科学-甲状腺中毒症、2012、1184-1189
- ③ 榎田紀子、飯利太朗：医学図書出版、泌尿器外科、分子標的薬の副作用マネジメントのコツ、2012、2127-2138
- ④ 飯利太朗、榎田紀子：医歯薬出版、医学のあゆみ、最新 G タンパク質共役受容体研究（総ページ数 290）2010、773-783

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：Gs 共役受容体に対する医薬品候補化合物をスクリーニングする方法
発明者：飯利太朗、榎田紀子
権利者：飯利太朗、榎田紀子
種類：特願
番号：2011-230569
出願年月日：2011 年 11 月 20 日
国内外の別：国内

名称：βアドレナリン受容体医薬品候補化

発明者：飯利太朗、榎田紀子

権利者：飯利太朗、榎田紀子

種類：特願

番号：2010-241688

出願年月日：2010 年 10 月 28 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.todai-jinnai.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎田 紀子 (MAKITA NORIKO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60353455

(2) 研究分担者

飯利 太朗 (IIRI TARHO)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：90313022

(3) 連携研究者

なし