

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590067

研究課題名(和文)7回膜貫通型受容体の表在量制御を目指した基盤研究

研究課題名(英文)Fundamental research for quantitative control of the surface GPCRs

研究代表者

中村 元直(Nakamura, Motonao)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40431762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：GPCRの細胞表在量の制御において有益な以下の知見を得た。(1)N型糖鎖修飾を有さないGPCR(アドレナリン 2B受容体等)の存在を示唆し、これらもER内で品質管理を受けて搬出制御されることを明らかにした。(2)ロイコトリエンB4第一受容体(BLT1)はC末端に一箇所のモノユビキチン修飾部位を有することを見出し、その責任リガーゼ候補をUb-split 酵母2-ハイブリッド法により得た。(3)BLT1は恒常的及びリガンド誘導的な2種のリン酸化修飾を受けることを見出し、その修飾部位を決定した。これらユビキチン及びリン酸化修飾のBLT1細胞内輸送(リサイクル/分解制御)への関与を現在進めている。

研究成果の概要(英文)：In this program, we have obtained several useful results required for the quantitative control of surface GPCRs. (1) GPCRs lacking N-glyco-modification (e.g., alpha-2B adrenergic receptor) also receive the quality control by ERAD system in the ER, resulting in the regulation for the surface trafficking of the receptor. (2) We confirmed the conjugation of mono-ubiquitin (mono-Ub) to the lysine residue in the C-terminus of leukotriene B4 type-1 receptor (BLT1). Moreover, we identified the candidate Ub-ligase by the Ub-split yeast two-hybrid system using the full length of BLT1 as a bait (unpublished). (3) We determined the basal and ligand (LTB4)-induced phosphorylation sites in BLT1. The biological significance of both modifications (mono-ubiquitination and phosphorylation) in the intracellular trafficking of BLT1 is under investigation in our group using mutant BLT1s lacking these modifications.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学 生物系薬学

キーワード：G蛋白質共役型受容体 品質管理 細胞内輸送 翻訳後修飾 リン酸化 ユビキチン化 糖鎖修飾

1. 研究開始当初の背景

GPCRの創薬標的としての魅力的には疑う余地がなく、多くの製薬企業がアゴニスト、アンタゴニスト開発にしのぎを削っている。一方で、GPCRはリガンド結合による単純なON/OFF制御では説明できないほど難解な分子であることも判ってきた。例えば最近、申請者はGPR20がリガンド無関係に活性化状態にあり、Gi蛋白質を恒常的に活性化することで細胞内cAMP量を制御していることを明らかにした (Hase et.al. *J.Biol.Chem.* 2008)。申請者は新たなGPCR制御コンセプトとして、細胞膜上の標的GPCRの量的制御を考え、そのための基盤研究の1つとして、GPCR遺伝子発現制御やER内の品質管理、ER搬出機構、さらには、活性化後の修飾やリサイクル/分解制御機構の解明を提案する。こうした研究は、リガンド探索、遺伝子改変マウスの解析やシグナル伝達解明に続く次世代のGPCR研究課題と位置付けられる。

2. 研究の目的

申請者が目指すものは、G蛋白質共役型受容体(GPCR)の遺伝子発現制御、小胞体(ER)での品質管理、搬出制御、さらには活性化後の修飾やリサイクル/分解制御を知り、こうした**GPCRの総合的基盤研究**から得られた知見を標的GPCRの細胞表面発現量のコントロールに結びつけることである。GPCRを標的とする創薬において、表在GPCRの量的制御はアゴニスト、アンタゴニストによる機能制御に加え、今後注目されるべきコンセプトと言える。

3. 研究の方法

以下の4つの研究を進める。(1)血球系細胞に特異的発現するGPCRに着目し、その発現制御を解明する。まずは、プロモーター、エンハンサー領域の解析を行い、転写制御を考えた場合の標的探索や発現制御可否検討を行う。(2)糖鎖修飾モチーフを持たないGPCRを材料とし、この希少な膜蛋白質のER品質管理、搬出機構について解析する。例のない糖

鎖非依存的な品質管理機構の存在を示唆すると共に、この品質管理に関与する蛋白質群の同定を目指す。(3)最近申請者が見出した新たなN型糖鎖付加モチーフに関し、品質管理との関連も含め、その重要性を検討する。(4)表在GPCRの細胞内取込み、リサイクル/分解等の引金となるユビキチン化およびリン酸化修飾を解析し、GPCRの活性化後細胞内輸送との関連を調べる。

4. 研究成果

GPCRの細胞表在量の制御において有益な以下の知見を得た。(1)ロイコトリエンB4第一受容体(BLT1)のプロモーター解析に関しては、血球系細胞株(HL60)において、プロモーター領域に結合する因子の解析を行い、Sp1以外にKLFファミリーの何れかが結合して活性化に寄与していることを示唆した。(2)N型糖鎖修飾を有さないGPCR(アドレナリンα2B受容体等)の存在を示唆し、これらもER内で品質管理を受けて搬出制御されることを明らかにした。(3)BLT1はC末端に一箇所のモノユビキチン修飾部位を有することを見出し、その責任リガーゼ候補をUb-split酵母2-ハイブリッド法により得た。(4)BLT1は恒常的及びリガンド誘導的な2種のリン酸化修飾を受けることを見出し、その修飾部位を決定した。これらユビキチン及びリン酸化修飾のBLT1細胞内輸送(リサイクル/分解制御)への関与を現在進めている。

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7件)すべて査読有

1. Sumida,H., Yanagida,K., Kita,Y., Abe,J., Matsushima,K., Nakamura,M., Ishii,S., Sato,S., and Shimizu,T.: Pathogenic role of CXCR2/BLT1-driven neutrophil infiltration for induction of psoriatic skin inflammation. *J.Immunol.*, (2014), *in press.*
2. Taketomi,Y., Ueno,N., Kojima,T., Kawana,M., Tanaka,S., Sakanaka,M., Nakamura,M., Sato,H., Nishito,Y., Kambe,N., Yamamoto,K., Gelb,M.H., Arita,M.,

Yokomizo,T.,Watanabe,K.,Nakamura.M., Shimizu,T., Hirai,H., Aritake,K., Urade,Y., Morimoto,K., Sugimoto,Y., Narumiya,S., Hara,S., and Murakami,M. : PLA2G3, a mammalian homolog of anaphylactic phospholipase A2 in bee venom, facilitates proper maturation of mast cells through the paracrine PGD2 loop. *Nature immunology*, (2013) 14, 554-566.

3. Taygerly,J.P., McGee,L.R., Rubenstein,S.M., Houze,J.B., Cushing,T.D., Li,Y., Motani,A., Chen,J-L., Frankmoelle,W., Ye,G., Learned,M.R., Jaen,J., Miao,S., Timmermans,P.B., Thoolen,M., Kearney,P., Flygare,J., Beckmann,H., Weiszmann,J., Lindstrom,M., Walker,N., Liu,J., Biermann,D., Wang,Z., Hagiwara,A., Iida,T., Aramaki,H., Kitao,Y., Shinkai,H., Furukawa,N., Nishiu,J., and Nakamura.M. : Discovery of INT131: a selective PPAR γ modulator that enhances insulin sensitivity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. (2013) 21, 979-992.

4. Nakamura.M., Yasuda,D., Hirota,N., Yamamoto,T., Yamaguchi,S., Shimizu,T., and Nagamune,T. : Amino acid residues of G-protein coupled receptors critical for endoplasmic reticulum export and trafficking., *Methods in Enzymol.*, (2013) 521, 203-216

5. 安田大恭、中村元直 : 特異的リガンドによる小胞体蓄積 GPCR の細胞膜への搬出、生化学、85、p1007-1012 (2013)

6. Echigo,R., Shimohata,N., Karatsu,K., Yano,F., Kayasuga-Kariya,Y., Fujisawa,A., Ohto,T., Kita,Y., Nakamura.M., Suzuki,S., Mochizuki,M., Shimizu,T., Chung,U-i., and Nobuo Sasaki,N. : Trehalose treatment suppresses inflammation, oxidative stress, and vasospasm induced by experimental subarachnoid hemorrhage. *J. Translational Medicine*, (2012) Apr 30, 10:80.

7. Yoshida,T., Kakegawa,J., Yamaguchi,T., Hantani,Y., Okajima,N., Sakai,T., Watanabe,Y., and Nakamura.M. :

Identification and characterization of a novel chemotype MEK inhibitor able to alter the phosphorylation state of MEK1/2. *Oncotarget*, (2012) 3, 1533-1545.

〔学会発表〕(計 9件)

1. Yoshimitsu Nakanishi, Keisuke Yanagida, Takao Shimizu, and Motonao Nakamura, “Analysis of human leukotriene B₄ type 1 receptor phosphorylation sites by Phos-tag SDS-PAGE “ Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases, 13th International Conference, Nov. 4, 2013, San Juan, Puerto Rico
2. 中村元直、清水孝雄；膜リン脂質代謝と脂質メディエーター受容体の新展開、2012年度日本農芸化学会大会、シンポジウム、2013、3/25、京都
3. 安田大恭、井村裕己、石井聡、清水孝雄、中村元直；ニコチン酸受容体 GPR 109A が有する N 型糖鎖付加のための非 sequon 配列の重要性について、日本生化学会年会、2012、12/14-16、福岡（国際会議場）
4. 中西由光、清水孝雄、中村元直；Phos-tag SDS-PAGE 法を用いたロイコトリエン B₄ 第一受容体(BLT1)におけるリン酸化部位の解析、日本生化学会年会、2012、12/14-16、福岡（国際会議場）
5. 歌代奈和、井村裕己、安田大恭、石浦章一、清水孝雄、中村元直；N 型糖鎖がない $\alpha 2 B$ アドレナリン受容体の小胞体内品質管理について、日本生化学会年会、2012、12/14-16、福岡（国際会議場）
6. 吉田（橋立）智美、清水孝雄、中村元直；ロイコトリエン B₄ 第一受容体の遺伝子発現調節機構の解明、日本生化学会年会、2011、9/21-24、京都（国際会議場）
7. 堀哲也、菅原光明、中村元直、横溝岳彦、清水孝雄、宮野雅司；結晶化のためのロイコトリエン B₄ 受容体(BLT1)の熱安定性と抗 BLT1 モノクローナル抗体の作製、日本生化学会年会、2011、9/21-24、京都（国際会議場）
8. 井村祐己、清水孝雄、中村元直；G 蛋白質

共役型受容体ファミリーにおける N 型糖鎖修飾の小胞体搬出に及ぼす影響、日本生化学会年会、2011、9/21-24、京都（国際会議場）
9. 宮崎陽造、吉田（橋立）智美、清水孝雄、中村元直；短鎖脂肪酸を認識する G 蛋白質共役型受容体の血球内での発現制御に関する解析、日本生化学会年会、2011、9/21-24、京都（国際会議場）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 元直 (Nakamura, Motonao)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：40431762

(2)研究分担者

なし ()

(3)連携研究者

なし ()