

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590311

研究課題名(和文)GPCRシグナル複合体の細胞内配置に関する時空間制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of spatio-temporal regulation of the intracellular configuration of GPCR-signaling complex

研究代表者

柳澤 輝行 (Yanagisawa, Teruyuki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90133941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は細胞表面に局在し、細胞外環境の情報を細胞内へ情報伝達する。その後GPCRは、細胞内へ内在化するが、それを制御する各種細胞質内タンパク質群の存在する。これらのタンパク質によるGPCRの局在制御がGPCR活性制御に必須であるが不明な点が多い。今回、GPCRの一つ、成長ホルモン放出ホルモン受容体(GHRHR)の細胞表面発現および情報伝達機構制御についてGHRHRと相互作用するPICK1の影響を検討した。PICK1がGHRHRの細胞表面発現や細胞内情報伝達を制御し、さらにこの相互作用がヒト前立腺ガン細胞LNCaPにおいて細胞増殖を制御することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：G-protein coupled receptors are located at the cell surface to transduce the extracellular information into the cells by converting it as a second messenger. Following transducing the signal, GPCR are sequestered from the cellular surface by interacting with many cytoplasmic proteins. These GPCR-interacting proteins (GIPs) are crucial for the regulation of the intracellular localization and the signaling of GPCR, however, the mechanisms of the regulation between the GIPs and GPCR remained unresolved. We have focused on one of the GPCR, growth hormone releasing hormone receptors and its interacting protein, PICK1. We have found that PICK1 regulated the cell surface expression and the intracellular signaling of GHRHR. Furthermore, the interaction of PICK1 with GHRHR could regulate the cellular proliferation of human prostate adenocarcinoma cells, LNCaP.

研究分野：薬理学

キーワード：受容体 チャンネル 輸送系 シグナル情報伝達系

## 1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は細胞表面に局在し、光子からタンパク質まで種々の特異的なリガンドを結合することにより、情報伝達変換装置として重要な分子群である。そのため、これら分子群の異常はヒトの多くの疾患の原因となり、この受容体の活性を制御する薬物が、種々の疾患に対する治療薬として開発され成功を収めてきた。しかしながら、薬物の標的GPCRへの特異性、組織選択性、その効果の不完全さなど、種々の問題が残っている。一方、GPCRがER/ゴルジ装置で生合成された後、細胞表面に局在し、細胞外からの情報を細胞内へと情報変換し伝達した後、細胞内へ内在化するダイナミックな細胞内輸送を制御する各種細胞質内タンパク質群の機能構築の存在が明らかになってきた。すなわち、GPCRの活性制御は、受容体に結合するリガンドによる細胞表面GPCR活性制御ばかりでなく、細胞全体におけるGPCRと相互作用する各種タンパク質の局在制御も必須であると考えられる。

本申請研究では、我々のグループが着目し研究を継続してきたGPCRの一つ、成長ホルモン放出ホルモン受容体(GHRHR)の細胞表面発現機構制御について、この受容体と相互作用する分子の結合機序および受容体からのシグナリング伝達における影響を詳細に解析することで明らかにしたいと考えている。

## 2. 研究の目的

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)分子は、薬物治療標的として最も重要である。この分子とエフェクター・調節分子との複合体の形成、細胞内輸送機構の制御機構が、新たな創薬のターゲットとなりつつある。本研究では、GPCRである成長ホルモン放出ホルモン受容体(Growth Hormone Releasing Hormone Receptor: GHRHR)および申請者が新規に見いだしたこの受容体と相互作用するタンパク質 PICK1 を

例にして、GPCRシグナル複合体の細胞内輸送制御機構を、明らかにし、新規な創薬の基盤を築く。

## 3. 研究の方法

(1) 免疫沈降実験による GHRHR と PICK1 の *in vivo* における相互作用の確認

GHRHR と PICK1 の相互作用検討のための遺伝子発現細胞系の確立

GHRHR と PICK1 の相互作用の有無による細胞表面に局在する GHRHR の受容体数の経時変動の検討

(2) GHRHR のシグナル伝達における PICK1 の影響に関する検討

GHRHRはGsタンパク質共役し、リガンド(GHRH)刺激でセカンドメッセンジャーであるcAMP産生を亢進し、また細胞増殖に關与するMAPキナーゼ系を活性化することが知られている。GHRH刺激後、受容体からの複数のシグナル伝達の経時変化においてGHRHRとPICK1との相互作用がどのように影響を与えているかを検討する。この実験に用いる細胞は前項で構築した細胞系を用いる。

cAMP系シグナルの計測。

ERK系シグナル伝達系の計測

(3) LNCaPにおけるGHRHR-PICK1の相互作用が細胞増殖に与える影響

## 4. 研究成果

(1) 免疫沈降実験による GHRHR と PICK1 の *in vivo* における相互作用の確認  
本研究のために作製した抗 GHRHR 抗体および抗 PICK1 抗体を用いた。ラット副腎皮質由来細胞の PC12、ヒト前立腺由来ガン細胞の LNCaP、ラット脳より調製した細胞あるいはラット脳抽出液を用い、PICK1 に対する特異抗体を使用して免疫沈降を行う。この免疫沈降物に GHRHR が含まれることを、抗 GHRHR 抗体を用いるウェスタンブロット法にて検証し、GHRHR と PICK1 の相互作用が生体内に

においても起きていることを確認できた。

GHRHR と PICK1 の相互作用検討のための遺伝子発現細胞系の確立

GHRHR および PICK1 の cDNA を搭載した組換えレンチウィルスを作製した。

このウィルスを培養細胞 CHO-K1 細胞に感染させ、遺伝子導入を行った。遺伝子導入した細胞における導入遺伝子の確認は、各導入遺伝子産物である GHRHR や PICK1 に対する特異抗体を用いる Western blot 法にて確認した。

(2)GHRHR のシグナル伝達における PICK1 の影響に関する検討

cAMP 系シグナルの計測

GHRH 刺激による GHRHR の活性化に伴い濃度が上昇する cAMP に応答してレポーター遺伝子の発現が変化するレポータープラスミド pGL4.29 を(1) で作製した細胞にトランスフェクションした。

この細胞を無血清培地で 12 時間、前処置を行った後、1pM から 100 nM の GHRH で 6 時間刺激した。細胞内 cAMP 濃度の変化に応答して遺伝子発現が増加するレポーター遺伝子ルシフェラーゼの酵素活性を測定することで GHRH による受容体活性化能を評価した。この結果、受容体全長を発現する細胞に対し受容体全長と PICK1 が発現する細胞においては、cAMP の最大反応が 15%低下した。一方、受容体の C 末端 4 アミノ酸が欠失した物では、cAMP の最大反応が 20%亢進した。これらの結果は、GHRH 刺激による cAMP 上昇は、受容体を介する反応であり、受容体の C 末端、および受容体と PICK1 の相互作用が、GHRH 刺激により受容体の活性化を調整していることがわかった。

GHRHR と PICK1 の相互作用の有無による細胞表面に局在する GHRHR の受容体数の経時変動の検討

受容体および PICK1 を発現する細胞を一定時間 GHRH 刺激を行い、その後細胞を

フォルマリン固定し、細胞表面に発現する GHRHR 量を抗 GHRHR 抗体を用いる蛍光抗体免疫染色を施し、細胞に結合した蛍光標識二次抗体の量をフローサイトメトリーを用いて定量した。その結果、GHRHR と PICK1 の相互作用があると、GHRHR の細胞発現量を有意に遅延させることが明らかになった。さらに GHRHR の C 末端を欠損させ PICK1 との相互作用しないものでは、GHRHR の細胞表面発現量は GHRH 刺激によらず変化しなかった。これは、GHRHR の C 末端部分に受容体の局在を制御する細胞内因子が結合し、受容体の時空間的細胞内局在制御している事を意味する。GHRHR は GHRH 刺激により一時的に内在化するが、PICK1 は内在化した受容体の細胞表面へのリサイクリング過程において Endosome の細胞内輸送を制御する分子であり、本研究で観察された GHRHR と PICK1 の両者が存在するときに GHRHR 単独の物と比べて GHRH 刺激後の受容体の細胞表面発現が遅延したことは、PICK1 が上述の作用を示し、GHRHR の細胞発現を制御している事を意味すると考えている。

さらに本検討をすすめるために PICK1 分子内にある BAR ドメインに点突然変異あるいは欠失させた変異体を作製した。この変異体を用いる GHRHR の細胞表面発現への影響については、現在解析中である。

(3) LNCaP における GHRHR-PICK1 の相互作用が細胞増殖に与える影響

これまでの研究で GHRHR と PICK1 の相互作用が受容体の細胞内情報伝達の効率や受容体の細胞内局在を制御している事が判っている。この相互作用がヒト前立腺がん由来細胞 LNCaP において細胞増殖に影響を与えると考え、検討を行った。LNCaP は GHRHR および PICK1 を内在性に発現していた。また GHRH 依存性の細胞増殖を示した。そこ

で細胞増殖に係る細胞内情報伝達系 ERK シグナリング系に対する影響を検討した。PICK1 の遺伝子導入で PICK1 の発現量を亢進させると GHRH 刺激による ERK シグナリング系が減弱し、細胞増殖能も低下した。また、PICK1-RNAi により内在性 PICK1 の発現量を減少させると ERK シグナリング系の亢進と細胞増殖能の亢進が観察された。これらの結果から、GHRH と相互作用する PICK1 の遺伝子発現量を調節することで GHRH 依存性細胞増殖をしめす LNCaP の細胞増殖能を制御できる可能性を見いだした。

#### 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 7 件)

1. Suzuki T, Yamaguchi H, Kikusato M, Matsushashi T, Matsuo A, Sato T, Oba Y, Watanabe S, Minaki D, Saigusa D, Shimbo H, Mori N, Mishima E, Shima H, Akiyama Y, Takeuchi Y, Yuri A, Kikuchi K, Toyohara T, Suzuki C, Kohzuki M, Anzai J, Mano N, Kure S, Yanagisawa T, Tomioka Y, Toyomizu M, Ito S, Osaka H, Hayashi K, Abe T. Mitochondrial acid 5 (MA-5), a derivative of the plant hormone indole-3-acetic acid, improves survival of fibroblasts from patients with mitochondrial diseases. *Tohoku J Exp Med.* 236, 225-232 (2015). (査読あり) 10.1620/tjem.236.225.
2. Murakami M, Yoshikawa T, Nakamura T, Ohba T, Matsuzaki Y, Sawamura D, Kuwasako K, Yanagisawa T, Ono K, Nakaji S, Yanai K. Involvement of the histamine H1 receptor in the regulation of sympathetic nerve activity. *Biochem Biophys Res Commun.*, 458, 584-589 (2015). (査読あり)

10.1016/j.bbrc.2015.02.009.

3. 佐藤岳哉, 野村亮介, 宋啓超, 柳澤輝行. ミトコンドリアダイナミズム制御機構 “Fragile—Handle with Care”. *日薬理誌* (査読あり), 142,203 (2013)
4. Sato T, Neschadim A, Lavie A, Yanagisawa T, Medin JA. The Engineered Thymidylate Kinase (TMPK)/AZT Enzyme-Prodrug Axis Offers Efficient Bystander Cell Killing for Suicide Gene Therapy of Cancer. *PLoS One* 8, e78711 (2013) (査読あり) 10.1371/journal.pone.0078711.
5. Neschadim A., Wang JCM., Sato T., Fowler DH., Lavie A., Medin JA. Cell Fate Control Gene Therapy Based on Engineered Variants of Human Deoxycytidine Kinase. *Mol Ther.* 20(5), 1002-1013 (2012). (査読あり) 10.1038/mt.2011.298.
6. 佐藤岳哉 ミトコンドリア品質管理機構の分子薬理学的研究 *Proceeding of clinical electron microscopy* 31,25-29 (2012). (査読あり)
7. Sato T, Neschadim A, Nakagawa R, Yanagisawa T, Medin JA. Evaluation of bystander cell killing effects in suicide gene therapy of cancer: Engineered thymidylate kinase (TMPK)/AZT enzyme-prodrug axis. *Methods Mol Biol.*, 1317:55-67(2015). (査読あり) 10.1007/978-1-4939-2727-2\_4.

[学会発表](計 25 件)

1. 戸田法子 ドキソルピシンによる Autophagic flux 阻害は SNARE 分子の発現減少により誘発される 第 89 回日本薬理学会年会 2016.3.9-3.11. 神奈川県横浜市パシフィコ横浜
2. 村上学 電位依存性カルシウムチャネ

- ル 4 サブユニットと自律神経 第 89 回日本薬理学会年会 2016.3.9-3.11. 神奈川県横浜市パシフィコ横浜
3. 平野穂菜 骨芽細胞のアデニル酸シクラーゼ活性における膜裏打ちタンパク質 4.1G の抑制作用 第 89 回日本薬理学会年会 2016.3.9-3.11. 神奈川県横浜市パシフィコ横浜
  4. 佐藤岳哉 新規ミトコンドリア病治療薬 Mitochonic acid-5 の薬理的プロファイル 第 89 回日本薬理学会年会 2016.3.9-3.11. 神奈川県横浜市パシフィコ横浜
  5. 斎藤将樹 増殖刺激による一次繊毛の短縮は分岐アクチンとクラスリン依存性エンドサイトーシスを介する 第 89 回日本薬理学会年会 2016.3.9-3.11. 神奈川県横浜市パシフィコ横浜
  6. 野村亮介 抗 HIV 薬 AZT によるミトコンドリア Mass 増加のメカニズム 第 89 回日本薬理学会年会 2016.3.9-3.11. 神奈川県横浜市パシフィコ横浜
  7. 宋啓超 AZT impairs the fusion step of autophagosome with lysosome in cardiac H9c2 cells. 第 66 回日本薬理学会北部会 2015. 9.18. 富山県富山市富山国際会議場
  8. 戸田法子 Autophagic flux 阻害によるドキシソルピシン誘発性心筋障害の分子機構 第 66 回日本薬理学会北部会 2015. 9.18. 富山県富山市富山国際会議場
  9. 斎藤将樹 PTH を用いた骨粗鬆症治療に関わる分子基盤研究 第 66 回日本薬理学会北部会 2015. 9.18. 富山県富山市富山国際会議場
  10. 野村亮介 Cyclosporin A による AZT 誘発性 mPTP 開口抑制は Cyclophilin D 依存性である 第 66 回日本薬理学会北部会 2015. 9.18. 富山県富山市富山国際会議場
  11. 佐藤岳哉 薬物誘発性心筋障害からみたミトコンドリア品質管理機構 第 18 回 Sendai Renal Research Seminar 2015.5.7. 宮城県仙台市勝山館
  12. 村岡幹夫 Propofol restores doxorubicin-induced disturbance of mitochondrial dynamisms. 第 88 回日本薬理学会年会 2015.3.18-3.20. 愛知県名古屋市国際会議場
  13. 崔林然 Subtype specific direct interaction of adenylyl cyclase with membrane scaffold protein 4.1G. 第 88 回日本薬理学会年会 2015.3.18-3.20. 愛知県名古屋市国際会議場
  14. 斎藤将樹 Cytoplasmic dynein light chain, Tctex-1, auments adenylyl cyclase activity in a dynein-independent manner. 第 88 回日本薬理学会年会 2015.3.18-3.20. 愛知県名古屋市国際会議場
  15. 野村亮介 抗 HIV 薬 AZT はオートファジー阻害により細胞死をもたらす第 88 回日本薬理学会年会 2015.3.18-3.20. 愛知県名古屋市国際会議場
  16. 佐藤岳哉 AZT 誘発 mPTP 開口抑制によるミトコンドリア機能回復 第 65 回日本薬理学会北部会 2014. 9.26-9.27. 福島県福島市コラッセ福島
  17. Nadine L. The inhibitory effects of a new macrolide EM900 on rinovirus infection in human airway epithelial cells. 第 65 回日本薬理学会北部会 2014. 9.26-9.27. 福島県福島市コラッセ福島
  18. 斎藤将樹 細胞質ダイニン軽鎖 Tctex-1 によるアデニル酸シクラーゼ/cAMP シグナルの増強作用 第 65 回日本薬理学会北部会 2014. 9.26-9.27. 福島県福

- 島市コラッセ福島
19. 柳澤輝行 カリウムチャネル開口薬の発見、開発、進歩 第 87 回日本薬理学会年会 2014.3.19-3.21. 宮城県仙台市仙台国際センター
  20. 野村亮介 AZT 活性化体細胞内蓄積はミトコンドリア Mass 増加をもたらす 第 64 回日本薬理学会北部会 2013.9.13. 北海道旭川市大雪クリスタルホール
  21. 佐藤岳哉 AZT active metabolite impairs mitochondrial quality system 第 86 回日本薬理学会年会 2013.3.21-3.23. 福岡県福岡市福岡国際会議場
  22. 柳澤輝行 Therapeutic targets of coronary artery spasms and K<sup>+</sup> channel openers. 第 86 回日本薬理学会年会 2013.3.21-3.23. 福岡県福岡市福岡国際会議場
  23. 野村亮介 AZT 誘発酸化ストレス応答遺伝子の発現解析 第 63 回日本薬理学会北部会 2012.9.14. 新潟県新潟市朱鷺メッセコンベンションセンター
  24. 佐藤岳哉 PICK1 と GHRHR の相互作用による受容体作動活性の調節 第 63 回日本薬理学会北部会 2012.9.14. 新潟県新潟市朱鷺メッセコンベンションセンター
  25. 佐藤岳哉 ミトコンドリア品質管理機構の分子薬理学的研究 第 63 回東北臨床超微細形態懇話会 2012.6.28, 宮城県仙台市東北大学医学部

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

柳澤 輝行 (Yanagisawa, TERUYUKI)  
(東北大学・医学系研究科・教授)

研究者番号: 90133941

##### (2)研究分担者

助川 淳 (Sukegawa, JUN) (東北大学・医学系研究科・客員教授)

研究者番号: 30187687

佐藤 岳哉 (Sato, TAKEYA) (東北大学・医学系研究科・准教授)

研究者番号: 10313696

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号: