

氏 名 (本籍)	とく 徳	え 江	しん 辰	いち 一
学 位 の 種 類	博	士	(薬	学)
学 位 記 番 号	薬	博	第	431 号
学位授与年月日	平	成	21	年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科、専 攻	東北大学大学院薬学研究科 (博士課程) 生命薬学専攻			

学 位 論 文 題 目

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の細胞内因子による活性調節機構の解明

論 文 審 査 委 員	(主 査) 教 授	中 畑 則 道
	教 授	榎 本 武 美
	教 授	平 澤 典 保

論文内容要旨

細胞膜上に存在する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は細胞外の情報を受け取り, その受容体に特異的な三量体 G タンパク質を活性化し細胞内にシグナルを伝達する。現在, 使用されている医療用医薬品の約半数が GPCR をターゲットとしており, GPCR の制御機構を解明することは治療薬の新たな標的分子を見出すだけでなく, 既存医薬品の作用機序のさらなる理解や副作用の発症機構の理解及び軽減に繋がる。最近の研究により, GPCR を介するシグナル伝達は必ずしもこれまで考えられてきた単純な経路ではなく, 様々な因子によって複雑な制御を受けることが明らかになってきた。その調節因子の一つに, regulator of G protein signaling (RGS) や GPCR 細胞内結合タンパク質が知られている。RGS は, GTPase activating protein (GAP) としての活性を持ち, 活性状態の G タンパク質 (GTP 結合型) を速やかに不活性型の GDP 結合型へ変換させる抑制調節を担っている。また, GPCR 細胞内領域結合タンパク質は GPCR のリン酸化や細胞内局在変化を引き起こし, GPCR シグナルを調節することが報告されている。しかし, 作用機序が明らかにされた調節因子はごく一部であり, 多くの因子がその機能については十分に解明されていない。本研究は GPCR の調節機構のうち, RGS9-1 anchoring protein (R9AP) による RGS9-1 活性制御機構, および新規 thromboxane A₂ 受容体 (TP) 結合タンパク質 TP interacting protein (TPIP) による TP シグナル制御機構の解明を行った。

RGS9-1 anchoring protein (R9AP) による RGS9-1 の G_{i/o} 特異的 GAP 活性制御機構, 及び結合部位の解明

RGS はほ乳類において現在までに 30 種類以上のアイソフォームが報告されており, その構造, 機能の特徴などから 6 つのサブファミリーに分類されている。その中の一つ, R7 サブファミリーに属する RGS (R7-RGS) としては RGS6, RGS7, RGS9-1, RGS9-2, RGS11 が知られており, 共通の構造として, RGS ドメイン, GGL ドメイン, DEP ドメインを持っている (Fig. 1)。これらは常に三量体 G タンパク質の β サブユニット 5 (G β 5) とダイマーを形成して存在し, G_{i/o} ファミリーのシグナル調節に関わると考えられている。また R7-RGS サブファミリーは網膜や中枢神経系に多く発現していることが報告されている。近年, R7-RGS に属する RGS9-1 の GAP 活性を促進するタンパク質として RGS9-1 anchoring protein (R9AP) がウシの網膜から同定されたが, その作用メカニズムについては十分に解明されていない。そこで本研究では, RGS9-1 に対する R9AP の役割を明らかにすることを試みた。

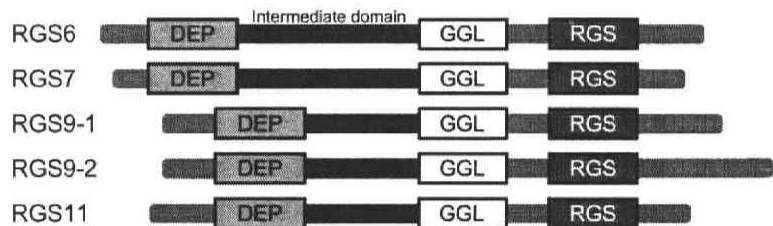


Fig. 1 R7-RGS サブファミリー

RGS9-1 の GAP 活性に対する R9AP の促進作用は, *in vitro* における膜再構築系での報告はされているが細胞レベルでの報告はされていない。そこで, NG108-15 細胞に RGS9-1, R9AP を一過性に発現せ,

アドレナリン α_2 受容体アゴニストである UK14304 で刺激したときに生じる extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) のリン酸化反応を $G_{i/o}$ シグナルの指標とし、これに対する RGS9-1, R9AP の影響を検討した。RGS9-1 を単独発現させた細胞では UK14304 刺激による ERK1/2 リン酸化に変化はみられなかったが、RGS9-1, 及び R9AP を共発現させた細胞では顕著な ERK1/2 リン酸化の抑制が引き起こされた。したがって、細胞レベルにおいても R9AP が RGS9-1 の GAP 活性を促進し、 $G_{i/o}$ シグナルの活性を抑制することが示唆された。

R9AP による GAP 活性促進作用のメカニズムを検討するために脂質ラフトへの局在に焦点をあてて検討を行った。脂質ラフトとは、コレステロール、スフィンゴ脂質に富む細胞膜マイクロドメインであり、近年様々なシグナル分子の集結が報告されていることから、シグナル伝達場として重要であると考えられている。ショ糖密度勾配遠心法により COS7 細胞から脂質ラフト画分の単離を行い、その画分に含まれるタンパク質を解析した。R7-RGS のターゲットである $G\alpha_{i/o}$ は脂質ラフトに局在していた。更に、RGS9-1, 及び R9AP を過剰発現し脂質ラフトへの局在を検討したところ、RGS9-1 は単独で脂質ラフト画分に集積しないが、R9AP と共発現することによって脂質ラフト画分への集積が観察された。このことから、RGS9-1 は R9AP を介して脂質ラフトに局在することが示唆された。

R9AP に対する RGS9-1 の結合部位を検討するため、RGS9-1 欠損変異体の発現ベクターを作製し、R9AP との共免疫沈降法を行った。従来、RGS9-1 の R9AP との結合には DEP ドメインが重要であると考えられてきたが、この結合には DEP ドメインのみではなく、DEP ドメイン、及び介在配列両方の関与が示唆された。一方、各 R7-RGS のアミノ酸配列の相同性解析の結果、DEP ドメインから RGS ドメインに至るまで全般的に良く保存されているが、この中で RGS6 および RGS7 には介在配列の部分にさらに二十数個のアミノ酸が挿入されていることが明らかになった。このことから、RGS9-1 以外の R7-RGS と R9AP との結合性についても検討することにより、RGS9-1 と R9AP との結合領域についてより詳細な情報を得ることを試みた。その結果、RGS9-2, RGS11 は R9AP と結合し、RGS6, RGS7 は結合しなかったことから、結合に対する介在配列の関与が示唆された。R9AP は網膜のみならず中枢神経系においても発現していることが報告されていることから、RGS9-2, RGS11 は RGS9-1 同様、R9AP によって GAP 活性が制御されていることが考えられる。

本研究により、R9AP は RGS9-1 を脂質ラフトに局在させることが示唆された。これにより、RGS9-1 は $G\alpha_{i/o}$ と会合する確立が高まり GAP 活性が促進されると思われる。また、R9AP と RGS9-1 との結合には、RGS9-1 の DEP ドメインと介在配列の両方が必要であること、さらに RGS9-2 と RGS11 も R9AP と結合することが示唆された。

TXA₂ 受容体 (TP) 新規会合タンパク質 TP interacting protein (TPIP) の機能解析

トロンボキサン A₂ (TXA₂) は強力な血小板凝集作用および血管平滑筋収縮作用を示すアラキドン酸代謝物で、血栓形成に伴う末梢循環障害の発症に深く関わっている。TXA₂ は GPCR の一つである TXA₂ 受容体 (TP) を介して作用を発現する。TP は主に三量体 G タンパク質の中でも $G_{q/11}$ と関連してホスホ

リパーゼ C を活性化させ、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇や、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化を引き起こすことが知られている。さらに TP は、 G_{12} 、 G_{13} 、 G_i 、 G_s 及び G_h とも関連して、様々なシグナル伝達を活性化させる。近年 GPCR の C 末端には様々な細胞内タンパク質が結合することが報告されている。これらの中には、GPCR の局在を決定する作用や、シグナル分子の足場タンパク質としての作用を持つものが存在し、GPCR 機能制御を考える上で非常に重要であると考えられている。しかし、TP に関しては十分に解析が進んでいない。そこで TP シグナル伝達活性制御メカニズムを明らかにするため、酵母ツーハイブリッド法を用いて TP の細胞内 C 末端領域に結合するタンパク質をヒト脳 cDNA ライブラリーの中から探索した。その結果、TP に結合する新規タンパク質として KIAA1005 を見だし、TP interacting protein (TPIP) と命名した。その構造の特徴として中央に二つの C2 ドメインと N 末端側に 5 つのコイルドコイルドメインを保持している (Fig. 2)。TPIP は 2005 年に初めて全長がクローニングされた新規タンパク質であり、その生理的役割や機能については検討されていない。そこで新規 TP 結合タンパク質 TPIP が TP の機能に与える影響を解明することを目的とし解析を行った。

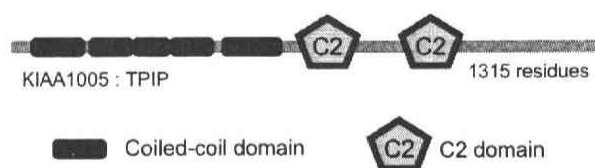


Fig. 2 TP interacting protein (TPIP) のドメイン構造

TPIP と TP の細胞内における結合を確認するため共免疫沈降法を行ったところ、TPIP は TP と共に共沈してきたことから、細胞内においても結合することが示された。さらに TPIP に対する TP の結合部位を検討するため、GST 標識した TP の C 末端部分変異体を用い GST-pull down assay を行った。その結果、TPIP は $TP\alpha$ 、 $TP\beta$ の C 末端共通配列である 313 番目から 328 番目までのアミノ酸に結合することが示された。生体における TPIP と TP 発現部位を検討するため、ヒトの各組織サンプルを用いて RT-PCR を行った TPIP mRNA は胸腺で比較的強い発現がみられたものの、いずれの組織にも普遍的に発現していることが明らかになった。一方、TP mRNA は TPIP mRNA と発現が重なる組織も存在するものの、必ずしも関連していなかった。

次に TP を介したシグナル伝達における TPIP の生理的意義を検討した。TP を安定発現させた CHO 細胞を TP アゴニストである U46619 で刺激すると ERK1/2 のリン酸化が引き起こされる。この反応に対する TPIP 過剰発現の影響を検討したところ、TPIP 過剰発現により ERK1/2 リン酸化の抑制がみられた。また同様の細胞を U46619 で刺激するとホスファチジルイノシトール水解反応の亢進が引き起こされるが、TPIP 過剰発現はこの反応に対しても抑制作用を示した。一方、1321N1 ヒトアストロサイトーマ細胞は内因性に TP を発現しており、U46619 で刺激するとインターロイキン (IL) -6 mRNA 産生の亢進が引き起こされる。TPIP を過剰発現させた 1321N1 では U46619 刺激により惹起された IL-6 mRNA 産生の亢進は TPIP の発現量依存的に抑制した。

TPIP による TP シグナル抑制メカニズムとして、細胞表面 TP 発現量、TP のリガンドアフィニティーに対する TPIP 過剰発現の影響について検討を行った。TP を安定発現させた HEK293 細胞に TPIP をトランスフェクション後、TP アンタゴニストである $[^3H]SQ29548$ を用いた細胞表面受容体結合実験を行い、

細胞表面における TP 数，リガンドアフィニティーを Scatchard 解析により算出した。その結果，解離定数 K_d は TPIP 過剰発現により変化しなかった。一方，細胞表面 $[^3H]$ SQ29548 結合部位 B_{max} は TPIP 過剰発現により減少することが明らかになった。これらの結果から TPIP 過剰発現は TP のリガンドに対するアフィニティーは変化させず，細胞表面の TP 発現量を減少させることでシグナル伝達を抑制することが示唆された。

以上の様に新規 TP 結合タンパク質として TP interacting protein (TPIP) を同定し，このタンパク質が TP シグナルを抑制することを明らかにした。さらにその抑制メカニズムの一つとして，細胞膜上の TP 量を減少させる作用を見出した。

本研究では R9AP 及び TPIP による GPCR 活性の調節作用を初めて明らかにした。GPCR シグナル調節タンパク質の作用機序を詳細に解析することは，GPCR 活性調節の新しい標的タンパク質を見出すことにもなる。今後，GPCR 調節タンパク質に関する研究のさらなる進展が期待される。

審査結果の要旨

最近、Gタンパク質共役型受容体（GPCR）を介するシグナル伝達は必ずしもこれまで考えられてきた単純な経路ではなく、様々な因子によって複雑な制御を受けることが明らかにされている。その調節因子に、regulator of G protein signaling（RGS）や GPCR 細胞内結合タンパク質が知られている。本研究は GPCR の調節機構のうち、RGS9-1 anchoring protein（R9AP）による RGS9-1 活性制御機構、および新規 thromboxane A₂ 受容体（TP）結合タンパク質 TP interacting protein（TPIP）による TP シグナル制御機構を検討した。

はじめに、NG108-15 細胞に RGS9-1 と R9AP を一過性に発現せ、アドレナリン α_2 受容体刺激により生じる extracellular signal-regulated kinase 1/2（ERK1/2）のリン酸化反応に対する RGS9-1、R9AP の影響を検討した。RGS9-1 を単独発現させた細胞では ERK1/2 リン酸化に変化はみられなかったが、RGS9-1、及び R9AP を共発現させた細胞では顕著な ERK1/2 リン酸化の抑制が引き起こされた。次に、脂質ラフトへの局在に焦点をあてて検討を行った結果、RGS9-1 は単独では脂質ラフト画分に集積しないが、R9AP と共発現することによって脂質ラフト画分への集積が観察された。以上より、R9AP は RGS9-1 を脂質ラフトに局在させることにより、RGS9-1 は G α_{i_0} と会合する確立が高まり GAP 活性が促進されると思われる。

トロンボキサン A₂（TXA₂）は TP を介して作用を発現する。近年 GPCR の C 末端には様々な細胞内タンパク質が結合することが報告されていることから、酵母ツーハイブリッド法を用いて TP の細胞内 C 末端領域に結合するタンパク質をヒト脳 cDNA ライブラリーの中から探索した結果、TP に結合する新規タンパク質として KIAA1005（TPIP）を見いだした。共免疫沈降法により TPIP と TP は細胞内においても結合するとともに、TPIP に対する TP の結合部位は TP α 、TP β の C 末端共通配列である 313 番目から 328 番目までのアミノ酸であった。TPIP は胸腺で比較的強く、いずれの組織にも普遍的に発現していた。TP アゴニストである U46619 による ERK1/2 のリン酸化、ホスファチジルイノシトール水解反応の亢進やインターロイキン -6 mRNA 産生の亢進は TPIP の過剰発現により抑制された。また、細胞表面 TP 発現量は TPIP 過剰発現により減少した。したがって、TPIP は細胞表面の TP 発現量を減少させることで TP を介するシグナル伝達を抑制することが示唆された。

以上のように本研究は R9AP 及び TPIP による GPCR 活性の調節作用を初めて明らかにした価値の高いものである。

したがって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。