

## 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 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370056

研究課題名（和文） 新しいGタンパク質共役受容体ファミリー分子の解析

研究課題名（英文） Analysis of the novel family of G protein-coupled receptor

研究代表者

伊東 広 (ITOHI HIROSHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：10183005

研究成果の概要（和文）：Adhesion G protein-coupled receptor (GPCR) は、大きな細胞外ドメインと膜7回貫通ドメインからなり、その多くはリガンドが不明のオーファン受容体である。Adhesion GPCR に属する GPR56 と Latrophilin1 に対する抗体作成、それぞれの変異体の作成、そしてシグナル伝達機構の解析を行った。その結果、がん細胞の遊走を抑制する抗 GPR56 モノクローナル抗体を得ることに成功し、さらに Latrophilin1 の細胞外ドメインが Latrophilin1 膜貫通ドメインの活性化を抑制していること、また Latrophilin1 の細胞外ドメインは GPR56 膜貫通ドメインの活性化も抑制することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Adhesion G protein-coupled receptors (GPCRs) have a long N-terminal extracellular domain and a seven-transmembrane domain. Most of adhesion GPCRs are orphan receptors, and the activation and signal transduction mechanisms remain to be clarified. GPR56 and Latrophilin1 belong to adhesion GPCRs. We succeed in preparing the monoclonal antibody against human GPR56, which inhibits the glioma cell migration, and have constructed several mutants. Analysis using mutants showed that an extracellular domain of Latrophilin1 has an ability to inhibit the activation of Latrophilin1 transmembrane domain as well as the GPR56 transmembrane activation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構、受容体、Gタンパク質、細胞遊走制御、モノクローナル抗体

## 1. 研究開始当初の背景

$\alpha\beta\gamma$  の3つのサブユニットからなり、細胞膜を7回貫通する受容体により活性化されるヘテロ3量体GTP結合タンパク質（Gタンパク質）は、酵母からヒトに至る真核生物に幅

広く存在し、様々な細胞機能を調節する。一方、細胞外のシグナルを受け取りGタンパク質を活性化するGタンパク質共役受容体（GPCR）はヒトにおいて800種類ほどあり、最も数が多い細胞膜受容体ファミリーを形成し、神経伝達系、内分泌調節系、生体防御系など様々な

生体システムで大事な役割を果たしている。現在、使われている薬剤の4割近くがGPCRを標的としており、このシグナル伝達系は生体の恒常性の維持や外部環境への応答に必須である。ゲノム解析から200種類以上のリガンド不明のオーファン受容体の存在が見出され、盛んにリガンドの探索や生理機能の解析が行われている。

Adhesion GPCRは、ゲノム解析より見出された新たなGPCRであり、その特徴はN末側の細胞外ドメイン (ECD) が長く、そして最初の膜貫通領域の直前にある GPSドメインで切断されることである。切断後、ECDと膜7回貫通ドメイン (TM) に分かれても両者は非共有結合で繋がって複合体を形成しているが、それぞれのドメインがどのような働きをしているかは明らかではなかった。GPR56とLetrophilin1 (LPHN1) はいずれもadhesion GPCRに属し、どちらも生体内の内在性リガンドは不明であった。私共は2008年に、GPR56が脳皮質形成における神経前駆細胞の遊走を負に調節することを、マウスGPR56に対するウサギ抗マウスGPR56ポリクローナル抗体を用いて明らかにしました。また、この抗体がアゴニスト様に働き、細胞内でG12/13→Rho経路を活性化して遊走を阻害することも見出しました。一方、いくつかのヒトがん細胞においてGPR56が発現しており、増殖や接着に関与することが報告されていました。また、Letrophilin1とGPR56との相互作用も示唆されていました。そこでadhesion GPCRの活性制御機構を明らかにし、かつ抗体医薬への発展も目指してモノクローナル抗体の作成、および各種変異体受容体を用いた解析を進めることとした。

## 2. 研究の目的

Adhesion GPCRの活性制御機構およびがん細胞や神経系細胞での役割の解明を目的として研究を進めた。GPR56はリガンド不明のオーファン受容体であったため、その機能を調べるのは当初困難であったが、アゴニスト様に作用するポリクローナル抗体を得ることが出来たため、その発現や作用機構を調べることが出来た。しかし、より詳細にadhesion GPCRの活性制御機構や生理機能を調べるためには、受容体の様々な部位、構造を認識するモノクローナル抗体が極めて有用なツールとなる。そこでGPR56の細胞外ドメインからなるリコンビナントタンパク質を調製し、それを抗原としてマウス、ラットに免疫して抗体作成に取り掛かった。

一方、神経前駆細胞の遊走抑制が見られたため、先に得られた抗体を用いて内在的にGPR56を発現しているがん細胞を選び出し、新たに得られたモノクローナル抗体ががん細胞の遊走を抑制するか、そして抑制した場合にはどのようなシグナル伝達経路を利用しているか明らかにすることを目指した。もしがん細胞の遊走を阻害するシグナル伝達系が判れば、今度はadhesion GPCRとは別にそのシグナル伝達系を動かせる別のGPCRの低分子アゴニストを利用したがん細胞の浸

潤、転移の阻害療法への展開も考えられる。また、Adhesion GPCRがヘテロ複合体を形成して、色々な細胞機能で働いている可能性があり、特にGPR56とLPHN1との関係を明らかにするために、両者の変異体や特異抗体を用いた複合体形成と受容体活性制御機構の解析を行った。

## 3. 研究の方法

バキュロウイルス Sf9 昆虫細胞発現系を用いてヒトおよびマウスのGPR56ECDの調製を行った。得られたリコンビナントタンパク質をマウスおよびラットに免疫した後、抗体産生細胞と不死化培養細胞を融合させ、抗体を産生するハイブリドーマを作成した。ELISA法とWestern blot法、さらに免疫沈降法によりモノクローナル抗体の抗原認識の特異性および力価、免疫沈降活性を検討した。GPR56により引き起こされる細胞応答を検討するために、SREなど各種外部刺激応答配列を有するホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現誘導発光測定、カルシウム蛍光指示薬を用いた細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の測定、8 μmの穴があいたフィルターを用いた細胞遊走アッセイを行った。またヒトGPR56をノックダウンさせるためにsiRNAをリポフェクトアミンあるいはNeonを用いたエレクトロポレーション法により細胞に導入した。また、細胞外ドメイン (ECD) と膜貫通ドメイン (TM) をHEK293細胞で発現させるためのプラスミドを構築した。受容体の全長およびそれぞれのドメインを発現させ、両ドメインの相互作用を調べるために、抗体による免疫沈降実験を行った。

## 4. 研究成果

ヒトGPR56ECDを抗原としてマウスに免疫して17CCおよびモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。17CC抗体はヒトGPR56を認識したが、マウスGPR56は認識しない特異性の高い抗体であった。ヒトグリア腫細胞U87の増殖、細胞接着、遊走に対する17CC抗体の作用を調べたところ、U87細胞の遊走を阻害することが判明した。この阻害効果は、予め抗体を抗原であるGPR56ECDと反応させておくと消失し、さらにU87細胞の内在性GPR56をsiRNAでノックダウンさせても17CC抗体の効果が減弱した。さらに17CC抗体を用いた実験を進めようとしたが、17CC抗体を産生するハイブリドーマの増殖が悪く、また細胞を継代していくと抗体の産生量が激減することが明らかとなった。そのため、ハイブリドーマのリスクリーニングを行い、純化したハイブリドーマを単離したが、抗体の産生量は低く、また継代による抗体産生量の低下は大きくは改善されなかった。それでも培養条件の最適化を行い、数百マイクログラムの精製抗体を得ることに成功した。しかし、マウス個体を用いたがん細胞の生着アッセイで用いる量を得ることが難しいため、再度ヒトGPR56ECDを抗原としてモノクローナル抗体産生細胞の樹立を試みた。その結果、

幾種類ものハイブリドームを得ることが出来た。それぞれの産生するモノクローナル抗体の中には、Western法で高感度でGPR56を認識するもの、免疫沈降可能なもの、そして17CCと同様にU87細胞の遊走を阻害するもの(11E9抗体)が含まれていた。17CC抗体および11E9抗体によるU87グリア腫細胞の遊走阻害がどのGタンパク質を介して起こるか検証するために、Gq特異的な阻害剤YM-254890の効果を検討した。その結果、YM-254890はどちらの遊走阻害効果も抑制した。神経前駆細胞のGPR56を介した遊走阻害はG12/13を介することから、ヒトとマウスの生物種、あるいは細胞の種類の違いによって受容体より下流のシグナル伝達機構が異なることが示唆された。現在、その原因が何に起因するのか、種々の細胞や変異体を用いて解析を進めている。

Adhesion GPCRの活性制御機構を調べるために細胞外ドメインのみからなる変異体ECDと、逆にECDを欠失し膜貫通ドメインからなる変異体ΔECDをGPR56およびLetrophilin1に関して作成し、全長およびそれらの変異体を用いて293細胞で発現させSREルシフェラーゼレポーターアッセイによりシグナルの活性化能を調べた。その結果、細胞外ドメインを欠失した変異体ΔECDはどちらの受容体の場合も、全長の野生型よりもレポーター活性が高い値を示し、恒常的な活性型を示すことが明らかとなった。さらに、Letrophilin1のECDは単独ではレポーター活性に何ら影響を示さなかったが、Letrophilin1ΔECDと共発現させるとΔECDにより上がったレポーター活性を抑制することが判明した。また、共発現させた別々のドメインが相互作用していることが免疫共沈降実験により明らかとなった。この実験結果から、Letrophilin1はリガンドが結合していない不活性状態では細胞外ドメインが膜貫通ドメインの活性化を抑制しており、リガンド結合によりその抑制が外れて受容体が活性化されるというモデルが示唆された。GPR56に関して、全長よりも細胞外ドメインを欠失したΔECD変異体の方が高いレポーター活性を示し、このモデルを支持したが、GPR56ECDの共発現による活性の低下は認められなかった。しかしながら、驚くべきことにLetrophilin1ECDがGPR56ΔECDによるレポーター活性化を抑制することを見出した。また両者がヘテロ複合体を形成していることを免疫共沈降法で確認することも出来た。この結果は、異なる受容体がある条件では細胞外ドメインと膜貫通ドメインの交換が起こり、そのために同じリガンドであっても、複合体を形成する膜貫通ドメインが変われば細胞内シグナル伝達も変わる可能性を示唆している。細胞シグナル情報伝達においてまったく新しい概念となる可能性があり、現在、内在的にそのような交換が起こった複合体が存在するか、またそのヘテロ複合体が機能する場所があるか、両者の内在的な発現が認められる細胞を用いて、解析を進めている。

さらにadhesion GPCRの活性化に伴い細胞

外ドメインと膜貫通ドメインの相互作用に変化が認められるかどうかを検証するため、アゴニスト様に働く抗体や細胞外ドメインに結合する特異的なアゴニストの免疫共沈降に対する効果を調べている。

またヒトグリア腫細胞の遊走を阻害する抗体が得られたので、ヌードマウスへのこの細胞の移植・生着実験の確立を目指し、確立後は抗体の効果を検討していきたいと考えている。

#### 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16件)

1. Toriyama M, Mizuno N, Fukami T, Iguchi T, Toriyama M, Tago K, Itoh H. Phosphorylation of doublecortin by protein kinase A orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration. *J Biol Chem* 2012 287 : 12691-12702 査読有
2. Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, Mashino T, Kasahara T. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *Int Immunopharmacol* 2011 11 : 1150-1159 査読有
3. Kamishimoto J, Tago K, Kasahara T, Funakoshi-Tago M. Akt activation through the phosphorylation of erythropoietin receptor at tyrosine 479 is required for myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant-induced cellular transformation. *Cell Signal* 2011 23 : 849-856 査読有
4. Sumi K, Tago K, Kasahara T, Funakoshi-Tago M. Aurora kinase A critically contributes to the resistance to anti-cancer drug cisplatin in JAK2 V617F mutant-induced transformed cells. *FEBS Lett* 2011 585 : 1884-1890 査読有
5. Kobayashi T, Ishida J, Musashi M, Ota S, Yoshida T, Shimizu Y, Chuma M, Kawakami H, Asaka M, Tanaka J, Imamura M, Kobayashi M, Itoh H, Edamatsu H, Sutherland LC, Brachmann RK. p53 transactivation is involved in the antiproliferative activity of the putative tumor suppressor RBM5. *Int J Cancer* 2011 126 : 304-318 査読有
6. Nagai Y, Nishimura A, Tago K, Mizuno N, Itoh H. Ric-8B stabilizes the alpha

- subunit of stimulatory G protein by inhibiting its ubiquitination. *J Biol Chem* 2010 285 : 11114-11120 査読有
7. Tago K, Funakoshi-Tago M, Sakinawa M, Mizuno N, Itoh H.  $\kappa$ B-Ras is a nuclear-cytoplasmic small GTPase that inhibits the NF- $\kappa$ B activation through the suppression of transcriptional activation of p65/RelA. *J Biol Chem* 2010 285 : 30622-30633 査読有
  8. Nishimura A, Kitano K, Takasaki J, Taniguchi M, Mizuno N, Tago K, Hakoshima T, Itoh H. Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 107:13666-13671 査読有
  9. 西村明幸、伊東 広 G タンパク質シグナルを調節する新規プローブ 細胞 2010 42 : 92-95 査読無
  10. Funakoshi-Tago M, Tanabe S, Tago K, Itoh H, Mashino T, Sonoda Y, Kasahara T. Licochalcone A potently inhibits TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation through the direct inhibition of IKK activation. *Mol Pharmacol.* 2009 76 : 745-753 査読有
  11. Abe M, Funakoshi-Tago M, Tago K, Kamishimoto J, Aizu-Yokota E, Sonoda Y, Kasahara T. The polycythemia vera-associated Jak2 V617F mutant induces tumorigenesis in nude mice. *Int Immunopharmacol.* 2009 9 : 870-877 査読有
  12. Nakata A, Urano D, Fujii-Kuriyama Y, Mizuno N, Tago K, Itoh H. G-protein signalling negatively regulates the stability of aryl hydrocarbon receptor. *EMBO reports* 2009 10 : 622-628 査読有
  13. Furusawa J, Funakoshi-Tago M, Tago K, Mashino T, Inoue H, Sonoda Y, Kasahara T. Licochalcone A significantly suppresses LPS signaling pathway through the inhibition of NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation at serine 276. *Cell Signal.* 2009 10 : 778-785 査読有
  14. Funakoshi-Tago M, Tago K, Sumi K, Abe M, Aizu-Yokota E, Oshio T, Sonoda Y & Kasahara T. The acute lymphoblastic leukemia-associated JAK2 L611S mutant induces tumorigenesis in nude mice. *J Biol Chem.* 2009 284 : 12680-12690 査読有
  15. Furusawa J, Funakoshi-Tago M, Mashino T, Tago K, Inoue H, Sonoda Y, Kasahara T. Glycyrrhiza inflata-derived chalcones, Licochalcone A, Licochalcone B and Licochalcone D, inhibit phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 in LPS signaling pathway. *Int Immunopharmacol.* 2009 9 : 499-507 査読有
  16. Mizuno N & Itoh H. Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *Neurosignals* 2009 17:42-54 査読有
- [学会発表] (計 20 件)
1. Tago K, Funakoshi-Tago M, Fukao Y, Sugiyama N, Tomita M, Mizuno N, Itoh H. Functional involvement of an atypical nuclear-cytoplasmic small GTPase  $\kappa$ B-Ras in oncogenic signaling pathway 第 34 回日本分子生物学会 2011.12.16 横浜
  2. Sasai N, Jyunkyu Kang, Ota S, Tago K, Mizuno N, Itoh H. N-terminal fragment of Latrophilin1 negatively regulates the adhesion GPCR-induced signals 第 34 回日本分子生物学会 2011.12.16 横浜
  3. Riris Jenie, Nishimura M, Tago K, Mizuno N, Itoh H. Involvement of Ric-8 in the G $\alpha$ q-induced suppression of Gs signaling 第 34 回日本分子生物学会 2011.12.16 横浜
  4. Takami K, Kanasaki T, Nishimura A, Nagai Y, Tago K, Mizuno N, Fuse N, Itoh H. Analysis of non-receptor type of G protein regulator Ric-8 involved in Drosophila gastrulation 第 34 回日本分子生物学会 2011.12.16 横浜
  5. 鳥山 真奈美, 多胡 憲治, 水野 憲一, 伊東 広 Doublecortin orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration in a manner dependent on phosphorylation by PKA 2011 Annual meeting, ASCB 2011.12.4 U.S.A.
  6. 鳥山 真奈美, 猪口 徳一, 深見 岳史, 多胡 憲治, 水野 憲一, 伊東 広 微小管結合タンパク質 doublecortin の PKA によるリン酸化を介した新規アクチン骨格制御 第 84 回日本生化学会 2011.9.24 京都
  7. 多胡 憲治, 多胡 めぐみ, Chiocca Susanna, 水野 憲一, 伊東 広 G タンパク質シグナルにより制御される SUMO 化とその分子機構の解析 第 84 回日本生化学会 2011.9.24 京都
  8. 伊東 広 New insight into the regulatory mechanism of G protein

- signaling 第 84 回日本生化学会  
2011.9.22 京都
9. 鳥山 真奈美, 水野 憲一, 多胡 憲治, 伊東 広 Gs-PKA シグナルによる微小管結合タンパク質 doublecortin の新規機能の獲得 第 58 回日本生化学会近畿支部例会 2011.5.21 大阪
  10. Toriyama M, Mizuno N, Tago K, Itoh H. Phosphorylation of doublecortin by G protein-PKA signaling regulates neuronal progenitor cell migration American Society for Neurochemistry 42nd Annual Meeting 2011.3.20 St. Louis U.S.A
  11. Mizuno N. Multi-regulation of neuronal progenitor migration by G protein signaling American Society for Neurochemistry 42nd Annual Meeting 2011.3.22 St. Louis U.S.A
  12. 伊東 広 G タンパク質シグナル制御機構の新しい展開 第 2 回膜生物学グローバル COE students-organized symposium 2010.12.22 神戸
  13. 水野 憲一, 鳥山 真奈美, 多胡 憲治, 伊東 広 大脳皮質形成における神経前駆細胞移動の G 蛋白質シグナルによる多重制御機構 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 (BMB2010) 2010.12.10 神戸
  14. Itoh H. Chemoprevention targeted on signal transduction. International seminar on Chemoprevention for Health and Beauty 2010.10.9 Yogyakarta Indonesia
  15. 西村 明幸, 北野 健, 高崎 淳, 谷口 昌要, 水野 憲一, 多胡 憲治, 箱嶋 敏雄, 伊東 広 Structural basis of a novel targeting site for the specific inhibition of heterotrimeric G proteins 第 32 回日本分子生物学会年会 2009.12.9 横浜
  16. Nagai Y, Nishimura A, Tago K, Mizuno N, Itoh H. Ric-8B accelerates Gs signaling through the stabilization of the  $\alpha$  subunit of stimulatory G protein. The American Society for Cell Biology 49th annual meeting 2009.12.4 San Diego U.S.A
  17. 永井 裕介, 西村 明幸, 多胡 憲治, 水野 憲一, 伊東 広 三量体 G タンパク質  $G\alpha_s$  のユビキチン化は Ric-8B との結合により抑制される 第 82 回日本生化学会大会 2009.10.24 神戸
  18. 伊東 広 G タンパク質シグナルを調節する新規分子の作用 第 82 回日本生化学会大会 2009.10.23 神戸
  19. 吉田 真奈美, 水野 憲一, 多胡 憲治,

伊東 広 G タンパク質シグナルによる doublecortin のリン酸化と細胞遊走の解析 第 82 回日本生化学会大会 2009.10.22 神戸

20. 伊東 広 3 量体 G タンパク質を標的とした薬剤の作用機構 第 9 回日本蛋白質科学会年会 2009.6.22 熊本

〔図書〕 (計 2 件)

1. Urano D, Itoh H. P-Rex Encyclopedia of Signaling Molecules Springer in press 2012
2. Mizuno N and Itoh H. Signal transduction mediated through adhesion-GPCRs. Adhesion-GPCRs: Structure to Function Landes Bioscience 2010 706-715

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページアドレス

<http://bsw3.naist.jp/itoh/home/index.html>

〔報道関連情報〕

1. Nishimura et al. *PNAS* (2010) 107, 13666 の発表内容が日本経済新聞、朝日新聞、読売新聞、奈良新聞、日刊工業新聞、日本経済産業新聞、「KIPPO NEWS」(月刊英文・和文関西国際情報発信誌)に取り上げられる

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 広 (ITOH HOROSHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号: 101883005

(2) 研究分担者

水野 憲一 (MIZINO NORIKAZU)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号: 90212232

多胡 憲治 (TAGO KENJI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号: 20306111

(3) 連携研究者

なし