

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293013

研究課題名(和文)新しいGタンパク質共役受容体シグナル制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory mechanisms of G protein-coupled receptor signaling

研究代表者

伊東 広 (Itoh, 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：Adhesion GPCRに属するGPR56に対するモノクローナル抗体を作成し、その抗体がヒトグリア腫細胞の遊走をGq, Rho, Rhoキナーゼを介するシグナル伝達系を介して阻害することを明らかとした。GPR56の膜貫通領域とLatrophilinの細胞外領域からなるキメラ受容体がGABA作動性抑制ニューロンに存在すること、そしてLatrophilinのリガンドであるLatrotoxinからのシグナルを伝達する可能性を見出した。Ric-8がGタンパク質のユビキチン化とパルミトイル化という翻訳後修飾を制御することでGタンパク質シグナルの正の因子として働くことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We generated agonistic monoclonal antibodies against GPR56 and showed that the antibodies inhibit the migration of human glioma cells through Gq, Rho, and Rho kinase pathway. We found the possibility that GPR56 transmembrane region and latrophilin1 extracellular region forms a chimera receptor in GABAergic neurons, and latrotoxin, a latrophilin1 ligand, induces cell response mediated by the chimera receptor. We demonstrated that Ric-8 functions as a positive regulator for GPCR signaling system by regulating two post-translational modifications, ubiquitination and palmitoylation, on G proteins.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Gタンパク質 GPCR

1. 研究開始当初の背景

G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) は細胞膜を七回貫通する特徴的な構造を有し、細胞外のシグナルを受け取るセンサーとして働いている。GPCR はヒトにおいて 800 種類程存在し、神経機能発現、循環器・血圧の調節、内分泌制御、個体の発達過程における細胞の遊走、癌細胞の浸潤・転移など、さまざまな局面で大事な働きをしている。そのため、現在使用されている薬剤の三割近くが GPCR を標的としている。GPCR は細胞膜上で G タンパク質を活性化することで細胞内へシグナルを伝達し、細胞応答を引き起こす。一方、リガンドが不明で機能未知のオーファン GPCR が 100 種類以上残っており、その機能や活性調節機構などが注目されている。また、GPCR とは別に単独で G タンパク質と結合し、G タンパク質の活性を制御する分子として Ric-8 と呼ばれる細胞質因子が線虫の遺伝学的解析から新たに明らかとなり、GPCR シグナル伝達系における Ric-8 の役割や機能発現の仕組みに関しても大変注目が集まっている。

私共は、adhesion GPCR と呼ばれるファミリーに属する GPR56 が神経前駆細胞に特異的に発現し、G12/13 と Rho を介する経路を活性化することで神経前駆細胞の遊走を抑制することを先に明らかにした。また作成したウサギ抗マウス GPR56 抗体が GPR56 を活性化するアゴニストのように働くことを見出し、抗 GPCR 抗体がオーファン GPCR 研究の重要なツールとなることを示した。一方、哺乳動物細胞に存在する Ric-8A が Gq の GEF として働き Gq を介するシグナル伝達をポジティブに制御すること、また Ric-8B が Gs の サブユニットのユビキチン化を抑制することでプロテアソームを介したタンパク質分解系への移行を阻害し、Gs タンパク質を量的に制御することで Gs シグナルの正の制御因子として働くことを明らかにした。

2. 研究の目的

GPCR を介するシグナルを制御する新しい分子として adhesion GPCR に属する GPR56 と Latrophilin1 (LPHN1) そして新規非受容体型 G タンパク質制御因子である Ric-8 に焦点を挙げた研究を展開する。具体的には(1) GPR56 に対するモノクローナル抗体を作成し、GPR56 の生理機能に影響する機能性抗体を選別する。得られた機能性抗体を用いて、GPR56 の活性制御機構の解析を行う。(2) GPR56 と LPHN1 の発現と両者からなるキメラ複合体の形成と機能を調べる。(3) Gs のユビキチン化における Ric-8B の役割を調べるために、心筋細胞などを用いて過剰な Gq シグナルに依存したユビキチン化や cAMP 応答の変化を調べる。(4) 原腸陥入に異常を示すショウジョウバエの Ric-8 変異体 atx 遺伝子と野生型 Ric-8 遺伝子の機能を

ショウジョウバエ株化培養 S2 細胞を用いて解析する。以上の研究から、新たな GPCR シグナル制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

ヒト GPR56 の細胞外ドメイン (ECD) タンパク質をバキュロウイルス/昆虫細胞発現系を用いて調製し、そのリコンビナントタンパク質をマウスへ免疫して GPR56(ECD) に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作成する。ELISA や内在的に GPR56 を発現しているヒトグリア腫細胞 U87-MG、各種 GPR56 変異体を発現させた HEK293 細胞を用いて免疫染色を行い、各種モノクローナル抗体の評価を行う。マウス脳由来の神経細胞や組織切片を調製し、GPR56 と LPHN1 抗体による免疫染色とウエスタンブロットによる発現の解析を行う。抗体や受容体の機能は、細胞内カルシウムの上昇及び細胞の遊走活性の測定により評価する。細胞内タンパク質のユビキチン化はユビキチンに対する抗体、あるいは His6Flag-ユビキチンを導入した細胞から調製した場合は抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出する。ショウジョウバエの Ric-8 の機能解析では、S2 細胞への Ric-8 の野生型 WT、atx 変異体の発現、哺乳動物細胞 G12/13 のショウジョウバエのホモログである Cta の発現を細胞の免疫染色、共沈降アッセイ、Click Chemistry を用いたパルミチン酸誘導体のタンパク質への付加の検出を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト GPR56 に対するモノクローナル抗体の作成を複数回行うことにより、いくつも得られてきた抗体の中で、ヒトグリア腫細胞 U87-MG の遊走を阻害する抗体を得ることに成功した。その遊走阻害は Gq 特異的阻害剤である YM-254890 によりキャンセルされた。また遊走阻害を示した抗体は U87-MG 細胞内のカルシウム上昇を引き起こし、その上昇が YM-254890 処理により消失し、さらに抗体による遊走阻害は Rho キナーゼ阻害剤である Y27632 によってもキャンセルされた。一方、細胞内カルシウム応答を引き起こすだけでは細胞遊走の阻害は認められなかった。以上の結果から、ヒト GPR56 を活性化するアゴニスト抗体により Gq が活性化され、その下流で RhoGEF, Rho, Rho キナーゼの活性化を介してグリア腫細胞の遊走が阻害されることが明らかとなった。マウス神経前駆細胞では G12/13 を介して Rho の活性化が遊走阻害を示したが、ヒトグリア腫細胞では GPR56 が共役する G タンパク質が異なることが示唆された。アミノ酸配列上、ヒトとマウスで異なる細胞内領域が G タンパク質の特異的な共役に関与している可能性が示唆された。今後、GPR56 のヒトマウスハイブリッド受容体を用いた解析により受容体と G タンパク質との共役の特異性を規定する配列が判ってくることが

期待できる。さらにアゴニスト様機能性抗体が結合した場合に GPR56 の細胞外ドメイン (ECD) と膜貫通ドメイン (TM) との相互作用が強まること、共沈降実験より明らかとなった。相互作用に障害を与える変異を持った受容体の作製や、アンタゴニスト様、インバースアゴニスト様に働く抗体を作成し、それらを用いて解析することでより詳細な adhesion GPCR の活性制御機構が見えてくることが期待される。

(2) 脳神経系の発達過程で LPHN1 と GPR56 の発現がどうなっているか調べるために、胎児、新生児、成体のマウス脳での発現を抗体を用いて検討したところ、胎生 19 日から生後 7 日目において両者の発現が認められた。生後 7 日目の脳切片を免疫染色し、抑制性 GABA 作動性ニューロンにおいて両者が発現していることが示唆された。GABA 抑制性ニューロンのマーカーである GAD67 のプロモーターに GFP 遺伝子をつなげたトランスジェニックマウスから FACS を用いて GABA 抑制性ニューロンを単離したところ、その細胞に LPHN1-ECD と GPR56-TM が発現していることが認められた。さらに LPHN1 の ECD と GPR56 の TM をそれぞれ単独で共発現させた HEK293 細胞を調製し、そこに LPHN1 のアゴニストである Latrotoxin (LTX) を作用させた。その結果、それぞれの単独発現細胞に比べ、共発現させた細胞において LTX により顕著な細胞内カルシウム応答が見られた。このことは GPR56 が LPHN1-ECD の細胞外応答に関与することを示唆している。LTX はポアを形成して細胞内カルシウム上昇を起こすと考えられているため、ポアを形成しない LTX 変異体や最近報告された内在性 LPHN1 のリガンドである Lasso を用いた実験により、今後、キメラ受容体の働き方や生理的な役割が明らかになるものと思われる。

(3) 大動脈を結索することで心肥大をおこさせたマウスの心臓においてグローバルなユビキチン化の亢進が見出された。またラット新生児由来の心筋細胞を Gq 共役受容体である α_1 アドレナリン受容体のアゴニストであるフェニレフリンで処理しても細胞内のユビキチン化が亢進するとともに、アドレナリン受容体を介する cAMP 産生が減弱することを明らかにした。さらに $G\alpha_q$ の活性型変異体を過剰発現させると $G\alpha_s$ のユビキチン化が増加し $G\alpha_s$ の発現量の低下が見出された。またこの $G\alpha_q$ の効果は Ric-8B の発現により抑制された。以上の結果から、持続的な Gq シグナルにより細胞内のユビキチン化が亢進すること、そして $G\alpha_s$ のユビキチン化が起こることで $G\alpha_s$ の分解が促進され $G\alpha_s$ の発現量が減弱して $G\alpha_s$ を介する cAMP 応答が抑制されることが判明した。また、Gq と Gs シグナルのクロストークに Ric-8B が関与する可能性が示唆された。

今後、 $G\alpha_s$ のユビキチン化に関する E3 リガーゼや、 $G\alpha_q$ 依存的にユビキチン化されるタンパク質を同定することで、その分子メカニズムとその制御機構の役割が明らかになることが期待される。

(4) ショウジョウバエ S2 細胞へ G12/13 ホモログである Cta を発現させるとほとんどが細胞質に局在するのに対し、Ric-8 を共発現させると Cta の膜局在が亢進されることを見出した。原腸陥入異常を示す atx 変異体の共発現ではそのような Cta 膜局在は認められなかった。共沈降実験より Cta と Ric-8 との結合が atx 変異により減弱することが判明した。Cta のパルミトイル化部位と予想される 3 つの Cys を Ser に置換した変異体は膜局在性を示さなかった。またパルミトイル化酵素阻害剤 2-BP 処理により Cta の膜局在が阻害された。次に、パルミチン酸誘導体 17-ODYA を培養液に添加した S2 細胞より Cta を免疫沈降により調製した後、蛍光色素アジド化合物を銅イオン存在下で反応させることでタンパク質への脂質修飾を検出する系でパルミトイル化を評価した。その結果、Ric-8 パルミトイル化を促進することが明らかとなった。パルミトイル化酵素は 23 種類の DHHC ファミリーからなるが、Ric-8 がどのような機構でこの酵素と協調して働くのか、今後、明らかになることが期待できます。本研究は、単に GPCR シグナルの制御機構の一端を明らかにしただけではなく、タンパク質の脂質修飾を調節する分子を初めて同定したという意味があり、その意義は大きいと言える。

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 9 件)

Torii M, Kojima D, Nishimura A, Itoh H, and Fukada Y. Light-dependent activation of G proteins by two isoforms of chicken melanopsins. **Photochem. Photobiol. Sci.** 14, 2015, 1991-1997 査読有
DOI: 10.1039/C5PP00153F

Ohta S, Sakaguchi S, Kobayashi Y, Mizuno N, Tago K, and Itoh H. Agonistic antibodies reveal the function of GPR56 in human glioma U87-MG cells. **Biol. Pharm. Bull.** 38, 2015, 594-600 査読有
DOI: 10.1248/bpb.b14-00752.

Tago K, Funakoshi-Tago M, Itoh H, Y. Furukawa Y, Kikuchi J, Kato T, Suzuki K, and Yanagisawa K. Arf tumor suppressor disrupts the oncogenic positive feedback loop

including c-Myc and DDX5. *Oncogene* 34, 2015, 314-322 査読有
DOI: 10.1038/onc

Kobayashi T, Kim S, Lin YC, Inoue T, and Dynlacht BD. The CP110-interacting proteins Talpid3 and Cep290 play overlapping and distinct roles in cilia assembly. *J. Cell. Biol.* 204, 2014, 215-229 査読有
DOI: 10.1083/jcb.201304153

Jenie RI, Nishimura M, Fujino M, Nakaya M, Mizuno N, Tago K, Kurose H, and Itoh H. Increased ubiquitination and the crosstalk of G protein signaling in cardiac myocytes: Involvement of Ric-8B in Gs suppression by Gq signal. *Genes Cells* 18, 2013, 1095-1106 査読有
DOI: 10.1111/gtc.12099

Li J, D'Angiolella V, Seeley ES, Kim S, Kobayashi T, Fu W, Campos EI, Pagano M, and Dynlacht BD. USP33 regulates centrosome biogenesis via deubiquitylation of a centriolar protein, CP110. *Nature* 495, 2013, 255-259 査読有
DOI: 10.1038/nature11941

Saito Y, Kaneda K, Suekane A, Ichihara E, Nakahata S, Yamakawa N, Nagai K, Mizuno N, Kogawa K, Miura I, Itoh H, and Morishita K. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool in bone marrow niches by EVI1-regulated GPR56. *Leukemia* 27, 2013, 1637-1649 査読有
DOI: 10.1038/leu

伊東 広, 西村明幸, 永井裕介. 三量体 G タンパク質シグナル制御機構の新たな展開 *生化学* 85, 2013, 531-542. 査読有
<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2014/03/85-07-03.pdf>

伊東 広. GPCR シグナル制御機構の多様性と創薬 *実験医学* 31, 2013, 382-389. 査読無
<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758100922/>

[学会発表](計 15 件)

鯉森貴行, 西村基喜, 竹田浩之, 多胡憲治, 小林哲夫, 澤崎達也, 伊東 広. G s ユビキチン修飾を制御する分子機構の解析. 第 38 回日本分子生物学会第・88 回日本生化学大会, 2015 年 12 月 2 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

鳥居雅樹, 小島大輔, 西村明幸, 伊東 広, 深田吉孝. 2 種類のニワトリメラノプシンにおける G タンパク質の選択性. 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学大会, 2015 年 12 月 2 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

伊東 広. Regulation of G protein-coupled receptor signal in cancer cells. Pontianak International Conference on Advanced Pharmaceutical Sciences (PICAPS) 2015 and the 6th Annual Symposium of Indonesian Society for Cancer Chemoprevention. 2015 年 9 月 14 日, Pontianak (Indonesia)

伊達山泉, 小林哲夫, 伊東 広. Analysis of serotonin signaling mediated through primary cilia. The 4th International Conference on Pharmacy and Advanced Pharmaceutical Sciences. 2015 年 9 月 11 日. Yogyakarta (Indonesia)

堀部修平, 梶紀子, 小林哲夫, 伊東 広. The role of Ric-8A and Gai signaling in spindle formation. International Conference on Biosciences (IcoBio). 2015 年 8 月 5 日. Bogor (Indonesia)

堀部修平, 梶紀子, 小林哲夫, 伊東 広. 紡錘体形成における Ric-8 と G α i シグナルの役割. 第 67 回日本細胞生物学会. 2015 年 6 月 30 日, タワーホール船堀(東京都江戸川区)

鯉森貴行, 小林哲夫, 伊東 広. Analysis of molecular mechanism for Gas ubiquitination. The 2014 米国細胞生物学会. 2014 年 12 月 7 日. Philadelphia (U.S.A)

小坂隆二, 岩崎剛, 中村陽介, 松田直樹, 多胡憲治, 小林哲夫, 伊東 広. G タンパク質共役受容体 GPR56 の結合分子 Leprecan1 の解析. 第 37 回日本分子生物学会. 2014 年 11 月 27 日. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

伊達山泉, 小林哲夫, 伊東 広. 一次繊毛を介したセロトニンシグナル伝達機構の解析. 第 66 回日本細胞生物学会 2014 年 6 月 13 日. 奈良新公会堂(奈良県奈良市)

水野憲一, 太田茂之, 小林祐希, 坂口さや香, 伊東 広. 機能抗体を用いた癌細胞

における GPR56 の機能解析. 第 66 回日本細胞生物学会 2014 年 6 月 11 日. 奈良新公会堂 (奈良県奈良市)

エンス研究科・助教
研究者番号 : 80433994

(3) 連携研究者
なし

根岩直希、水野憲一、小林哲夫、伊藤友里、伊東 広. LGR5 の発現とシグナル伝達の解析. 第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 5 日. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

鯉森貴行、小林哲夫、水野憲一、伊東 広. Gas ユビキチン修飾を制御する分子機構の解析. 第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 4 日. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

野島悠佑、水野憲一、伊東 広. 神経細胞の分化に伴う GPR56 の発現パターンの変化. 第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 3 日. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

Jenie Riris I, 中矢道雄、水野憲一、多胡憲治、黒瀬等、伊東 広. 心筋細胞の G タンパク質シグナルにおける Ric-8B の機能. 第 86 回日本生化学大会. 2013 年 9 月 12 日 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

北野健、西村明幸、箱嶋敏雄、伊東 広. Allosteric inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. EMBO Conference on Allosteric Interactions in Cell Signaling and Regulation. 2013 年 5 月 15 日. Paris (France)

〔図書〕(計 1 件)

堀部修平、伊東 広 医学書院、生体の科学「細胞シグナル操作法」三量体 G タンパク質、2015、125

〔その他〕

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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 広 (ITOH, 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 : 101883005

(2) 研究分担者

小林 哲夫 (KOBAYASHI, Tetsuo)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ