

表 題 V1b バゾプレッシン受容体の細胞内トラフィック機  
構をターゲットとした創薬研究

論 文 の 区 分 博士課程

著 者 名 柏崎 亜樹

担当指導教員氏  
名 興水 崇鏡 准教授

所属 自治医科大学大学院医学研究科  
人間生物学系専攻  
生体防御医学分野  
細胞分子薬理学

2017年1月10日申請の学位論文

## 目次

1. 序論	2
2. 実験材料	7
3. 実験方法	9
3-1. タグ抗原付き受容体発現コンストラクトの作成	9
3-2. タグ付き受容体発現細胞の樹立	9
3-3. 細胞培養	10
3-4. 調整した細胞膜を用いた受容体結合実験	12
3-5. 細胞を用いた受容体結合実験	13
3-6. 受容体内在化の測定	14
3-7. 免疫染色	15
3-8. Western blot 解析	16
3-9. 統計学的解析	17
4. 結果	18
4-1. CHO/V1b 細胞における V1b 受容体の局在は、大部分が細胞内である	18
4-2. イメージングによる V1b 受容体の細胞内局在解析	22
4-3. V1b 受容体内在化の解析	28
4-4. V1b 受容体内在化による [ <sup>3</sup> H]AVP 取り込みは、飽和状態に達する	31
4-5. [ <sup>3</sup> H]AVP 解離の時間経過	34
4-6. 受容体内在化を抑制する薬物の探索	36
4-7. 受容体内在化を抑制する細胞外液条件の探索	41
5. 考察	44
6. 結論	48
7. 謝辞	49
8. 引用文献	50

## 1. 序論

G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor : GPCR) は、現在世界中で使用されている全医薬品中の 30% 以上が標的分子としている重要な遺伝子ファミリーである(Pierce and Lefkowitz, 2001)。近年では GPCR のシグナル伝達経路や結晶構造解析が進み、構造情報を基にした新しい医薬品探索法の開発が加速すると考えられる。GPCR の多くは細胞膜表面に局在し、細胞外環境の変化を伝えるホルモンや神経伝達物質、光、匂いなど多様な分子を受容する(Gomes et al., 2016)。刺激を受けて活性化した GPCR は、細胞内へ情報を伝達するが、この情報伝達経路には大きく分けて2種類が知られる。三量体 G タンパク質を介する経路では、活性化された受容体により、三量体 G タンパク質 $\alpha$ サブユニットに結合する GDP と GTP の交換が効率化され、GTP-結合型となった G タンパク質 $\alpha$ サブユニット、または $\beta\gamma$ サブユニットによってアデニレートサイクラーゼなどの効果器分子が活性化される。一方、三量体 G タンパク質を介さないで、 $\beta$ -arrestin を情報伝達分子として利用する経路も知られる。

非刺激時に細胞膜に局在する GPCR ファミリー受容体が刺激されると、その細胞内カルボキシル末端のアミノ酸がリン酸化され、 $\beta$ -arrestin を誘導し、脱感作して細胞内へ内在化することが知られている(Gainetdinov et al., 2004; von Zastrow and Williams, 2012)。また一旦内在化した受容体は、リサイクルされ再び

細胞膜へ戻るか、あるいは細胞内の蛋白質分解機構でダウンレギュレーションを受ける。受容体のリン酸化による脱感作や、内在化、ダウンレギュレーションなどの機構は、生体が繰り返し刺激された場合、やがてそれ以上の刺激に対し不応性を示す機序と考えられる。また受容体の不応性は、治療薬が受容体を刺激するタイプだった場合、効果減衰や耐性に直接関わるため、治療効果を規定する重要因子と考えられている。

受容体の細胞内への内在化機構の詳細は、アドレナリン受容体など非刺激時に細胞膜に局在する GPCR を研究対象として解明されてきた(Luttrell and Gesty-Palmer, 2010)。しかし、GPCR に属する受容体分子の中には、非刺激時に多くが細胞膜でなく、細胞質内に局在するものが知られる。CB1 カンナビノイド受容体や $\alpha_{1d}$  アドレナリン受容体などがその例であるが、これらの場合、水溶性のホルモンや治療薬は細胞膜を通過することができず、多くの細胞内受容体には結合できない。薬物の開発スクリーニングにおいても、細胞内の受容体を対象とした場合は、水溶性化合物の評価は困難となる。そのため、細胞内に局在する受容体の細胞内局在機構や細胞膜との輸送機序を解明し、それらを制御する新たな手段が求められている。

アルギニンバゾプレッシン (AVP) は下垂体後葉由来の強力な血管収縮物質として発見され、下垂体後葉から血中に放出されて腎集合管での水再吸収に関

わる抗利尿ホルモンとしてとしての役割が明らかとなった。バゾプレッシンあるいはバゾプレッシン受容体作動薬が現在治療に利用される疾患は、尿崩症、消化管出血、血友病等であり、ホルモン分泌障害時には検査薬としても利用される。AVP は、視床下部室傍核や視索上核で合成され、下垂体後葉の神経終末や脳内に広く分泌される(Stoop, 2012)。バゾプレッシン受容体には3つのサブタイプ V1a、V1b および V2 が知られている。それぞれの受容体は、抵抗血管、下垂体前葉 adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 分泌細胞、腎集合管が代表的な発現組織として知られる。V1a 及び V1b バゾプレッシン受容体が刺激された場合、Gq タンパク質と共役してフォスホリパーゼ C を活性化し、細胞内イノシトール 3 リン酸、ジアシルグリセロール、カルシウム濃度の上昇を来す(Koshimizu et al., 2012)。また、V2 受容体の活性化は Gs タンパク質を介して cyclic-AMP の上昇を惹起する。3 種類のバゾプレッシン受容体の中、V1a と V2 受容体は代表的な GPCR としてこれまでに多くの研究が報告されてきた。これら2つの受容体は、非刺激時に主に細胞膜に局在し、刺激とともに内在化を起こす典型的な GPCR と考えられる(Innamorati et al., 2001; Innamorati et al., 1998; Oakley et al., 1999)。しかし、V1b バゾプレッシン受容体に関して受容体の細胞内局在とその変化に関する詳細な解析はこれまで報告されていない。

AVP は、下垂体前葉の V1b バゾプレッシン受容体を刺激することで ACTH の

分泌を促進することが知られる(Antoni, 1993; Lolait et al., 1995)。さらに、代表的 ACTH 分泌刺激である corticotropin-releasing hormone (CRH) の作用を増強する効果も報告されており、視床下部-下垂体-副腎皮質系による生体のストレス反応において重要な役割を果たしていると考えられる(Aguilera et al., 2008; Lolait et al., 2007; Murat et al., 2012; Tanoue et al., 2004)。下垂体以外でも、膵 $\beta$ 細胞におけるインスリン分泌促進効果や、消化管における炎症反応に AVP-V1b 受容体経路が働いていることが判明している(Ferrier et al., 2010; Oshikawa et al., 2004)。さらに V1b 受容体は、V1a 受容体とともに中枢神経系に広く分布する。V1b 受容体に比較的特異的な化合物や、V1b 遺伝子を全身性に欠損させたマウスを用いた他のグループにより、V1b 受容体が不安や社会行動、中枢性の薬物感受性に関与することが報告されている(Roper et al., 2011; Stevenson and Caldwell, 2012)。このように V1b 受容体が大きく関与する生命現象が明らかになる中、V1a 及び V2 受容体を対象とする治療薬は臨床応用されているが、V1b 受容体に対する薬物は未だ上市されておらず、今後の新薬開発分野として期待が寄せられている。

本研究では、基礎的情報のこれまで少なかった V1b バゾプレッシン受容体を対象として、細胞外からの刺激を受けた受容体が細胞内局在を変化させる機構の全体像を解明し、この受容体の効率的な医薬品開発に役立てることを目標にする。我々は本研究の過程において意外なことに、V1b 受容体は非刺激時に多

くが細胞内に局在することを見出した。このことは V1b 受容体発現細胞を対象に薬物スクリーニングを行う際に、水溶性薬物が受容体に到達困難であることを意味する。

## 2. 実験材料

Chinese hamster ovary (CHO) 細胞および Human embryonic kidney (HEK) 細胞は研究室の保存株を用いた。マウス V1b 受容体の発現用ベクターは以前報告されたコンストラクトを使用した(Oshikawa et al., 2004)。マウス V1a 受容体は脳 total RNA より cDNA 合成し、以前に報告した方法で塩基配列を確認した(Koshimizu et al., 2010)。[phenilalany1-3,4,5-3H(N)]-8-L-Arginine Vasopressin、Enhanced Chemiluminescence 試薬は Perkin Elmer から購入した。PVDF 膜は GE healthcare から購入した。F-12 メディウム、zeocin、および pcDNA3.1(-)Zeo は Life Technologies Japan から購入した。 $\beta$ -glycerophosphate は Merck Millipore から購入した。TEMED (tetramethylethylenediamine)、Tris、Fetal bovine serum (FBS)、Trypsin-EDTA、NP-40、DTT (dithiothreitol)、は Tocris Bioscience から、U73122、U0126、SP600125、および AG1478 は Cell Signaling Technology から購入した。Fluo-4、Penicillin/Streptomycin、Ham F-12 メディウム、pluronic F-127、zeocin、pcDNA3.1 Zeo (-)ベクター、Bradford タンパク質測定試薬は ThermoFisher から購入した。Arginine vasopressin (AVP) はペプチド研究所（大阪）より購入した。Sodium dodecyl sulfate (SDS)、NaF、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、NaCl、4- (2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)、ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA)、 $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、glycine、ethylene glycol tetra-acetic acid (EGTA)、glucose、



CaCl<sub>2</sub>、NaOH、MgCl<sub>2</sub>、methanol、*n*-butanol は和光純薬工業株式会社から購入した。Bovine serum albumin (BSA) はナカライテスク株式会社から購入した。Dimethyl sulfoxide (DMSO)、latrunculin、および nocodazole は SIGMA-Aldrich から購入した。Prestained Protein Marker、Broad Range (7-175 kDa)、acrylamide/bis、Tween-20 は BioRad から購入した。FuGene 6 は Promega から購入した。15 mL、および 50 mL のコニカルチューブ、ガラスベース 35 mm dish は IWAKI から購入した。12 穴ウェル、24 穴ウェル、および 60 mm dish は FALCON から購入した。100 mm dish はベクトン・デッキンソンから購入した。

### 3. 実験方法

#### 3-1. タグ抗原付き受容体発現コンストラクトの作成

V1a 及び V1b 受容体を動物細胞に発現するために、pcDNA3.1(-)ベクターに各受容体遺伝子のタンパク質コード領域を移行した。また、PCR 法を用いてアミノ基末端 (N 末端) またはカルボキシル基末端 (C-末端) に FLAG タグ抗原 (アミノ酸配列 : N-DYKDDDDK-C) を付加した。以降、N-末、C-末 FLAG タグ抗原付き V1a 及び V1b 受容体をそれぞれ、FLAG-V1a、V1a-FLAG、FLAG-V1b、V1b-FLAG とする。C-末端に Green fluorescent protein (GFP) を付加する場合、PCR 法にて終止コドンを除き、EcoRI/BamHI 制限酵素にて V1a 及び V1b のタンパク質コード領域を pEGFPN3 ベクター (Takara Bio, Japan) へ移行した。これら発現用コンストラクトは塩基配列をシーケンスにて確認した。

#### 3-2. タグ付き受容体発現細胞の樹立

FLAG タグ抗原を付加した V1a 及び V1b 受容体を安定発現する CHO 細胞と HEK 細胞は以前に述べた方法で作成した(Arai et al., 2015) 。具体的には、100 mm ディッシュに  $10^5$  細胞の細胞を播種し、24 時間培養用培地で培養した。トランスフェクションには、0.7mL の血清無し培地、21 $\mu$ L の FuGene 6 トランスフェクション試薬、7 $\mu$ g の発現用ベクターを混和した液を加えよく攪拌し、さらに 24

時間培養した。翌日に 100 mm dish 10 枚に植え継ぎ、 zeosin によるセレクションを開始した。zeosin 耐性を持つ細胞はコロニーを形成して生き残るため、単一コロニーをクローニングシリングでクローニングした。得られた細胞は、プラスミド DNA が細胞のゲノムに挿入され、zeosin 耐性遺伝子とタグ付き受容体遺伝子の両方を安定発現する。V1a、及び V1b 受容体安定発現細胞は、AVP 刺激による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇反応を示すため、これを指標に細胞株をスクリーニングした。その後の CHO 細胞の培養は 10% FBS、 0.1% Penicillin/Streptomycin、0.5 mg/ml zeocin を添加した F-12 Nutrient Mixture (Ham's F-12)を用い、HEK 細胞は、同様の DMEM 培地を用いて 100 mm 細胞培養プレート中に行なった。細胞の継代は 3~4 日毎に行なった。GFP 付き受容体安定発現細胞は G418 耐性遺伝子を持つため、1 mg/mL G418 存在下で維持した。

### 3-3. 細胞培養

液体窒素中に保存された凍結細胞は常法に従い解凍した(Arai et al., 2015) 。15 mL のコニカルチューブ中に 10%FBS 入り Ham's F-12 medium 9 mL あるいは 10%FBS 入り DMEM 9 mL を加えた。次に、液体窒素内で凍結チューブにて保存されている 10%DMSO 入り Ham's F-12 medium 中の CHO 細胞 1 mL、及び 10% DMSO 入り DMEM 中の HEK293 細胞を 37 °C の恒温槽中で溶解した。溶解した

後、直ちに培養メディウム 9 mL が入った 15 mL のコニカルチューブ中に加え、混合した。細菌の混入を防ぐために凍結チューブの蓋はピンセットを用いて開き、開けた容器の口に触れないように注意した。凍結細胞と合わせた細胞懸濁液 10 mL 入りのコニカルチューブを室温 1,100 rpm で 2 分間遠心した。続いて上清を吸引し、コニカルチューブをタッピングして細胞を解してから、メディウム 3 mL を加え、全量を 60 mm の細胞培養用ディッシュに播種した。翌日まで 37°C で培養した後、培養メディウムを入れ替えて培養を継続した。

細胞を継代する場合、細胞ディッシュのメディウムをアスピレーターで吸引し、phosphate buffered saline (PBS:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  238 mM、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10 mM、NaCl 154 mM、pH = 7.4) 3 mL を加えて、細胞全体を洗い流した。続いて PBS を吸引し、0.25% Trypsin + 1mM EDTA 1mL を加えてインキュベーター中 37°C で 2 分間留置した。インキュベーターから取り出したディッシュの底を軽く叩いて細胞を剥がし、培養用メディウムを 2 mL 加えて Trypsin の反応を停止した後、ピペッティング操作により細胞を解して全量を 15 mL コニカルチューブに移し、1,100 rpm で 2 分間遠心した。さらに上清を吸引し、残った細胞のペレットをタッピングして崩してから、メディウム 10 mL を加え、転倒混合し細胞懸濁液を作製した。10 cm dish に 6~6.5 mL のメディウムを加え、さらに細胞懸濁液 0.5~1 mL を加えて全量を 7 mL とした。10 cm dish を 37°C、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター中

で培養し、細胞が再び増殖したところで同様の操作を繰り返して行い、細胞を継代および維持した。

### 3-4. 調整した細胞膜を用いた受容体結合実験

V1a または V1b 受容体を発現する CHO 細胞 (CHO/V1a、CHO/V1b 細胞) から膜分画を得るために、Shibata らの方法を用いた (Shibata et al., 1995)。具体的には、150 mm dish 中で培養した細胞を受容体結合実験用 buffer (50 mM Tris-HCL, pH 7.4、10 mM MgCl<sub>2</sub>) に回収後超音波で粉碎し、高速遠心機で 1500 rpm 4°C で 5 分間遠心し、核成分を除いた後、上清を 18000 rpm 4°C で 20 分間遠心することによって粗膜分画を回収し、タンパク質濃度を Bradford 法によって計測した。膜分画は使用まで摂氏-80 度に保存した。膜分画の使用量は、K<sub>d</sub> 値付近の濃度 1 nM [<sup>3</sup>H]AVP を単独で結合させた際に、シンチレーションカウンターの計測値が 2000~3000 cpm になるよう調整した。受容体結合実験では、非放射性リガンド 50μL、放射性リガンド 50μL、膜分画 100μL を入れ、0.3% bovine serum albumin を含む受容体結合実験用 buffer 中、室温で 1 時間インキュベーションした。反応は氷冷した受容体結合実験用 buffer を加えて Glass fiber filter (Type GF/B, GE Healthcare UK Ltd., UK) を用いて膜分画を回収し、洗浄後、液体シンチレーションカクテル (Ultima Gold<sup>TM</sup>, PerkinElmer) を 4mL 加え、シンチレーションカウ

ンター (LSC-6500; Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan) を用いて計測した。非特異的結合は、1  $\mu$ M AVP 存在下での結合分とし、特異的結合から除去した。

### 3-5. 細胞を用いた受容体結合実験

受容体安定発現細胞を用い、細胞表面の受容体に対する [ $^3$ H]AVP の結合量を測定する実験は Arai らの方法を用いた (Arai et al., 2015)。すなわち、CHO 細胞用 F-12 培地 (10% FBS、2.0% zeocin、0.1% Penicillin-Streptomycin) 中で 24-well dish に  $1 \times 10^5$  cells/well で播種し、24 時間培養した。競合的受容体結合実験では、Buffer C (F-12 培地に 20 mM Hepes pH = 7.4、0.3 % BSA を加え作製) 500  $\mu$ L で細胞を 2 回リンスし、1 nM の [ $^3$ H]AVP 存在下、濃度の異なる非標識リガンドを含む Buffer C 450  $\mu$ L/well 中で 37°C、1 時間反応させた。その後反応液を吸引除去し、受容体結合実験用 buffer 500  $\mu$ L で洗浄し、0.1 N NaOH 500  $\mu$ L を加えて細胞に結合した放射性標識リガンドを回収後、4 mL の液体シンチレーションカクテル (Ultima Gold<sup>TM</sup>, PerkinElmer) を 4mL 加え、シンチレーションカウンター (LSC-6500; Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan) を用いて放射性トリチウム量を計測した。非標識リガンドとして Buffer C を加えた場合の結合量を 100 % とし、1  $\mu$ M AVP を含む場合の結合量を非特異的結合とした。

### 3-6. 受容体内在化の測定

12 または 24-well dish で 24 時間培養した細胞を、buffer C または基本 buffer [10 mM HEPES (pH = 7.4), 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose] 中で 1 nM [<sup>3</sup>H]AVP と 4°C で 2 時間インキュベーションした。内在化の阻害薬を用いる場合は、最初からバッファーに含有させた。次に培養ディッシュを 4°C または 37°C に移し、30 分間インキュベーションした。その後、培養ディッシュを氷上に移し、反応液を除き氷冷した基本 buffer で結合しなかった [<sup>3</sup>H]AVP を除去した。受容体内在化とともに細胞内に取り込まれた [<sup>3</sup>H]AVP と、細胞表面に結合している [<sup>3</sup>H]AVP を分けるため、細胞を酸性 buffer (50 mM 酢酸ナトリウム、150 mM NaCl, pH = 3) で 10 分間処理し、基本 buffer で 3 回洗浄した (Haigler et al., 1980)。予備実験ではこの操作によって、細胞表面に結合した [<sup>3</sup>H]AVP は 99%取り除かれた。酸性 buffer 中の放射能を細胞表面の結合分、細胞を 0.1 N NaOH で回収した溶液中の放射能を内在化分として評価した。回収したそれぞれのサンプルに 4 mL の液体シンチレーションカクテルを加えて混合した後、液体シンチレーションカウンターを用いて放射能を計測した。

β-arrestin の siRNA トランスフェクションによる受容体内在化抑制実験では、CHO/V1b 細胞を、 $1 \times 10^5$  cells/well の濃度で 12 穴ウェルに播種し、24 時間培養した。続いて、2.0 mL のエッペンドルフチューブに siRNA 1.2 μL と OPTI MEM

100  $\mu$ L、及び 1.5 mL のエッペンドルフチューブに RNAiMax 2.0  $\mu$ L と OPTI MEM 100  $\mu$ L 加え、それぞれ混合した後に 10 分間静置した。その後、それぞれ 200  $\mu$ L/well ずつ加えよく混和し 24 時間後に受容体内在化実験に用いた。

### 3-7. 免疫染色

マウス V1b 受容体 Lysine-228 から Serine248 までのアミノ酸配列に対応する合成ペプチドを抗原とするラットモノクローナル抗体を作成した (CREA Japan)。

細胞の免疫染色では、ガラスベースディッシュに培養した細胞を 4% paraformaldehyde で処理し、リン酸バッファー (pH = 7.4) で 1 回洗浄後、0.25% Triton X-100 と 5% dimethyl sulfoxide を含むリン酸バッファー (pH = 7.4) で室温 5 分間処理した。ブロッッキングには 3% BSA を含むリン酸バッファー (pH = 7.4) を用いた。1 次抗体は以下の希釈で用いた (anti-FLAG M2 抗体 1:1500、抗マウス V1b 受容体抗体 1:100)。Alexa 488 または 594 で標識された 2 次抗体は 1:1000 で用いた。ラット下垂体の免疫組織染色では、8 週齢の雄性 Wister-Kyoto ラット (Charles River Laboratories Japan) をペントバルビタールで深麻酔後、4% PFA で灌流固定し、取り出した下垂体を 20% sucrose 液中で 4  $^{\circ}$ C 24 時間処理した。8  $\mu$ m の凍結切片をリン酸バッファー (pH = 7.4) で洗浄後、1% Triton X-100 で 3 分間処理し、5% ウシ胎児血清でブロッッキング後、1 次抗体を 4  $^{\circ}$ C 一晚処理



した。リン酸バッファー (pH = 7.4) で洗浄後、2 次抗体を処理し、3,3'-diaminobenzidine (DAB) と nickel chloride を使用してシグナルを検出した (Vectastain Elite ABC kit、Vector Laboratories)。蛍光観察には共焦点レーザー顕微鏡を使用した (Olympus、FV3000)。

### 3-8. Western blot 解析

ラット抗 V1b モノクローナル抗体のハイブリドーマは、Western blot 解析と免疫染色によって陽性シグナルが得られるクローンを選択した。Western blot 解析では、HEK 細胞に強制発現させた FLAG-V1b 受容体を抗 FLAG 抗体または抗 V1b 抗体で免疫沈降させ、電気泳動の後 PVDF 膜へ転写した。以前に述べた方法を用い抗 FLAG 抗体で目的のバンドが検出されることを陽性コントロールとした (Koshimizu et al., 2002)。具体的には、 $2 \times 10^6$  cells/10 cm dish に細胞を播種し、24 時間培養後、PBS 2 mL で dish をリンスし、Lysis buffer [Hepes-NaOH (pH = 7.4) 20 mM、MgCl<sub>2</sub> 3mM、NaCl 50 mM、Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM、NaF 10mM、 $\beta$ -glycophosphate 20 mM、EDTA 1mM、EGTA 1mM、NP-40 0.5%、DTT 10 mM、PMSF 10 mM、Complete-mini (protease inhibitor) 1 錠/10 mL] 0.2 mL を加えて細胞膜を回収し、20 分間氷上にて保持した。その後、10 秒間の超音波処理を 3 回行い、15,000 g、4°C で 15 分間遠心した。得られた上清に抗体を加え、4°C で 1 時間転

倒攪拌した。さらに、Protein G を 50  $\mu$ L 加えて 4°C で 1 時間転倒攪拌した。TBS (Tris base 12 mM、NaCl 137 mM、pH = 7.6) 1mL で 3 回洗浄した後、5×sample buffer [1M Tris-HCl (pH = 6.8) 、50% glycerol、10%SDS、2M Methanol、10% Bromophenol Blue] 50  $\mu$ L を加えて、37°C で 30 分間処理し、泳動用サンプルとした。泳動、トランスファー後、PVDF 膜は 3% BSA を含む TBS でブロッキングし、抗体はこのブロッキング液で希釈した。抗 FLAG 抗体、抗 V1b モノクローナル抗体はそれぞれ 1:2000 と 1:100 の希釈倍率で Western blot 解析に用いた。Horseradish peroxidase 付き 2 次抗体は、1:5000 の希釈倍率で使用し、化学発光試薬 (Western Lightning Plus ECL, PerkinElmer ) と Imaging analyzer (Fuji film) を用いて検出した。

### 3-9. 統計学的解析

図中の値は平均値 $\pm$ S.E.M.を示す。有意差は Student's t-test または ANOVA と Holm's 法による多重比較により評価した。統計計算は R プログラムを使用した [R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria]。受容体結合実験で得られた結果は、Igor ver.6.2 プログラムを用いて non-linear least square method により Hill の公式で近似し、IC<sub>50</sub> 値を算出した。

## 4. 結果

### 4-1. CHO/V1b 細胞における V1b 受容体の局在は、大部分が細胞内である

これまで解析が十分でなかった V1b 受容体に関し、我々はまず非刺激時の細胞内局在から解析した。そのために、CHO 細胞に V1a または V1b 受容体を安定的に発現する細胞を樹立した。2 種の細胞株の受容体発現量は 2 倍以内となるような細胞株を選び以降の実験に用いた。図 1A に CHO/V1a 及び CHO/V1b 細胞から膜標本を調整し、放射性 $[^3\text{H}]\text{AVP}$  の総結合部位を求めた Saturation binding study（飽和受容体結合実験）の結果を示す。 $[^3\text{H}]\text{AVP}$  の各受容体に対する親和性を示す  $K_d$  値は以前報告された値にほぼ匹敵し、総受容体数を示す  $B_{\text{max}}$  は 2 倍以内の差であった (Table 1)。

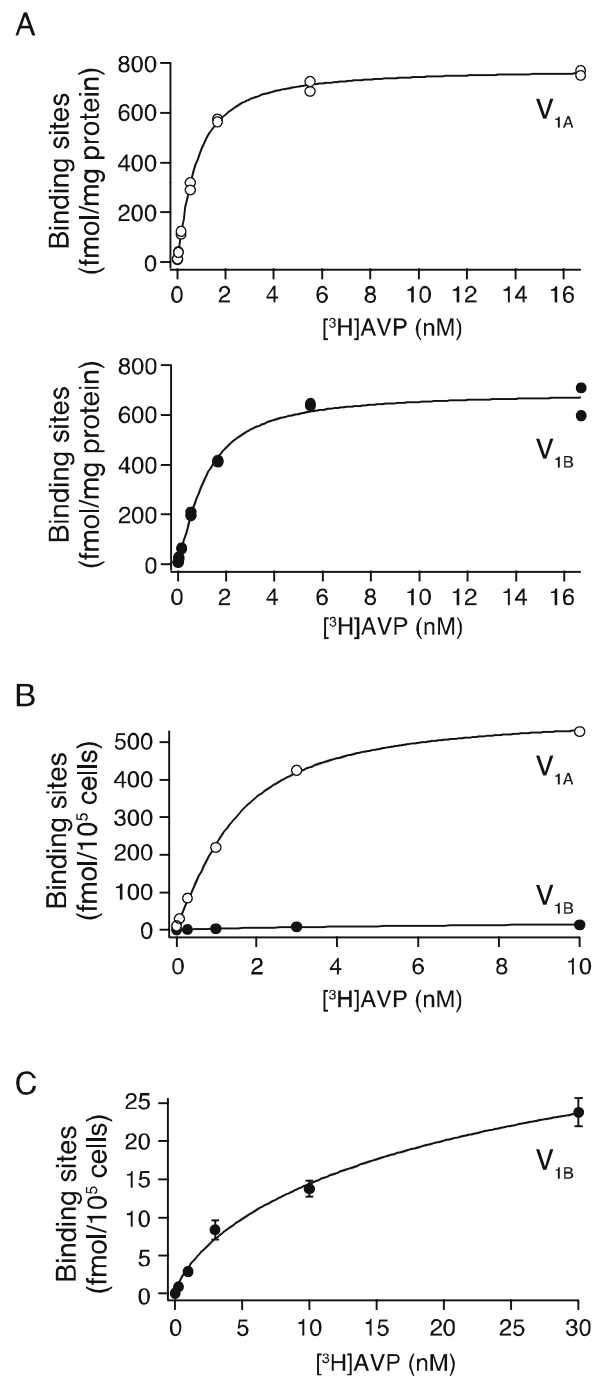


図1 CHO/V1a細胞、CHO/V1b細胞における飽和受容体結合実験

(A)各細胞から膜分画を調整し、段階的に濃度を上昇させた $[^3\text{H}]\text{AVP}$ との飽和結

合曲線を示す。グラフは4変数ロジスティック式に最小二乗法を用いてフィッティングし **Bmax** と **Kd** 値を得た。図には **duplicate** で行った代表的な1回分の結果を示す。実験は3回繰り返し、同様の結果を得た。**Bmax** と **Kd** 値の平均は Table 1 に示す。(B)12-well 培養ディッシュ上に培養した細胞表面の受容体に対する [<sup>3</sup>H]AVP との飽和結合曲線を示す。CHO/V1a 細胞、及び CHO/V1b 細胞培養ディッシュは氷上に保持し、段階的に濃度を上昇させた [<sup>3</sup>H]AVP と反応させた。**Duplicate** による1回の実験の結果を示す。同様の結果を合計3回の実験より得て、平均した値を Table 1 に示す。(C) Fig.1B における Y 軸を、V1b 受容体の飽和曲線に合わせて拡大した。V1b 受容体に対する [<sup>3</sup>H]AVP の結合曲線は、飽和状態に達し、得られた **Bmax** は Table 1 に示す。図は参考文献より引用(Kashiwazaki et al., 2015)

Table 1. Bmax and Kd values obtained from saturation binding study on membrane samples or intact cells.

		°C	Bmax (fmol/mg)	Kd (nM)	(n)
CHO/V <sub>1A</sub>	Membrane homogenates	25	855 ± 78	0.9 ± 0.1	(3)
CHO/V <sub>1B</sub>	Membrane homogenates	25	645 ± 53	1.8 ± 0.7	(3)
		°C	Bmax (fmol/10 <sup>5</sup> cells)	Kd (nM)	
CHO/V <sub>1A</sub>	Intact cells	4	446 ± 16 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.1	(3)
	Intact cells	37	281 ± 14 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.2	(3)
CHO/V <sub>1B</sub>	Intact cells	4	49 ± 10 <sup>b</sup>	32 ± 17	(4)
	Intact cells	37	217 ± 4 <sup>b</sup>	11 ± 1	(3)

<sup>a</sup>,  $P < 0.05$ , Bmax of intact CHO/V<sub>1A</sub> cells at 4 °C vs. 37 °C

<sup>b</sup>,  $P < 0.05$ , Bmax of intact CHO/V<sub>1B</sub> cells at 4 °C vs. 37 °C

細胞膜分画を用いた受容体結合実験とは対比的に、培養細胞をディッシュに培養したまま細胞膜表面の受容体に対する $[^3\text{H}]\text{AVP}$ の結合を調べた所、CHO/V1b細胞ではCHO/V1a細胞と比較して、細胞表面に存在する $[^3\text{H}]\text{AVP}$ の結合部位が有意に少ないことが判明した(図1B)。CHO/V1a細胞とCHO/V1b細胞の細胞表面における $B_{\text{max}}$ 値は、それぞれ $446 \pm 16$ と $49 \pm 10 \text{ fmol}/10^5 \text{ cells}$ であった(図1B、Table 1)。CHO/V1b細胞表面への $[^3\text{H}]\text{AVP}$ の結合は、CHO/V1a細胞のおよそ10分の1だが、Saturableであった(図1C)。これより、細胞膜に局在するV1a受容体に対し、V1b受容体は多くが細胞内に局在し水溶性のリガンドは細胞膜を通過できないために細胞内のV1b受容体には届かないと考えられる。さらに、膜分画を使用した受容体結合実験と比較し、細胞膜上のV1b受容体は $K_d$ 値で約18倍大きく、V1a受容体は1.6倍に留まることと対比的であった。細胞膜上のV1b受容体で $K_d$ 値が大きくなる理由は現時点では不明であり、今後の研究課題と考えられる。

#### 4-2. イメージングによるV1b受容体の細胞内局在解析

受容体結合実験での細胞内局在の所見をイメージング解析により確認するため、C末にGFP蛍光タンパク質を付加したV1aまたはV1b受容体を作成し、CHO細胞に安定発現させた細胞株を作成した。V1a-GFPを発現させたCHO細胞では

(CHO/V1a-GFP)、以前報告された如く(Fukunaga et al., 2006)、蛍光は主に細胞膜に一致して観察され受容体は細胞膜上に分布した。一方、CHO/V1b-GFP 細胞では、細胞質と細胞膜の両方に蛍光が観察され、画像解析でも V1b 受容体は多くが細胞内に局在することが明らかとなった (図 2 A)。



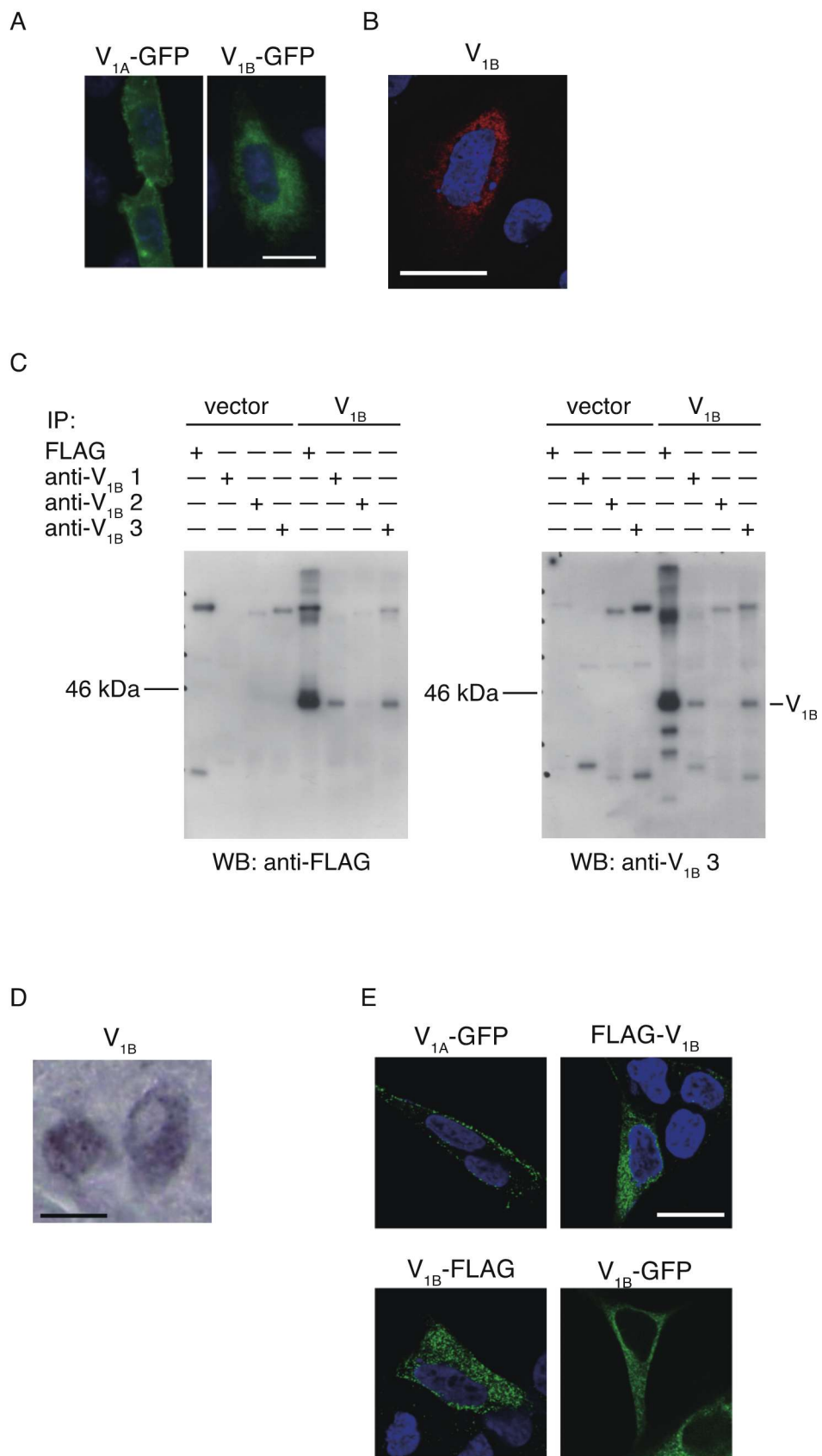


図 2 培養細胞と下垂体前葉における非刺激時の V1b 受容体は、細胞質に多く分布する。

(A) V1a-GFP、V1b-GFP 受容体を CHO 細胞に安定発現させた場合の細胞内局在。

4%PFA で固定した細胞をコンフォーカル顕微鏡にて蛍光観察した。核は DAPI

にて染色した。(B) CHO 細胞に発現させたタグ無し V1b 受容体の細胞内局在。

抗 V1b 受容体モノクローナル抗体により認識された受容体を、Alexa594 付き 2

次抗体（赤）で可視化した。核は DAPI にて染色し、コンフォーカル顕微鏡にて

蛍光観察した。(C) Western blot 解析による抗 V1b 抗体の確認。HEK 細胞に

V1b-FLAG 受容体を発現させ、抗 FLAG 抗体、または 3 種類の抗 V1b モノクロ

ーナル抗体で免疫沈降後、抗 FLAG 抗体、または抗 V1b モノクローナル抗体 3

で Western blot 解析を行った。抗 V1b モノクローナル抗体 1 及び 3 では、FLAG

抗体で観察される V1b-FLAG 特異的シグナルと同じ泳動度のバンドが得られ、

抗 V1b モノクローナル抗体を用いて特異的な免疫沈降が可能ことが判明した。

(D) ラット下垂体前葉細胞における V1b 受容体の局在。抗 V1b 抗体処置後、ビ

オチン付き 2 次抗体とアビジン-horseradish peroxidase を処置し、DAB と nickel

chloride を基質として発色させた。組織内の V1b 受容体が細胞質に分布している

ことが判明した。(E) V1b 受容体に GFP や FLAG を付加しても HEK 細胞におけ

る細胞内局在は影響を受けない。GFP は 480nm の励起光による 512 nm の蛍光

を、抗 FLAG 抗体は Alexa488 付加 2 次抗体と反応させ GFP と同様に観察した。  
実験結果は 3-4 回繰り返し同様の結果を得た 1 回の結果を示す。図中のスケール  
バーは 20  $\mu\text{m}$  を示す。図は参考文献より引用(Kashiwazaki et al., 2015)

さらに、付加した GFP タグが受容体の局在には影響を与えないことを確かめるため、タグの無い受容体の局在について抗 V1b 受容体抗体を用いて検索した。その結果、タグ無し抗体も多くが細胞内に局在することが明らかとなった（図 2B）。V1b 受容体を発現しない CHO 細胞からはシグナルを検出しなかったことから、抗 V1b 受容体抗体は V1b 受容体を特異的に検出していることが示唆された。さらに、抗 V1b 受容体抗体の特異性は、Western blot 解析でも示唆された（図 2C）。すなわち、Western blot 解析で V1b-FLAG を抗 FLAG 抗体によって検出したバンドシグナルと、抗 V1b 受容体抗体で検出したバンドシグナルは、同じ泳動度を示した（図 2C）。培養細胞に強制発現させた V1b 受容体だけでなく、生体内の V1b 受容体についても局在の解析を行った。すなわち、ラット下垂体前葉の V1b 受容体は、細胞に発現させた V1b 受容体と同様に細胞質に多くのシグナルを認めた（図 2D）。また HEK 細胞において、FLAG 抗原を V1b 受容体の N 末や C 末に付加しても、受容体の局在に大きな影響は与えないことが明らかとなった（図 2E）。以上より、V1b 受容体やタグ付き V1b 受容体は、CHO 細胞、HEK 細胞、下垂体前葉細胞内において多くが細胞質に分布することが明らかとなった。V1b 受容体を発現する細胞はこれまでも AVP の刺激によって Gq-PLC パスウェイを活性化することが報告されている。我々が作成した CHO/V1b 細胞、HEK/V1b 細胞においても、100 nM AVP 刺激によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの上昇を

認めた(Arai et al., 2015)。すなわち、細胞膜に局在する比較的少量の V1b 受容体は機能を保持しており、細胞内情報伝達を惹起する能力を保持していると考えられた。以上より、V1a と V1b 受容体は高いアミノ酸配列の相同性を示すにも関わらず(Koshimizu et al., 2012)、非刺激時の局在には大きな違いを認めることが明らかとなった。

#### 4-3. V1b 受容体内在化の解析

V1b 受容体の内在化を、CHO/V1b 細胞に $[^3\text{H}]\text{AVP}$  を処置した際に細胞内に取り込まれる放射能を指標に解析し、V1a 受容体と比較した。細胞膜上の受容体に結合した $[^3\text{H}]\text{AVP}$  は酸性バッファーを処置することで 99%除去できることより、酸性バッファーによる洗浄後にも細胞に残る放射能を内在化分とした(Haigler et al., 1980)。これまで受容体の内在化は、4℃ で阻害されることが知られている。事実、私の実験系でも氷上に培養ディッシュを保持しつつ $[^3\text{H}]\text{AVP}$  を処置した場合は、全く放射能の取り込みが起らず、酸性バッファーにより 99%の放射能が除去できることを確認した（データは示していない）。この終始氷上で得られた細胞表面の結合分を”Surface”とした。一方で 37℃ で $[^3\text{H}]\text{AVP}$  を処置した場合、CHO/V1a 細胞、CHO/V1b 細胞ともに $[^3\text{H}]\text{AVP}$  の取り込みを認め、受容体が内在化したことが判明した（図 3）。

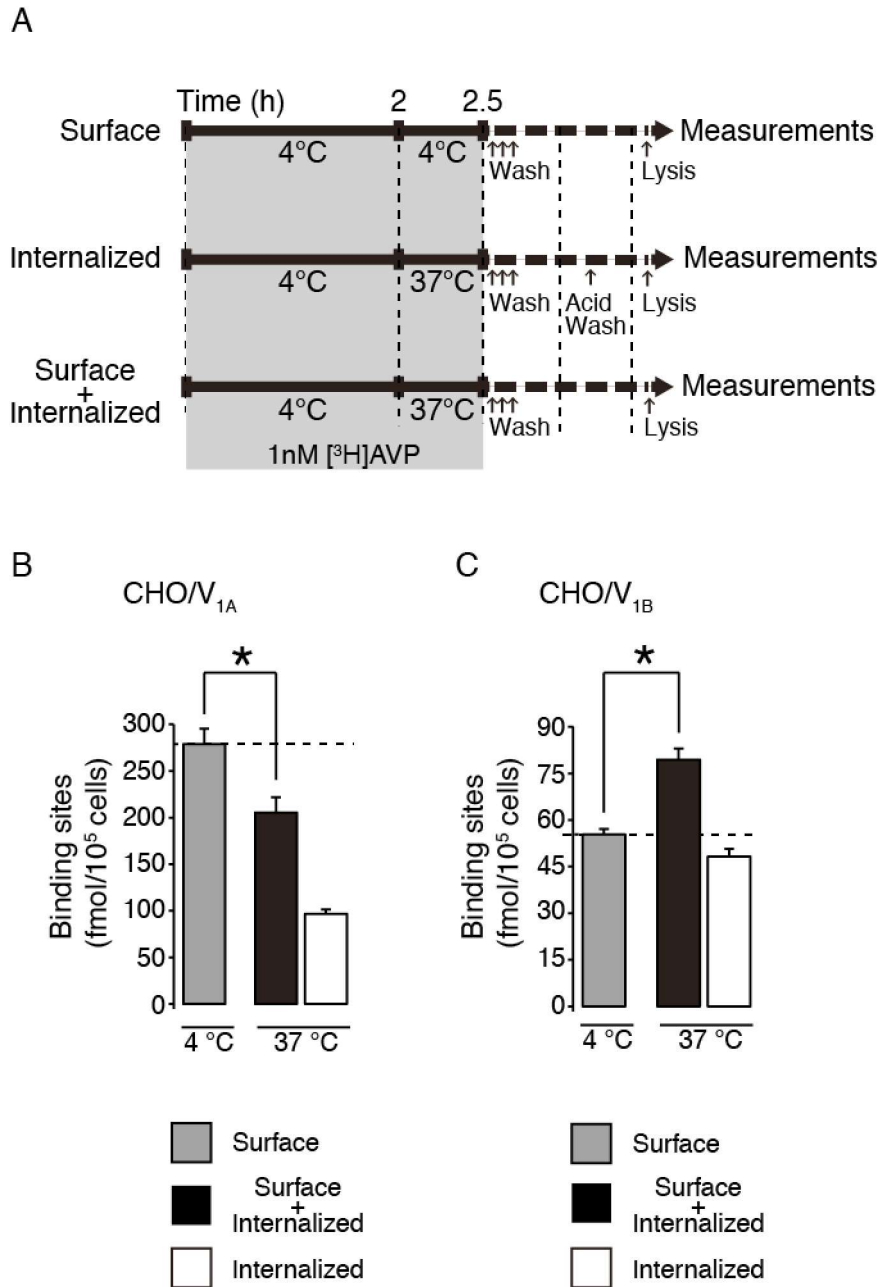


図3 CHO細胞において刺激後のV1b受容体は内在化が亢進している

(A) 実験手順のシェーマを示す。CHO/V1a、CHO/V1b細胞を1 nM [<sup>3</sup>H]AVP と4 °C で2時間反応させた。その後、培養ディッシュを4 °C または37 °C に移し、さらに30分間反応させ、氷上にて氷冷した binding バッファーで洗浄し過

剰の $[^3\text{H}]\text{AVP}$ を除いた (Wash)。経過中  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  のままであった細胞は、受容体内在化が抑制され、細胞表面の受容体に結合した放射活性 (Surface) が得られた。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  に移した場合は受容体内在化が起こり、細胞表面に結合した $[^3\text{H}]\text{AVP}$  を酸性 buffer で除き、細胞内に受容体内在化で取り込まれた放射活性 (Internalized) を計測した。Surface plus internalized は、 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  に移し acid wash を行わず、細胞表面と内在化した受容体の両方から得られた放射活性を示す。CHO/V1a (B)、CHO/V1b (C) の結果を示す。非特異的結合は、 $1\text{ }\mu\text{M AVP}$  によっても排除されない放射活性とした。\*,  $P < 0.05$ , surface sites ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) vs. surface plus internalized sites ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ )、t 検定。triplicate で行った 6 回の実験の平均を示す。図は参考文献より引用(Kashiwazaki et al., 2015)

内在化した受容体は、酸性バッファーで洗浄後に残った放射能で、“Internalized”とし、洗浄前の細胞から得られる放射能は、“Surface + Internalized”とした。細胞膜上に受容体の多い CHO/V1a 細胞では、CHO/V1b 細胞よりも多くの“Surface”カウントが得られ（図 3B、3C 灰色棒グラフ）、多くの受容体が内在化した（図 3B、3C 白棒グラフ）。興味深いことに、V1a 受容体では、細胞表面受容体の 35% が内在化したのに対し、V1b 受容体では細胞表面受容体の 87%と比較的多くの割合の受容体が内在化していることが明らかとなった（図 3 において灰色棒グラフに対する白棒グラフの割合）。CHO/V1b 細胞では、内在化受容体が多く、インキュベーション後の“Surface + Internalized”の放射能は、“Surface”カウントよりも大きくなることが判明した。対照的に、CHO/V1a 細胞で“Surface + Internalized”の放射能は、“Surface”カウントよりも小さいことが判明した（図 3B、3C）。

#### 4-4. V1b 受容体内在化による $[^3\text{H}]\text{AVP}$ 取り込みは、飽和状態に達する

処置する $[^3\text{H}]\text{AVP}$  の濃度を変化させ、細胞に結合し取り込まれた放射活性が飽和状態に至るかどうかを検索した。CHO/V1a と CHO/V1b 細胞を 37 °C で段階的に濃度を高くした $[^3\text{H}]\text{AVP}$  とインキュベーションさせた。非結合分の $[^3\text{H}]\text{AVP}$  を洗浄後、細胞を回収し放射能を測定した。図 4 に示すごとく、“Surface + Internalized”に相当する放射活性は、 $[^3\text{H}]\text{AVP}$  濃度を高くした場合、飽和状態に



達することが判明した。非特異的な結合の場合、飽和状態には達しないことを考えると、 $[^3\text{H}]\text{AVP}$  の結合、取り込みは受容体を介する特異的な細胞反応と考えられた。

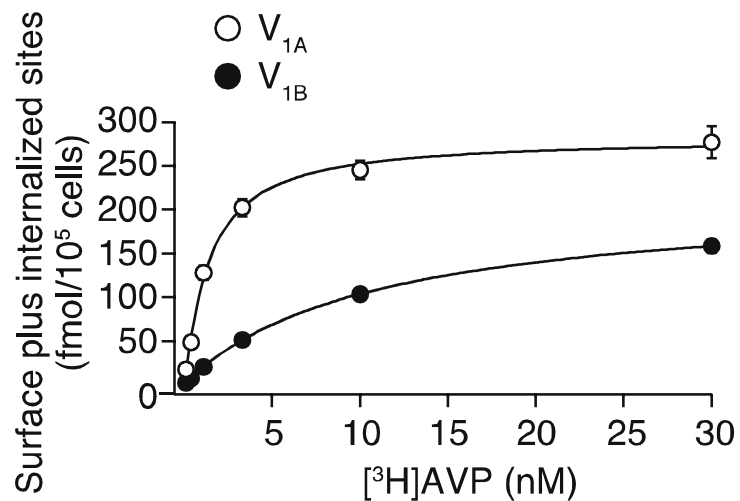


図4 CHO/V1A と CHO/V1B 細胞の 37 °C における Surface + Internalized 結合部

位は、飽和曲線を示す。

培養 CHO/V1A または CHO/V1B 細胞を 37 °C において段階的に濃度を増加させた [<sup>3</sup>H]AVP と反応させ、Surface + Internalized 結合部位を計測した。非特異的結合は、1 μM AVP によっても排除されない放射活性とした。duplicate で行った 3 回の実験の平均を示す。図は参考文献より引用(Kashiwazaki et al., 2015)

#### 4-5. [ $^3\text{H}$ ]AVP 解離の時間経過

CHO/V1b 細胞において”Surface + Internalized”が”Surface”カウントより大きくなることに関し（図 3C）、一旦結合した[ $^3\text{H}$ ]AVP が解離する過程が遅い場合（off-rate）には細胞に結合している[ $^3\text{H}$ ]AVP が多くなる可能性が考えられる。そこで、CHO/V1a 細胞と CHO/V1b 細胞において、[ $^3\text{H}$ ]AVP が細胞表面の受容体から解離する経過を測定した。その結果、解離速度は V1a より V1b の方が早いことが判明した（図 5）。よって解離速度が遅いことが CHO/V1b 細胞の”Surface + Internalized”に[ $^3\text{H}$ ]AVP が多く結合する理由とは考えられないことが判明した。

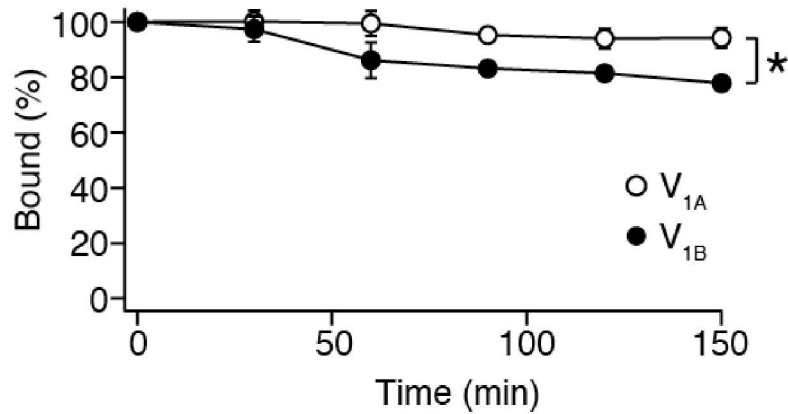


図5 CHO/V1A と CHO/V1B 細胞における $[^3\text{H}]\text{AVP}$  解離の時間経過

12-well ディッシュに培養した CHO/V1A と CHO/V1B 細胞を 4 °C で 1 nM  $[^3\text{H}]\text{AVP}$  と 1.5 時間反応させた後、3 回洗浄した。その後図に示す時間細胞を 4 °C でインキュベーションして再度洗浄し、細胞に結合して残る $[^3\text{H}]\text{AVP}$  を測定した。

\*,  $P < 0.05$ ,  $V_{1A}$  vs.  $V_{1B}$ . ANOVA 解析では、受容体の種類と時間経過の両方が放射活性に関与する因子と考えられた。duplicate で行った 3 回の実験の平均を示す。

図は参考文献より引用(Kashiwazaki et al., 2015)

#### 4-6. 受容体内在化を抑制する薬物の探索

V1b 受容体は非刺激時に細胞内に局在し、刺激時には内在化が亢進するため、細胞表面でリガンドと結合できる受容体は限られていると考えられる。我々は次に、V1b 受容体の内在化を抑制する薬物を探索した。これまで GPCR の内在化には細胞骨格とその関連タンパク質が関与するとの報告があることより (Roman-Vendrell et al., 2012)、これらの阻害薬を使用した。latrunculin はアクチン重合の阻害薬であり、nocodazole は微小管の阻害薬として知られる。これらを単独で CHO/V1b 細胞に処置した場合は V1b 受容体の内在化を抑制することはできなかったが、両者を同時に処置した場合には、有意に V1b 受容体の内在化が抑制された (latrunculin、nocodazole、両者の同時処置は、コントロール時に観察された V1b 受容体の内在化を 90 (データは示していない)、89 (データは示していない)、75% (図 6) それぞれ減少させた。 )。

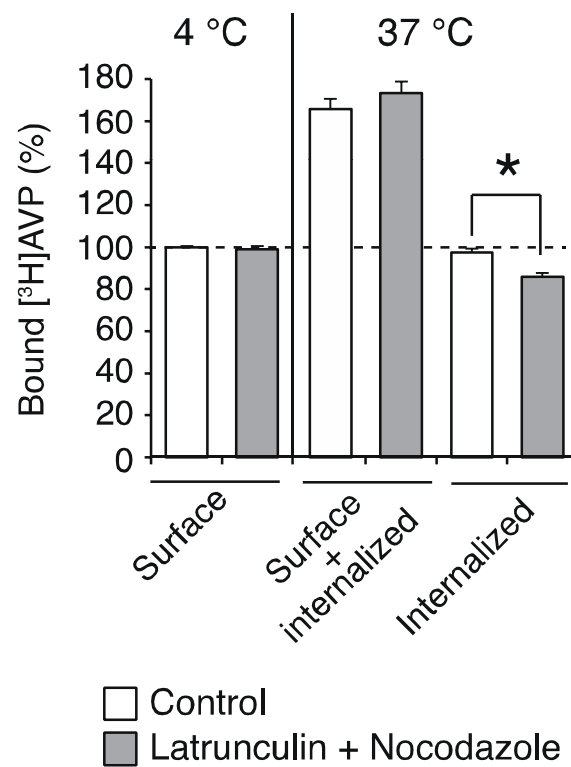


図 6 細胞骨格タンパク質の阻害による V1b 受容体の内在化阻害

10  $\mu$ M latrunculin と 10  $\mu$ M nocodazole の双方を反応液に含む場合の V1b 受容体内在化反応を示す。Surface、Internalized、Surface plus Internalized は図 3 と同様である。\*,  $P < 0.05$  vs. control、t 検定。duplicate で行った 3-7 回の実験の平均を示す。図は参考文献より引用(Kashiwazaki et al., 2015)

その他のリン酸化酵素阻害薬は以下の濃度で使用したが、V1b 受容体の内在化を抑制することはなかった。10  $\mu$ M U73122 (phospholipase C 阻害薬)、10  $\mu$ M U0126 (MEK1 阻害薬)、10  $\mu$ M SP600125 (JNK 阻害薬)、0.1  $\mu$ M AG1478 (チロシンキナーゼ阻害薬)。これらの阻害薬の濃度は、各酵素活性を 50%以上抑制する濃度を採用した。

多くの GPCR の内在化には、 $\beta$ -arrestin が受容体結合タンパク質として機能することが報告されている(Luttrell and Gesty-Palmer, 2010)。そこで、RNA 干渉技術を用いて  $\beta$ -arrestin1 と  $\beta$ -arrestin2 をノックダウンさせた場合の V1b 受容体の内在化について検索した ( $\beta$ -arrestin1 についてはデータを示していない。図 7)。 $\beta$ -arrestin2 ノックダウンにより、 $\beta$ -arrestin1 の発現量には変化なく、 $\beta$ -arrestin2 の下流に位置する ERK1/2 蛋白量にも変化を認めず、 $\beta$ -arrestin2 にのみ特異的に蛋白量の減少が認められた (図 7A)。細胞表面に結合する [ $^3$ H]AVP は、 $\beta$ -arrestin1 と  $\beta$ -arrestin2 の siRNA を細胞に導入後も変化が見られなかった (図 7B)。RNA 干渉実験より、 $\beta$ -arrestin1 でなく  $\beta$ -arrestin2 をノックダウンさせた場合にのみ V1b 受容体の内在化が減少することが明らかとなった (図 7C)。以上より、V1b 受容体の内在化には、細胞骨格タンパク質と  $\beta$ -arrestin2 が関与することが示唆された。

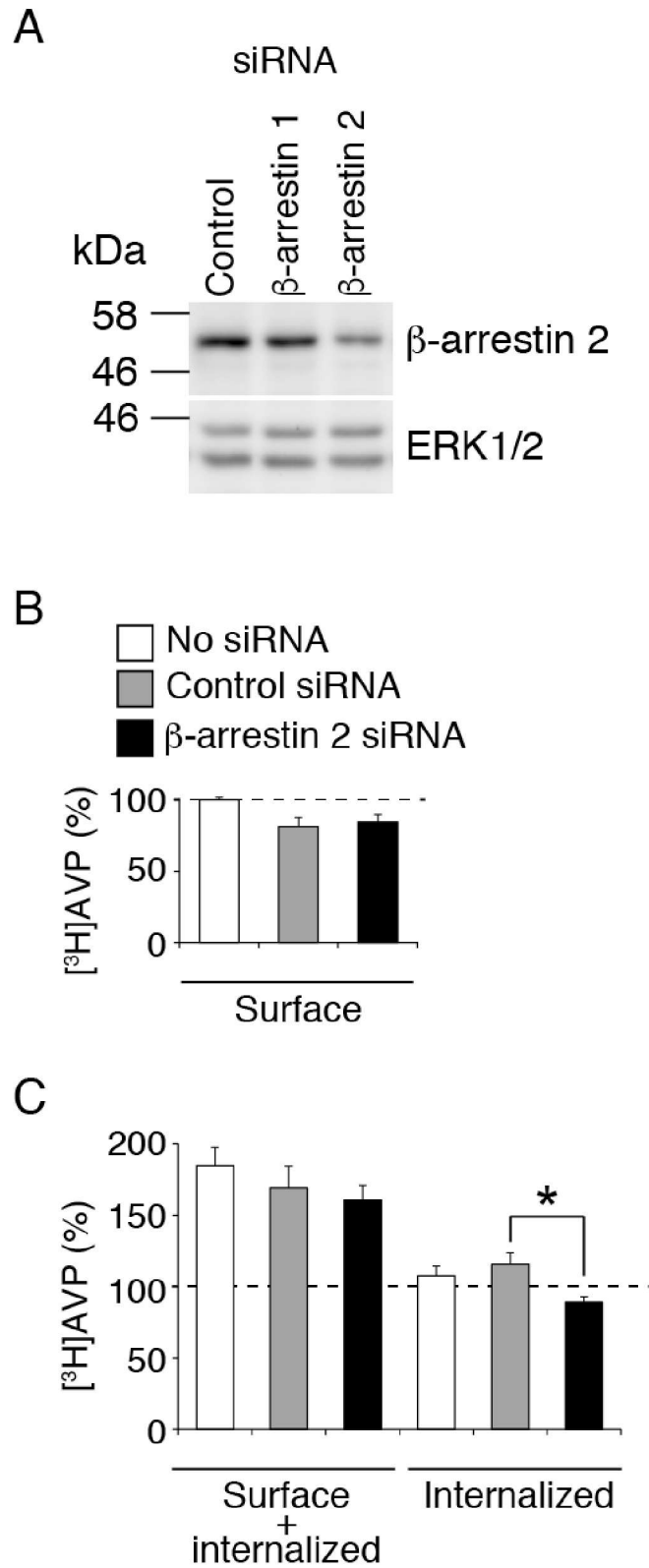


図 7  $\beta$ -arrestin2 に対する siRNA により V1b 受容体の内在化は抑制される



(A) Western blot 解析の結果、siRNA 干渉により  $\beta$ -arrestin2 が特異的にノックダウンされ、類縁の  $\beta$ -arrestin1 や情報伝達経路で  $\beta$ -arrestin2 の下流に位置する ERK1/2 は影響を受けないことが判明した。  $\beta$ -arrestin2 に対する siRNA により、Surface 結合部位(B) には変化なく、内在化受容体 (C、Internalized) が減少した。

\*,  $P < 0.05$  vs. control siRNA。 duplicate で行った 3 回の実験の平均を示す。図は参考文献より引用(Kashiwazaki et al., 2015)

#### 4-7. 受容体内在化を抑制する細胞外液条件の探索

我々は、V1b 受容体の内在化を変化させる条件を検索していた所、細胞外液のイオン構成を変化させることで内在化の効率が変化することを発見した。特に、NaCl は V1b 受容体の内在化に必須であった。通常の培養液として用いている Ham's F12 は 131 mM NaCl を含み V1b 受容体の内在化が観察される。細胞外液用として全ての成分を調整したバッファーより、135 mM NaCl を除いた場合、CHO/V1b 細胞に見られた V1b 受容体内在化は顕著に抑制されることが判明した。細胞外液用バッファーに必須アミノ酸を加えた溶液、細胞外液用バッファーに非必須アミノ酸を加えた溶液、および Ham's F12 を用いた場合には、内在化を抑制することはなかった (図 8)。

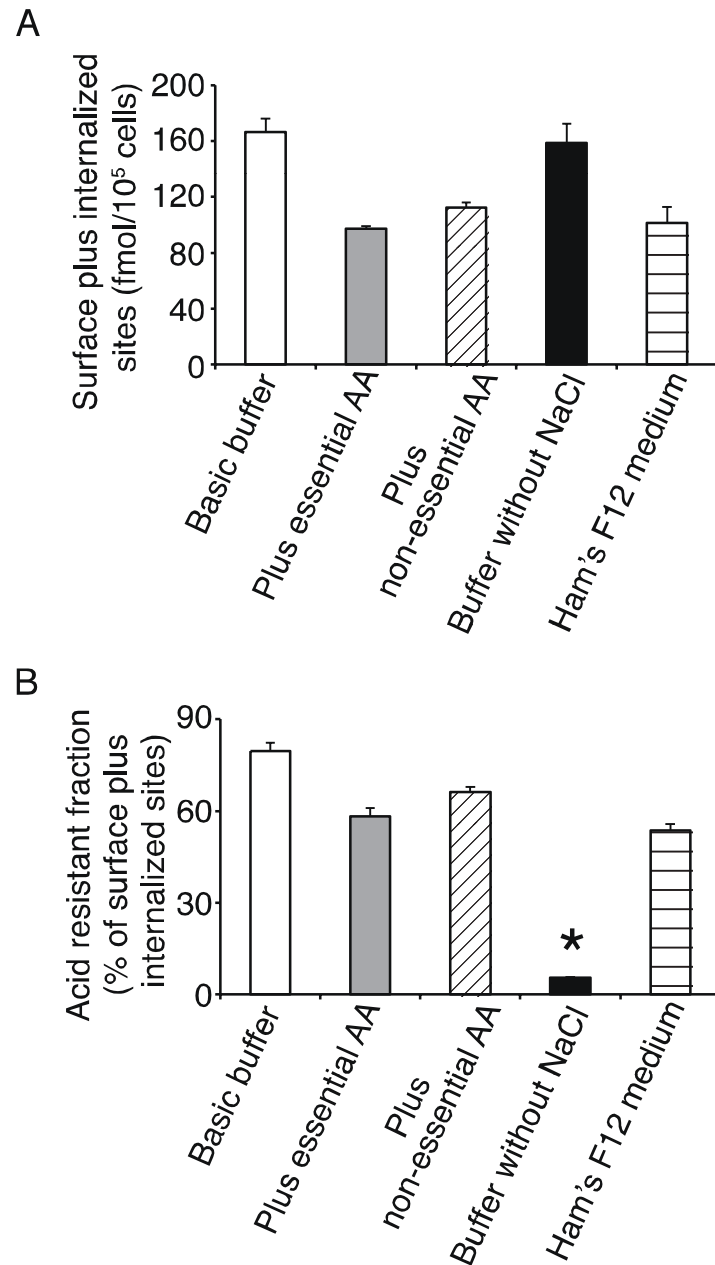


図 8 V1b 受容体の内在化には、細胞外液に NaCl が必須である

各種の細胞外液を用いて CHO/V1b 細胞における V1b 受容体の内在化を解析した。(A) Surface plus Internalized と (B) Internalized の放射活性を示す。外液に NaCl を含まない場合は、受容体内在化による [<sup>3</sup>H]AVP の取り込みが顕著に減少することが判明した。\*,  $P < 0.05$  vs. all other conditions. Essential AA は必須アミノ酸を

示す。図は参考文献より引用(Kashiwazaki et al., 2015)

## 5. 考察

本研究において、以下の3点が明らかとなった。すなわち、1) V1b 受容体の非刺激時の局在の多くは細胞内であること、2) 細胞表面に局在する受容体を AVP で刺激した場合、V1b 受容体では V1a 受容体よりも内在化が亢進していること、3) V1b 受容体の内在化には細胞外液に NaCl が必須であること、である。受容体の総発現量が近い2つの細胞株 CHO/V1a と CHO/V1b において、細胞表面の結合部位は、CHO/V1b 細胞で顕著に少なく、非刺激時に V1b 受容体は多くが細胞内に局在することが判明した。画像による V1b 受容体の局在解析も、受容体結合実験の結果と良く合致した。受容体へのタグの付加の有無にかかわらず、V1b 受容体は細胞質と細胞膜の両方に観察された。よって V1a や V2 受容体が非刺激時に細胞膜に主に局在するのとは対比的に、V1b 受容体は多くが細胞質に局在するという特徴を持つことが判明した。細胞膜に局在する V1b 受容体は V1a 受容体と比較して少量であるが、機能的に細胞内シグナルを惹起するには十分であることが報告されている(Thibonnier et al., 1998)。刺激後には、V1a 受容体よりも多くの割合の V1b 受容体が内在化した(Arai et al., 2015)。さらに、V1b 受容体の内在化には、細胞骨格蛋白質や $\beta$ -arrestin2 が関与し、細胞外の NaCl を必須とすることが初めて明らかになった。これらの新事実は、V1b 受容体の機能を理解し、V1b 受容体を標的とする医薬品の創製のために役立つと考えら

れる。

数は少ないが主に細胞内に局在する GPCR はこれまでも報告されている。

例えば、 $\alpha_{1D}$  アドレナリン受容体は、主に細胞内に局在し、比較的少量が細胞膜に局在する(Chalothorn et al., 2002)。対してアミノ酸配列の良く似た  $\alpha_{1B}$  アドレナリン受容体は、主な局在は細胞膜である。 $\alpha_{1D}$  と  $\alpha_{1B}$  受容体の局在の違いは、N-末端の違いにあることが報告されている(Hague et al., 2004a; Hague et al., 2004b)。

また、これまでにヒト V1b 受容体に関し、インスリンの分泌シグナル配列を N 末端に付加し細胞膜に局在させた場合、V1b 受容体の C-末端にある配列 ( $F^{341}N(X)_2LL(X)_3L^{350}$ ) は、V1b 受容体が小胞体から脱して細胞膜に局在するために必須であることが報告された(Robert et al., 2005)。我々は、マウス V1b 受容体の N-末端や C-末端に FLAG タグ抗原を付加、或いは C-末端に GFP を付加しても、受容体が細胞局在は変化がないこと、また、細胞内局在は CHO 細胞、HEK 細胞、下垂体前葉細胞で共通であることを見出した。GFP を付加したヒト V1b 受容体についても、主に細胞内に局在する画像が以前に報告されている(Murat et al., 2012)。ヒト V2 バゾプレッシン受容体は主に細胞膜に局在するが、 $D^{136}RY^{138}$  配列にアミノ酸変異が導入されると変異受容体は構成的に (constitutively) 脱感作し内在化した状態となり、AVP に反応せず尿崩症の原因となることが報告されている(Barak et al., 2001)。我々は今回、膜標本と細胞全体を使用した受容体結

合実験の結果を比較し、細胞膜上の V1b 受容体は AVP に対する親和性が有意に減少していることを発見した。この結果は、細胞の状態では受容体の置かれている環境が異なり、G タンパク質など受容体と相互作用するタンパク質によりアゴニストの親和性が低下している可能性を示唆する。

V1b 受容体によって取り込まれた $[^3\text{H}]\text{AVP}$  は、当初細胞膜に結合し得る $[^3\text{H}]\text{AVP}$  を超えて取り込まれていることが判明した。どのように V1b 受容体の内在化が制御されているのかは今後の研究課題である。細胞膜に受容体が局在する際、細胞内で受容体がプールされることが、thromboxane A2 受容体 C-末端スプライスバリエント(Parent et al., 2001)、angiotensin II AT1A 受容体の構成的活性化変異体(Miserey-Lenkei et al., 2002)、RNA 編集を受けた 5-hydroxytryptamine 2c セロトニン受容体(Marion et al., 2004)、C-末端を切断した  $\mu$ -type オピオイド受容体変異体 (Segredo et al., 1997)、や protease-activated receptor 1(Shapiro and Coughlin, 1998)で仮定されている。しかし、カナビノイド CB1 受容体の場合には、構成的に内在化した受容体は、リソゾーム分画へ移動して細胞膜受容体としては働かないことが示されている(Irannejad et al., 2013; Tsvetanova et al., 2015)。内在化した  $\beta$ アドレナリン受容体や CB1 カナビノイド受容体は、それぞれ後期エンドソームやリソゾームにおいて、三量体 G タンパク質と共役してシグナル伝達するとともに ERK をリン酸化した。内在化が亢進した V1b 受容体が細胞内においてシグ

ナル伝達に関与し得るのかどうかは今後の研究課題である。

V1b 受容体の内在化には、細胞骨格蛋白や $\beta$ -arrestin2、細胞外液の NaCl の関与が示唆された。これらの事実は、V1b 受容体内在化にクラスリン被覆小胞が関与することを示唆している。微小管とアクチン線維は、エンドサイトーシスや細胞内小胞の運搬に関与する(Apodaca, 2001)。 $\beta$ 2 アドレナリン受容体の細胞膜へのリサイクリングにはアクチン骨格が必要であった(Puthenveedu et al., 2010)。また、 $\mu$ オピオイド受容体のリサイクリングにアクチンと微小管の働きが必要なことが報告されている(Roman-Vendrell et al., 2012)。V1b 受容体の内在化において、どのように細胞骨格蛋白が関与するのかは今後の研究課題である。

細胞外液環境に関しては、以前に短期間の低浸透圧ショックと低  $K^+$  外液条件ではクラスリン小胞の形成が障害され、LDL 受容体やトランフェリン受容体の内在化が障害されることが報告されている(Larkin et al., 1983)。受容体内在化に NaCl を必要とすることは今回の研究による新事実である。最近我々は、外液の構成成分をさらに詳細に解析することにより、細胞外の  $Na^+$  が V1b 受容体の内在化に必須であること、陰イオンの構成成分も受容体内在化の効率に影響を及ぼすことを明らかにした(Koshimizu et al., 2016)。



## 6. 結論

今回の研究により、刺激時、および非刺激時の V1b 受容体の細胞内局在とその調節機構は、これまでよく知られていた V1a や V2 受容体と大きく異なることが判明した。V1b 受容体は刺激を受けた後に内在化が観察された。また、この内在化にはアクチン、微小管、 $\beta$ -arrestin2、および細胞外液の NaCl が関与していることが示唆された。

## 7. 謝辞

本研究を行うにあたり、始終御指導、御鞭撻を承りました奥水崇鏡 准教授に篤く御礼申し上げます。

また、本研究に関して御検討、御助言、ならびに研究室での活動において御指導くださった谷口淳一講師、土屋裕義先生には一方ならぬお世話になり、深く感謝いたします。

さらに、研究手技を丁寧にご指導くださった小山有紀技師、どんな時も温かく励ましてくださった藤原葉子様、橋本美智子様のお言葉を忘れることはないでしょう。

研究を初めとする苦楽を分かち合った荒井和音さんにも感謝いたします。

どんな時も温かく見守ってくださった薬理学講座分子薬理学部門の皆様のご協力無しにこの論文を仕上げることはかないませんでした。皆様に感謝し、謝辞といたします。

平成二十九年一月

## 8. 引用文献

- Aguilera, G., Subburaju, S., Young, S., Chen, J., 2008. The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Prog. Brain Res.* 170, 29-39.
- Antoni, F.A., 1993. Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropic secretion comes of age. *Front. Neuroendocrinol.* 14, 76-122.
- Apodaca, G., 2001. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2, 149-159.
- Arai, K., Kashiwazaki, A., Fujiwara, Y., Tsuchiya, H., Sakai, N., Shibata, K., Koshimizu, T.A., 2015. Pharmacological lineage analysis revealed the binding affinity of broad-spectrum substance P antagonists to receptors for gonadotropin-releasing peptide. *Eur. J. Pharmacol.* 749, 98-106.
- Barak, L.S., Oakley, R.H., Laporte, S.A., Caron, M.G., 2001. Constitutive arrestin-mediated desensitization of a human vasopressin receptor mutant associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 93-98.
- Chalothorn, D., McCune, D.F., Edelmann, S.E., Garcia-Cazarin, M.L., Tsujimoto, G., Piascik, M.T., 2002. Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the alpha(1)-adrenoceptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* 61, 1008-1016.
- Ferrier, L., Serradeil-Le Gal, C., Schulte, A.M., Văsina, V., Gaultier, E., Schroedel, S., Ursino, M.G., Chaumaz, G., Pascal, M., De Ponti, F., Bueno, L., 2010. Proinflammatory role of vasopressin through V1b receptors in hapten-induced experimental colitis in rodents: implication in IBD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G1298-1307.
- Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., 2004. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 107-144.
- Gomes, I., Ayoub, M.A., Fujita, W., Jaeger, W.C., Pflieger, K.D., Devi, L.A., 2016. G Protein-Coupled Receptor Heteromers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 403-425.
- Hague, C., Chen, Z., Pupo, A.S., Schulte, N.A., Toews, M.L., Minneman, K.P., 2004a. The N terminus of the human alpha1D-adrenergic receptor prevents cell surface expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 388-397.
- Hague, C., Uberti, M.A., Chen, Z., Hall, R.A., Minneman, K.P., 2004b. Cell surface

- expression of alpha1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with alpha1B-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 279, 15541-15549.
- Haigler, H.T., Maxfield, F.R., Willingham, M.C., Pastan, I., 1980. Dansylcadaverine inhibits internalization of 125I-epidermal growth factor in BALB 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 255, 1239-1241.
- Innamorati, G., Le, G.C., Balamotis, M., Birnbaumer, M., 2001. The long and the short cycle. Alternative intracellular routes for trafficking of G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* 276, 13096-13103.
- Innamorati, G., Sadeghi, H.M., Tran, N.T., Birnbaumer, M., 1998. A serine cluster prevents recycling of the V2 vasopressin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2222-2226.
- Irannejad, R., Tomshine, J.C., Tomshine, J.R., Chevalier, M., Mahoney, J.P., Steyaert, J., Rasmussen, S.G., Sunahara, R.K., El-Samad, H., Huang, B., von Zastrow, M., 2013. Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature* 495, 534-538.
- Kashiwazaki, A., Fujiwara, Y., Tsuchiya, H., Sakai, N., Shibata, K., Koshimizu, T.A., 2015. Subcellular localization and internalization of the vasopressin V1b receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 765, 291-299.
- Koshimizu, T.A., Fujiwara, Y., Sakai, N., Shibata, K., Tsuchiya, H., 2010. Oxytocin stimulates expression of a noncoding RNA tumor marker in a human neuroblastoma cell line. *Life Sci.* 86, 455-460.
- Koshimizu, T.A., Kashiwazaki, A., Taniguchi, J., 2016. Combined sodium ion sensitivity in agonist binding and internalization of vasopressin V1b receptors. *Sci Rep* 6, 25327.
- Koshimizu, T.A., Nakamura, K., Egashira, N., Hiroyama, M., Nonoguchi, H., Tanoue, A., 2012. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol. Rev.* 92, 1813-1864.
- Koshimizu, T.A., Ueno, S., Tanoue, A., Yanagihara, N., Stojilkovic, S.S., Tsujimoto, G., 2002. Heteromultimerization modulates P2X receptor functions through participating extracellular and C-terminal subdomains. *J. Biol. Chem.* 277, 46891-46899.
- Larkin, J.M., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Anderson, R.G., 1983. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* 33, 273-285.
- Lolait, S.J., O'Carroll, A.M., Brownstein, M.J., 1995. Molecular biology of vasopressin receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 771, 273-292.

- Lolait, S.J., Stewart, L.Q., Jessop, D.S., Young, W.S., 3rd, O'Carroll, A.M., 2007. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress in mice lacking functional vasopressin V1b receptors. *Endocrinology* 148, 849-856.
- Luttrell, L.M., Gesty-Palmer, D., 2010. Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol. Rev.* 62, 305-330.
- Marion, S., Weiner, D.M., Caron, M.G., 2004. RNA editing induces variation in desensitization and trafficking of 5-hydroxytryptamine 2c receptor isoforms. *J. Biol. Chem.* 279, 2945-2954.
- Miserey-Lenkei, S., Parnot, C., Bardin, S., Corvol, P., Clauser, E., 2002. Constitutive internalization of constitutively active angiotensin II AT(1A) receptor mutants is blocked by inverse agonists. *J. Biol. Chem.* 277, 5891-5901.
- Murat, B., Devost, D., Andres, M., Mion, J., Boulay, V., Corbani, M., Zingg, H.H., Guillon, G., 2012. V1b and CRHR1 receptor heterodimerization mediates synergistic biological actions of vasopressin and CRH. *Mol. Endocrinol.* 26, 502-520.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., Caron, M.G., 1999. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J. Biol. Chem.* 274, 32248-32257.
- Oshikawa, S., Tanoue, A., Koshimizu, T.A., Kitagawa, Y., Tsujimoto, G., 2004. Vasopressin stimulates insulin release from islet cells through V1b receptors: a combined pharmacological/knockout approach. *Mol. Pharmacol.* 65, 623-629.
- Parent, J.L., Labrecque, P., Driss Rochdi, M., Benovic, J.L., 2001. Role of the differentially spliced carboxyl terminus in thromboxane A2 receptor trafficking: identification of a distinct motif for tonic internalization. *J. Biol. Chem.* 276, 7079-7085.
- Pierce, K.L., Lefkowitz, R.J., 2001. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Neurosc.* 2, 727-733.
- Puthenveedu, M.A., Lauffer, B., Temkin, P., Vistein, R., Carlton, P., Thorn, K., Taunton, J., Weiner, O.D., Parton, R.G., von, Z.M., 2010. Sequence-dependent sorting of recycling proteins by actin-stabilized endosomal microdomains. *Cell* 143, 761-773.
- Robert, J., Clauser, E., Petit, P.X., Ventura, M.A., 2005. A novel C-terminal motif is necessary for the export of the vasopressin V1b/V3 receptor to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 280, 2300-2308.
- Roman-Vendrell, C., Yu, Y.J., Yudowski, G.A., 2012. Fast modulation of mu-opioid

- receptor (MOR) recycling is mediated by receptor agonists. *J. Biol. Chem.* 287, 14782-14791.
- Roper, J., O'Carroll, A.M., Young, W., 3rd, Lolait, S., 2011. The vasopressin Avpr1b receptor: molecular and pharmacological studies. *Stress* 14, 98-115.
- Segredo, V., Burford, N.T., Lamah, J., Sadee, W., 1997. A constitutively internalizing and recycling mutant of the mu-opioid receptor. *J. Neurochem.* 68, 2395-2404.
- Shapiro, M.J., Coughlin, S.R., 1998. Separate signals for agonist-independent and agonist-triggered trafficking of protease-activated receptor 1. *J. Biol. Chem.* 273, 29009-29014.
- Shibata, K., Foglar, R., Horie, K., Obika, K., Sakamoto, A., Ogawa, S., Tsujimoto, G., 1995. KMD-3213, a novel, potent, alpha 1a-adrenoceptor-selective antagonist: characterization using recombinant human alpha 1-adrenoceptors and native tissues. *Mol. Pharmacol.* 48, 250-258.
- Stevenson, E.L., Caldwell, H.K., 2012. The vasopressin 1b receptor and the neural regulation of social behavior. *Horm. Behav.* 61, 277-282.
- Stoop, R., 2012. Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron* 76, 142-159.
- Tanoue, A., Ito, S., Honda, K., Oshikawa, S., Kitagawa, Y., Koshimizu, T.A., Mori, T., Tsujimoto, G., 2004. The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions. *J. Clin. Invest.* 113, 302-309.
- Thibonnier, M., Conarty, D.M., Preston, J.A., Wilkins, P.L., Berti-Mattera, L.N., Mattera, R., 1998. Molecular pharmacology of human vasopressin receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 449, 251-276.
- Tsvetanova, N.G., Irannejad, R., von Zastrow, M., 2015. GPCR signaling via heterotrimeric G proteins from endosomes. *J. Biol. Chem.*
- von Zastrow, M., Williams, J.T., 2012. Modulating neuromodulation by receptor membrane traffic in the endocytic pathway. *Neuron* 76, 22-32.