

氏 名	かしわ ざき あ き 柏 崎 亜 樹
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第 533 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 21 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	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 審 査 委 員	(委員長) 教 授 尾 仲 達 史 (委 員) 准教授 藤 原 研 准教授 出 崎 克 也

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は世界で使用される全医薬品中で最多の 30%以上が作用する治療標的分子ファミリーである。GPCR によるシグナルは三量体 G タンパク質と共役して情報伝達を司り、受容体が刺激されると、 $\alpha\beta\gamma$  の 3 つのサブユニットで構成される G タンパク質の  $\alpha$  サブユニットに結合する GDP が GTP に変換され、GTP 結合型  $G\alpha$  が効果器を活性化する。一方で  $G\beta\gamma$  は G-protein coupled receptor kinase (GRK) を活性化し、活性化された受容体は GRK によってリン酸化され、 $\beta$  アレスチンを誘導して不応性となり脱感作して内在化することが知られている。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が、このホルモン不応性を示す過程は、例えば心不全における  $\beta$  アドレナリン受容体拮抗薬が、生命予後を改善する際の標的機構と考えられている。しかし、受容体不応性の原因の一つとなる受容体内在化とリサイクル過程をコントロールし、医療に応用する方法は未だ開発されていない。これまでに多くの GPCR において、細胞膜に分布した受容体が刺激後に細胞内局在を変化する過程が解析されてきた。GPCR に分類されるバゾプレッシン受容体はさらに 3 種類のバゾプレッシン受容体 (V1a、V1b および V2) サブタイプに分類される。筆者は、これまでに V1b バゾプレッシン受容体が未刺激の状態で細胞膜のみならず細胞質にも局在することを発見した。未刺激でも細胞質に分布する V1b バゾプレッシン受容体は他のバゾプレッシン受容体と異なるユニークなモデルとなることが予想される。本研究では、V1b バゾプレッシン受容体をモデルとして、刺激された受容体が細胞内で局在を変化させる機構を解明し、この過程をコントロールすることで受容体のホルモン応答性を調節する新しい作用機序の薬物候補を見出すことを目的とする。

### 2 研究方法

1. バゾプレッシン受容体安定発現細胞の樹立 各々のバゾプレッシン受容体遺伝子を CMV プロモーター下で安定発現する Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を樹立した。
2. 受容体細胞内局在の可視化解析 緑色蛍光タンパク質 (GFP) をカルボキシル末端に付加した融合受容体を発現させるベクターを V1a 及び V1b 受容体について作製し、Human embryonic kidney (HEK) 細胞に安定発現させた。融合蛋白質となっていない本来の受容体の細胞内局在については、

V1b バゾプレッシン受容体に対するモノクローナル抗体を作製し解析に用いた。

**3. 放射性リガンドを用いた受容体結合実験** CHO 細胞をトリチウム標識したバゾプレッシンと非標識試薬とで処置し、細胞膜表面の受容体と標識リガンドとを結合させ、その後 37°C で培養した。酢酸バッファーで洗浄後に細胞を回収した。続いて、液体シンチレーションカウンターを用い、回収した細胞の放射能を測定し、標識リガンドとともに内在化した受容体の割合を評価した。

**4. 受容体刺激後の細胞内局在を変化させる化合物の探索** 方法 3 で用いた V1b バゾプレッシン受容体の内在化を定量する受容体結合実験系を用い、内在化を減少させて受容体の反応性を保持する可能性のある化合物を探索した。V1b 受容体が引き起こす細胞内反応を化合物や RNA 干渉法 (siRNA) によって阻害した際に、内在化の割合が変化するかどうかを指標にスクリーニングを行った。細胞内局在を変化させる化合物の候補として、 $\beta$ -アレスチン siRNA、EGF 受容体リン酸化阻害剤、微小管阻害剤等を用いて評価した。

**5. イオン濃度変化による受容体細胞内局在変化の評価** GPCR の内在化には細胞外の  $\text{Na}^+$ 濃度が影響を与える可能性が示唆されている。本研究では方法 3 で用いた、V1b バゾプレッシン受容体の内在化を定量する受容体結合実験系を用いて、アッセイバッファー中の  $\text{Na}^+$ 濃度変化による受容体の内在化を評価した。

### 3 研究成果

#### 1. 受容体細胞内局在

HEK 細胞と CHO 細胞に発現させた GFP 付き V1b バゾプレッシン受容体は、非刺激の状態でも細胞膜のみならず細胞質にも分布することが判明した。一方でアミノ酸配列の良く似た V1a バゾプレッシン受容体-GFP 融合蛋白質は大部分が細胞膜に局在した。GFP 無しの本来の受容体の局在を同定するために、マウス V1b バゾプレッシン受容体細胞内部分アミノ酸配列に対するラットモノクローナル抗体を作製し、特異性を評価した後に解析に用いたところ、やはり V1b バゾプレッシン受容体は細胞膜のみならず細胞質にも分布することが確認された。さらに V1b バゾプレッシン受容体が発現する下垂体前葉コルチコトロピン含有細胞において、抗 V1b 抗体による染色が細胞膜と共に細胞質からも観察された。

#### 2. 受容体内在化解析

受容体内在化の程度を定量的に評価するために放射性標識バゾプレッシンを用いた結合実験を行なった。細胞培養プレートを氷上に保持した場合、内在化は抑制されて、細胞表面の受容体のみ結合が観察された。細胞表面に結合した標識リガンドは、酢酸バッファーで 99.9 % 除去可能であった。細胞を氷上から 37°C での培養に変えると、V1a および V1b バゾプレッシン受容体ともに内在化したが、内在化する受容体の割合は、V1a バゾプレッシン受容体では当初細胞表面で計測された放射能の結合量の、 $35.1 \pm 0.1 \%$  ( $n=6$ ) が 30 分間で内在化したのに対し、V1b バゾプレッシン受容体は  $86.8 \pm 0.1 \%$  ( $n=6$ ) が内在化していることが判明した ( $P < 0.05$ )。さらに、細胞膜表面と内在化した放射性リガンドの合計は、V1a バゾプレッシン受容体では  $72.8 \pm 0.1 \%$  ( $n=6$ ) と当初と比べ減少していたのに対し、V1b バゾプレッシン受容体では、 $143.9 \pm 0.2 \%$  ( $n=6$ ) と有意に上昇していた。よって、V1a バゾプレッシン受容体と比較して、V1b バゾプレッシン受容体では内在化する受容体が多いことが判明した。

### 3. 受容体刺激後の細胞内局在を変化させる化合物の探索

V1b バゾプレッシン受容体の内在化を定量する受容体結合実験系を用い、内在化を減少させて受容体の反応性を保持する可能性のある化合物を探索した V1b 受容体が引き起こす細胞内反応を化合物や RNA 干渉法も用いて阻害した際に、内在化の割合が変化するか否かを指標にスクリーニングを行なった。これまでに、 $\beta$ アレスチン siRNA、EGF 受容体リン酸化阻害剤、微小管阻害剤などが有意な効果を持つことが判明した。

### 4. イオン濃度変化による受容体細胞内局在変化の評価

外液  $\text{Na}^+$ 濃度の低下とともに V1b バゾプレッシン受容体の内在化は抑制され、細胞外液のイオン組成の変化により内在化をコントロールできる可能性が示唆された。

## 4 考察

V1a バゾプレッシン受容体と V1b バゾプレッシン受容体の未刺激の状態での局在の相違、細胞膜表面の受容体への結合量の相違、及び表面に局在する受容体と細胞内に内在化する受容体の割合の相違から、V1b バゾプレッシン受容体の細胞内局在変化は、最もアミノ酸配列が類似した V1a バゾプレッシン受容体の変化とは異なることが示唆された。

## 5 結論

V1b バゾプレッシン受容体は特徴的な細胞内局在を示し、刺激により多くが内在化することが判明した。また、 $\beta$ アレスチン siRNA、EGF 受容体リン酸化阻害剤、微小管阻害剤が V1b バゾプレッシン受容体の内在化を抑制する化合物の候補となること見出した。

## 論文審査の結果の要旨

本学位論文の研究は、V1a 受容体あるいは V1b 受容体を安定的に発現する CHO 細胞あるいは HEK 細胞の膜標本と細胞標本、そして $^3\text{H}$ AVP を用いて受容体の内在化について探求したものである。その結果、V1b 受容体の多くは細胞内に局在していること、V1b 受容体の内在化はアクチン重合阻害剤と微小管阻害剤の同時処置、 $\beta$ -arrestin の siRNA 処置、細胞外 NaCl 濃度の低下により減少することを見出した。以上から、申請者は V1b 受容体は刺激前から細胞内に局在しており、AVP 刺激によりさらに内在化がおきること、内在化に細胞外 NaCl が関与する可能性を主張している。

論文要旨および学位論文に関し、一部文言の誤記、一部結果の記載漏れ、アクチン重合阻害剤と微小管阻害剤の同時処置の効果の程度と $\beta$ -arrestin のノックダウン処置の効果の程度の議論、受容体内在化に関する細胞外 NaCl 濃度依存性の機構、統計の処理について指摘があった。また一部の表記、特に結論部分の表現が強すぎるという指摘がなされた。これらは全て、適切に訂正された。

培養細胞のみならず、*in vivo* から採取した細胞を用いた受容体の細胞内局在のデータもあり、論文は全体として新しく学位論文として十分にふさわしいと満場一致で判断された。

## 最終試験の結果の要旨

申請者は、まず G 蛋白質共役型受容体の内在化とリサイクリングについてレビューを行い、次いで、膜分画あるいは細胞レベルの V1a 受容体あるいは V1b 受容体発現と内在化について申請者のデータを中心に説明を行った。申請者は発表において分かり易い説明を行った。これに対し、受容体の内在化により細胞膜受容体が減少するというデータが得られているのか、受容体の内在化の阻害により細胞膜受容体が増大するというデータがあるのか、受容体に対する抗体の特異性を示すデータはどれか、細胞レベルと膜レベルにおいて受容体の  $K_d$  値が異なる機構は何か、AVP で本当に受容体の内在化が亢進しているのか、受容体の内在化が細胞外の低 NaCl 濃度で阻害される機構は何か、またそのときの浸透圧の役割は何かについて、質疑がなされた。申請者は、これらの質問に対し真摯なおおむね適切に答えた。申請者の研究は新規性があり、申請者は専門分野における学識を十分に備えており博士の学位授与にふさわしいと全員一致で判断された。