

博士論文

摂食関連受容体 MCHR1 の細胞内分子メカニズム解明

平成 27 年 3 月

広島大学大学院総合科学研究科

総合科学専攻

濱本 明恵

# 目次

要約 .....	1
序論 .....	3
<b>第 I 章 魚類 MCH 受容体の情報伝達系解析 .....</b>	<b>9</b>
I-1: 序論 .....	10
I-2: 実験材料及び方法 .....	14
I-2-1: 細胞培養 .....	14
I-2-2: 細胞内カルシウム濃度測定 .....	14
I-2-3: 細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 1/2 リン酸化測定 .....	14
I-2-4: cAMP 量測定 .....	16
I-3: 結果 .....	17
I-3-1: キンギョ MCH 受容体における細胞内カルシウム濃度測定 .....	17
I-3-2: キンギョ MCH 受容体における ERK1/2 リン酸化の測定 .....	17
I-3-3: キンギョ MCH 受容体における cAMP 量測定 .....	21
I-3-4: キンギョ MCH 受容体のリガンド選択性解明 .....	21
I-3-5: マツカワ MCH 受容体に対する MCH2 の機能解析 .....	28
I-4: 考察 .....	30
<b>第 II 章 哺乳類 MCHR1 における G タンパク質選択機構の解明 .....</b>	<b>34</b>
II-1: 序論 .....	35
II-2: 実験材料及び方法 .....	37
II-2-1: MCHR1 変異体の作製 .....	37
II-2-2: 細胞培養及びトランスフェクション .....	42
II-2-3: ウェスタンブロット解析 .....	42

II-2-4 : 細胞免疫化学染色 .....	43
II-2-5 : フローサイトメトリー解析 .....	43
II-2-6 : リガンド結合能測定 .....	43
II-2-7 : 細胞内カルシウム濃度測定 .....	44
II-2-8 : GTP $\gamma$ S 結合能測定 .....	44
II-2-9 : cAMP 量測定 .....	45
II-2-10 : Dynamic mass redistribution (DMR) 解析 .....	45
II-3 : 結果 .....	46
II-3-1 : 置換体の受容体発現及びリガンド結合能解析 .....	46
II-3-2 : 細胞内カルシウム濃度測定による Gi/o 及び Gq 活性の評価 .....	50
II-3-3 : MCHR1 における Gi/o 選択的共役に重要なアミノ酸の探索 .....	55
II-3-4 : GTP $\gamma$ S 結合能測定及び cAMP 量測定による Gi/o 活性の評価 .....	55
II-3-5 : DMR アッセイによる G タンパク質選択性の評価 .....	58
II-4 : 考察 .....	60
<b>第III章 哺乳類 MCHR1 における NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフの機能解析 .....</b>	<b>64</b>
III-1 : 序論 .....	65
III-2 : 実験材料及び方法 .....	68
III-2-1 : MCHR1 変異体の作製 .....	68
III-2-2 : 細胞培養及びトランスフェクション .....	68
III-2-3 : ウェスタンブロット解析 .....	68
III-2-4 : フローサイトメトリー解析 .....	68
III-2-5 : 細胞免疫化学染色 .....	68
III-2-6 : 細胞内カルシウム濃度測定 .....	68
III-2-7 : GTP $\gamma$ S 結合能測定 .....	69
III-3 : 結果 .....	70
III-3-1 : 高度保存 NPxxY(x) <sub>5,6</sub> F モチーフの機能解析 .....	70

III-3-2 : Phe318 置換による受容体機能解析.....	73
III-3-3 : F318K の G タンパク質選択性解明.....	80
III-3-4 : F318K の機能亢進に関わる分子メカニズム .....	83
III-4 : 考察 .....	89
<b>総合考察.....</b>	<b>92</b>
<b>謝辞 .....</b>	<b>99</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>100</b>

## 略語集

$\alpha$ -MSH : alpha-melanocyte-stimulating hormone (メラニン細胞刺激ホルモン)
bf : barfin flounder (カレイ目 : マツカワ)
cAMP : cyclic AMP
CHO 細胞 : チャイニーズハムスター卵巣細胞
COS-7 細胞 : アフリカミドリザル腎臓由来細胞
DMR : Dynamic mass redistribution
ERK : extracellular signal-regulated kinase (細胞外シグナル制御キナーゼ)
gf : goldfish (キンギョ)
GPCR : G-protein coupled receptor (G タンパク質共役型受容体)
GTP $\gamma$ S : guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate (加水分解抵抗性 GTP 類縁体)
HEK293T 細胞 : ヒト胎児由来腎臓細胞
HeLa 細胞 : ヒト子宮頸癌由来細胞
MCH : melanin-concentrating hormone (メラニン凝集ホルモン)
MCHR : melanin-concentrating hormone receptor (メラニン凝集ホルモン受容体)
PTX : pertussis toxin (百日咳毒素)

## 要約

メラニン凝集ホルモン (MCH) は哺乳類において視床下部外側野に局在しており、摂食やエネルギー代謝、情動を制御する神経ペプチドである。MCH 受容体は MCHR1 と MCHR2 の二種類のサブタイプが存在しており、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に属する。哺乳類 MCHR1 において構造活性相関 (受容体の構造と機能の相関関係) の解明が進展している。しかし、細胞内で共役する G タンパク質の種類がどのように決定付けられるかという「G タンパク質選択機構」及び不活性状態から活性状態への状態遷移の過程を示す「構造ダイナミクス」に関しては未だ不明であり、重要な課題である。そこで本研究では、これらの疑問点を明らかにすることを目的として研究を行った。

まず第 I 章において、G タンパク質選択機構解明の礎となる研究—魚類 MCH 受容体の細胞内情報伝達系の解析を行った。キンギョ MCHR1 は MCH 刺激で細胞内カルシウム濃度の上昇、ERK1/2 のリン酸化及び弱い cAMP 産生を示した。また、Gi/o を特異的に不活性化させる百日咳毒素に非感受性であったことから、キンギョ MCHR1 は Gq 及び Gs 共役能を持つことが判明した。一方、キンギョ MCHR2 も細胞内カルシウム濃度の上昇、ERK1/2 リン酸化を示したが、cAMP 産生抑制及び百日咳毒素感受性を有することから、Gi/o 及び Gq 共役能を持つことが認められた。哺乳類 MCHR1 は Gi/o 及び Gq と共役し、ヒト MCHR2 は Gq と共役する。即ち、哺乳類と魚類間で MCH 受容体の G タンパク質選択性が異なることを明らかにした。さらに、哺乳類 MCHR1 選択的アゴニスト Compound.15 はキンギョ MCHR1 に対して強いアゴニスト効果を示したが、キンギョ MCHR2 においても弱い cAMP 産生抑制を示すことが分かった。また、哺乳類 MCHR1 選択的アンタゴニスト Compound.30 はキンギョ MCHR1 に対して、活性は弱い選択的アゴニストであることを見出した。これらの化合物をキンギョの行動実験に用いることで、各受容体が担う生理機能解明が期待出来る。また、近年、魚類で新規に発見された MCH (MCH2) のマツカワ MCH 受容体における機能を解析した。細胞内カルシウム濃度測定の結果、MCH2 は従来の MCH と同程度に機能的な、MCH 受容体に対する内在性アゴニストであることが判明した。以上の結果は、魚類 MCHR の細胞内シグナル経路を詳細に調べた初の報告であり、生物種を超えた MCH-MCHR 経路の統合的理解に繋がるものである。

GPCR の G タンパク質選択機構は、基礎的で重要な課題であるが未だ明らかにされていない。そこで、第 I 章において判明した G タンパク質選択性の違いを活用して、第 II 章では、ラット MCHR1 のアミノ酸配列をキンギョの配列に順次置換することで、Gi/o 共役能が消失する可能性を考えた。そして、細胞内第 1、第 2、第 3 ループ領域及び第 5 膜貫通領域にそれぞれ着目した置換体を作製し、種々のアッセイ系により Gi/o 活性を評価した。その結果、細胞内第 2 ループ領域におけるアミノ酸 6 残基と、細胞内第 3 ループ領域の 4 残基及び第 5 膜貫通領域の 2 残基がそれぞれ Gi/o 選択的共役に重要であることを明らかにした。これらの置換箇所において、点置換から 4 残基置換を含む 10 種類の置換体はいずれも Gi/o 活性低下を示さなかった。従って、複数のアミノ酸から形成される立体構造が Gi/o との選択的共役に重要であることが推測された。この結果は、MCHR1-Gi/o 相互作用の 3 次元モデル作製や、各 G タンパク質が担う

シグナル伝達及び生理作用解明の手掛かりとなる。

クラス A GPCR 間において高度に保存されるアミノ酸配列として、DRY 及び NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフが挙げられる。これらの配列は保存性の高さから受容体機能に重要な役割を担うことが予測されるが、哺乳類 MCHR1 における NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフの役割は不明であった。そこで第 III 章では、NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフの機能解析を行った。その結果、F318K は細胞内カルシウム動員能において機能亢進を示すことを見出した。哺乳類 MCHR1 は Gi/o 及び Gq と共役することから、F318K の機能亢進が Gi/o 又は Gq どちらに選択的か調べるため、Gi/o 活性選択的な GTP $\gamma$ S 結合能測定を実施した。F318K は機能亢進を示さず、F318K は Gi/o ではなく Gq 選択的に親和性が上昇することが推測された。また、F318K-Gq 及び-Gi の 3 次元相同モデルから、F318K-Gq 間における水素結合が予測され、Gq 選択的な活性亢進を支持する結果を得た。加えて、他の GPCR との配列を比較した解析によると、F318K の Gq 選択的な機能亢進には MCHR1 の細胞内第 1 ループ領域に存在する Trp73、Asp79 と Gq における Asn357 が重要であると予測された。F318K の機能亢進は、MCHR2 や他の GPCR において例が見られないため、F318K は特殊な置換体であると考えられる。以上より、哺乳類 MCHR1 において、不活性型から活性型への変換機構における構造ダイナミクス解明に貢献する結果が得られた。

本研究により、「魚類 MCH 系の細胞内情報伝達系」及び「哺乳類 MCHR1 において Gi/o 又は Gq を選択的に活性化する際の構造動態の一端」を明らかにした。得られた解析結果は、他の GPCR における構造活性相関の研究に対して重要な知見をもたらすことが期待される。

## 序論

Gタンパク質共役型受容体 (G-protein coupled receptor : GPCR) は、細胞膜上に存在する膜タンパク質である。GPCR は、細胞膜に埋め込まれる形で7回膜貫通ヘリックドメイン、細胞外にリガンド結合部位、細胞内に3量体GTP結合タンパク質 (Gタンパク質) 結合部位を持つ。GPCR は1000種類以上存在し、神経伝達物質、ホルモン、タンパク質、脂質などの多様な生理活性物質がそれぞれ特異的に結合する。そして、細胞内のGタンパク質を介して細胞外から細胞内へ情報を伝達する。Gタンパク質は $\alpha$ 、 $\beta$ 及び $\gamma$ サブユニットのヘテロ3量体から構成される。受容体にリガンドが結合すると $\alpha$ サブユニットにおいてGDP-GTP交換反応が促進される。その後、GTP結合型となった $\alpha$ サブユニットと $\beta\gamma$ サブユニットは受容体から解離し、効果器である酵素やイオンチャネルに作用することで細胞内シグナル伝達の活性化をもたらす。Gタンパク質 $\alpha$ サブユニットはGs、Gi/o、Gq、G<sub>12/13</sub>ファミリーに分類され、それぞれ下流の情報伝達系が異なる。

GPCR は生物の感覚モダリティである光、匂い、味のセンサーとしての働きに関与しており、神経伝達物質の受容体として働く。また、細胞の増殖や分化、筋収縮、情動など高次機能の発現において重要な役割を果たしている。今日、医療の現場で使われている50%以上の薬物がこのGPCRに対するアゴニスト (作用薬) やアンタゴニスト (拮抗薬) であり、これらは臨床において有効な実績を持つことが示されている。従って、GPCRに関する研究は直接創薬マーケットに繋がる可能性が高く、基礎研究への貢献とともに社会的還元性を兼ね備えていると言える。GPCR はヒトでは865種存在し、そのうちの365種がnon-chemosensory受容体 (嗅覚・味覚受容体ではない受容体) である。この内、約160種程度は内因性リガンドが不明なためオーファン (孤児) GPCR と呼ばれる (Chung et al., 2008)。

メラニン凝集ホルモン (melanin-concentrating hormone : MCH) は、1983年にサケの脳下垂体から抽出された神経ペプチドである (Kawauchi et al., 1983)。魚類のMCHはアミノ酸17残基の環状ペプチドで、色素細胞内のメラニン顆粒を凝集させて皮膚体色を明るくすることが知られている。哺乳類においてもMCHは1989年にラットの脳からアミノ酸19残基の環状ペプチドとして単離された (Vaughan et al., 1989)。ラットにおいて、MCHは主に視床下部の外側野 (lateral hypothalamus) 及び不確体 (zona incerta) のニューロンに高発現し、脳内の広範囲にわたって投射している (Bittencourt et al., 1992)。

哺乳類においてMCHは、主として摂食行動やエネルギー代謝の制御に関わっており、情動、薬物嗜癖性、睡眠、末梢での炎症反応などにおいて多様かつ重要な役割を担っている (Takase et al., 2014)。MCHをラットやマウスの脳室内に投与すると摂食が亢進し、体重が増加する (Qu et al., 1996; Ito et al., 2003)。MCH過剰発現マウスは肥満、過食、インスリン抵抗性を示す (Ludwing et al., 2001)。また、摂食抑制として働く機能的レプチンが欠損した遺伝的肥満モデルマウスob/obではMCHが過剰発現し、絶食によりMCH mRNA発現量が増加すると報告されている (Qu et al., 1996)。さらにMCHは摂食亢進と同時に代謝を抑制 (脂肪合成促進、分解抑制) し、体温を下げる効果を有する。MCHのエネルギー代謝制御に関しては、(ob/ob) /MCHダブルノック

クアウトマウスの表現系においても示されている (Segal-Lieberman et al., 2003)。ダブルノックアウトマウスでは、摂食量が ob/ob 並みに増加する一方で、自発運動量及び静止時の酸素消費量が増加するため、ob/ob マウスよりも体重、体脂肪量の低下を示した。さらに、MCH は魚類の色素胞細胞で色素顆粒拡散、げっ歯類で食欲減退作用を持つ alpha-melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) と生理的に拮抗する。 $\alpha$ -MSH の前駆体である pro-opiomelanocortin (POMC) ノックアウトマウスは摂食亢進、肥満を呈し、視床下部外側野で MCH 発現が亢進することが認められた (Challis et al., 2004)。1998 年に作製された MCH ノックアウトマウスは、摂食量、体重、体脂肪が減少する「ヤセ」形質を示した (Shimada et al., 1998)。ラットにおいても MCH 欠損動物が作製され、その表現系は MCH ノックアウトマウスと同様であった (Mul et al., 2010)。多くの摂食亢進ペプチドの中でも、ノックアウトマウス・ラットの表現系で摂食抑制、体重減少を示すものは MCH だけである。例えば、MCH よりも強力な摂食亢進作用を持つニューロペプチド Y (NPY) ノックアウトマウスは摂食行動に影響を与えない (Butler et al., 2001)。これは NPY をはじめ他の物質の欠損は、別の摂食亢進因子で代償されるのに対して、MCH の作用は完全に代償出来ないことを意味する。加えて MCH/アタキシン-3 トランスジェニックマウスは、アタキシン-3 の毒性により MCH ニューロンの 6-7 割が変性していく時期にヤセの表現系を示した (Alon et al., 2006)。以上の報告より、MCH は摂食行動制御の下流に存在し、MCH 系がエネルギー代謝調節に非常に重要な鍵分子であることが示唆された。

MCH の受容体は 1998 年まで不明であったが、1999 年にオーファン GPCR の一員であり、ソマトスタチン受容体と膜貫通部分で 40% のホモロジーを持つ SLC-1 が MCH 受容体であることが報告された (Bächner et al., 1999; Chambers et al., 1999; Lembo et al., 1999; Saito et al., 1999; Shimomura et al., 1999)。ソマトスタチン受容体は Gi と共役することが知られており、SLC-1 も同様の情報伝達系を動員すると予測された。斎藤らはこの Gi のシグナルを細胞内カルシウム濃度の変動に置き換えて測定するアッセイ系を開発し、SLC-1 の内因性リガンドをラットの脳から精製した。7 段階の精製の結果、SLC-1 が MCH の受容体 (MCHR1) であることを見出した (Saito et al., 1999)。MCH 受容体は哺乳類や魚類、両生類、爬虫類において存在が確認されているが、ホヤや線虫、蚊ではゲノムショットガン法で同定されていない (Fredriksson et al., 2005)。ヒトゲノムにおいて、GPCR は GRAFS 分類システムにより大きく 5 つのファミリー (Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/taste2, Secretin) に分けられる (Fredriksson et al., 2003)。MCHR1 は最も大きなロドプシンファミリーグループ (クラス A) に分類され、このグループにはヒトにおいてロドプシンやアドレナリン受容体など 241 種 (嗅覚受容体を除く) の GPCR が属する。

MCHR1 mRNA は RT-PCR 法によると、肝臓・腎臓・心臓では検出されないが、眼や筋肉にわずかに発現し、脳で高発現している (Saito et al., 1999)。また、*in situ* hybridization による脳における局在の詳細な解析の結果、MCHR1 は特に海馬、扁桃核、側坐核、嗅球などの摂食行動及び嗅記憶行動に非常に関連の深い部域で高発現していることが明らかになった (Saito et al., 2001a)。MCHR1 アゴニストをラット・マウスの脳室内に投与すると摂食が亢進し、体重が増加すると報告された (Ito et al., 2003; Shearman et al., 2003)。2002 年に発表された非ペプチド性の MCHR1 選択的アンタゴニストは、経口投与により MCH による反応性の摂食を抑制した



(Takekawa et al., 2002)。加えて、同年発表されたアンタゴニスト SNAP-7941 を長期連日皮下注射すると、高カロリー食による肥満を防ぐと同時に、抗うつ作用・抗不安作用が観察された (Borowsky et al., 2002)。MCHR1 は扁桃体にも高発現しているため、情動との関係が推測される。以上より、MCH とその受容体は、摂食行動に重要な役割を担い、摂食や情動の疾患における治療の創薬ターゲットとなることから、多くの製薬会社で注目を浴びている。

多くの GPCR にはサブタイプが存在する。2001 年に MCH の第 2 の受容体として、MCHR2 がヒト胎児脳ライブラリーから単離同定された (An et al., 2001; Hill et al., 2001; Mori et al., 2001; Rodriguez et al., 2001; Sailer et al., 2001; Wang et al., 2001)。MCHR2 はヒト、イヌ、フェレット、アカゲザルでは機能を有するが、マウス、ラット、ウサギといったげっ歯類においては偽遺伝子として存在し、機能を失っている (Tan et al., 2002)。ニワトリのゲノムにおいても、MCHR1 のみの存在が予測されている (Lagerström et al., 2006)。ヒトにおいて MCHR2 は、末梢組織ではほとんど発現しておらず、皮質・海馬・扁桃体を含んだ中枢領域に主に発現する (Hill et al., 2001; Rodriguez et al., 2001)。また、MCHR2 は *in situ* hybridization によるとアフリカミドリザルの弓状核や腹内側核で検出されるが (Sailer et al., 2001)、ヒト視床下部では RT-PCR 法を用いても検出されなかった (Rodriguez et al., 2001)。MCHR1 のノックアウトマウスは過食でありながらも運動量増加及び基礎代謝亢進によりヤセの表現形を示すことから (Chen et al., 2002; Marsh et al., 2002)、MCHR2 が存在しないげっ歯類では MCHR1 が生体のエネルギー代謝に重要な役割を果たすと推測できる。最近、哺乳類 MCHR2 に対する選択的アンタゴニストが初めて同定されたが (Chen et al., 2011)、哺乳類では MCHR2 が発現する利用可能な動物モデルがアカゲザルしか存在しないこともあり、MCHR2 の機能は未だよく調べられていない。そこで MCHR1 と MCHR2 が発現しており、なおかつ行動実験に用いられる魚類であるキンギョに注目した。

本研究の第 I 章では「魚類 MCH 受容体の情報伝達系解析」を行った。哺乳類 MCHR1 は哺乳類培養細胞発現系において、Gi/o 及び Gq と共役し、細胞内カルシウム濃度の上昇、細胞外シグナル制御キナーゼ ERK1/2 のリン酸化、cAMP 産生の抑制を引き起こす (図 1) (Chambers et al., 1999; Saito et al., 1999; Hawes et al., 2000)。ヒト MCHR2 は Gq と共役し、細胞内カルシウム濃度を上昇する (An et al., 2001; Sailer et al., 2001)。先行研究において、細胞内カルシウム濃度測定の結果、キンギョ MCHR1 は Gq と、キンギョ MCHR2 は Gi/o 及び Gq と共役することが示唆された (Mizusawa et al., 2009)。即ち、哺乳類と魚類では MCH 受容体の G タンパク質選択性が異なる可能性が高いことが分かった。そこで、魚類における MCH システムの理解を目的として、キンギョ MCH 受容体の細胞内情報伝達系について多角的に解析した。また、哺乳類 MCHR1 に選択的なアゴニスト Compound.15 やアンタゴニスト Compound.30 が報告されている (Bednarek et al., 2002a, b)。この 2 つのリガンドがそれぞれキンギョ MCH 受容体に対してどのように働くのか検討した。さらに、近年新たに発見された魚類における第 2 の MCH である MCHR2 を用いて (Berman et al., 2009)、カレイ目マツカワの MCH 受容体に対する効果を調べた。

受容体のアミノ酸残基が受容体機能にどのように関与するのかといった、受容体の構造と機能の相関関係を構造活性相関と呼ぶ。GPCR の構造活性相関を解明することはタンパク質化学、

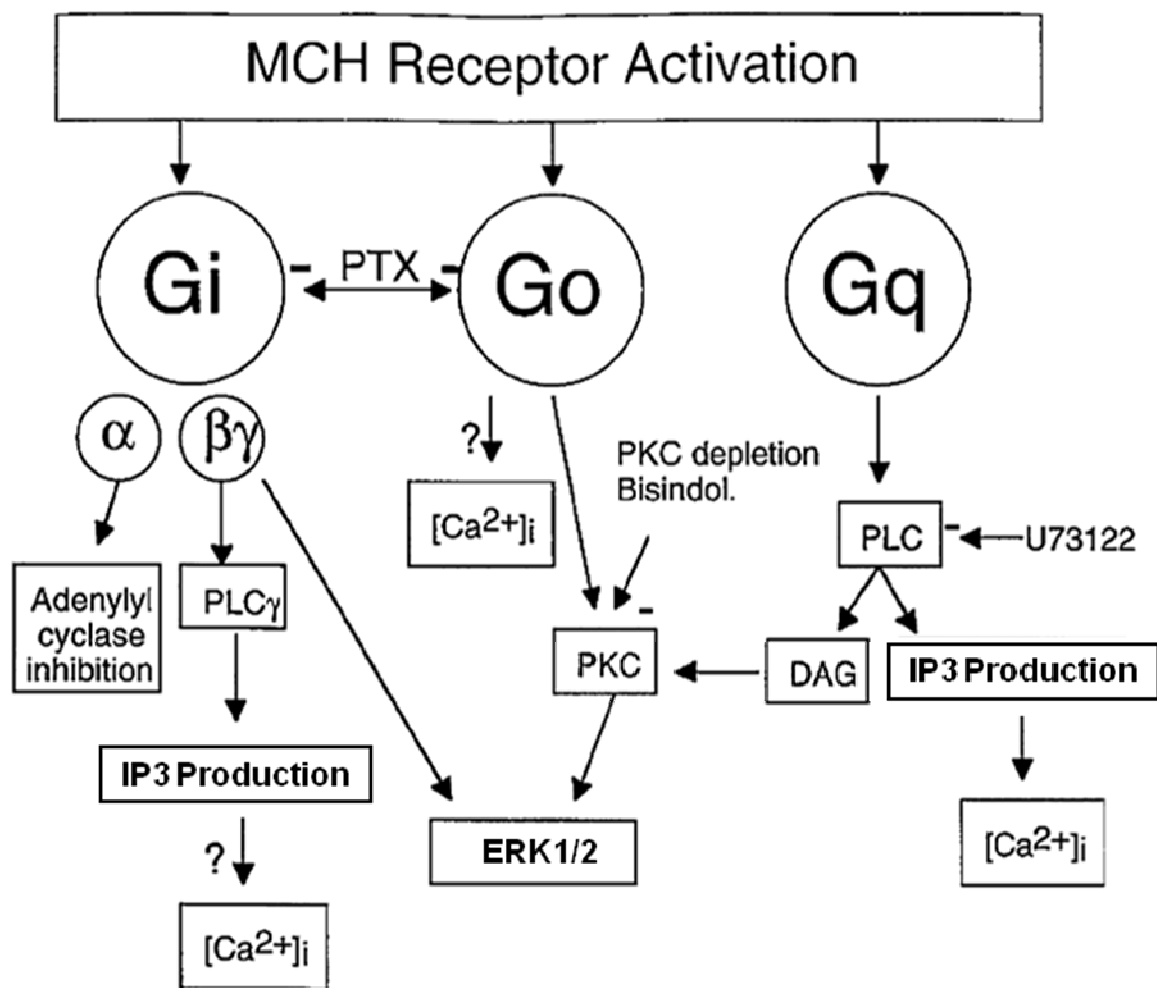


図 1. 哺乳類 MCHR1 を介した細胞内情報伝達経路の概略図。哺乳類 MCHR1 は Gi/o 及び Gq と共役し、細胞内情報伝達系を活性化することが報告されている (Hawes et al., 2000)。

1. Gi が活性化すると、アデニル酸シクラーゼの活性が抑制され cAMP 量が減少する。Gi の βγ サブユニットはイノシトール三リン酸 (IP3) 産生を介して細胞内カルシウム動員及び ERK1/2 リン酸化を引き起こす。
2. Go が活性化すると、細胞内カルシウム動員及びプロテインキナーゼ C (PKC) 活性を経て ERK1/2 リン酸化を引き起こす。
3. Gq が活性化すると、IP3 産生を介して細胞内カルシウムを動員する。また、PKC を介して ERK1/2 リン酸化を引き起こす。

分子モデリング、薬理学そして創薬開発にとって非常に重要である。構造活性相関の解明により、アミノ酸同士の相互作用や不活性状態から活性状態への状態遷移メカニズムなどの理解に繋がり、GPCRの3次元モデル作製のヒントとなり得る。それを基に分子モデリングを行うことで、アゴニストやアンタゴニストのデザインが容易になり、基礎研究の発展や創薬開発が期待される。

哺乳類 MCHR1 においても構造活性相関の解明が進められており、MCH の結合に必須なアミノ酸や糖鎖付加部位、G タンパク質結合に関与する部位、受容体の膜移行や受容体インターナリゼーションに関与する領域などが明らかにされてきた(図2)(Chung et al., 2009; Saito et al., 2013)。しかし未だ明らかにされていない基礎的かつ重要な課題として、G タンパク質選択機構の解明が挙げられる。即ち、哺乳類 MCHR1 は Gi/o 及び Gq と複数種の G タンパク質と共役するが、どちらかの G タンパク質と選択的に結合する領域は全く不明であった。特に哺乳類 MCHR1 は共役する G タンパク質の種類によって、下流の情報伝達系(Gi/o: 情報抑制、Gq: 亢進)及び生理作用が全く異なることが予測されるため、G タンパク質選択機構の解明は極めて重要な課題である。しかしながら、哺乳類 MCHR1 において Gi/o 選択的共役に関与するアミノ酸残基は同定されていなかった。そこで、第I章で判明した魚類と哺乳類間における MCH 受容体の G タンパク質選択性の違いを参考に、第II章は「哺乳類 MCHR1 における G タンパク質選択機構の解明」を目的として研究を行った。魚類 MCHR1 は Gi/o 共役能を持たないため、哺乳類 MCHR1 のアミノ酸配列を魚類の配列に置換すると、Gi/o 活性が消失することが予想される。そこで、一般的に G タンパク質との相互作用部位とされる細胞内ループ領域近傍に注目し、哺乳類とキンギョ MCHR1 の配列アライメントを行った。そして、ラット MCHR1 のアミノ酸配列をキンギョの配列に置換した置換体を作製し、種々の細胞内情報伝達系解析で Gi/o 活性を評価することで、Gi/o 選択的共役に重要なアミノ酸領域を明らかにした。

クラス A GPCR 間において高度に保存されるアミノ酸配列として、第3膜貫通領域から細胞内第2ループ領域において存在する DRY、第7膜貫通領域から細胞内 C 末端領域に渡って位置する NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフ、第2、4、5、6、7膜貫通領域の中央部付近にそれぞれ存在する Pro が挙げられる。ラット MCHR1 において、DRY モチーフ(140-142番目)の特に Asp140 と Tyr142 は受容体のコンフォメーション形成や G タンパク質との共役に必要不可欠である(Aizaki et al., 2009)。また、膜貫通領域に存在する Pro は糖鎖付加や細胞内シグナリングに重要であることが見出された(Saito et al., 2013)。一方、哺乳類 MCHR1 において NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフの役割は不明であった。哺乳類 MCHR1 には細胞内 C 末端領域の細胞膜近位において、両親媒性のらせん構造 Helix 8 が存在する(Tetsuka et al., 2004)。NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフは第7膜貫通領域から Helix 8 領域にかけて存在する配列であり(Gether, 2000; Huynh et al., 2009)、特に Helix 8 上に位置する Phe318 は、クラス A GPCR において機能的重要性が報告されている(Acharya et al., 1996; Delos Santos et al., 2006; Duvernay et al., 2009)。そこで第III章「哺乳類 MCHR1 における NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフの機能解析」では、NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフ、特に Phe318 の置換体を作製し、細胞内情報伝達系の解析を行った。その結果、F318K 置換体が細胞内カルシウム濃度測定において機能亢進を示したため、次に、この機能亢進が Gi/o もしくは Gq どちらの活性に由来するか検証した。さらには、F318K-Gq 及び-Gi の3次元相同モデルから(サン

トリー生命科学財団生物有機科学研究所 堀川学先生)、F318K における受容体機能亢進の分子メカニズムを推測した。

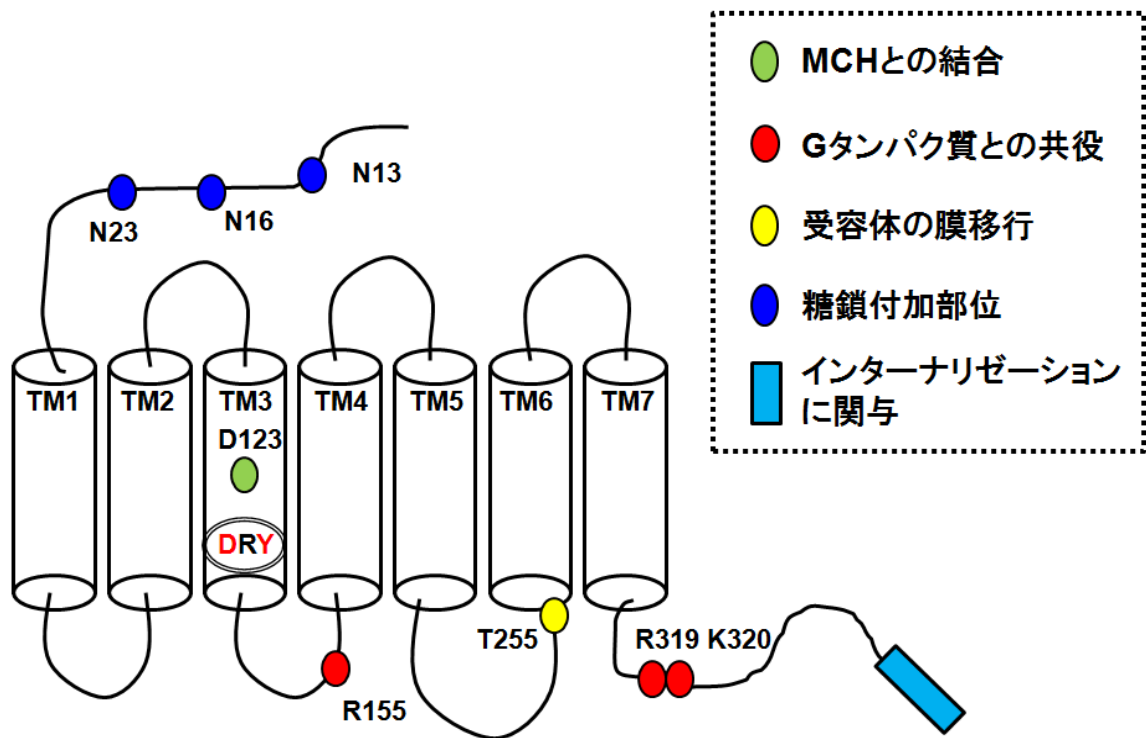


図 2. MCH 受容体の構造活性相関解析。記号はそれぞれ受容体機能に重要な役割を担うアミノ酸を示す。

## 第 I 章 魚類 MCH 受容体の情報伝達系解析

---

**Signalling pathway of goldfish melanin-concentrating hormone receptors 1 and 2.**

Hamamoto A., Mizusawa K., Takahashi A., Saito Y.  
Regulatory Peptides 169, 6-12, 2011.

---

## I-1: 序論

魚類の MCH は、アミノ酸 17 残基から構成される環状ペプチドとしてサケの脳下垂体から初めて単離された (Kawauchi et al., 1983)。MCH ニューロンは、ヤツメウナギからヒトまで全ての脊椎動物の視床下部に存在する (Baker et al., 1991)。硬骨魚類において MCH は、視床下部の外側隆起核で主に合成された後、下垂体神経葉から血流を介して全身へ放出される (Kawauchi et al., 2006)。また、MCH 免疫陽性線維は嗅球、視蓋前野、視蓋、中脳といった視床下部以外においても認められる (Naito et al., 1985)。

硬骨魚類において体色調節は、婚姻色、天敵から隠れる等、生存に必要な生理機能であるが、MCH は当該機能の一端を担う。即ち、魚類における MCH の主な生理作用は、黒色素胞中の色素顆粒凝集であり、結果として体色を明るくする「明化」を引き起こす。さらに魚類の MCH は体色明化以外にも、ストレス応答、浸透圧調節、pH 調節等に関与する (Gröneveld et al., 1995a; Francis et al., 1997)。また、ティラピア脳下垂体の培養細胞では  $\alpha$ -MSH の放出 (Gröneveld et al., 1995b)、キンギョの脳下垂体細胞においては黄体形成ホルモンの分泌 (Cerdá-Reverter et al., 2006)、カワスズメの脳下垂体培養細胞ではソマトラクチンの放出 (Cánepa et al., 2008) を制御することが報告された。哺乳類において MCH は摂食亢進作用を持つが、魚類の摂食行動に対する MCH の効果に関しては、未だ議論の余地がある。即ち、キンギョでは MCH の脳室内投与により摂食が抑制されることが報告された (Matsuda et al., 2009)。逆に、カレイでは白背景に適応させると MCH 発現量が増加し、成長も促進したこと、絶食時に視床下部の MCH 発現量が上昇したことの 2 点から摂食亢進作用が示唆された (Takahashi et al., 2004)。一方、MCH を過剰発現させた遺伝子改変メダカは体色が明るくなったが、摂食行動や体長にほとんど変化は見られず、メダカにおいて MCH は摂食制御に関与しないことが示唆された (Kinoshita et al., 2001)。従って、哺乳類における MCH の明白な摂食亢進作用とは異なり、魚類における MCH の摂食制御は魚種によって異なるため、その解釈が困難である。そこで、魚類における MCH システムの多角的な理解を目的として、キンギョとカレイに着目し、後述する 2 つの研究 (1-A、1-B) を行った。

### 1-A: キンギョ MCH 受容体の情報伝達系解析

MCH 受容体は魚類、両生類、爬虫類、哺乳類を通して広く発現し機能する。げっ歯類や鳥類には MCHR2 が存在しないのに対し、高等霊長類やイヌ、魚類では 2 種類の受容体 (MCHR1 と MCHR2) の発現が確認されている (Tan et al., 2002; Lagerström et al., 2006)。キンギョ、ゼブラフィッシュ、フグ、カレイなどの魚類では MCHR1 と MCHR2 両方の一次構造 (cDNA) 及び発現が報告されており、ゼブラフィッシュではさらに MCHR1a と MCHR1b が存在する (Logan et al., 2003; Takahashi et al., 2007; Mizusawa et al., 2009)。MCH 受容体の系統学的な解析によると、硬骨魚類の進化の早い段階において MCH 受容体の最初の遺伝子重複が起こり、起源型 MCHR から MCHR1 と MCHR2 が生じたと予測されている (Logan et al., 2003; Takahashi et al., 2007)。

キンギョは魚類の中でも MCH 関連分子に関して遺伝子解析が進んでおり、摂食、生殖、情動、記憶に関する行動実験にも利用可能なモデル生物である。哺乳類においては、MCHR1 の機能に関して主にげっ歯類を中心に解明が進められているが、MCHR2 に関しては利用可能な動物モデルがアカゲザルしか存在しないため、その明確な機能は未だに明らかにされていない。そこで MCHR1 及び MCHR2 の両方が発現しており、行動実験も可能であるキンギョに着目した。

MCH 受容体のアミノ酸配列比較によると、キンギョ (gf) MCHR1 と gfMCHR2 のアミノ酸配列のホモロジーは膜貫通領域も含めて約 30% である。gfMCHR1 と他の魚類 (ゼブラフィッシュ・フグ・カレイ) MCHR1 では 57-88%、gfMCHR1 と哺乳類 (ヒト・ラット・マウス) MCHR1 は 49-50% の配列相同性を示す。また、gfMCHR2 は他の魚類 MCHR2 と 72-92%、ヒト MCHR2 と 32% 配列が一致する。さらに、MCH 受容体の進化系統樹を作製すると、gfMCH 受容体はいずれも、それぞれ対応する哺乳類 MCH 受容体サブタイプのグループに属したことから、オルソログであると考えられている (図 3) (Mizusawa et al., 2009)。哺乳類 MCHR1 で解明されたリガンド結合、シグナル伝達及び受容体膜移行に重要なアミノ酸残基は、2 種の gfMCH 受容体においても保存されているが、シグナル伝達に関与する細胞内 C 末端領域近位の二塩基性アミノ酸モチーフは、gfMCHR2 では欠損している。gfMCH 受容体の発現組織は RT-PCR 法により調べられており、脳下垂体、脳、眼球、脂肪組織において gfMCHR1 の発現が検出された (Mizusawa et al., 2009)。一方、gfMCHR2 は脳下垂体、脳、眼球、皮膚組織で発現していた。従って、魚類 MCH の主な生理作用である皮膚の体色明化は、MCHR2 を介して制御されると考えられる。

MCH は脊椎動物を通して摂食行動の調節に関与していながら、哺乳類と一部の魚類 (キンギョ) 間で反対の効果を示す。この要因の一つとして、MCH 受容体の細胞内情報伝達系の違いが想定された。実際、先行研究のヒト胎児由来腎臓細胞 (HEK293T 細胞) 発現時における細胞内カルシウム濃度測定において、gfMCHR1 は Gq と、gfMCHR2 は Gi/o 及び Gq と共役することが示唆された (Mizusawa et al., 2009)。そこで、gfMCH 受容体のさらに詳細な情報伝達系の解明を目的として研究を行った。実験には、gfMCHR1 又は gfMCHR2 が安定高発現した HEK293T 細胞を用いた。情報伝達系の解析には、蛍光マイクロプレートリーダーを利用した細胞内カルシウム濃度測定、ウエスタンブロット法による ERK1/2 リン酸化測定を行った。この時、Gi/o を特異的に不活性化させる作用を持つ百日咳毒素 (pertussis toxin : PTX) を用いることで、gfMCH 受容体の G タンパク質共役能を調べた。さらに、gfMCH 受容体の Gs 及び Gi/o に対する共役能及び親和性を解析するために、サイクリック AMP (cAMP) 量を測定した。加えて、哺乳類 MCHR1 のアゴニスト及びアンタゴニストの魚類 MCH 受容体に対する効果の検討も試みた。即ち、哺乳類 MCHR1 に選択的なアゴニスト Compound.15 やアンタゴニスト Compound.30 をリガンドとして (表 1) (Bednarek et al., 2002a, b)、細胞内カルシウム濃度測定、ERK1/2 リン酸化測定、cAMP 量測定を実施した。

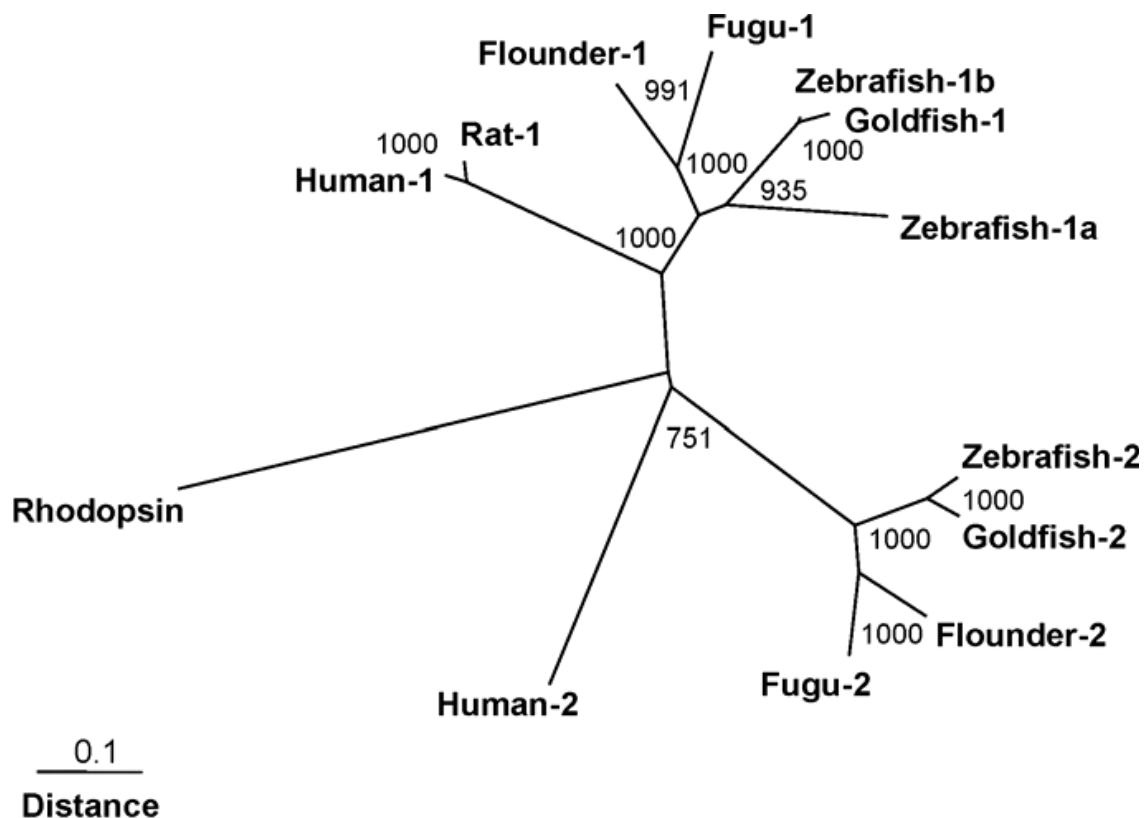


図3. MCH 受容体の分子学的系統樹。neighbor-joining method (近隣結合法) によって作製された MCH 受容体の系統樹である。ノード上の数値はブートストラップ値を示す (Mizusawa et al., 2009)。

表1. 本研究で使用したリガンドの一次構造。

**Rat/mouse/human MCH**

Asp-Phe-Asp-Met-Leu-Arg-[Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys]-Trp-Gln-Val

**Salmon/goldfish MCH**

Asp-Thr-Met-Arg-[Cys-Met-Val-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys]-Trp-Glu-Val

**Compound.15**

Ac-D-Arg-[Cys-Met-Leu-Asn-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys]-NH<sub>2</sub>

**Compound.30**

Ac-Arg-[Cys-Met-Ava-Arg-Val-Tyr-Ava-Cys]-NH<sub>2</sub>

各種 MCH、Compound.15、Compound.30 はペプチド性であり、Cys-Cys の間でジスルフィド結合を形成する。Ava は Aminovaleric Acid の略。下線の部分はラット MCH を基準として共通のアミノ酸残基を示す (Bednarek et al., 2002a, b)。



## 1-B：魚類において新規に報告された MCH サブタイプ (MCH2) の機能解析

近年、ゼブラフィッシュ、メダカ、フグ、カレイにおいて第 2 の MCH が存在することが報告された (Berman et al., 2009; Tuziak et al., 2012; Mizusawa et al., 2014)。本章中 (1-B) のみ、既知の魚類 MCH を MCH1、新たに報告された MCH を MCH2 と呼称する。MCH1 は 1 エクソン型であるのに対し、ゼブラフィッシュの MCH2 は哺乳類と同様に 3 つのエクソンから構成されていることから、MCH2 は遺伝子的に哺乳類の MCH に近いと推測された (Berman et al., 2009)。加えて、ゼブラフィッシュ及びフユヒラメの視床下部において、絶食により MCH2 の発現が上昇傾向にあったことから、摂食調節に関与する可能性が示唆された (Berman et al., 2009; Tuziak et al., 2012)。また、ゼブラフィッシュ及びツキリガレイでは白背景で飼育することで MCH2 mRNA の発現が上昇したことから、MCH1 同様に体色明化にも関与することが考えられた。(Berman et al., 2009; Zhang et al., 2010)。しかしながら、MCH2 の生理機能に関する理解は断片的であり、未だ明確な回答は得られていない。そこで、MCH2 の機能解析を目的として、カレイ目マツカワに着目した。

天然資源及び漁獲量の低さから、北日本で養殖が推進されている水産重要魚種であるマツカワは、体色調節及び摂食行動実験において実績があり、MCH1、MCHR1 及び MCHR2 を有している (Takahashi et al., 2004)。当研究室において、MCH1 をリガンドとしてマツカワ (bf) の MCH 受容体における細胞内カルシウム濃度を測定したところ、bfMCHR1 は Gq と bfMCHR2 は Gi/o と共役することが示された。また、マツカワにおいて MCHR1 は専ら脳に発現するが、MCHR2 は脳だけでなく皮膚を含む末梢組織にも発現する (Takahashi et al., 2007)。近年、マツカワにおいても MCH2 が同定され、脳下垂体や脳に高発現し、眼球や心房、体腎、性腺で弱く発現していることが報告された (Mizusawa et al., 2014)。また、bfMCH1 と同様に、黒色素胞及び黄色素胞の色素凝集に関与することも判明した。bfMCH2 のアミノ酸数は 25 残基から構成されており、bfMCH1 よりもアミノ酸が 8 残基長い (表 2)。そのために、bfMCH1 と bfMCH2 では各 bfMCH 受容体に対する親和性が異なる可能性が考えられる。そこで bfMCH2 をリガンドとして bfMCH 受容体の情報伝達系を解析し、従来型の bfMCH1 と機能を比較した。

表 2. マツカワにおける MCH のアミノ酸配列比較。

<b>bfMCH1</b>	<b>-----DNMRCMVGRVYRPCWEV-----</b>
<b>bfMCH2</b>	<b>DTDFNMLRCMIGRVYRPCWESSNGT</b>

従来型の bfMCH (MCH1) と新規に同定された bfMCH2 のアミノ酸配列を表す。これらのペプチドは Cys-Cys の間でジスルフィド結合を形成する。下線は MCH1 と MCH2 間で共通のアミノ酸残基を示す (Mizusawa et al., 2014)。

## I-2: 実験材料及び方法

### I-2-1: 細胞培養

細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。培養 medium は 10% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum : FBS) と抗生物質ストレプトマイシン・ペニシリン G (SM/PG) を含む Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM、Invitrogen) を使用した。ヒト胎児由来腎臓細胞 (human embryonic kidney cells : HEK293T 細胞) に、解析する各 MCHR の配列が組み込まれたプラスミド DNA を、リポフェクション法によってトランスフェクションした。各 MCHR 安定発現細胞のセレクションは、プラスミド DNA : pc3.1(+) が有する耐性遺伝子を考慮し、100 µg/ml Hygromycin を添加して行った。細胞の継代について、1 : 10 でまいた場合を述べる。培地をアスピレートし、PBS(-) [NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>] を 7 ml を壁から静かに加えた。再び PBS(-) をアスピレートし、0.25% トリプシン 1 ml を細胞上から加え、シャーレを軽く揺らして攪拌した。室温で 1 分間静置した後に、培養 medium を 7 ml 壁から静かに添加し、細胞をほぐすためにピペッティングを 2-3 回行い、15 ml チューブに回収した。1,000 rpm、5 分間遠心分離を行った後、上清の培養 medium を除去し、新しい培養 medium を 5 ml 加えてボルテックスした。新しいシャーレに培養 medium を 7 ml 加え、チューブから細胞懸濁液を 0.46 ml シャーレに移した。軽く攪拌して細胞を均等に播種した後、プレートに終濃度が 100 µg/ml になるように Hygromycin を添加した。以上の工程を行い、適宜、解析に用いた。

### I-2-2: 細胞内カルシウム濃度測定

キンギョ MCH 受容体又はマツカワ MCH 受容体が一過性発現した細胞では細胞内カルシウム動員能の解析が困難であったことから、各受容体が安定発現した細胞 (pool) を用いた。ポリ D リジン (PDL) コート済みの Black-96-well プレート (Becton Dickinson) に 8×10<sup>4</sup> cells/well になるように各種受容体安定発現細胞を播種した後、37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 18-20 時間培養し、細胞内カルシウム濃度測定に用いた。以下にカルシウムアッセイの概略を記す。細胞が剥がれない様に、培養 medium を静かに除去した後、Hank's balanced salt solution (HBSS) /20 mM HEPES (pH 7.5) を 86 µl 加えた。さらに Calcium assay kit 3 (Molecular Device) 付属の assay buffer component B で溶解した non-wash calcium dye を 86 µl 添加して 37°C、5% CO<sub>2</sub> で 1 時間インキュベートした。この間に 0.1% BSA を含む HBSS/HEPES で希釈したリガンドを分注した 96 well ドラッグプレートを用意した。カルシウムイオン濃度の上昇は蛍光マイクロプレートリーダー Flexstation3 (Molecular Device) により検出した。データは、蛍光時間に対しての arbitrary unit として表した。各 MCH に対する EC<sub>50</sub> 値は、nonliner curve-fitting program (Prism version3.03) を用いたシグモイド曲線を適用し算出した。

### I-2-3: 細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 1/2 リン酸化測定

#### ERK アッセイ

PDL コートした 12 well プレート (Becton Dickinson) に 80×10<sup>4</sup> cells、又は 3 cm シャーレに

160×10<sup>4</sup> cells で播種し、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで、37°C、17 時間培養した。培養 medium をアスピレート後、血清除去のために serum free medium を 800 µl/well 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> で 5 時間培養した。また、PTX の効果を評価する場合は、17 時間インキュベートする際の培養 medium 及び、5 時間インキュベートを行う serum free medium の双方に、PTX を 260 ng/ml になるように加えて培養を行った。培養後、氷上で serum free medium を除去し、それぞれの濃度のリガンド（希釈液：0.1% BSA in HBSS/20 mM HEPES）を 300 µl/well 添加した。これを、37°C で指定した時間反応させた後、ただちに氷上でリガンド溶液を除去した。RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、1% Nonidet P-40、0.5% Deoxycholic Acid Sodium Salt Monohydrate、0.1% Sodium Lauryl Sulfate (SDS)、2.5 mM NaF、5 mg/ml leupeptin、0.1 M Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride] を 150 µl/well 加え、10 分間、室温で静置した。先端をカットしたチップを用いて、溶解した細胞をかきとり、1.5 ml チューブに回収し、4°C で 30 分間 rotate した。その後、15,000 rpm、4°C で 30 分間遠心分離を行い、上清を 120 µl 回収した。3×SDS サンプルバッファーを 60 µl 加えた後、100°C で 3 分間加熱し、直ちに氷上に戻して電気泳動用サンプルを調製した。

#### ウエスタンブロット解析

電気泳動用サンプルを 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ゲルを用いて泳動した。泳動後、セミドライ式トランスファー装置（ホライズブロット・4M、ATTO）を用いて、メタノールで親水性処理した Hybond-P PVDF 膜（Amersham）に、ゲル上のタンパク質を一晩かけて転写した。転写後、phospho ERK (P-ERK) 検出の場合、TBS [0.05 M Trizma base、0.2 M NaCl] に溶解した 5% BSA で 1 時間ブロッキングした。TTBS (0.2% Tween 20/TBS) で洗浄した後、1 次抗体 (P-ERK mouse monoclonal IgG 抗体、Santa Cruz Biotechnology) を 2% BSA/TTBS で 1 : 500 に希釈した溶液中で、抗原抗体反応 (4°C、一晩) を行った。これを TTBS で洗浄した後、2% BSA/TTBS で 1 : 3000 に希釈した 2 次抗体 (anti-mouse IgG HRP 抗体、Amersham) 溶液中で、室温、1 時間反応させた。反応したタンパク質は、ECL 基質 (Amersham) と X 線フィルムにより可視化し、解析を行った。

また、ERK の basal level は、total ERK の発現量で評価した。P-ERK の検出に用いた PVDF 膜を TBS で洗浄後、抗体剥離溶液である WB Stripping Solution (ナカライテスク) に浸して抗体を除去した。再度 TBS で洗浄した後、TTBS に溶解した 5% skim milk で 1 時間ブロッキングし、TTBS で洗浄を行った。1 次抗体 (Map Kinase 抗体、Cell Signaling) を 5% BSA/TTBS で 1 : 500 に希釈し、4°C で一晩反応させた。その後、TTBS で洗浄し、2 次抗体 (anti-rabbit IgG HRP 抗体、Amersham) を 5% BSA/TTBS で 1 : 5000 に希釈し、室温 1 時間で反応させた。反応したタンパク質は、P-ERK 検出時と同様の手法で検出した。結果は P-ERK 測定で検出されたバンドの濃淡を ImageJ (National Institutes of Health) により数値化し、リガンド刺激 0 分もしくは 0 nM の時の値を 100% として、各刺激群の値を増加率 (%) に変換した。有意差の判定には t 検定を用いた。

#### I-2-4 : cAMP 量測定

gfMCHR1 又は gfMCHR2 が安定高発現した HEK293T 細胞 (pool)、もしくは一過性に gfMCHR1 が発現した細胞を培養し、PDL コート済みの 24 well plate (Becton Dickinson) に  $40 \times 10^4$  cells/well で播種した。CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 19-20 時間培養後、氷上で培養 medium を除去し、cAMP アッセイ用バッファー [HBSS/20 mM HEPES/0.3 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (IBMX) : pH 7.5] を各 well に 300  $\mu$ l 加えた。37°C のウォーターバス内で 10 分間インキュベートし、直ちに氷上でアスピレートした。次に、cAMP アッセイ用バッファー (cAMP 抑制能解析時には 1  $\mu$ M forskolin を含む) で希釈した各種リガンド溶液を 300  $\mu$ l 添加し、37°C で 15 分間反応させた。氷上でリガンド溶液を除去した後、200  $\mu$ l の 0.3 N HCl により 10 分間室温で処理し、上清を回収した。gfMCHR1 の場合は上清 20  $\mu$ l を MilliQ (MQ) 水 30  $\mu$ l で希釈したものを、gfMCHR2 の場合は上清 10  $\mu$ l を MQ 水 40  $\mu$ l で希釈したものを測定用サンプルとして用いた。

cAMP 量の検出にはヤマサ醤油株式会社の cAMP キット「ヤマサ」を用いた。測定用サンプル (50  $\mu$ l) にスクシニル化剤を 50  $\mu$ l 加えて攪拌し、室温で 10 分間反応させた後、氷冷したイミダゾールバッファーを 400  $\mu$ l 添加した。その内の 50  $\mu$ l を 5 ml チューブに移し、氷上で [<sup>125</sup>I] cAMP 液を 50  $\mu$ l、さらに cAMP 抗血清を 50  $\mu$ l 加えて良く攪拌させた。4°C で 12-48 時間反応させた後、B/F 分離剤を 250  $\mu$ l 添加して攪拌し、氷中で 20 分間静置した。その後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。回収した上清 250  $\mu$ l を、オートウェルガンマシステム ARC-380CL (ALOKA) により 1 分間あたりの放射線量を測定し、標準曲線から cAMP 量を算出した。

## I-3: 結果

### I-3-1: キンギョ MCH 受容体における細胞内カルシウム濃度測定

哺乳類培養細胞発現系において、哺乳類 MCHR1 は G タンパク質 Gi/o 及び Gq と共役し、ヒト MCHR2 は Gq との共役を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させることが明らかになっている (Chambers et al., 1999; Saito et al., 1999; An et al., 2001)。そこで、カルシウムイオン感受性の dye と蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、gfMCHR1 又は gfMCHR2 が安定高発現した HEK293T 細胞に gfMCH を添加した際の細胞内カルシウム動員能及び G タンパク質共役能を調べた。最初に、ネガティブコントロールとして Mock (空ベクター) を導入した HEK293T 細胞を gfMCH で刺激しても、細胞内カルシウム濃度が変化しないことを確認した (data not shown)。一方、gfMCHR1 及び gfMCHR2 安定発現細胞においては、gfMCH 添加により、急速な細胞内カルシウムの動員が認められた (図 4)。gfMCHR1 の EC50 値は  $1.1 \pm 0.5$  nM、gfMCHR2 の EC50 値は  $39.1 \pm 5.7$  nM であり、gfMCHR1 の方が gfMCHR2 よりも gfMCH に対する親和性が高かった。

次に、Gi/o を特異的に不活性化する PTX を用いて、gfMCH 受容体の G タンパク質選択性を調べた。gfMCHR1 において、PTX は EC50 値、最大反応値共に影響を与えなかった (図 4)。従って、gfMCHR1 は PTX 感受性を示さないことから Gi/o と共役せず、Gq と共役することが示された。一方、gfMCHR2 は PTX 前処理により、EC50 値は  $164.0 \pm 39.5$  nM に上昇し、最大反応値は  $38.7 \pm 8.3\%$  減少した。従って、gfMCHR2 は PTX 感受性を示すことから Gi/o と共役し、また PTX を前処理しても活性が完全に消失しないことから Gq と共役することが予測された。以上より、細胞内カルシウム濃度測定において、gfMCHR1 は Gq と、gfMCHR2 は Gi/o 及び Gq と共役することが推測された。これらの結果は、先行研究と一致する (Mizusawa et al., 2009)。

### I-3-2: キンギョ MCH 受容体における ERK1/2 リン酸化の測定

セリン/スレオニンキナーゼの一種である ERK1/2 は、リン酸化されることで、多数の転写制御因子を調節し、様々な細胞において成長や増殖等に関与する重要なキナーゼである (Chen et al., 2001)。Gs、Gi/o 及び Gq を介した多様な細胞内シグナル伝達の下流では、ERK1/2 がリン酸化されることが多数報告されている。哺乳類 MCHR1 においても、MCH 刺激により ERK1/2 のリン酸化を引き起こすことが報告された (Hawes et al., 2001; Pissios et al., 2003)。そこで、gfMCH 受容体の ERK1/2 リン酸化をウエスタンブロット法で解析したところ、gfMCH 受容体はいずれも  $1 \mu\text{M}$  MCH 刺激により ERK1/2 のリン酸化を誘導し、gfMCHR1 は MCH 刺激 3-5 分、gfMCHR2 は 5 分で ERK1/2 リン酸化のピークを示した (図 5A)。また、MCH で 30 分間刺激しても、ERK1/2 のリン酸化レベルは MCH 未添加時の Basal レベルに戻ることはなかった。gfMCH 受容体の ERK1/2 リン酸化は MCH 濃度依存的であり、gfMCHR1 の EC50 値は  $5.4$  nM、gfMCHR2 の EC50 値は  $29.4$  nM であった (図 5B)。最大反応値は gfMCHR1 では  $165.2 \pm 14.0\%$ 、gfMCHR2 では  $204.3 \pm 28.3\%$  を示し、両受容体間で有意差は認められなかった。

次に、gfMCH 受容体における ERK1/2 リン酸化にどの G タンパク質ファミリーが関与する

かを調べるために、PTX 前処理を行い、同様に実験を行った。その結果、PTX 処理した際の gfMCHR1 の EC50 値は 8.63 nM であり、最大反応は  $177.4 \pm 16.2\%$  であった。即ち、PTX 処理の有無による違いは認められなかった (図 5C)。一方、PTX 処理した gfMCHR2 の EC50 値 (37.1 nM) は、PTX 未処理群と有意差は認められなかったが、最大反応は  $163.1 \pm 12.3\%$  と約 40% 低下した。以上より、PTX 感受性を示さない gfMCHR1 は Gq と、PTX 感受性を示すが PTX を前処理しても活性が完全に消失しない gfMCHR2 は Gi/o 及び Gq を介して ERK1/2 のリン酸化を誘導することが明らかになった。

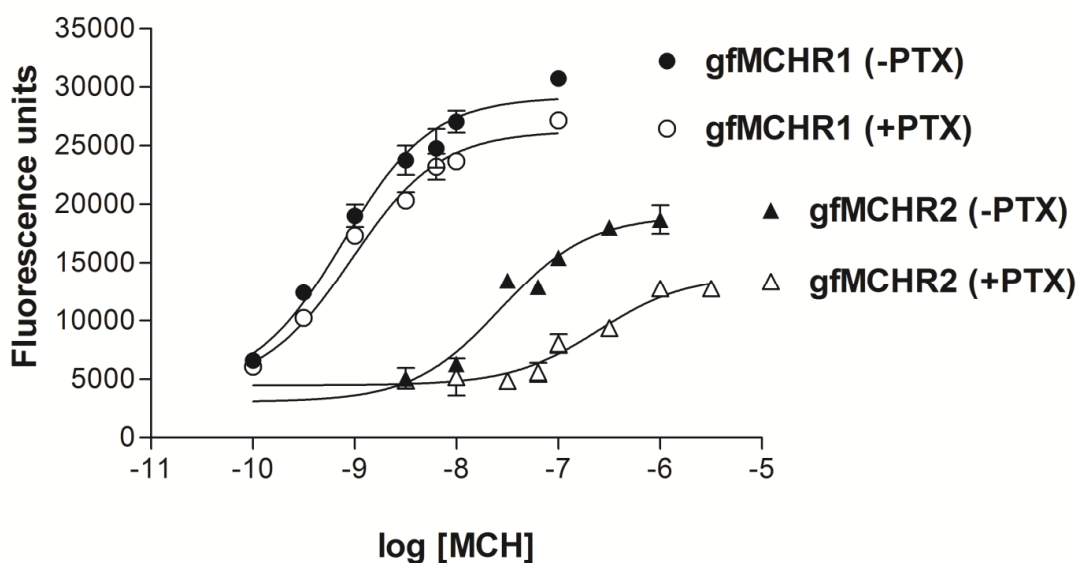
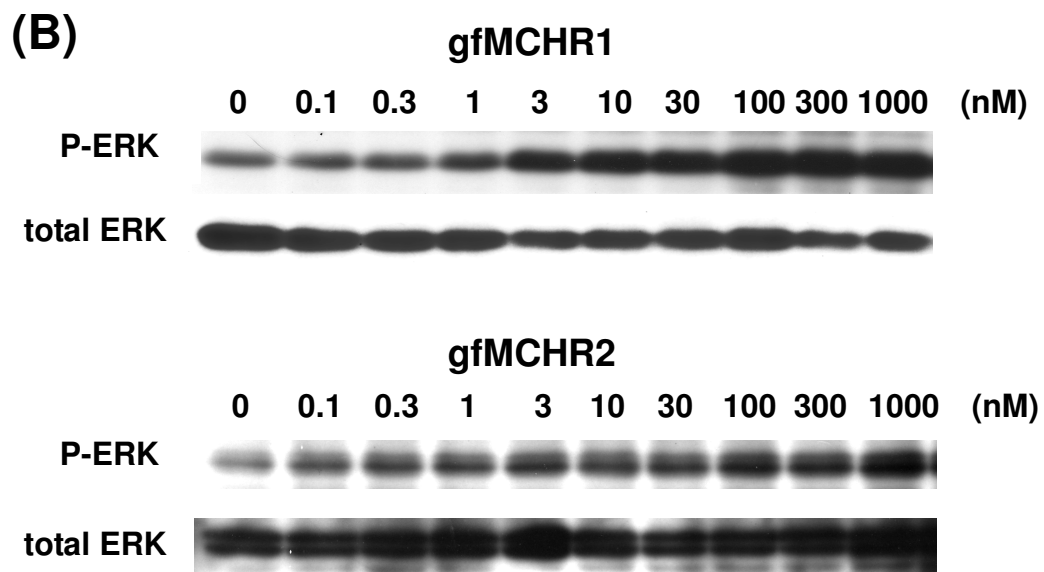
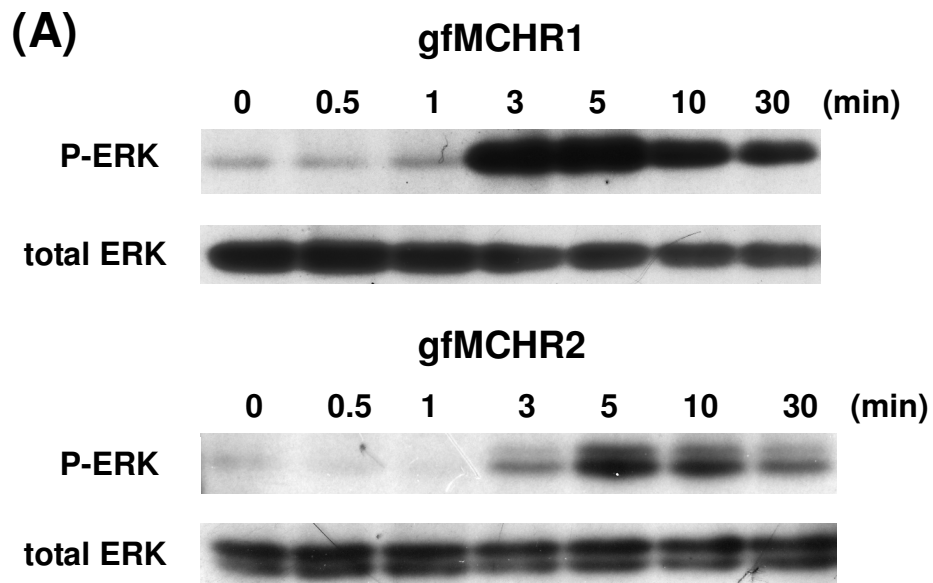


図 4. gfMCH 受容体における細胞内カルシウム動員能解析。gfMCHR1 (●) もしくは gfMCHR2 (▲) が安定発現した HEK293T 細胞の細胞内カルシウム濃度変化を示す。PTX 処理群 (○又は△) は終濃度 280 ng/ml PTX で 37°C、18 hr インキュベートを行った。リガンドには gfMCH を使用し、細胞内カルシウム濃度の変化は蛍光マイクロプレートリーダー-Flexstation を用いて測定した。濃度反応曲線は duplicate で 3 回以上独立して実験を行った際の代表例を示す。



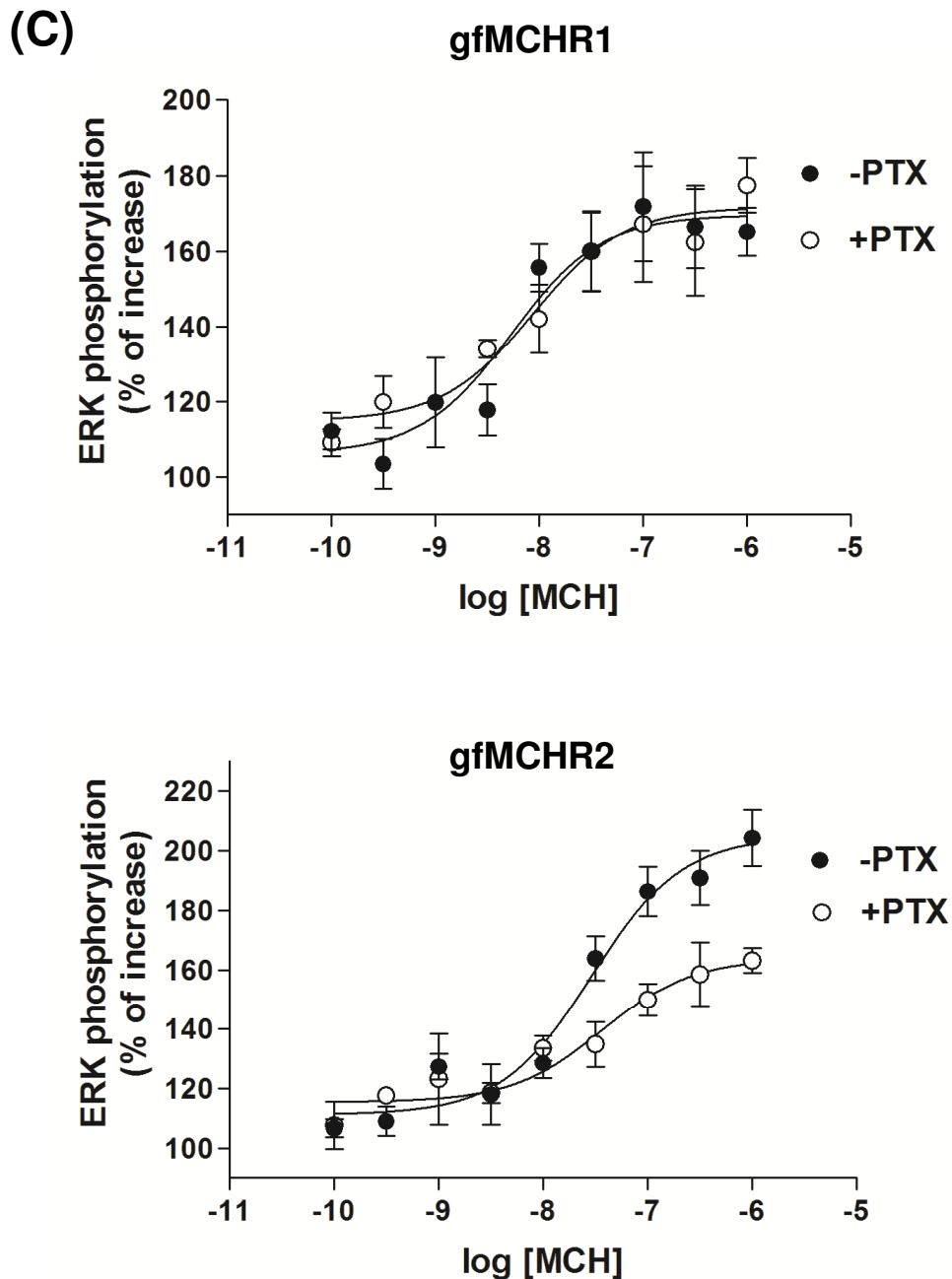


図5. gfMCH 受容体における ERK1/2 リン酸化の解析。gfMCHR1 もしくは gfMCHR2 が安定発現した HEK293T 細胞を用い、ERK1/2 リン酸化を測定した。その際のリン酸化 ERK1/2 (P-ERK) 及び total ERK の発現量をウェスタンブロット法で検出し、バンドの密度を ImageJ で定量した。

(A) は 1  $\mu$ M MCH を各時間添加した際、(B) は各濃度の MCH を 5 分間添加した際の P-ERK 及び total ERK の発現量を示す。(C) 各濃度の gfMCH を 5 分間添加した際の ERK1/2 リン酸化レベルの変化を示した (PTX 未処理群：●、PTX 処理群：○)。PTX 処理群は終濃度 280 ng/ml PTX で 37°C、18 hr インキュベートを行った。写真及び濃度反応曲線はいずれも 3 回以上独立して実験を行った際の代表例を示す。



### I-3-3: キンギョ MCH 受容体における cAMP 量測定

細胞内カルシウム濃度測定及び ERK1/2 リン酸化測定の結果から、gfMCHR1 は Gq と gfMCHR2 は Gq 及び Gi/o との共役が予測された。CHO 又は HEK293 細胞において、哺乳類 MCHR1 は Gi/o との共役を介してアデニル酸シクラーゼの活性を抑制し、cAMP 量を減少させることが報告されている (Chambers et al., 1999; Saito et al., 1999; Hawes et al., 2001)。一方、ヒト MCHR2 は Gi/o と共役能を持たないため、同細胞において、MCH で刺激しても cAMP 量に影響を与えない (An et al., 2001; Sailer et al., 2001)。そこで、gfMCH 受容体の Gi/o に対する共役能及び親和性を解析するために、gfMCH 受容体安定発現株を用いて cAMP 量測定を行った。

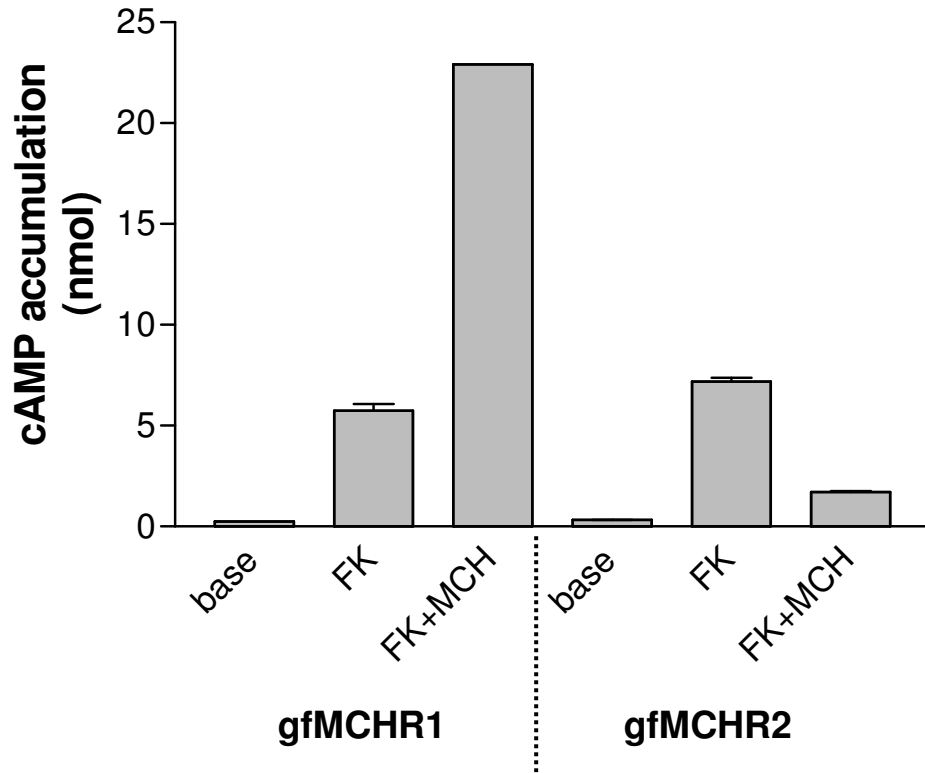
GPCR は一般的に、Gs と共役することでアデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMP の産生に関与する。一方、Gi/o と共役すると、アデニル酸シクラーゼ活性が抑制され、cAMP 産生の抑制が生じる。そこで、最初にアデニル酸シクラーゼを直接活性化させるフォルスコリンを用いて細胞内 cAMP 量を増加させた後に、gfMCH で刺激し、gfMCH 受容体の cAMP 産生に対する作用を評価した (図 6)。MCH もフォルスコリンも加えていない定常状態の cAMP 量は、gfMCHR1 と gfMCHR2 間で差はなかった。また予想通り、Gi/o との共役が予測された gfMCHR2 が安定発現した細胞では、フォルスコリンによる cAMP 濃度の増加が MCH 添加により著しく抑制された (図 6A)。この抑制は MCH 濃度依存的 (EC50 値=3.10 nM) であり (図 6B)、1  $\mu$ M MCH の添加により cAMP 量が約 70%減少した。従って、gfMCHR2 は Gi/o と共役することが証明された。

一方、gfMCHR1 安定発現細胞ではフォルスコリンによる cAMP 産生に対する抑制効果は検出されなかった。それどころか予想に反し、gfMCHR1 はフォルスコリンと MCH の同時添加において有意な cAMP 産生の増加が観察された (図 6A)。フォルスコリンを添加せずに測定を行った場合も、gfMCHR1 は MCH 濃度依存的に cAMP の産生を促進した (図 6C 上部)。この際、EC50 値は 103.4 nM を示し、1  $\mu$ M MCH の投与により cAMP 量が約 80%増加した。この解釈として、本実験に安定発現株を用いていることに着目した。即ち、培養細胞に受容体を強制発現させて安定発現株を作製すると、抗生物質を用いた長い選択期間により、一過性発現とは異なる機能を獲得する可能性がある。そこで、一過性に gfMCHR1 を発現させた細胞を用いて同様に実験を行った。その結果、安定発現株と比べると受容体機能はやや低下したが、濃度依存的な cAMP 量の増加が認められ、EC50 値は 235.0 nM、最大反応は MCH 未添加時と比べて 50%増加した (図 6C 下部)。従って、gfMCHR1 は Gq のみならず、親和性は低いが Gs と共役能を有することが判明した。以上より、gfMCH 受容体の G タンパク質選択性を明らかにした。キンギョを含むこれまでに研究が行われた動物種における MCH 受容体の細胞内情報伝達系解析の結果を、表 3 にまとめた。

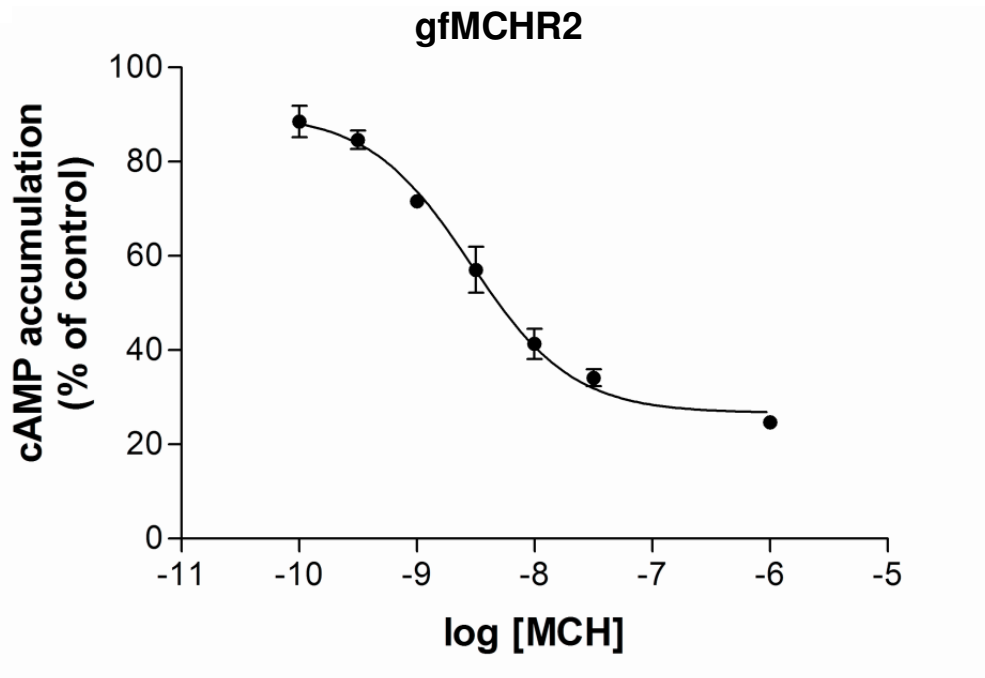
### I-3-4: キンギョ MCH 受容体のリガンド選択性解明

哺乳類 MCH の類似体リガンドである Compound.15 と Compound.30 はペプチド性の化合物であり哺乳類 MCHR1 に対して高い親和性を持つことが報告されている (Bednarek et al., 2002a, b)。Compound.15 は、哺乳類 MCHR1 の選択的なアゴニストである。Compound.30 は、哺乳類 MCHR1

**(A)**



**(B)**



(C)

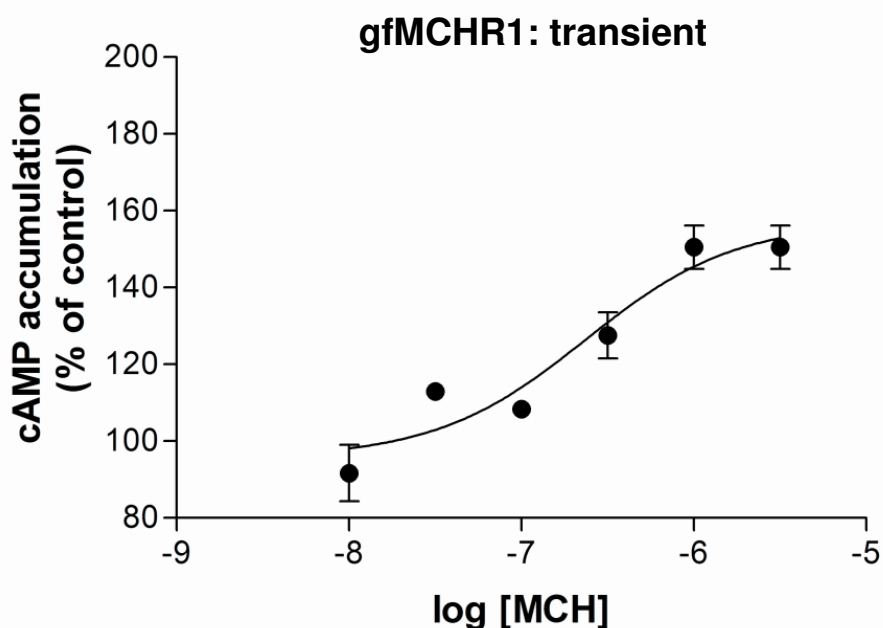
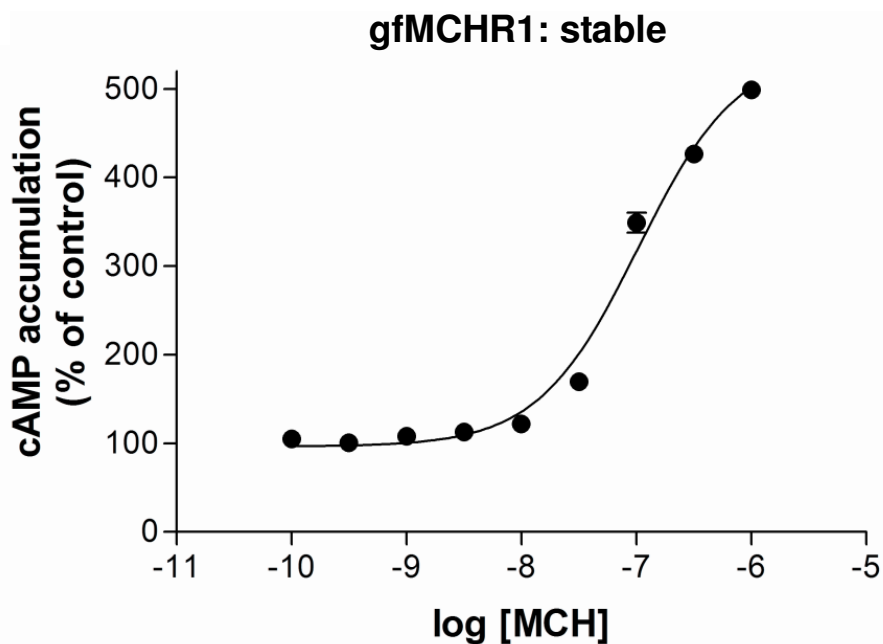


図6. gfMCH 受容体における cAMP 量変化の解析。(A) gfMCHR1 もしくは gfMCHR2 が安定発現した HEK293T 細胞に 1  $\mu$ M Forskolin (FK) 及び 1  $\mu$ M gfMCH を 15 分間添加した際の cAMP 量 (24 well plate における 1 well の総量) を示す。(B) gfMCHR2 安定発現細胞に 1  $\mu$ M FK 及び各濃度の gfMCH を添加した際の cAMP 量変化を表す。(C) gfMCHR1 が安定 (上図、stable) 又は一過性 (下図、transient) に発現した HEK293T 細胞に各濃度の gfMCH を添加した際の cAMP 量変化を示す。グラフはいずれも duplicate で 2 回又は 3 回独立して実験を行った際の代表例である。

表 3. 各種 MCH 受容体の細胞内情報伝達系。

	Ca <sup>2+</sup> 動員	ERK1/2 リン酸化	cAMP 産生	G タンパク質選択性
ラット/ヒト MCHR1	Partially PTX-sensitive	PTX-sensitive	Inhibition	Gi/o > Gq
ヒト MCHR2	PTX-insensitive	—	No effect	Gq
キンギョ MCHR1	PTX-insensitive	PTX-insensitive	Stimulation	Gq >> Gs
キンギョ MCHR2	Partially PTX-sensitive	Partially PTX-sensitive	Inhibition	Gi/o > Gq
ニワトリ MCHR1	—	—	—	—
アフリカツメガエル MCHR1a	Partially PTX-sensitive	—	—	Gq・Gi/o
アフリカツメガエル MCHR1b	PTX-insensitive	—	—	Gq
アフリカツメガエル MCHR2a	PTX-insensitive	—	—	Gq
アフリカツメガエル MCHR2b	No effect	No effect	No effect	?

—:未確認

細胞内情報伝達系解析でこれまでに判明した各 MCH 受容体の PTX 感受性及び G タンパク質選択性を示す (Chambers et al., 1999; Saito et al., 1999; Hawes et al., 2000; Mizusawa et al., 2009; Kobayashi et al., 2014)。

の選択的アンタゴニストであり、摂食抑制効果と抑うつ効果を有する (Georgescu et al., 2005)。そこで、生理行動解析のことも視野に入れ、Compound.15 と Compound.30 の gfMCH 受容体に対する作用を調べた。各リガンドのアミノ酸配列を表 1 に示す。

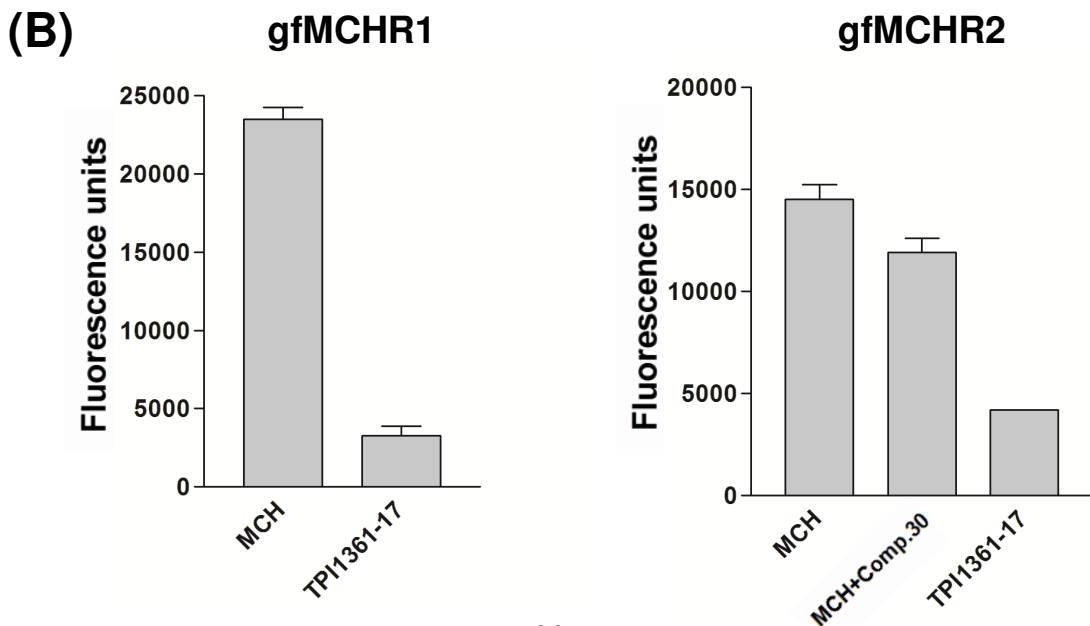
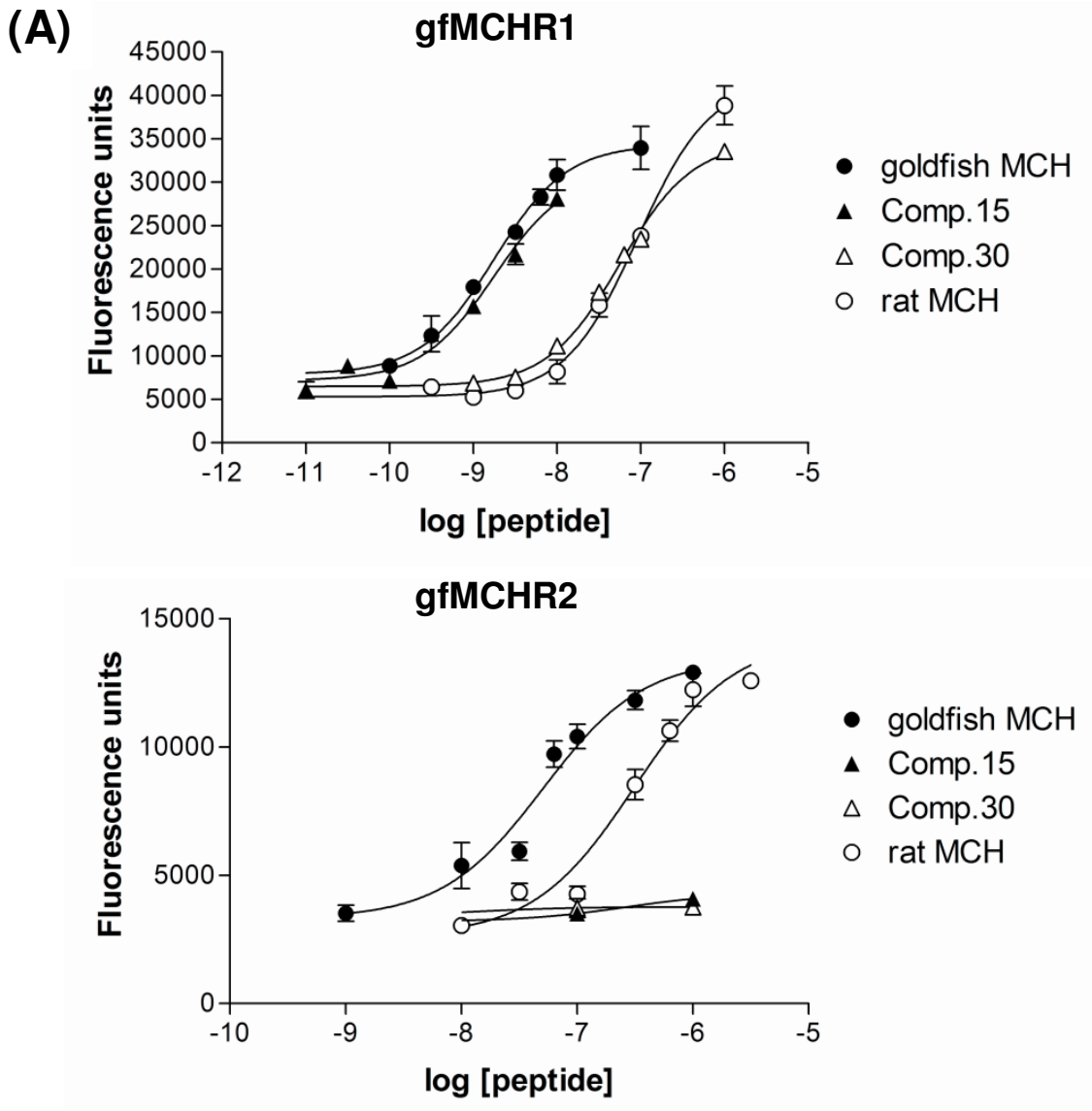
細胞内カルシウム濃度測定の結果、Compound.15 と Compound.30 は gfMCHR1 に対して濃度依存的な細胞内カルシウム動員を示し、アゴニスト効果を有することが判明した (図 7A 上部)。特に Compound.15 の EC50 値は  $1.3 \pm 0.4$  nM と gfMCH と同程度の親和性を示した。また、gfMCH をリガンドとした際の最大反応の値を 100% とした場合、Compound.15 の最大反応は  $93.2 \pm 9.3\%$  で同程度であった。Compound.30 は gfMCHR1 において、gfMCH よりも EC50 値が 20 倍程度高かったが ( $21.3 \pm 12.8$  nM)、ラット MCH ( $78.2 \pm 27.0$  nM) よりも EC50 値の比較から親和性が高い傾向が認められた。一方、gfMCHR2 において、ラット MCH は濃度依存的に細胞内カルシウム動員を示したが、Compound.15 及び Compound.30 は細胞内カルシウム動員を引き起こさなかった (図 7A 下部)。また、1  $\mu$ M gfMCH と 1  $\mu$ M Compound.30 を同時に添加した場合、1  $\mu$ M gfMCH 単独投与時と比較して約 20% の最大反応低下を示したことから、アンタゴニスト効果を有することが分かった (図 7B 右)。加えて、哺乳類 MCHR1 のアンタゴニストである非ペプチド性の TPI1361-17 のアゴニスト効果を調べたところ、1  $\mu$ M TPI1361-17 を添加しても gfMCHR1 と gfMCHR2 の両方において、細胞内カルシウム動員は引き起こさなかった (図 7B)。

次に、gfMCH 受容体における Compound.15 及び Compound.30 の ERK1/2 リン酸化に及ぼす作用を調べた。gfMCHR1 において、Compound.15 と Compound.30 はどちらも ERK1/2 のリン酸化を亢進した (図 7C 左)。最大値は gfMCH、Compound.15 及び Compound.30 の間で有意差は認められなかった。一方、gfMCHR2 において、Compound.15 又は Compound.30 を 1  $\mu$ M 添加しても、ERK1/2 リン酸化は引き起こされなかった (図 7C 右)。

ソマトスタチン受容体 2A 型には cAMP 抑制系においてはアゴニストとして働くが、細胞内カルシウム動員及び ERK1/2 リン酸化ではアンタゴニストとして作用するバイアスリガンドが存在する (Cescato et al., 2010)。そこで、Compound.15 及び Compound.30 がバイアスリガンドとして作用する可能性を考慮し、さらに gfMCH 受容体発現細胞を用いて cAMP 量測定を行った。gfMCHR1 安定発現細胞において、Compound.15 は gfMCH と同様に著しい cAMP の産生を示し (図 7D)、1  $\mu$ M gfMCH の添加で 24 well plate の 1 well あたり 6.22 pmol (183.5%) の cAMP が産生されるのに対して、1  $\mu$ M Compound.15 では 8.01 pmol (236.3%) が産生された。一方、1  $\mu$ M Compound.30 は cAMP 量の増減を引き起こさなかった。gfMCHR2 発現細胞では、1  $\mu$ M MCH を添加すると、フォルスコリンによる cAMP 産生を約 75% 抑制したが、意外にも Compound.15 も cAMP 産生を有意に抑制し、100 nM で 20%、1  $\mu$ M で 40% の減少を示し、弱いアゴニスト効果が認められた (図 7E)。また、Compound.30 では、cAMP 量の増減は認められなかった。

以上より判明した Compound.15 及び Compound.30 の gfMCH 受容体における作用を表 4 にまとめた。哺乳類 MCHR1 の選択的なアゴニストである Compound.15 は、gfMCHR1 発現細胞において、gfMCH と同程度の強いアゴニスト効果を示し、gfMCHR2 では cAMP 産生抑制に選択的な弱いアゴニストとして機能することが分かった。一方、哺乳類 MCHR1 の選択的アンタゴニスト Compound.30 は、gfMCHR1 においてはアゴニストとして働くが Compound.15 よりも親和性は低く、gfMCHR2 においてアンタゴニスト効果のみ示し、アゴニスト効果を示さないこ

とが判明した。



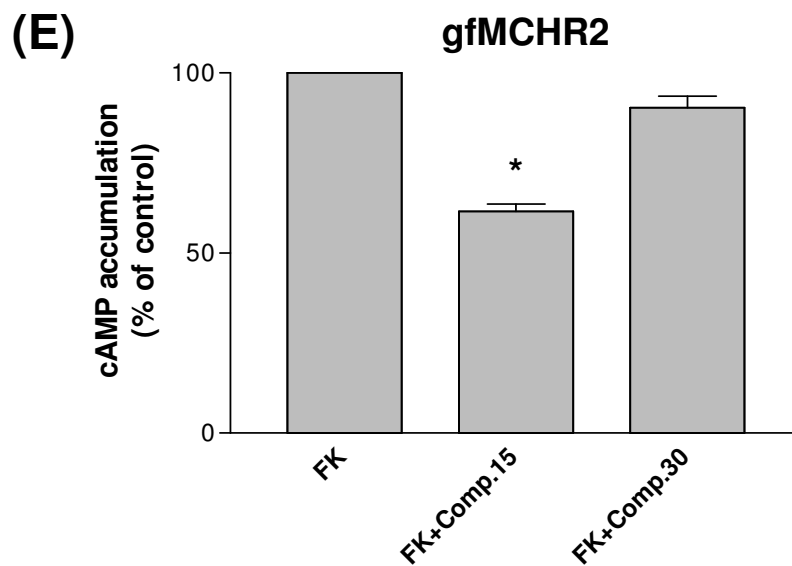
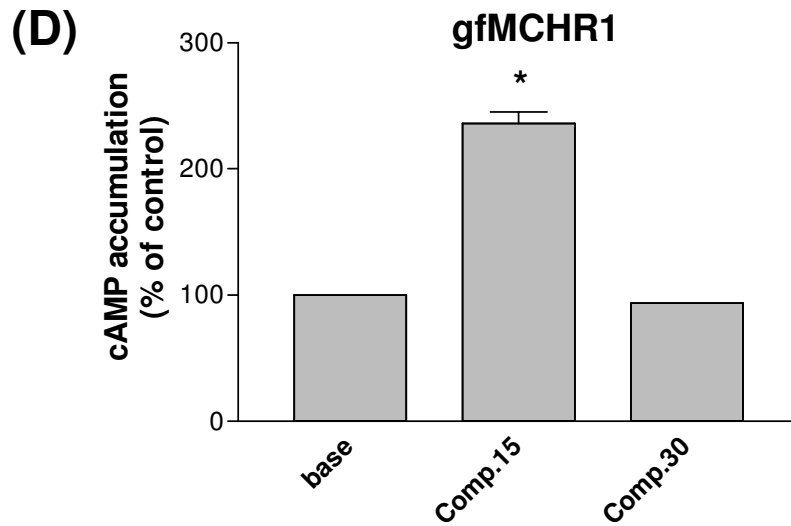
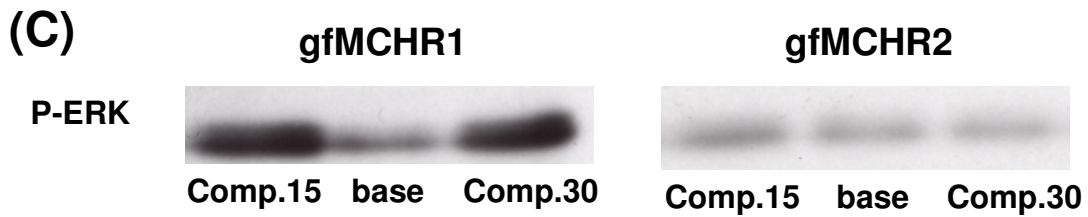


図 7. Compound. 15 及び Compound. 30 の gfMCH 受容体における効果。gfMCHR1 もしくは gfMCHR2 が安定発現した細胞において、リガンドに Compound. 15 (Comp.15) 又は Compound. 30 (Comp.30)、TPI1361-17 を用いた際の細胞内情報伝達系を解析した。細胞内カルシウム濃度測定において、濃度反応曲線を (A)、1  $\mu\text{M}$  各種リガンド添加時の値を (B) に示す。(C) は 1  $\mu\text{M}$  の各種リガンドを 5 分間添加した際の ERK1/2 リン酸化を、(D) 及び (E) は gfMCHR1 又は gfMCHR2 発現細胞に 1  $\mu\text{M}$  の各種リガンド及び 1  $\mu\text{M}$  FK を添加した際の cAMP 量変化を示す。グラフは duplicate でいずれも 3 回以上独立して実験を行った際の代表例である。

\* P < 0.01 significantly different from (D) control group (base) or (E) FK group by Student's *t*-test.

表 4. gfMCH 受容体における Compound.15 及び Compound.30 の作用。

	gfMCHR1		
	Ca <sup>2+</sup> 濃度測定	ERK1/2 リン酸化測定	cAMP 量測定
<b>Compound.15</b>	<b>agonist</b>	<b>agonist</b>	<b>agonist</b>
<b>Compound.30</b>	<b>agonist</b>	<b>agonist</b>	<b>No effect</b>
	gfMCHR2		
	Ca <sup>2+</sup> 濃度測定	ERK1/2 リン酸化測定	cAMP 量測定
<b>Compound.15</b>	<b>No effect</b>	<b>No effect</b>	<b>partial agonist</b>
<b>Compound.30</b>	<b>antagonist</b>	<b>No effect</b>	<b>No effect</b>

各細胞内情報伝達系解析で判明した gfMCH 受容体に対する Compound.15 及び、Compound.30 の作用を示す。

#### I-3-5 : マツカワ MCH 受容体に対する MCH2 の機能解析

カレイ目マツカワには MCHR1 と MCHR2 の二つのサブタイプが機能的に発現している (Takahashi et al., 2007)。PTX を利用した細胞内カルシウム濃度測定において、マツカワ (bf) MCHR1 は Gq と、bfMCHR2 は Gi/o と共役することが当研究室で以前に見出された。さらに近年、ゼブラフィッシュ、メダカ、フグ、カレイで新たに発見された第 2 の MCH である MCH2 がマツカワからも同定された (表 2) (Mizusawa et al., 2014)。そこで、bfMCH2 をリガンドとして、bfMCH 受容体の細胞内カルシウム濃度測定を行い、bfMCH2 の作用を調べた。

bfMCHR1 安定発現細胞において、bfMCH2 濃度依存的な細胞内カルシウムの動員が観察された (図 8A)。また、bfMCH1 あるいは bfMCH2 をリガンドとして用いた際の、濃度反応曲線、EC50 値 (MCH1=1.30 nM、MCH2=1.49 nM) 及び最大反応において違いは認められなかった。bfMCHR2 安定発現細胞においても、bfMCH2 は濃度依存的な細胞内カルシウム動員を引き起こした (図 8B)。bfMCH1 で刺激した際の EC50 値は 16.72 nM、bfMCH2 の場合は 23.26 nM を示し、最大反応も同程度であった。以上より、bfMCH 受容体において、bfMCH2 は従来の MCH (bfMCH1) と同様に機能的なアゴニストとして働くことが推測された。



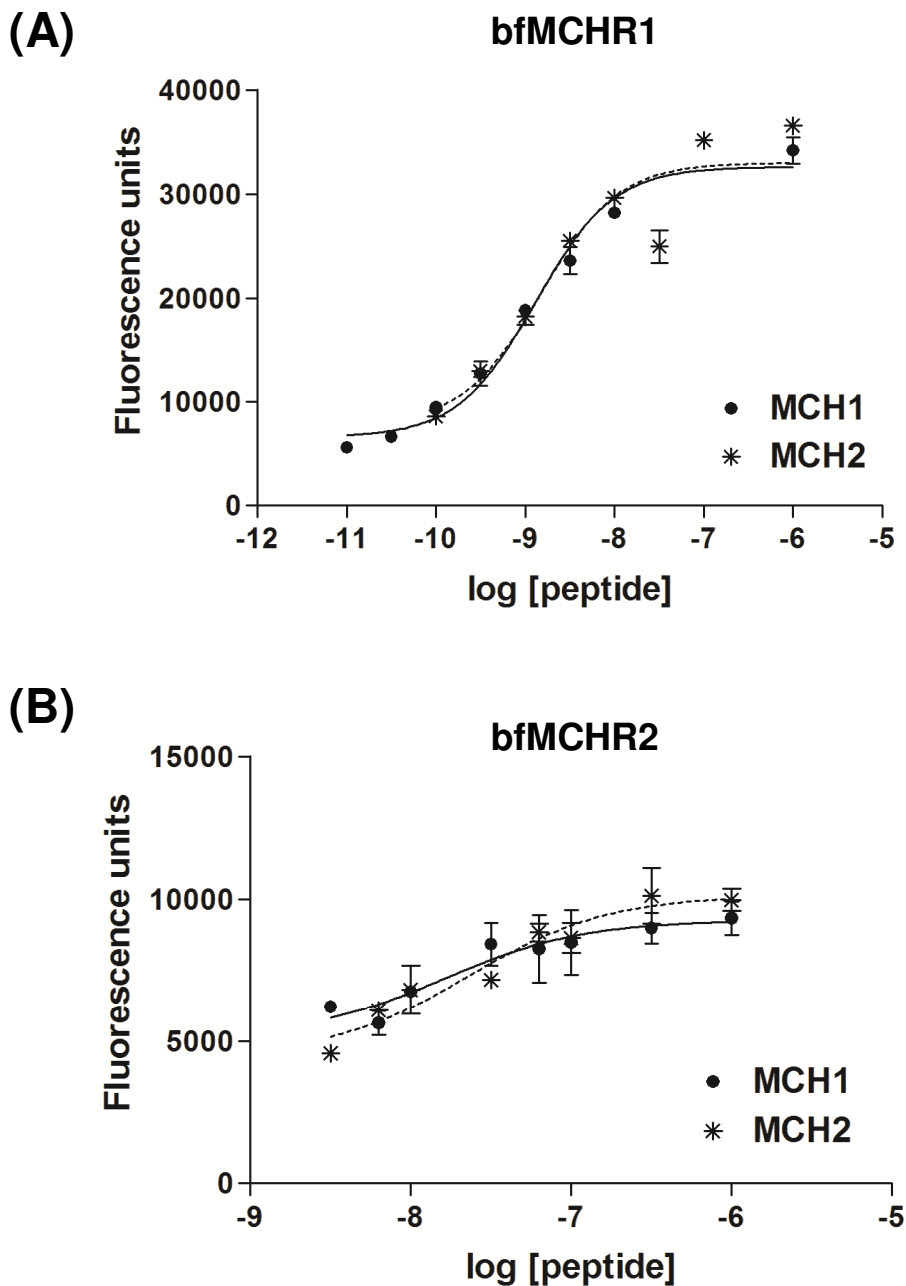


図 8. bfMCH 受容体の情報伝達系解析。(A) bfMCHR1 もしくは (B) bfMCHR2 が安定発現した HEK293T 細胞の細胞内カルシウム濃度変化を示す。リガンドには従来型の bfMCH1 (●) 又は新規に発見された bfMCH2 (\*) を使用した。細胞内カルシウム濃度の変化は蛍光マイクロプレートリーダー Flexstation を用いて測定した。濃度反応曲線は duplicate で 3 回以上独立して実験を行った際の代表例を示す。

## I-4: 考察

### 1-A: キンギョ MCH 受容体の情報伝達系解析

gfMCH 受容体は哺乳類 MCH 受容体と相同性は低い、系統学的な解析によると両者はオルソログの関係であり、重要な機能を担うアミノ酸残基はよく保存されている (Mizusawa et al., 2009)。そこで本研究では、哺乳類培養細胞発現系において、細胞内カルシウム濃度測定、ERK1/2 リン酸化測定、cAMP 量測定を行うことで、gfMCH 受容体の細胞内情報伝達系を多角的に解析した。その結果、哺乳類と魚類では MCH 受容体を介する細胞内情報伝達系が全く異なることを見出した(表3)。さらに、哺乳類 MCHR1 の選択的アゴニストである Compound.15 が gfMCHR1 に選択的ではなく gMCHR2 にも働くこと、そして、ヒト MCHR1 の選択的アンタゴニストである Compound.30 が gfMCHR1 のアゴニストとして働くことが判明した (表4)。

哺乳類 MCHR1 が発現した CHO 及び HEK293T 細胞は、Gi/o、Gq と共役して情報伝達を行う (Chambers et al., 1999; Saito et al., 1999; Hawes et al., 2000)。また、ヒト MCHR2 は Gq と共役することが報告されている (An et al., 2001; Sailer et al., 2001)。gfMCH 受容体が安定発現した HEK293T 細胞を用いて細胞内情報伝達系を解析した結果、gfMCHR1 は MCH 濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇、ERK1/2 のリン酸化、cAMP 量の上昇を示した。また、Gi/o を特異的に不活性化させる作用を持つ PTX に非感受性であったことから、Gq 及び Gs 共役能を持つことが判明した。哺乳類 MCHR1 が発現した HEK293T 細胞では、Gs を介したシグナル伝達系はこれまで報告されていないが、内在的に MCHR1 が発現したヒトの末梢血単核細胞において、100 nM 以上の MCH で一日刺激すると、cAMP 量が約 2 倍増加し (Verlaet et al., 2002)、G<sub>16</sub> をトランスフェクションした神経芽細胞腫 IMR32 でも有意 (4-5 倍) な cAMP 量の増加が検出された (Fry et al., 2006)。実際、gfMCHR1 における細胞内カルシウム濃度測定及び ERK1/2 リン酸化測定における EC<sub>50</sub> 値は 1.12 nM と 5.35 nM であったが、cAMP 量測定の EC<sub>50</sub> 値は 100 nM 以上だった。通常、内在性リガンドがペプチド性の場合の EC<sub>50</sub> 値は 10 nM 以下であることを考慮すると、cAMP 量測定における EC<sub>50</sub> 値は内在性リガンドに対する値としてはかなり高いため、Gs 共役の生理的意義については解釈に注意を要する。従って、gfMCHR1 が発現した HEK293T 細胞では Gs を介するシグナル伝達よりも Gq を介する経路の方がより優先的なシグナル経路であると思われる。

一方、gfMCHR2 発現細胞では、MCH 濃度依存的に細胞内カルシウム濃度の上昇と ERK1/2 のリン酸化が認められたが、gfMCHR1 とは異なり cAMP 産生量は減少した。加えて PTX に対して感受性を示したことから、Gi/o 及び Gq 共役能を有すると考えられる。gfMCHR2 を用いた細胞内カルシウム濃度測定及び ERK1/2 リン酸化測定の EC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 39.1 nM、29.4 nM であり、cAMP 量測定における EC<sub>50</sub> 値は 3.10 nM であったことから、Gq よりも Gi/o に対する感受性のほうが高いと推測される。gfMCHR2 は色素胞が存在する皮膚に豊富に発現しているため (Mizusawa et al., 2009)、MCH による体色明化は Gi/o を介して行われている可能性が高い。

以上より、HEK293T 細胞発現系において、哺乳類と魚類では MCH 受容体の G タンパク質選択性が異なることが明らかになった。MCH 受容体と同じく、摂食やエネルギー代謝の調節

に關与するソマトスタチン受容体（ブラックゴーストとヒトでアミノ酸配列が 59%相同）や  $\alpha$ -MSH 受容体（ゼブラフィッシュとヒトで 71%相同）では、哺乳類と魚類の間で G タンパク質選択性に差異は見られない（Siehler et al., 1999; Metz et al., 2006）。私の調べた限り、ペプチド受容体において、哺乳類と魚類間で G タンパク質選択性が異なる例は当研究が初である。このことは魚類から哺乳類への進化の過程で、MCH 受容体の G タンパク質選択性に変化が生じたことを表している。即ち、MCHR1 は進化によって Gi/o 共役能を獲得し、一方 MCHR2 は Gi/o 共役能が消失したと考えるのが現在最も論理的であろう。ただしキンギョは魚類の中で特殊化した種であり、我々の純粋な祖先として考えることは懸念もある。従って、肺魚やシーラカンスのような我々の祖先と考えられている魚種においても MCH 受容体の G タンパク質選択性を調べることで新たな知見が得られる可能性がある。

これまで両生類 *Xenopus tropicalis* のゲノムにおいて、4 種の MCH 受容体の存在が推定されていた（Ji et al., 2009）。両生類は魚類と哺乳類の進化の過程に位置することから、*X. tropicalis* の MCH 受容体の情報伝達系を解析し、G タンパク質選択性を明らかにすることで、MCH 受容体サブタイプの機能や起源を知る手がかりを得られる可能性がある。そこで、我々の研究室では *X. tropicalis* から X-MCHR1a, 1b, 2a, 2b の 4 種の MCH 受容体をクローニングし、CHO dhfr(-) 細胞に一過性発現させて機能解析を行った（Kobayashi et al., 2014）。その結果、X-MCHR1a は Gi/o 及び Gq と共役し、X-MCHR1b と 2a は Gq と共役することが判明した。興味深いことに、X-MCHR2b は細胞内カルシウム濃度測定、GTP $\gamma$ S 結合能測定、cAMP 量測定いずれにおいても活性を示さなかったが、免疫化学染色法によると MCH 添加により受容体インターナリゼーションが観察された。このような特徴を持つ MCH 受容体は初めてであり、X-MCHR2b は *X. tropicalis* 特有の性質を有した機能的受容体である可能性が示唆された。また、系統樹と G タンパク質共役能から、X-MCHR1a 及び 2a は哺乳類型に、X-MCHR1b（とおそらく 2b）は魚類型に近いことが予測された。従って、魚類から両生類への進化の過程で MCHR1 と MCHR2 でそれぞれサブタイプが生じ、両生類から哺乳類への進化の過程で MCHR1b と R2b が消失したと推測される。*X. tropicalis* の研究成果は、MCH 受容体の G タンパク質選択性が進化の過程で変化したことを強く支持する。

次に、Compound.15 と Compound.30 をリガンドに用いて、MCH 受容体の情報伝達系を解析した結果を述べる。哺乳類 MCHR1 に対する選択的アゴニスト Compound.15 は gfMCHR1 において、内在性リガンド MCH と同程度のアゴニスト効果を示した。本薬剤は gfMCHR2 では細胞内カルシウム濃度変化、ERK1/2 リン酸化を引き起こさなかったが、予想に反し cAMP 量測定においては弱いアゴニスト効果が観察された。従って、Compound.15 は gfMCHR1 に選択的ではなく、gfMCHR2 においては、Gq よりも Gi/o に選択的なバイアスアゴニストであることが分かった。一方、哺乳類 MCHR1 の選択的アンタゴニストである Compound.30 は意外なことに、gfMCHR1 においてアゴニスト効果を示した。しかし、細胞内カルシウム濃度測定では Compound.15 よりも EC50 値が 16 倍高く、cAMP 量測定では影響を与えなかったことから親和性は低いと考えられる。これまでに、キンギョの行動実験において、体重 1 g 当たり 200 pmol の Compound.30 と 10 pmol の gfMCH を同時にキンギョの脳室内に投与しても、摂食行動に影響を与えないことが報告されている（Matsuda et al., 2009）。このことは、Compound.30 の作用

が哺乳類と魚類の MCH 受容体で異なるという本研究成果で説明が出来る。Compound.15 及び Compound.30 以外にも、哺乳類と魚類の受容体間で効果が異なり、アンタゴニストとして使用しているはずが実はアゴニスト効果を有する小分子の存在が予想される。従って、哺乳類で作用が確認されたアゴニスト・アンタゴニストを魚類へ適用して生理実験を行う前に、誤った解釈を引き出さないためには培養細胞発現系で受容体に対する薬理効果を確認する必要がある。

MCH は視床下部ホルモンであり、魚類において、多くの下垂体ホルモンの制御に関与する。例えば、ティラピアの下垂体培養細胞では  $\alpha$ -MSH 放出に影響し、キンギョ下垂体細胞ではゴナドトロピン分泌やソマトラクチン放出などが報告されている (Cánepa et al., 2008; Tanaka et al., 2009)。加えて、MCH は魚類において、多様なシグナル系を介して体色調節、ストレス応答、摂食制御等の様々な生理機能を調節する (Francis et al., 1997; Takahashi et al., 2004; Matsuda et al., 2009)。今後、Compound.15 や Compound.30 をツールとしてキンギョの行動実験を行うことで、gfMCHR1 や gfMCHR2 がそれぞれ担う生理的機能が解明され、*in vivo* における MCH 系の理解が進むと考えられる。他にも哺乳類 MCHR1 の選択的アンタゴニストである ATC0065 及び GW803430、SNAP94847 も利用可能であるため、これら化合物の gfMCH 受容体における効果を検討し、行動実験等に利用可能か検討することも役立つと思われる。以上、Compound.15 と Compound.30 のアミノ酸配列、物理化学的性質及び立体構造の解析は、MCH 受容体のリガンド選択性の解明や、ヒト MCH 受容体に対する、より効果的な新規薬物を開発するための手がかりになることも期待される。

近年、これまで知られていた 4 種の G タンパク質  $\alpha$  サブユニット (Gq、Gs、Gi/o、G<sub>12</sub>) に加えて、新たに 5 種類目の Gv が発見された (Oka et al., 2009)。Gv は哺乳類では欠損しているが、硬骨魚類では *in vivo* で広く発現している。G $\alpha$  が共通して有する  $\alpha$ 1 ヘリックス、Ras 様ヌクレオチド結合ドメインである  $\beta$ 2 シート、GTP 結合により構造変化が生じる 3 箇所のスイッチ領域を Gv が有することはその配列から予測されたが、現時点で Gv の担う細胞内情報伝達系は不明である。ゼブラフィッシュにおいて、RT-PCR によると Gv は鰓、腎臓、嗅上皮、胃に高発現している。しかし至る所に存在してはいなかったことから、ハウスキーピングの過程に関与しないと推測される。また、水生動物の腎臓で発現していることと、幼生期で発現パターンが異なることから、浸透圧調節や細胞分化に関与する可能性が考えられる。ニジマスにおいて、MCH 系は浸透圧調節にも関与すると報告された (Francis et al., 1997)。以上より、gfMCHR1 及び gfMCHR2 の Gv に対する親和性と下流の情報伝達系を調べる必要がある。さらに、キンギョにおいてもマツカワ等と同じく MCH2 (下記、1-B 参照) の存在が予想されることから、gfMCH 受容体における MCH2 発現機能の解析が望まれる。

### 1-B : 魚類において新規に報告された MCH サブタイプ (MCH2) の機能解析

カレイ目マツカワの MCH2 を用いて、bfMCH 受容体の細胞内情報伝達系を解析した。細胞内カルシウム濃度測定の結果、bfMCH2 は bfMCHR1 と bfMCHR2 に対して濃度依存的な細胞内カルシウム動員を引き起こした。また従来の魚類 MCH (MCH1) と比較しても、両者間に情報伝達系の違いはなかった。従って、bfMCH2 は従来の bfMCH1 と同程度に機能的な、bfMCH 受容体に対する内在性アゴニストであることが判明した。

最初に報告されたゼブラフィッシュの MCH2 が、哺乳類の MCH にアミノ酸数及び配列が類似していることから、MCH2 は哺乳類 MCH の主な生理作用である摂食制御に関与し、MCH1 は体色調節に重要であるという説がこれまで提唱されていた (Berman et al., 2009)。しかし、本研究では MCH1 と MCH2 が MCHR1、MCHR2 に及ぼすアゴニスト作用に差異はなかった。また、マツカワの皮膚の培養実験において、MCH2 は濃度依存的に黒色素胞及び黄色素胞の凝集を引き起こし、白背景で飼育することで MCH2 mRNA の転写レベルが 3 倍上昇した (Mizusawa et al., 2014)。即ち、マツカワにおいて、MCH2 は MCH1 と同様に体色調節に関与することが薬理学実験及び生理学実験の双方において示された。黒色素胞の凝集には Gi/o が、拡散には Gs が関与することが知られている。加えて、RT-PCR レベルでは、魚類の皮膚には MCHR2 のみしか検出されないことを考慮すると MCHR2 が体色調節を主に担うと考えられる (Takahashi et al., 2007; Mizusawa et al., 2009; Mizusawa et al., 2011)。従って、bfMCHR2 発現細胞を用いて、まずは Gi/o 選択的な細胞内シグナル解析である cAMP 量測定を行い、MCH1 と MCH2 の作用の違いを比較する必要もある。マツカワにおける MCH2 の摂食行動に及ぼす影響を始めとして、MCH2 に関する研究は未だ発展段階であり、生体内での役割に関しては議論の余地がある。また、魚類以外の生物においても第 2 の MCH が存在する可能性を考慮し、MCH-MCHR 系の理解のために、さらなる検討が必要であろう。

結論として、我々は 3 種類の独立した実験手法により gfMCH 受容体の機能解析を精査した結果、キンギョと哺乳類で G タンパク質を介した細胞内情報伝達系が全く異なることを明らかにした。硬骨魚類は解剖学、神経ネットワークの機能、脊椎動物の進化を理解するために適したシンプルなモデル動物である。現時点において、MCH 受容体は線虫やハエを含む無脊椎動物では存在が確認されていないため (Fredriksson et al., 2005)、これら良く知られたモデル動物において MCH システムは解析が出来ない。そのため MCH ニューロンがどのように色素凝集や摂食といった生理機能を誘発するかを解析するために、キンギョは比較的原始的で適した種であると考えられる。従って、キンギョにおいて見出した特徴的な 2 種類の MCH 受容体は、ニューロンや様々な組織における MCH 受容体活性の機能解明に寄与することが期待される。

## 第Ⅱ章 哺乳類 MCHR1 における G タンパク質選択機構の解明

---

**Identification of amino acids that are selectively involved in Gi/o activation  
by the rat melanin-concentrating hormone receptor 1.**

Hamamoto A., Kobayashi Y., Saito Y.  
Cellular Signaling, 2015. in press (doi: 10.1016/j.cellsig.2015.01.008.)

---

## II-1: 序論

これまで、1つのGPCRが複数の生理機能に関与することが報告されたが、その制御に関しては不明点が多い。この現象には様々な細胞内因子の関与が推測されるが、GPCR自身が持つGタンパク質選択性も下流のシグナルの起点となることから、非常に重要であると考えられる。多くのGPCRは、複数の異なるGタンパク質サブファミリーを介して活性化される。例を挙げると、プロスタグランジンE2受容体EP3DはGs、Goと共役する(Negishi et al., 1993)。血小板活性化因子受容体はGiとGqを活性化し(Shi et al., 1996; Ishii et al., 2000)、スフィンゴシン-1リン酸受容体S1P1及びS1P2はGi、G<sub>12/13</sub>と共役する(Sugimoto et al., 2003)。従って、同じGPCRにおいても、共役したGタンパク質の種類によって引き起こされる下流の情報伝達系が全く異なることから、この違いが多様な生理機能を制御する可能性がある。しかし、Gタンパク質選択性を決定する受容体側のアミノ酸残基の特定は予測も非常に難しく、予測ソフトの精度も低いのが現状である。特に複数のGタンパク質が共役するGPCRにおいて、Gタンパク質選択性に関与するアミノ酸残基の特定が行われた研究は数例しか存在しない。例えば、ロイコトリエンB4受容体1型はGi/o、Gqと共役するが、細胞内第3ループ領域に存在するN末側膜近位のアミノ酸がGi/o共役に選択的な部位であることが報告された(Kuniyeda et al., 2006)。また、サイロトロピン受容体はGq、Gsと共役するが、細胞内第1ループ領域と細胞内C末端領域に存在するアミノ酸がGq選択的な活性に重要である(Kleinau et al., 2010)。

ラットMCHR1において、第3膜貫通領域のC末から細胞内第2ループ領域の境界に存在するDRYモチーフ(140-142番目)は、多くのクラスA GPCR間で高度に保存されている。特にAsp140とTyr142は受容体のコンフォメーション形成やGタンパク質との共役に必要不可欠であり、D140A及びY142Aは細胞内シグナル伝達が生じない機能欠損型置換体であった(Aizaki et al., 2009)。他にもラットMCHR1の細胞内第2ループ領域の中央部に位置するArg155が受容体の活性化に(Saito et al., 2005)、ヒトMCHR1の細胞内第3ループ領域C末側にあるThr255が細胞膜移行に著しく重要な役割を果たすと報告されている(Fan et al., 2005)。さらには、ラットMCHR1の細胞内C末端領域において、N末端側に位置するArg319とLys320がGi/oとGq両方の共役に(Tetsuka et al., 2004)、C末端側がプロテインキナーゼC及びβアレスチン2を介した受容体インターナリゼーションに関与する領域であることが明らかにされた(Saito et al., 2004)。以上のように、哺乳類MCHR1における構造活性相関の研究が進展してきたが、未だ解決されていない基礎的な課題がGタンパク質選択機構に重要なアミノ酸領域の同定である。即ち、哺乳類MCHR1はGi/o及びGqの2種類のGタンパク質と共役し得るが、受容体のどのドメインが両者を選択的に認識しているか全く不明である。

哺乳類MCHR1は様々な脳領域に局在し、その生理作用は摂食調節、エネルギー代謝、情動、薬物嗜癖性、睡眠など多岐に渡る。また、MCHR1はMCH刺激により、細胞内カルシウム濃度の上昇、ERK1/2のリン酸化、cAMP産生の抑制など、多様な細胞内情報伝達を行うことが報告されている(Chambers et al., 1999; Saito et al., 1999; Hawes et al., 2000)。しかしながら、哺乳類MCHR1と共役するGi/o又はGqがそれぞれ担う下流の情報伝達系の詳細や、生理作用と

の相関関係は未だ解明されていない。これを明らかにするためには Gi/o 又は Gq のどちらかに選択的に共役する変異体の作製が望まれる。そのような変異体が利用出来れば、Gi/o 又は Gq に選択的に作用するバイアスリガンドの開発や、片方の G タンパク質との共役に選択的な MCHR1 変異体ノックインマウスの作製が可能となり、今まではアプローチが困難であった、哺乳類 MCHR1 に共役する Gi/o と Gq がそれぞれ担うシグナル伝達の詳細や生理機能の解明に繋がることを期待される。そこで、本研究においてまずは哺乳類 MCHR1 の Gi/o 活性に選択的に重要なアミノ酸領域の特定を目的として研究を行った。

本研究の糸口として着目したのが、自身の先行研究である。私は本論文の第 I 章「魚類 MCH 受容体の情報伝達系解析」において、MCH 受容体の G タンパク質選択性が哺乳類と魚類で異なることを見出した (Hamamoto et al., 2011)。哺乳類 MCHR1 は Gi/o と Gq (Chambers et al., 1999; Saito et al., 1999; Hawes et al., 2000)、キンギョ MCHR1 では主に Gq が共役する (Mizusawa et al., 2009; Hamamoto et al., 2011)。この G タンパク質選択性の違いから、ラット MCHR1 のアミノ酸配列をキンギョの配列に順次置換することで、Gi/o 共役能が減弱あるいは消失すると予想した。ラット MCHR1 とキンギョ MCHR1 のアミノ酸配列は、50%相同である (Mizusawa et al., 2009)。従来のランダムにアミノ酸を置換する手法等と比較して、本アプローチ法は Gi/o 選択的共役領域の候補がかなり絞られるため、迅速かつ正確な Gi/o 活性評価が可能になる。また、いくつかの例外を除いて、細胞内第 2、第 3 ループ領域及び細胞内 C 末端領域の特に膜近位のアミノ酸が G タンパク質の共役に関与することが多く報告されている (Hermans et al., 2003; Katritch et al., 2012; Moreira et al., 2014)。従って、ラットとキンギョの MCHR1 のアミノ酸配列を比較し、細胞内第 1、第 2 及び第 3 ループ領域それぞれにおいて、物理化学的性質が特に異なるアミノ酸をキンギョ型へと置換したラット MCHR1 を作製した。これら置換体を HEK293T 細胞に一過性発現させた後、Gi/o を特異的に不活性化させる PTX を用いた細胞内カルシウム濃度測定と、Gi/o 選択的な GTP $\gamma$ S 結合能測定及び cAMP 量測定を行うことで Gi/o 活性を評価した。さらに、G タンパク質を含めた細胞内の活性を統合的に測定可能な Dynamic mass redistribution (DMR) アッセイを行い、置換体の G タンパク質選択性を評価した。



## II-2: 実験材料及び方法

### II-2-1: MCHR1 変異体の作製

哺乳類細胞用発現ベクターである pcDNA 3.1(+) に、ラット MCHR1 の N 末端に Flag タグを付加した Flag-MCHR1 (FMCHR1) を挿入した発現プラスミドを変異体作製の鋳型として用いた。また、MCHR1 の N 末端に Flag タグを付加しても受容体機能が変化しないことは、先行研究において確認済みである (Saito et al., 2003)。

### プライマーデザインと PCR 反応

#### ・プライマーの配列

MCH 受容体の変異体作製のために用いたプライマーの配列を下表に示した。

プライマー名	Sequence
C74Q	5'-CTACACTGGCAGAGCAACGTCC-3'
C74Q-RV	5'-GGACGTTGCTCTGCCAGTGTAG-3'
W73A/C74Q	5'-AAGCTACACGCGCAGAGCAAC-3'
W73A/C74Q-RV	5'-GTTGCTCTGCGCGTGTAGCTT-3'
W73A/C74Q/S75Q	5'-ACACGCGCAGCAAAACGTCCCC-3'
W73A/C74Q/S75Q-RV	5'-GGGGACGTTTTGCTGCGCGTGT-3'
L71F/H72R/W73A/C74Q/S75Q	5'-GAAGTCCAAGTTCCGCGCGCAGCAA-3'
L71F/H72R/W73A/C74Q/S75Q-RV	5'-TTGCTGCGCGCGGAACTTGGACTTC-3'
L71F/H72R/W73A/C74Q/S75Q/N76T	5'-CGCAGCAAACCGTCCCCGA-3'
L71F/H72R/W73A/C74Q/S75Q/N76T-RV	5'-TCGGGGACGTTTTGCTGCG-3'
i1_7sub	5'-GGTGAAGAAGAACAAGTTCCGC-3'
i1_7sub-RV	5'-GCGGAACTTGTTCTTCTTACC-3'
S150R/S151F	5'-CACCCATCCGCTTACCAAGTTC-3'
S150R/S151F-RV	5'-GAACTTGGTGAAGCGGATGGGGTG-3'
S150R/S151F/T152N/K153H	5'-ATCCGCTTCAACCACTTCCGGAAG-3'
S150R/S151F/T152N/K153H-RV	5'-CTCCGGAAGTGGTTGAAGCGGAT-3'
S150R/K153H/K156T/S158C	5'-CCATCCGCTCCACCACTTCCG-3'
S150R/K153H/K156T/S158C-RV	5'-CGGAAGTGGGTGGAGCGGATGG-3'
K156T	5'-AAGTTCCGGACGCCCTCCATG-3'
K156T-RV	5'-CATGGAGGGCGTCCGGAACTT-3'
S158C	5'-GGAAGCCCTGTATGGCCAC-3'
S158C-RV	5'-GTGGCCATACAGGGCTTCC-3'

K156T/S158C	5'-AGTTCCGGACGCCCTGCATGGCCAC-3'
K156T/S158C-RV	5'-GTGGCCATGCAGGGCGTCCGGAAC-3'
i2_7sub	5'-TTCAACCACATCCGGACGCC-3'
i2_7sub-RV	5'-GGCGTCCGGATGTGGTTGAA-3'
Y228F/V229F	5'-ACCGCCGCATTCCTTTAAAATACTAC-3'
Y228F/V229F-RV	5'-GTAGTATTTTAAAGAATGCGGCGGT-3'
R234N	5'-ATACTACAGAACATGACGTC-3'
R234N-RV	5'-GACGTCATGTTCTGTAGTAT-3'
S243P	5'-GCCCCAGCCCCTCAACGCAGCAT-3'
S243P-RV	5'-ATGCTGCGTTGAGGGGCTGGGGC-3'
A242L/S243P	5'-GGTGGCCCCACTCCCTCAACGCA-3'
A242L/S243P-RV	5'-TGCGTTGAGGGAGTGGGGCCACC-3'
L242A/S243P	5'-GTGGCCCCAGCTCCTCAACGCA-3'
L242A/S243P-RV	5'-TGCGTTGAGGAGCTGGGGCCAC-3'
T257M	5'-GACCCGCATGGCCATTGC-3'
T257M-RV	5'-GCAATGGCCATGCGGGTC-3'
C315S	5'-CATAGTGCTCTCTGAGACCTTTC-3'
C315S-RV	5'-GAAAGGTCTCAGAGAGCACTATG-3'

プライマーは簡易カラム精製したものを、北海道システム・サイエンス株式会社から購入した。

・ PCR 反応

Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit (アジレント・テクノロジー) を用いて、以下の組成及びサイクルで PCR 反応を行った。

組成

10×buffer	5 µl
80-100 ng/µl Template DNA	1 µl
Primer FV (20 pmol/µl)	1 µl
Primer RV (20 pmol/µl)	1 µl
dNTP (2 mM eaoh)	5 µl
Pfu Ultra High-Fidelity DNA polymerase (2.5 U)	1 µl
MQ 水	36 µl
Total	50 µl

cycle

95°C	1 min
95°C	30 sec
55°C	1 min
68°C	10 min
4°C	2 min
4°C	∞

} 16-18 cycle

PCR 産物は 500 µl チューブ内で、制限酵素 Dpn I (10 U/µl) を 1 µl 加えた後、37°C で 90 分間インキュベートを行い、鋳型を除去した。

## PCR 産物のトランスフォーメーション

*E.coli* (DH5 $\alpha$  Competent Cells、タカラバイオ株式会社) 20  $\mu$ l に PCR 産物を 1  $\mu$ l 加え、氷上に 30 分間静置した。次に、42°C のウォーターバスで 40 秒間 heat shock を与え、直ちに氷上に戻し 3 分間静置した。その後、SOC medium を 180  $\mu$ l 添加し、37°C、140 rpm で 1 時間振とう培養した。37°C でプレインキュベートした LB/carbenicillin (carb) plate (carb 終濃度 50  $\mu$ g/ml) に、上述の *E.coli* をストリークし、37°C で 15-16 時間培養を行った。翌日、LB medium/carb 2 ml に爪楊枝でピックアップしたシングルコロニーを植菌し、37°C、140 rpm で約 16 時間振とう培養を行った。

## Mini prep による精製 DNA を用いたシーケンス確認

### ・ Mini prep

Wizard Plus SV Minipreps (Promega) を用い、上述の *E.coli* 溶液からプラスミド DNA を精製した。*E.coli* 溶液を 1.5 ml チューブに移し、13,000 rpm で 1 分間遠心を行った後、上清を捨て、ペーパー上で逆さまにして水気を切った。Cell Resuspension Solution 250  $\mu$ l を加え、ボルテックスによりペレットを完全に溶かした後、Cell Lysis Solution 250  $\mu$ l を添加して 4 回静かに転倒混和した。次に Alkaline Protease Solution 10  $\mu$ l を加え、4 回混和し、室温で 5 分間静置した。さらに、Neutralization Solution (中和液) 350  $\mu$ l を加え、4 回静かに混和後、15,000 rpm で 10 分間遠心を行った。遠心後の上清をカラムに注ぎ、15,000 rpm で 2 分間遠心した。下層の液を捨て、Column Wash Solution 750  $\mu$ l を添加して、15,000 rpm で 2 分間遠心した。再度下層の液を捨て、Column Wash Solution 250  $\mu$ l を加えて 15,000 rpm で 2 分間遠心分離した後、カラムを新しいチューブに移しさらに 2 分間遠心した。再びカラムを新しいチューブに入れ替えた後、Nuclease Free Water 100  $\mu$ l をカラムの中央に滴下し、約 1 分間室温に静置した。その後、15,000 rpm で 2 分間遠心してプラスミド DNA を溶出した。得られたプラスミド DNA を制限酵素 *EcoR* I / *Xho* I により下記の組成で 37°C、30 分以上消化し、6 $\times$ dye を 2  $\mu$ l 加えてアガロースゲルで電気泳動した。UV 下 (365 nm) でインサートサイズ (1170 bp) を確認した後、OD 測定 (260、280 nm) により DNA 濃度及び精製度 (260/280 比) を算出した。

### 制限酵素で消化する際の組成

10 $\times$ H	1 $\mu$ l
<i>EcoR</i> I	0.5 $\mu$ l
<i>Xho</i> I	0.5 $\mu$ l
MQ 水	1 $\mu$ l
DNA	7 $\mu$ l
total	10 $\mu$ l

アガロース電気泳動の結果、インサート (FMCHR1) のサイズが理論値と一致し、かつ DNA 濃度の高いサンプルを鋳型として、ジデオキシ法によるサイクルシーケンス反応を行い、インサート配列を確認した。

・ サイクルシーケンス反応

以下の組成、サイクル条件で反応を行った。

組成

Big Dye Terminator mix	1 $\mu$ l
$\times 5$ Dilution Buffer	3.5 $\mu$ l
Template DNA (360 ng)	X (=360 $\mu$ g) $\mu$ l
Primer (3.2 pmol)	1 $\mu$ l
MQ 水	14.5-X $\mu$ l
Total	20 $\mu$ l

cycle

95°C	1 min	} 25 cycle
95°C	30 sec	
55°C	1 min	
68°C	10 min	
4°C	2 min	
4°C	$\infty$	
4°C	$\infty$	

反応産物を 1.5 ml チューブにすべて移し、125 mM EDTA 5  $\mu$ l と 100% EtOH 60  $\mu$ l を加えてボルテックスを行い、室温で 15 分間静置した。15,000 rpm、4°C で 30 分間遠心を行った後、上清を除いて沈殿物に 70% EtOH を 500  $\mu$ l 添加した。さらに、15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心を行って上清を除去し乾燥させた。沈殿物に HiDi ホルムアルデヒド 10  $\mu$ l を加え、ピペッティングを 10 回行うことで DNA を溶解した後、95°C で 2 分間加熱した。その後、すぐに氷上に戻し、シーケンス解析用チューブに全量移した。このサンプルを ABI PRISM310 Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムジャパン) を用いて塩基配列の決定を行い、結果を Genetyx 5 (株式会社ゼネティックス) で解析した。

Midi prep による大容量のプラスミド精製

・ コロニーの pick up

シーケンス解析により、配列を確認した *E.coli* のコロニーを 2 つ選び、Midi prep に用いた。まず、LB/carb (終濃度 50  $\mu$ l/ml) 2 ml でコロニーの前培養 (37°C、3 時間) を行い、次にその全量を LB/carb 20 ml へ加え、さらに 37°C で 18 時間振とう培養を行った。

・ Midi prep

QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を使用して *E.coli* から DNA を精製した。培養した *E.coli* を 50 ml チューブに集菌後、5,000 rpm で 10 分間遠心を行った。上清を捨てた後、P1 buffer 4 ml を加えボルテックスし、ペレットを完全に溶かした。次に P2 buffer 4 ml を添加して静かに 6 回混和した後、室温で 5 分間静置した。さらに P3 buffer 4 ml を加え 6 回転倒混和し、氷上に 15 分間静置後、8,000 rpm で 30 分間遠心を行った。カラムを QBT 4 ml で平衡化し、遠心後の上清を沈殿物が入らないようにカラムに注ぎ入れた。全て溶出した後、カラムに wash buffer QC 10 ml を加え、これを 2 回繰り返した。溶出後、カラムの下に新しい 15 ml チューブを置き、カラムに QF buffer 5 ml を添加して DNA を溶出した。溶出した DNA 溶液に、100% isopropanol 3.5 ml を加えてよく混和し、9,000 rpm で 30 分間遠心分離後、上清を除去した。次に 70% EtOH 2 ml を加え、8,500 rpm で 15 分間遠心を行った。上清を除去し、キムワイプ上で逆さにして乾燥させた後、クリーンベンチ内で滅菌した TE (pH 8.0) 100-120  $\mu$ l を加え、DNA を溶解した。

その後、OD 測定を行い、DNA 濃度及び精製度 (260/280 比) を算出した。また、制限酵素 *EcoR* I / *Xho* I で消化後、電気泳動を行いインサートサイズの確認を行った。

#### サブクローニング

##### ・制限酵素消化及び電気泳動

乗せかえる insert (Y228F/V229F/R234N/A242L/S243P/T257M: i3\_6sub) と vector (pc3.1(+)*zeo*) を以下の組成によりそれぞれ 37°C で一晩、酵素消化した。vector にはさらにアルカリフォスファターゼ (phosphatase, alkaline (AP)、Roche) を 1 µl 添加し、脱リン酸化を行うことで、セルフライゲーションを防いだ。

制限酵素消化の組成

DNA (10 µg)	X µl
10×H buffer	10 µl
<i>EcoR</i> I	2.5 µl
<i>Xho</i> I	2.5 µl
MQ 水	85-X µl
Total	100 µl

酵素消化したサンプルに 3 M NaOAc 10 µl と 100% EtOH 300 µl を加え、ボルテックス後、室温で 15 分間静置した。そして 15,000 rpm で 25 分間、遠心分離を行い、上清を除去した。そこに 70% EtOH を 700 µl 添加し、15,000 rpm で 15 分間遠心を行った。その後、上清を除きペレットを風乾させた。TE (pH 8.0) を 20 µl 加え、ピペッティングを 10-15 回行って DNA を溶解させた後、6×dye を 4 µl 入れて 10 µl ずつ 1% アガロースゲルで電気泳動した。

##### ・DNA の精製

電気泳動による DNA の分離後、UV 下 (365 nm) で目的のバンドを切り出し、DNA 精製を行うために QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を使用して DNA 精製を行った。

切り出したゲルの重さを測定し、ゲル 100 mg につき 300 µl の QG バッファーを加えた。50°C に温めたウォーターバスで 10 分間、転倒混和しながらインキュベートしてゲルを溶解した。その後、ゲル 100 mg につき 100 µl のイソプロパノールを入れてボルテックスし、カラムにアプライした。13,000 rpm で 1 分間遠心して下層の液を取り除いた後、QG バッファーを 0.5 ml 加えて 15,000 rpm で 1 分間遠心を行った。下層の液を除去し、PE バッファー 0.8 ml を添加して 15,000 rpm で 1 分間遠心した。再度下層の液を取り除いて再度 15,000 rpm で遠心した。その後、カラムを新しい 1.5 ml チューブにセットし、EB バッファーを 55 µl 加えて 1 分間静置した。そして 15,000 rpm で 1 分間遠心を行って DNA を溶出した。

##### ・ライゲーション反応

vector 量と insert 量の比が 1 : 4 になるように DNA を調整し、Ligation High (東洋紡) を 5 µl、

MQ 水を加えて全量を 10  $\mu$ l とした。反応は 16°C、30 分から一晩静置により行った。

反応物 1  $\mu$ l を *E.coli* 20  $\mu$ l に既述の方法でトランスフォーメーションし、Mini prep で回収した DNA を酵素消化して、insert の挿入を確認した。insert の組み込まれたコロニーを用いて Midi prep 後、OD 測定による濃度確認を行ってトランスフェクションに用いた。

## II-2-2 : 細胞培養及びトランスフェクション

### 細胞培養

方法は第 I 章 2-1 と同様に行った。細胞は HEK293T 細胞に加え、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO-K1 細胞、アフリカミドリザル腎臓由来細胞 COS-7 細胞、ヒト子宮頸癌由来細胞 HeLa\_S3 細胞を使用した。CHO-K1 細胞の培養においては、培養 medium に Ham's F-12 Nutrient Mix, GlutaMAX (GIBCO) に SM/PG と 10% FBS を加えたものを用いた。

### 一過性トランスフェクション

トランスフェクションを行う 18-20 時間前に、HEK293T 細胞を 6 well plate (Beckton Dickinson) に 80%密度で均一にまき、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。

Lipofectamine PLUS トランスフェクション試薬 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションを行った。まず、1.5 ml チューブに OPTI-MEM 100  $\mu$ l を入れ、1  $\mu$ g となるように DNA を加えてボルテックスした。さらに PLUS reagent 6  $\mu$ l を添加した後、ボルテックスを行い、15 分間室温に置いた。次に 15 ml チューブに OPTI-MEM 100  $\mu$ l を入れ、Lipofectamine 4  $\mu$ l を加えてボルテックスし、遠心機を用いて 1,000 rpm で Flash した。室温で 15 分間静置した溶液 (1.5 ml チューブ) を OPTI-MEM で希釈した Lipofectamine (15 ml チューブ) に少量ずつ泡立てるように加え、15 分間室温で静置した。最後に OPTI-MEM を 800  $\mu$ l 入れてボルテックスし、OPTI-MEM 2 ml で洗った細胞に壁から静かに滴下した。細胞を 37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 3-4 時間インキュベートした後、培地を培養 medium に交換した。

## II-2-3 : ウェスタンブロット解析

### サンプル作製

トランスフェクションを行った翌日に、細胞を 3 cm シャーレに 80%密度で播種し、さらに 24 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養を行った。この HEK293T 細胞に 2xSDS sample buffer [50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、10% SDS、50 mM  $\beta$ メルカプトエタノール、10%グリセロール] を 100-140  $\mu$ l 加えた後、先端をカットしたチップでかき取り、1.5 ml チューブに移した。これを氷上でソニケーター (型番 : W-225、HEAT SYSTEM-ULTRASONIC) を用いて超音波 (DUTY CYCLE : 50、OUTPUT CONTROL : 5、PULSED) により破碎した。

### ウェスタンブロット解析

方法は第 I 章 2-3 と同様に行った。ただし、電気泳動には 12.5% SDS-PAGE ゲルを使用した。

ブロッキングには 5% skim milk/TBS を用いた。一次抗体は wako anti DYKDDDDK (Flag) tag monoclonal 抗体 (和光純薬工業株式会社) を 3% skim milk/TTBS で 1 : 1000 に、二次抗体は

anti-mouse IgG-HRP (GE healthcare) を 3% skim milk/TTBS で 1 : 2000 になるように希釈した。得られた結果は ImageJ を用いて各バンドの濃度を定量的に解析した。

#### II-2-4 : 細胞免疫化学染色

トランスフェクションを行った HEK293T 細胞をラボテック 8 well プレパラート (Nunc) 上に播種し、翌日、3% パラホルムアルデヒド/NaP-NaCl を加え、室温で 10 分間固定した。NaP-NaCl で 2 回洗浄後、0.05% Triton X-100/NaP-NaCl を用いて膜透過処理を 15 分間室温で行った。さらに NaP-NaCl で洗浄後、ブロッキングとして 20% goat serum/NaP-NaCl で 30 分間処理した。一次抗体として 0.5  $\mu\text{g/ml}$  anti DYKDDDDK 抗体 in 5% goat serum/NaP-NaCl tween を用いて、4°C で一晩反応させた。翌日に洗浄後、二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG 抗体 in 5% goat serum/NaP-NaCl tween を室温で 50 分間反応させた。その後、再度 NaP-NaCl tween で洗浄し、ベクターシールド (VECTOR Lab.) を用いて封入した。蛍光イメージは FLUOVIEW FV1000 confocal microscope (Olympus) を用いて観察及び撮影した。共焦点画像は ImageJ を用いて相対強度を定量した。相対強度は細胞当たりのピクセルの密度の比で算出し、統計解析のために *t*-検定を実施した。

#### II-2-5 : フローサイトメトリー解析

トランスフェクションを行った HEK293T 細胞を 24 well plate 上に播種し、翌日、1.5% パラホルムアルデヒド/PBS(-) を加え、室温で 10 分間固定した。PBS(-) で洗浄後、一次抗体として 0.67  $\mu\text{g/ml}$  wako anti DYKDDDDK (Flag) tag monoclonal 抗体 in 20% FBS/PBS(-) を細胞に添加し、室温で一時間抗原抗体反応を行った。その後、PBS(-) で 3 回洗浄し、二次抗体に Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG 抗体 (Life Technologies) in 5% FBS/PBS(-) を加えて一時間反応させた。細胞は洗浄後、5 mM EDTA で回収し、FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometer Systems Inc.) を用いて細胞表面の蛍光強度を測定した。この時、細胞 1 万個当たりの蛍光強度を平均化することで定量化した。

#### II-2-6 : リガンド結合能測定

トランスフェクションを行った HEK293T 細胞を 10 cm シャーレに播種した。翌日、氷上で細胞を一度 PBS(-) で洗い、再び PBS(-) を加えて scraper で細胞をかきとり 15 ml チューブに回収した。回収した細胞懸濁液は 4°C、1000  $\times g$  で 5 分間遠心分離を行った。上清を除去した後、Tris buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、5 mM EDTA、protease inhibitor tablet (cOmplete Mini, EDTA-free, Roche)] を 0.8-1 ml 加え、氷上で glass homogenizer (1 ml 用、WHEATON) を用いてホモジナイズした。そのサンプルを超遠心用チューブに移して 4°C、48,000  $\times g$  で 20 分間超遠心した。上清を除去して Tris buffer を 0.8-1 ml 添加し、plastic homogenizer によりホモジナイズ後、再び 48,000  $\times g$  で 20 分間超遠心を行った。上清を除いて適量の Tris buffer を入れて glass homogenizer でホモジナイズし、23 G 針 (テルモ) と 1 ml syringe を用いて沈殿を破碎して測定用サンプルとした。サンプルのタンパク質濃度はビスコニン酸アッセイキット (ナカライテスク) を用いて算出した。サンプルは液体窒素で急速凍結し、-80°C で保存した。

1.5 ml チューブにそれぞれ 20 µg 相当のサンプルを加え、 $[^{125}\text{I}]$  (Phe<sup>13</sup>, Tyr<sup>19</sup>) MCH (PerkinElmer) を各濃度添加した。半数のサンプルにはさらに終濃度 1 µM MCH (非放射性) を入れ、総量が 300 µl になるように assay buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 µM phosphoramidon, 0.5 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 0.2% BSA] を加えてボルテックスを行った。室温で 2 時間静置後、GF/C フィルター (ワットマン) をサンプリングマニホールド (型番: 1225, ミリポア) にセットして各 well に 0.2% polyethylenimine を 1 ml 入れて吸引した。その後、サンプルを添加し、PBS(-) 3 ml で 3 回洗った。フィルターは室温で乾燥して 15 ml チューブに移し、放射能をオートウェルガンマシステム ARC-380CL で 1 分間放射能を測定した。

#### II-2-7: 細胞内カルシウム濃度測定

方法は第 I 章 2-2 と同様に行った。

#### II-2-8: GTP $\gamma$ S 結合能測定

##### 膜標本の作製

トランスフェクションを行った HEK293T 細胞を 10 cm シャーレに播種した。翌日、氷上で細胞を一度 PBS(-) で洗い、再び PBS(-) を加えて scraper で細胞をかきとり 15 ml チューブに回収した。回収した細胞溶解液は 4°C、3,000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。上清を除去した後、10 cm シャーレに残った細胞と PBS(-) を添加し、再度 3,000 rpm で 10 分間遠心した。上清を除いた沈殿物に Membrane isolation buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, protease inhibitor tablet] を 0.8-1 ml 加え、氷上で glass homogenizer (1 ml 用) を用いてホモジナイズした。そのサンプルを超遠心用チューブに移して 4°C、35,000 rpm で 30 分間超遠心した。上清を除去して Membrane isolation buffer を 0.8-1 ml 添加し、plastic homogenizer によりホモジナイズ後、再び 35,000 rpm で 30 分間超遠心を行った。上清を除いて適量の Membrane isolation buffer を入れて glass homogenizer でホモジナイズし、23 G 針と 1 ml シリンジを用いて沈殿を破碎して膜標本とした。膜標本のタンパク質濃度はビシコニン酸アッセイキットを用いて算出した。膜標本は液体窒素で急速凍結し、-80°C で保存した。

##### GTP $\gamma$ S 結合能測定

1.5 ml チューブに binding buffer [20 mM Hepes (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 2 mg/ml BSA, 3 µM GDP] で希釈した 10 µg 相当の膜標本を含む 400 µl の溶液と各濃度の MCH 50 µl、0.2 nM [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S (PerkinElmer) を加えてボルテックスを行い、30°C に設定した恒温器で 30 分間静置した。GF/C フィルターをサンプリングマニホールドにセットして各 well に presoak buffer [20 mM Hepes (pH 7.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 2 mg/ml BSA] を 1 ml 入れて吸引した。その後、サンプルを添加し、wash buffer 2-3 ml [20 mM Hepes, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl] で 3 回洗った。フィルターは室温で一晩乾燥させ、翌日、液体シンチレーションカクテル 9 ml (EMULSIFIER SCINTILLATOR PLUS, PerkinElmer) を入れたスーパーポリエチレンバイアル (PerkinElmer) 中で 5-6 時間、溶出させた。各バイアルの放射能を液体シンチレーションシステム LSC-6100 (ALOKA) で 2 分間測定し、GTP $\gamma$ S 結合量の増加率を算出した。



## II-2-9 : cAMP 量測定

方法は第 I 章 2-4 と同様に行った。

## II-2-10 : Dynamic mass redistribution (DMR) 解析

DMR アッセイは、全ての G タンパク質ファミリーを含む一般的な細胞内応答の結果として生じる「細胞の形態及び分子密度の変化」を測定するものである。共役する G タンパク質の種類によって DMR の応答は異なり、一般的に Gi/o 共役すると素早い初期応答を、Gq 共役は遅延性の応答を引き起こすことが知られている (Schröder et al., 2010; Sundström et al., 2013)。

DMR アッセイは EnSpire label-free system (PerkinElmer) を用いて、プロトコルに沿って実施した ([http://www.perkinelmer.com/pdfs/downloads/TCH\\_Comparison\\_of\\_Performance\\_Enspire\\_Multimode\\_Plate\\_Reader\\_and\\_Corning\\_Epic\\_System.pdf](http://www.perkinelmer.com/pdfs/downloads/TCH_Comparison_of_Performance_Enspire_Multimode_Plate_Reader_and_Corning_Epic_System.pdf))。トランスフェクションを行った CHO-K1 細胞を EnSpire-LFC 96 well cellular assay microplates-uncoated (PerkinElmer) に  $2.5 \times 10^4$  cells/well で播種した。翌日、培養 medium を除いて HBSS/20 mM HEPES (pH 7.5) を 50  $\mu$ l 添加し、すぐに除去した。これを 4 回繰り返し、最終的に各 well に HBSS/20 mM HEPES を 80  $\mu$ l 加え、EnSpire label-free system 内で 2 時間、室温で静置することで平衡化した。その後、ベースラインを 5 分間測定し、各濃度の MCH を 20  $\mu$ l 添加した際の DMR 応答を室温で 1 時間モニターした。PTX 添加の細胞は終濃度 200 ng/ml で 16-20 時間インキュベートした。DMR の定量は一分毎の実測値を用いて行った。

## II-3: 結果

### II-3-1: 置換体の受容体発現及びリガンド結合能解析

哺乳類 MCHR1 は Gi/o、Gq と共役し、魚類 MCHR1 は主に Gq と共役する (Chambers et al., 1999; Saito et al., 1999; Hamamoto et al., 2011)。この G タンパク質選択性の相違から、ラット MCHR1 の特定の amino 酸配列をキングョ型に置換すると Gi/o 活性が消失すると予測した。そこで、細胞内ループ領域及び膜貫通ドメインの C 末側付近に着目してラットとキングョの MCHR1 で配列アライメントを行い、特に化学的・物理的に性質の異なる amino 酸を交換した置換体を作製した (図 9)。テンプレートには N 末端に Flag タグが付加されたラット Flag-MCHR1 (FMCHR1) を使い、i1\_7sub (S69N/L71F/H72R/W73A/C74Q/S75Q/N76T) は細胞内第 1 ループ領域に存在する amino 酸 7 残基を同時に置換した。i2\_6sub (S150R/S151F/T152N/K153H/K156T/S158C) は細胞内第 2 ループ領域における amino 酸 6 残基の置換を同時に行った。i3\_6sub (Y228F/V229F/R234N/A242L/S243P/T257M) に関しては、第 5 膜貫通領域の amino 酸 2 残基と細胞内第 3 ループ領域の amino 酸 4 残基の計 6 残基を同時に置換した。

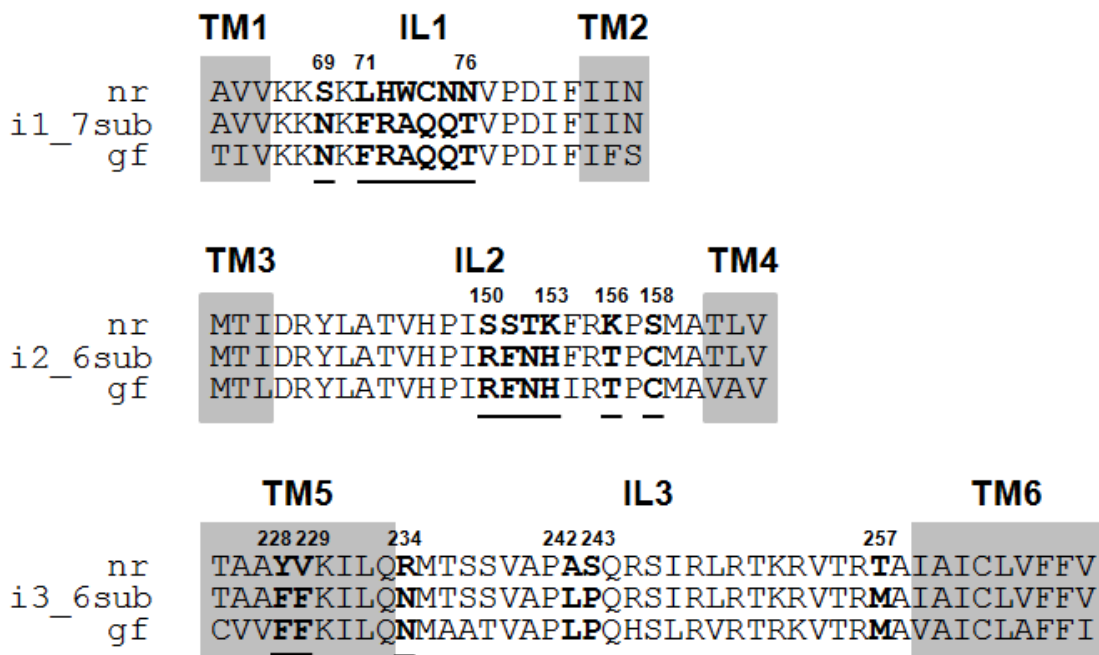


図 9. ラット及びキングョ MCHR1 の amino 酸配列アライメント。細胞内第 1、第 2、第 3 ループ領域近傍に着目して、MCHR1 の amino 酸配列アライメントを行った。i1\_7sub、i2\_6sub、i3\_6sub は下線及び太字の箇所を、ラット (nr) からキングョ (gf) の配列に同時に置換した置換体である。背景が灰色の部分は膜貫通領域を示す。使用した各 MCHR1 の amino 酸配列の accession number はラット (nr) : NP\_113946、キングョ (gf) : BAH70338 である。TM は膜貫通領域、IL は細胞内ループ領域の略。

まず、FMCHR1 及び置換体を HEK293T 細胞に一過性に導入し、受容体発現量と糖鎖付加パターンをウエスタンブロット法により解析した。先行研究通り、FMCHR1 において糖鎖付加の異なる 35、44/45、60 kDa のバンドが検出された (図 10) (Saito et al., 2003, 2005; Tetsuka et al., 2004)。i1\_7sub 及び i2\_6sub の受容体発現レベルは FMCHR1 と同程度であった。しかしながら、i3\_6sub 発現細胞において、60 kDa の受容体発現量が野生型と比べて 72%と著しく低下した (図 10 矢印)。次に、置換体の細胞内局在を解析するため、細胞免疫化学染色法を利用して蛍光顕微鏡観察を行った。膜透過未処理の細胞において、FMCHR1 と i1\_7sub、i2\_6sub は細胞膜上に局在していた (図 11 上部)。ImageJ を用いて蛍光強度を定量したところ、FMCHR1 と比較して i2\_6sub はおよそ 25%細胞膜発現量が上昇し、一方、i3\_6sub は約 35%低下した。Triton X-100 により膜透過処理を行った細胞において、FMCHR1 と置換体はいずれも主に細胞膜上に局在し、核周囲や細胞質には存在していなかった (図 11 下部)。これらの結果から、置換体はいずれも小胞体から細胞膜上へ移行しており、i3\_6sub の細胞膜上における蛍光強度が低く見えるのは小胞体やゴルジ体に受容体が蓄積しているためではないことが分かった。次に、置換体の細胞膜上の発現を FACSscan flow cytometry 解析により定量した (表 5)。FMCHR1 と比較して、i1\_7sub の膜発現量は  $103.1 \pm 2.7\%$  を示し、同程度であった。一方、i2\_6sub は  $120.2 \pm 5.9\%$  と有意に増加した。対照的に、i3\_6sub の膜発現量は  $72.5 \pm 4.9\%$  とおよそ 30%低下し、FMCHR1 と比べて有意差が認められた。

置換体のリガンド親和性を明らかにするため、受容体発現細胞の細胞膜画分を抽出し、 $[^{125}\text{I}]$  (Phe<sup>13</sup>, Tyr<sup>19</sup>) MCH を用いてリガンド結合能測定を実施した。その結果、受容体膜発現量が低い i3\_6sub の Bmax 値は FMCHR1 と比較して低下傾向を示す (FMCHR1 =  $2.79 \pm 0.69$  pmol/mg protein、i3\_6sub =  $2.28 \pm 0.52$  pmol/mg protein) など、置換体によって Kd 値と Bmax 値が若干変動する傾向があった (表 6)。しかし、いずれの置換体も FMCHR1 と比較して有意差は認められなかった。従って、FMCHR1 と作製した置換体はいずれもリガンド結合能を保持しているこ

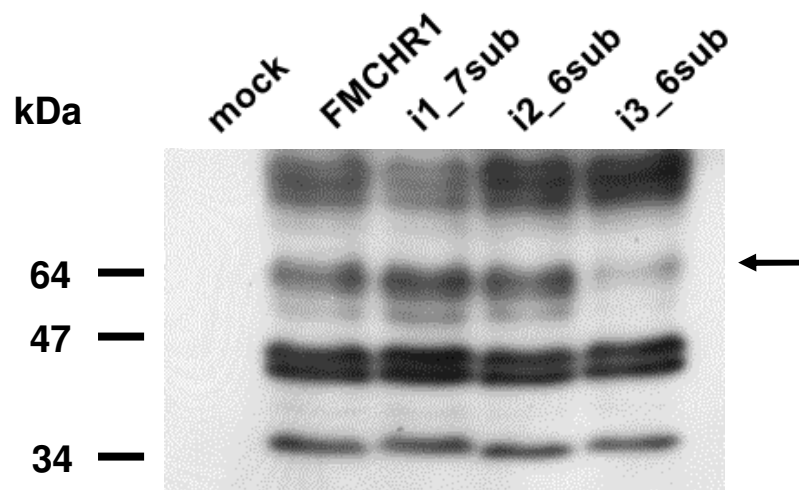


図 10. 置換体の受容体発現解析。HEK293T 細胞に一過性発現した FMCHR1 及び置換体の糖鎖付加パターン及び発現量を、抗 Flag タグ抗体を用いてウエスタンブロット法で解析した。FMCHR1 をウエスタンブロット解析すると、35、44/45、60 kDa のバンドが検出される。矢印は i3\_6sub において発現量が低下した 60 kDa の受容体を表す。

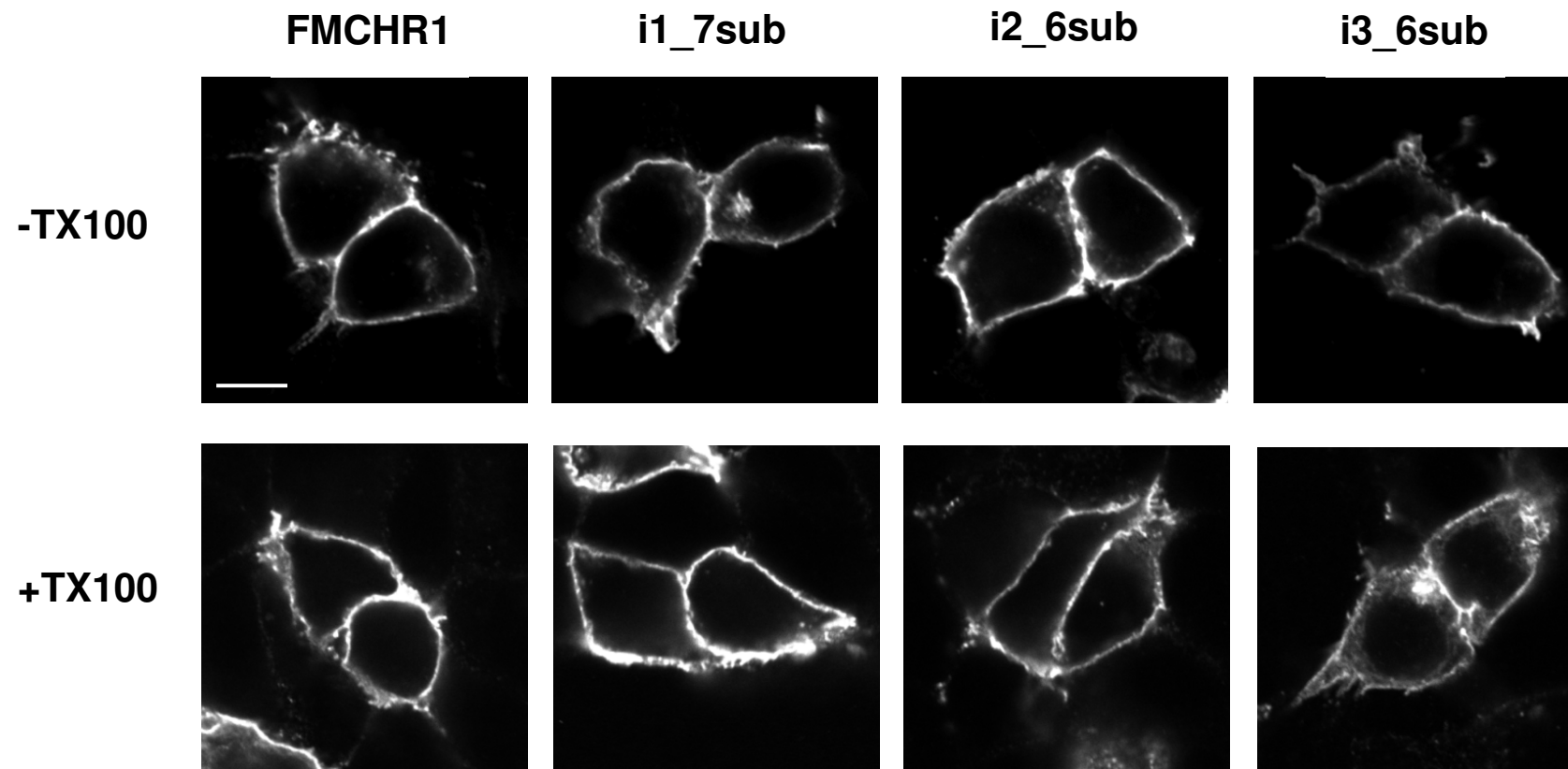


図 11. 置換体の細胞内局在解析。抗 Flag タグ抗体を用いた免疫細胞化学法により、HEK293T 細胞に一過性に発現した FMCHR1 及び置換体の細胞内局在を観察した。-TX100（上部）は膜透過処理を行ってない細胞を、+TX100（下部）は膜透過処理を行った細胞を示す。細胞の観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。Bar, 10 $\mu$ m。

表 5. FMCHR1 及び置換体の受容体膜発現量解析。

Receptor	Cell surface expression (FACS, %)
FMCHR1	100
i1_7sub	103.1 ± 2.7
i2_6sub	120.2 ± 5.9 <sup>a</sup>
i3_6sub	72.5 ± 4.9 <sup>b</sup>

HEK293T 細胞に各受容体を一過性発現させて FACSscan flow cytometry 解析を行った際の、受容体膜発現量を示す。

数値は triplicate で 3 回又は 4 回独立して実験を行った際の平均値±S.E.M を表す。

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01 significantly different from FMCHR1 by Student's *t*-test.

表 6. FMCHR1 及び置換体のリガンド結合能解析。

Receptor	Kd (nM)	Bmax (pmol/mg protein)
FMCHR1	1.29 ± 0.42	2.79 ± 0.69
i1_7sub	3.25 ± 1.92	2.62 ± 0.65
i2_6sub	2.02 ± 1.03	2.62 ± 0.91
i3_6sub	2.59 ± 0.51	2.28 ± 0.52

HEK293T 細胞に各受容体を一過性発現させ、<sup>[125]</sup>I (Phe<sup>13</sup>, Tyr<sup>19</sup>) MCH を用いたリガンド結合能測定を行った際の結果を示す。

数値は duplicate で 3 回又は 4 回独立して実験を行った際の平均値±S.E.M を表す。

とが確認された。

## II-3-2: 細胞内カルシウム濃度測定による Gi/o 及び Gq 活性の評価

哺乳類培養細胞発現系において、MCHR1 は Gi/o 及び Gq 両方を介したシグナル経路により細胞内カルシウムを動員する (図 1)。置換体の Gi/o 活性を調べるため、受容体を一過性発現させた HEK293T 細胞に百日咳毒素 (PTX) を前処理し、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて細胞内カルシウム濃度を測定した。PTX は Gq 活性に影響を与えることなく、Gi/o 活性を特異的に抑制することが知られている。図 12 のように、FMCHR1 発現細胞は MCH 刺激により、濃度依存的な細胞内カルシウム濃度の上昇を示した。PTX を前処理しても FMCHR1 の最大反応値は変動しなかったが、Gi/o 活性が消失するために濃度反応曲線が高濃度側へシフトし、EC50 値が有意に上昇した。PTX 未処理群の EC50 値は  $3.77 \pm 0.85$  nM であるのに対して、PTX 処理群の EC50 値は  $12.12 \pm 3.33$  nM を示し、+PTX/-PTX 比は 3.2 であった (表 7)。i1\_7sub の +PTX/-PTX 比は 2.9 であり、FMCHR1 と比較して有意差は認められなかった (図 12A)。そこで、i1\_7sub 置換箇所に基づいた置換体 (C74Q、W73A/C74Q、W73A/C74Q/S75Q、L71F/H72R/W73A/C74Q/S75Q、L71F/H72R/W73A/C74Q/S75Q/N76T) を順次作製した。i1\_7sub と同様に細胞内カルシウム濃度測定を行ったが、いずれの置換体の +PTX/-PTX 比も FMCHR1 と同程度の値を示した。従って、細胞内第 1 ループ領域は Gi/o 活性に関与しないことが推測される。一方、i2\_6sub と i3\_6sub の +PTX/-PTX 比はそれぞれ 1.3 と 1.7 と有意に低下し、PTX 感受性低下が示された (図 12B, C、表 7)。即ち、i2\_6sub と i3\_6sub はどちらも FMCHR1 と比べて Gi/o 活性低下が示唆された。FACSscan flow cytometry 解析によると、i3\_6sub の膜発現量は FMCHR1 よりも有意に減少 (約 30%) した (表 5)。従って、i3\_6sub の Gi/o 活性低下が受容体膜発現量の減少に起因するかどうか検証した。第 5 膜貫通領域に存在するアミノ酸 2 残基を置換した Y228F/V229F の受容体発現量は i3\_6sub と同程度であったが (data not shown)、+PTX/-PTX 比は FMCHR1 とおよそ等しかった (表 8)。従って、i3\_6sub の Gi/o 活性低下は膜発現量低下に依るものではないと考えられる。

次に、Gq 活性を評価するため、細胞内カルシウム濃度測定において、PTX 処理時における Gq 共役依存的な状態の EC50 値を比較した (表 7)。いずれの置換体も、PTX 処理時の EC50 値は FMCHR1 と比較して有意差が認められず、置換体の Gq 活性は変化しないと推測される。以上より、FMCHR1 と比較して、i2\_6sub と i3\_6sub は両方とも Gq 活性に影響を与えることなく、Gi/o 活性が低下することが示唆された。i2\_6sub 及び i3\_6sub における G タンパク質選択性の変化は COS-7 細胞、CHO-K1 細胞、HeLa\_S3 細胞発現時においても認められた (図 13)。EC50 値の +PTX/-PTX 比は COS-7 細胞において、FMCHR1 は 3.7 であるのに対し、i2\_6sub 及び i3\_6sub はそれぞれ 1.3、1.5 を示し、置換体の PTX 感受性が低下する傾向が観察された (図 13A)。この傾向は CHO-K1 細胞 (FMCHR1 = 4.3、i2\_6sub = 1.0、i3\_6sub = 1.4) (図 13B) と HeLa\_S3 細胞 (FMCHR1 = 8.9、i2\_6sub = 2.1、i3\_6sub = 3.5) においても同様であった (図 13C)。以上より、MCHR1 における Gi/o 活性に重要な領域は細胞の種類特異的ではないことが確認された。

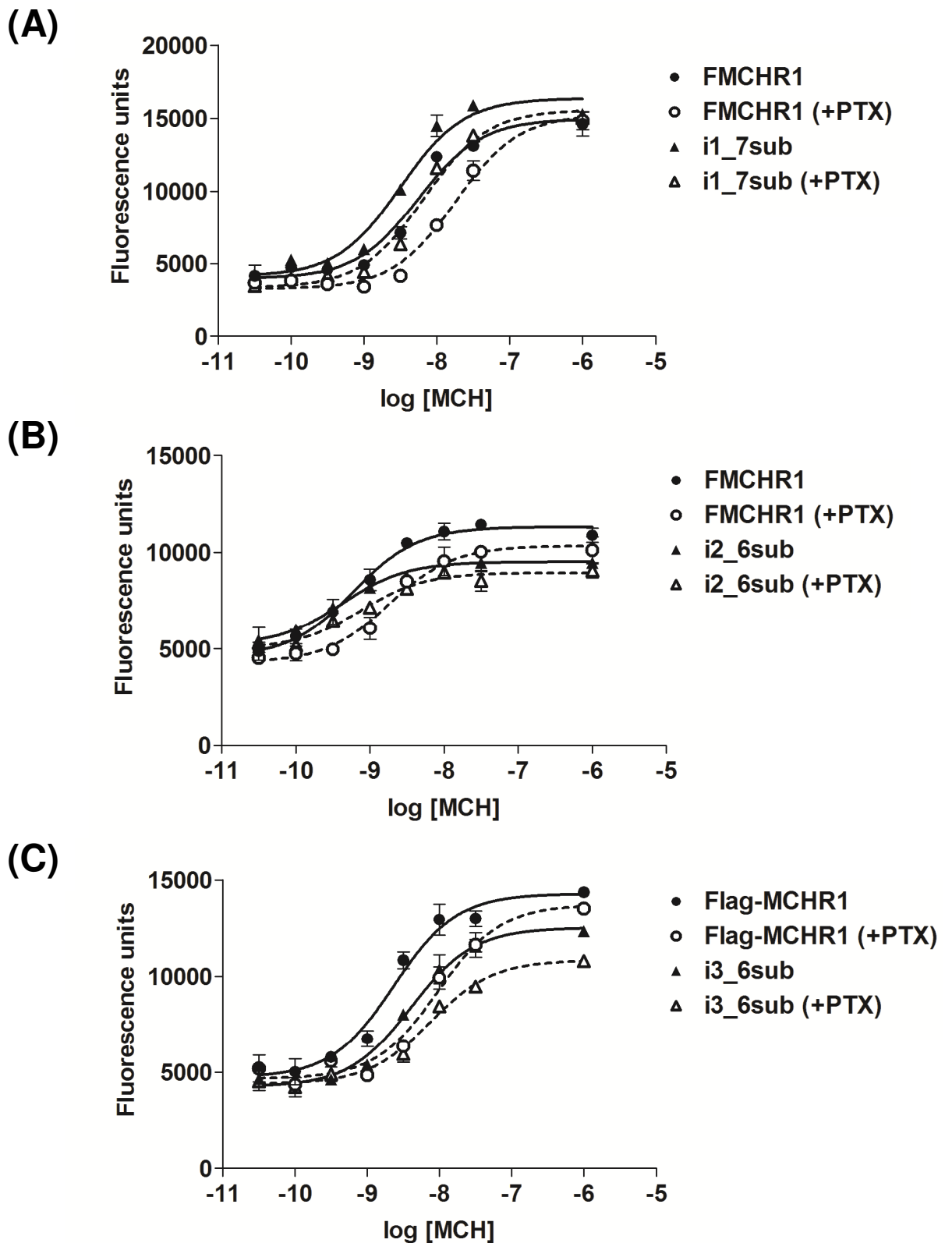


図 12. 置換体の細胞内カルシウム動員能解析。FMCHR1 (●) または各アミノ酸置換体 (▲) が一過性に発現した HEK293T 細胞の細胞内カルシウム濃度変化を示す。実線は PTX 未処理群を、破線は PTX 処理群を表す。PTX 処理群 (○又は△) は終濃度 280 ng/ml PTX で 37°C、18 hr インキュベートを行った。リガンドにはラット MCH を使用し、細胞内カルシウム濃度の変化は蛍光マイクロプレートリーダー Flexstation を用いて測定した。濃度反応曲線は duplicate で 3 回以上独立して実験を行った際の代表例を示す。

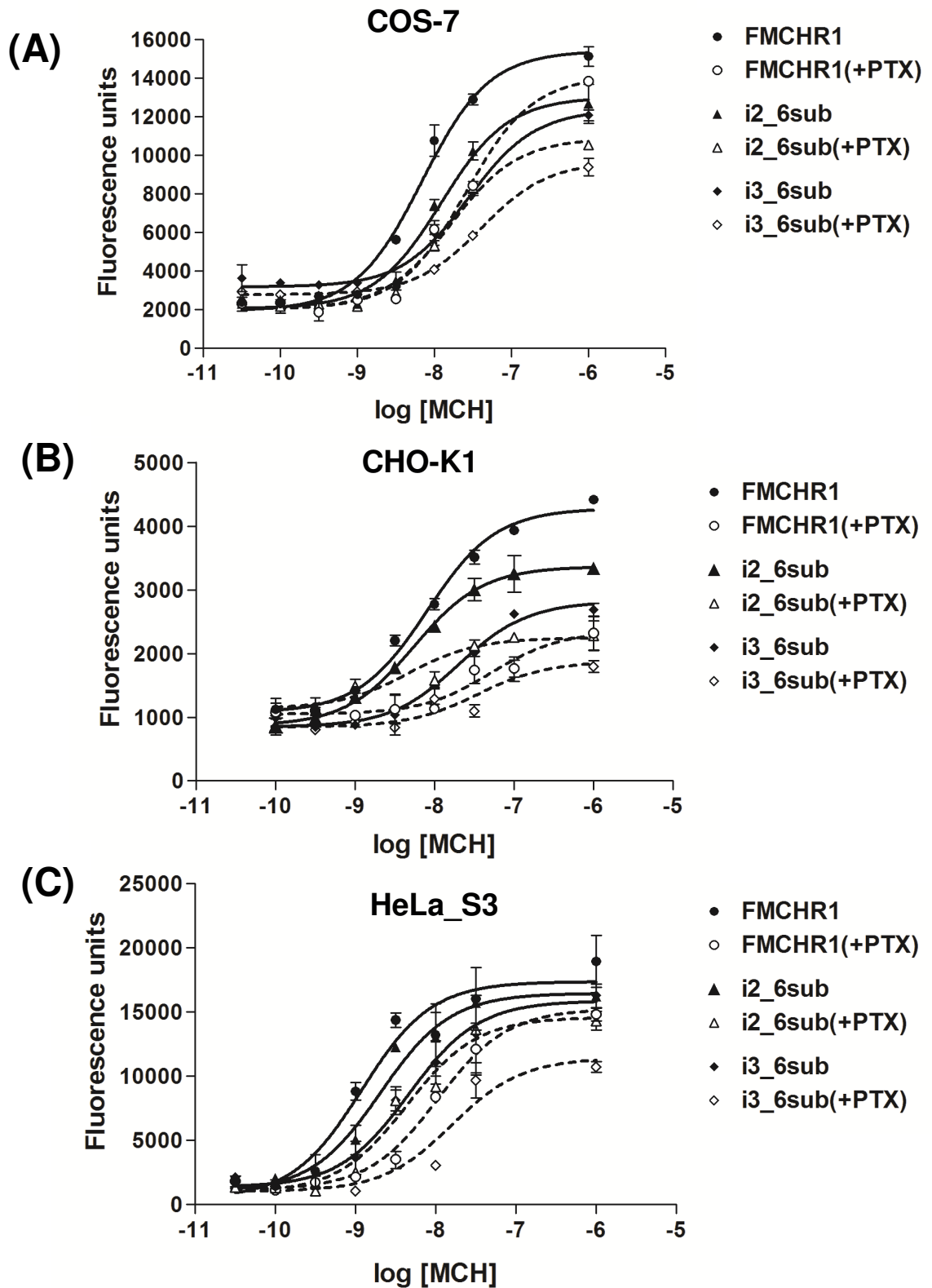


図 13. 様々な細胞株発現時における置換体の細胞内カルシウム動員能解析。FMCHR1 または (●) 各アミノ酸置換体 (▲、◆) が一過性に発現した (A) COS-7 細胞、(B) CHO-K1 細胞、(C) HeLa\_S3 細胞の細胞内カルシウム濃度変化を示す。実線は PTX 未処理群を、破線は PTX 処理群を表す。PTX 処理群 (○、△、◇) は終濃度 280 ng/ml PTX で 37°C、18 hr インキュベーションを行った。リガンドにはラット MCH を使用し、細胞内カルシウム濃度の変化は蛍光マイクロプレートリーダー Flexstation を用いて測定した。濃度反応曲線は duplicate で 2 回以上独立して実験を行った際の代表例を示す。



表 7. FMCHR1 及び置換における細胞内カルシウム動員能解析。

Receptor		EC50 value of MCH (nM)	+PTX/-PTX ratio	Max response (%)
FMCHR1	-PTX	3.77 ± 0.85	3.2	100
	+PTX	12.12 ± 3.33		90.43 ± 3.41
i1_7sub	-PTX	2.01 ± 0.50	2.9	100
	+PTX	5.38 ± 0.08		94.82 ± 2.99
i2_6sub	-PTX	6.24 ± 2.74	1.3 <sup>a</sup>	100
	+PTX	8.30 ± 3.79		90.81 ± 2.73
i3_6sub	-PTX	8.23 ± 0.28	1.7 <sup>b</sup>	100
	+PTX	13.68 ± 1.07		83.31 ± 3.59

HEK293T 細胞に各受容体を一過性発現させ、細胞内カルシウム濃度測定を行った際の EC50 値及び最大反応値を示した。+PTX/-PTX ratio は PTX 有無により変動する EC50 値の比を示す。Max response は各受容体発現細胞において、PTX 未添加時の最大反応を 100%と設定した際の増加率 (%) である。

数値は duplicate で 3 回以上独立して実験を行った際の平均値±S.E.M を表す。

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01 significantly different from FMCHR1 by Student's *t*-test.

表 8. 細胞内カルシウム動員能測定による各受容体の Gi/o 活性評価。

Receptor	+PTX/-PTX ratio
FMCHR1	3.2
<b>i1 loop</b> i1_7sub	2.9
<b>i2 loop</b> S150R/S151F/T152N/K153H/K156T/S158C (= i2_6sub)	1.3 <sup>a</sup>
S150R/S151F	3.7
K156T/S158C	2.7
S150R/S151F/T152N/K153H	5.1
S150R/K153H/K156T/S158C	2.2
<b>i3 loop</b> Y228F/V229F/R234N/A242L/S243P/T257M (= i3_6sub)	1.7 <sup>b</sup>
R234N (i3 loop)	3.0
T257M (i3 loop)	3.3
Y228F/V229F (TM5)	2.6
A242L/S243P (i3 loop)	2.9
R234N/A242L/S243P (i3 loop)	2.8
R234N/A242L/S243P/T257M (i3 loop)	3.2
Y228F/V229F/R234N/S243P/T257M (TM5 + i3 loop) (=i3_5sub)	1.2 <sup>a</sup>

HEK293T 細胞に各受容体を一過性発現させ、細胞内カルシウム濃度測定を行った。その際の PTX 有無により変動する EC50 値の比を示す。

数値は duplicate で 3 回以上独立して実験を行った際の平均値を表す。

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01 significantly different from FMCHR1 by Student's *t*-test.

### II-3-3 : MCHR1 における Gi/o 選択的共役に重要なアミノ酸の探索

i2\_6sub 及び i3\_6sub における複数の置換箇所の中でも、特に Gi/o 活性に重要なアミノ酸残基を特定するため、i2\_6sub 及び i3\_6sub の置換箇所を様々な組み合わせた置換体を作製した。そして、細胞内カルシウム濃度測定における EC50 値の+PTX/-PTX 比を算出して各置換体の Gi/o 活性を評価した。細胞内第 2 ループ領域において、2 種類のアミノ酸 2 残基置換体 (S150R/S151F、K156T/S158C) や 2 種類のアミノ酸 4 残基置換体 (S150R/S151F/T152N/K153H、S150R/K153H/K156T/S158C) は FMCHR1 と比較して+PTX/-PTX 比が変化しなかった (表 8)。i3\_6sub 置換体の場合において、第 5 膜貫通領域の細胞質側に位置する Y228F/V229F の+PTX/-PTX 比は FMCHR1 と同程度であった。細胞内第 3 ループ領域に着目すると、点置換体 (R234N、T257M) やアミノ酸 2 残基置換体 (A242L/S243P)、3 残基置換体 (R234N/A242L/S243P) だけでなく、アミノ酸 4 残基置換体 (R234N/A242L/S243P/T257M) も FMCHR1 と同様の+PTX/-PTX 比を示した (表 8)。次に、i3\_6sub の置換部位において、細胞内第 3 ループ領域に存在する Ala242 のみ野生型の配列である i3\_5sub を作製した。細胞内カルシウム濃度測定の結果、FMCHR1 (3.2) と比較して、i3\_5sub の+PTX/-PTX 比 (1.2) は i3\_6sub (1.7) と同様に有意に低下した。この結果は i3\_6sub における A242L 置換は Gi/o 活性低下に必要でないことを意味する。本研究では、i2\_6sub 及び i3\_6sub 置換箇所において、全ての組み合わせを考慮した置換体を作製して Gi/o 活性を確認していない。しかしながら、10 種類の置換体の解析から、少なくとも MCHR1 における Gi/o 活性低下には、複数のアミノ酸残基を同時に置換する必要があることが明らかになった。

### II-3-4 : GTP $\gamma$ S 結合能測定及び cAMP 量測定による Gi/o 活性の評価

細胞内カルシウム動員能測定で認められた i2\_6sub 及び i3\_6sub の Gi/o 活性低下を確認するため、Gi/o 活性選択的な GTP $\gamma$ S 結合能を測定することで、FMCHR1 及び置換体の Gi/o 活性を詳細に調べた。FMCHR1 が一過性発現した HEK293T 細胞において、MCH 刺激による濃度依存的な GTP $\gamma$ S の結合が認められた (図 14)。EC50 値は  $0.58 \pm 0.11$  nM、1  $\mu$ M MCH 添加時の最大反応は  $186.5 \pm 20.6\%$  を示した。i1\_7sub の EC50 値は  $0.45 \pm 0.12$  nM、最大反応は  $175.1 \pm 6.0\%$  であり、FMCHR1 と i1\_7sub の間で GTP $\gamma$ S の結合能に有意差は認められなかった (図 14A)。一方、i2\_6sub と i3\_6sub は FMCHR1 と比較して EC50 値が有意に上昇し、それぞれ  $1.30 \pm 0.12$  nM、 $5.65 \pm 2.95$  nM を示した (図 14B, C)。また、最大反応は i2\_6sub において  $160.2 \pm 5.7\%$ 、i3\_6sub において  $160.2 \pm 28.9\%$  に低下した。i3\_5sub に関して、EC50 値は  $4.65 \pm 1.79$  nM、最大反応は  $146.9 \pm 23.8\%$  を示し、i3\_6sub における値とほぼ等しかった。この結果は、i3\_5sub の Gi/o 活性低下は i3\_6sub と同程度であることを示した細胞内カルシウム濃度測定の結果と一致する。加えて、MCH 添加前の定常状態における GTP $\gamma$ S 結合量は FMCHR1、i1\_7sub、i2\_6sub、i3\_6sub、i3\_5sub の間で有意差は認められず、これらの置換体は恒常的活性化状態ではないことが確認された。

次に、i2\_6sub 又は i3\_6sub が安定発現した HEK293T 細胞を作製し、MCH 添加後の cAMP 量を測定することでさらに Gi/o 活性を精査した。FMCHR1 発現細胞において、MCH はフォルスコリン誘発性の cAMP 産生を阻害し、EC50 値は  $0.04 \pm 0.01$  nM を示した (図 15A)。この時、

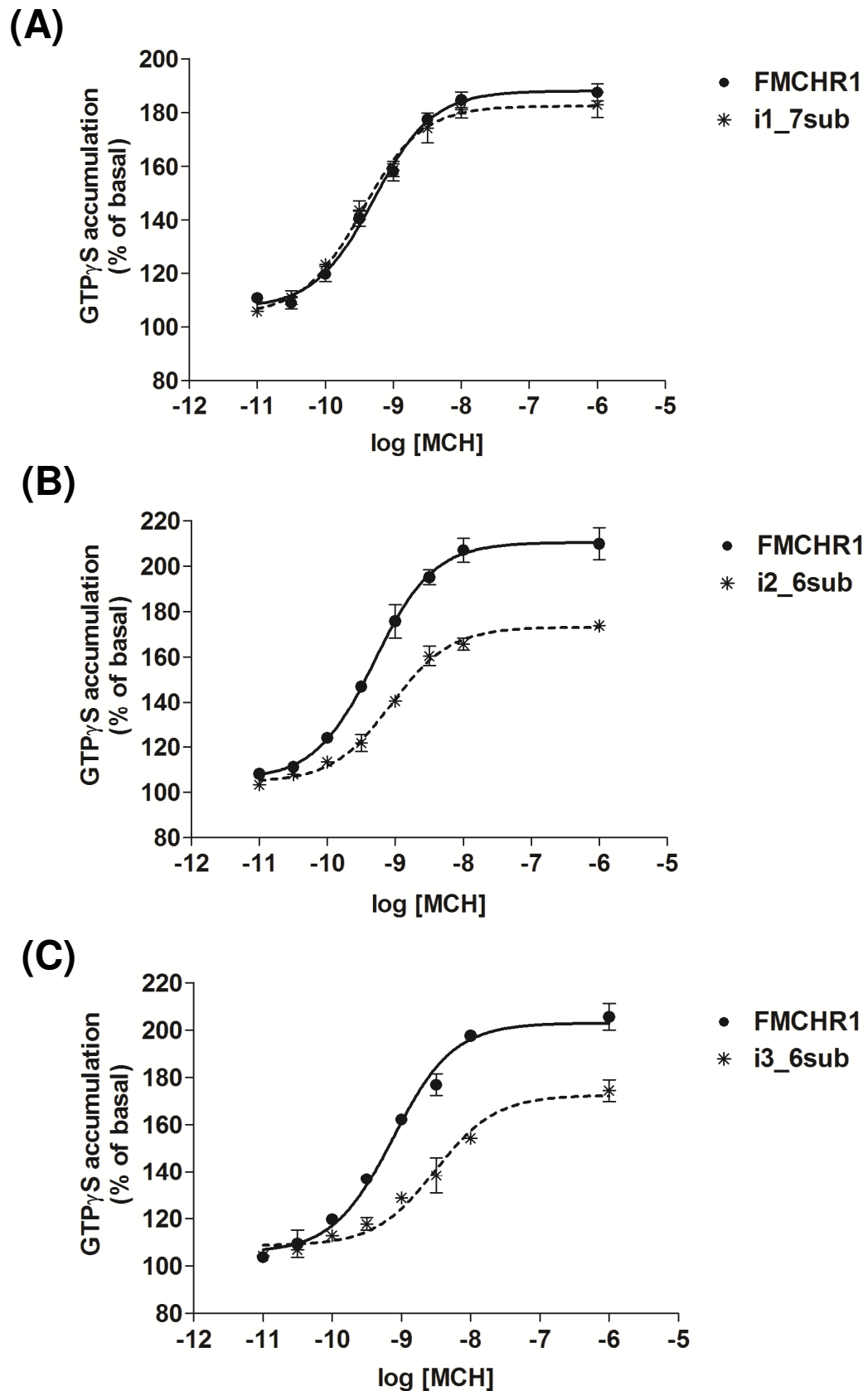


図 14. 置換体の GTP $\gamma$ S 結合能解析。FMCHR1 (●、実線) または各置換体 (\*、破線) が一過性に発現した HEK293T 細胞の GTP $\gamma$ S 結合量を示す。リガンドにはラット MCH を使用した。値は MCH 未添加時を 100% と設定した際の増加率 (%) を表す。濃度反応曲線は triplicate で 3 回以上独立して実験を行った際の代表例を示す。

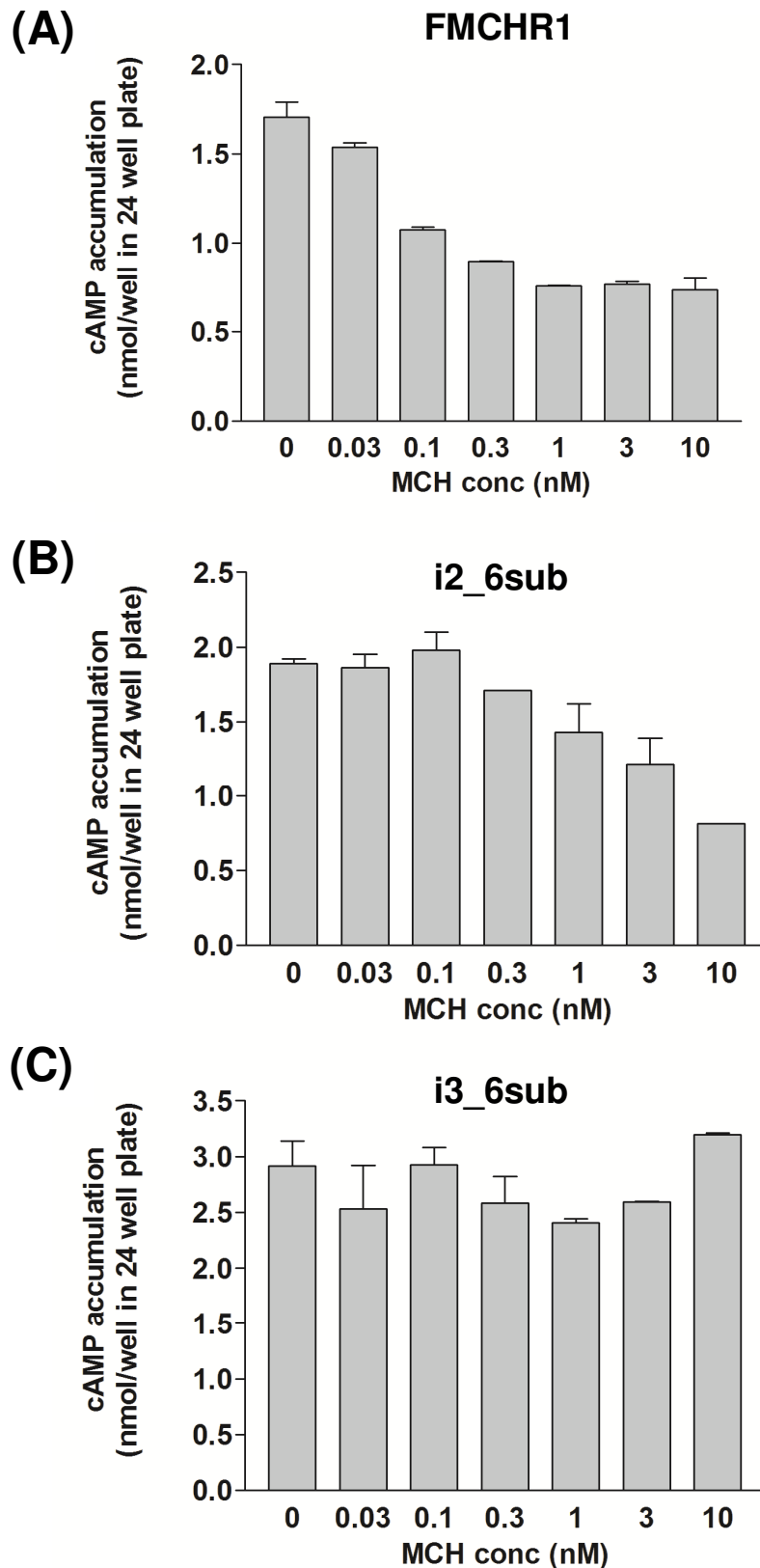


図 15. 置換体における cAMP 量解析。(A) FMCHR1 または (B) i2\_6sub、(C) i3\_6sub が安定発現した HEK293T 細胞において、1  $\mu$ M Forskolin 及び各濃度のラット MCH を 15 分間添加した際の cAMP 量 (24 well plate における 1 well の総量) を示す。グラフはいずれも duplicate で 3 回以上独立して実験を行った際の代表例である。

10 nM MCH 添加時において cAMP 産生量を  $43.8 \pm 1.3\%$  抑制した。i2\_6sub は FMCHR1 と同様の最大抑制値を示したが ( $46.9 \pm 5.2\%$ )、EC50 値は 40 倍と著しく上昇した ( $1.62 \pm 0.39$  nM,  $P < 0.01$  versus FMCHR1) (図 15B)。i3\_6sub に関しては、0.03 nM-1  $\mu$ M MCH を添加しても、フォルスコリン誘発性の cAMP 産生を全く抑制しなかった (図 15C)。i2\_6sub 及び i3\_6sub 発現細胞において、フォルスコリンのみを添加した状態の cAMP 量は FMCHR1 と同程度であった。以上、Gi/o 活性選択的な GTP $\gamma$ S 結合能測定と cAMP 量測定において、i2\_6sub と i3\_6sub はどちらも Gi/o 活性低下を示した。

### II-3-5 : DMR アッセイによる G タンパク質選択性の評価

これまでに実施した通常の細胞内情報伝達系を測定する実験系に加えて、統合的な細胞の活性を示す DMR 応答を調べることにより、置換体の G タンパク質選択性を評価した。DMR アッセイは、全ての G タンパク質ファミリーを含む一般的な細胞内応答の結果として生じる「細胞の形態及び分子密度の変化」を測定するものである。共役する G タンパク質の種類によって DMR の応答は異なり、一般的に Gi/o 共役は素早い初期応答を、Gq 共役は遅延性の応答を引き起こすことが知られている (Schröder et al., 2010; Sundström et al., 2013)。

また、DMR アッセイにおいては、HEK293T 細胞よりも CHO-K1 細胞一過性発現時の方が、応答観察が容易であったことから CHO-K1 細胞を用いた。CHO-K1 細胞における受容体発現を調べるため、ウェスタンブロット解析を実施した (図 16A)。HEK293T 細胞発現時において FMCHR1 及び置換体で観察された 60 kDa のバンドは観察されなかったが、35、44/45 kDa のバンドは CHO-K1 細胞において検出された。ImageJ 解析によりバンドの定量を行ったところ、i1\_7sub 及び i3\_6sub において、受容体発現レベルは FMCHR1 とほぼ等しかった。一方、i2\_6sub における 44/45 kDa のバンドは FMCHR1 と比べて約 40% 減少した。前述のように、CHO-K1 細胞に i2\_6sub 又は i3\_6sub を一過性発現させた時、細胞内カルシウム動員の解析において、置換体の Gi/o 活性低下が示された (図 13B)。HEK293T 細胞と同様に、CHO-K1 細胞における受容体発現レベルは Gi/o を介したシグナルの効率に影響を与えないと思われる。従って、DMR 応答による Gi/o 活性を評価するために CHO-K1 細胞を用いた。

FMCHR1 を一過性発現した CHO-K1 細胞において、1  $\mu$ M MCH 添加により Gi/o 活性に由来すると思われる初期の急速な上昇反応と、Gq 活性に由来すると思われる遅延性の反応が観察された (図 16B)。実際、初期の上昇反応は PTX 処理により著しい減少を示した。i1\_7sub 発現細胞の DMR 応答は FMCHR1 と同様のトレースを示した。一方、i2\_6sub 及び i3\_6sub 発現細胞は Gi/o 由来の急速な初期上昇反応が低下した。さらに、MCH 刺激後 5 分間 (Gi/o 活性由来) における最大値を比較すると、FMCHR1 は  $73.82 \pm 3.54$  picometer (pm)、PTX 添加時の FMCHR1 は  $31.92 \pm 4.74$  pm を示した。i1\_7sub の最大振幅は  $79.99 \pm 7.46$  pm であり、FMCHR1 とおおよそ等しかった。一方、i2\_6sub と i3\_6sub は FMCHR1 と比較して Gi/o 依存的な活性が有意に低下し、最大値はそれぞれ  $59.50 \pm 3.16$  pm、 $46.09 \pm 1.41$  pm を示した。従って DMR 応答においても、i2\_6sub 及び i3\_6sub の Gi/o 活性は FMCHR1 と比べて低下していることが確認された。

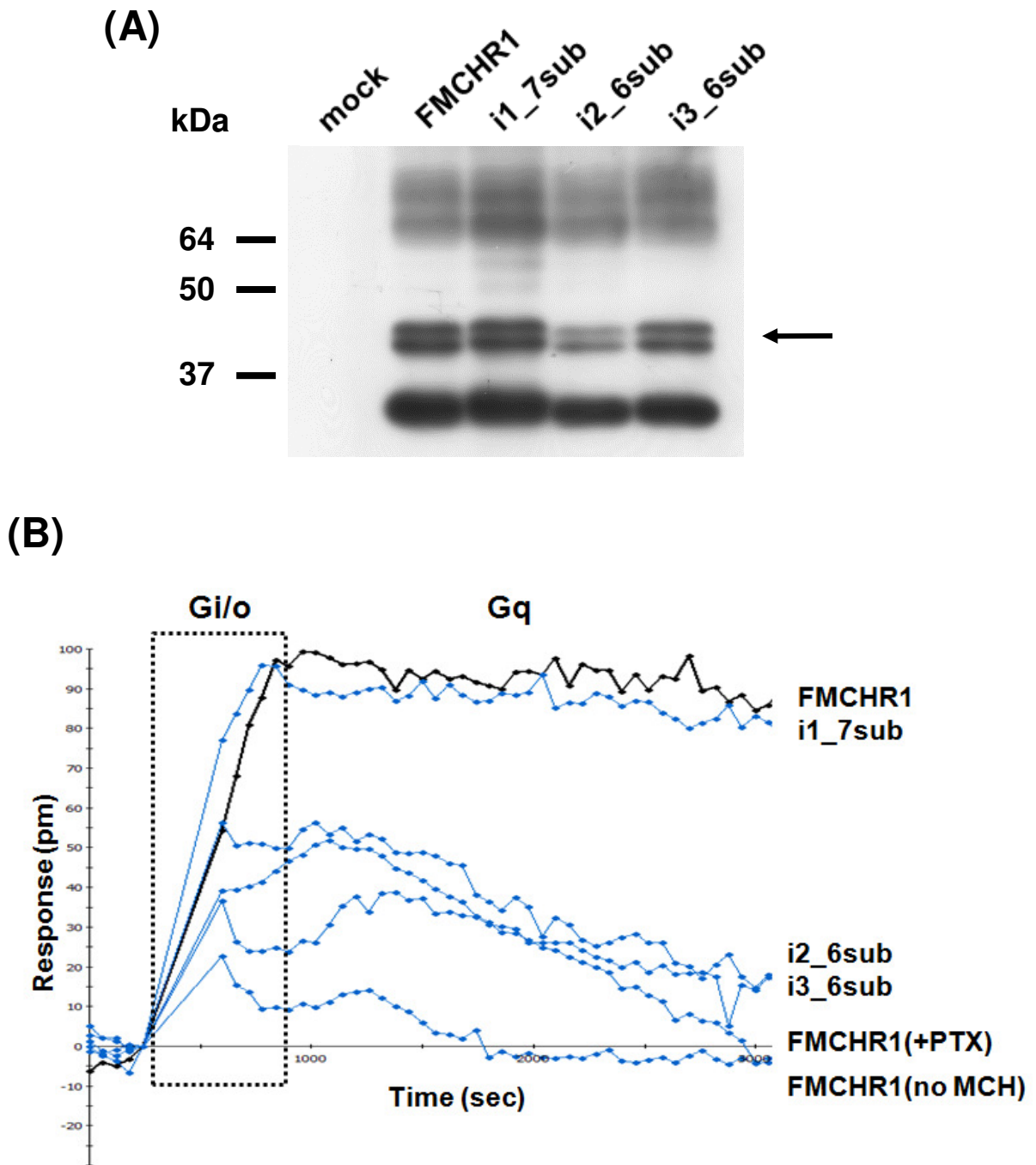


図 16. 置換体における Dynamic mass redistribution (DMR) 応答の解析。(A) CHO-K1 細胞に一過性発現した FMCHR1 及び置換体の糖鎖付加パターン及び発現量を、抗 Flag タグ抗体を用いてウエスタンブロット法で解析した。FMCHR1 をウエスタンブロット解析すると、35、44/45 kDa のバンドが検出される。矢印は i2\_6sub において発現量が低下した 44/45 kDa の受容体を表す。(B) FMCHR1 又は各置換体を一過性に発現した CHO-K1 細胞に、1  $\mu$ M ラット MCH を添加した際の DMR 応答の変化を示す。PTX 処理群は終濃度 280 ng/ml PTX で 37°C、18 hr インキュベーションを行った。グラフはいずれも triplicate で 3 回以上独立して実験を行った際の代表例である。

## II-4: 考察

GPCR-G タンパク質間相互作用の分子的なメカニズム及び G タンパク質活性メカニズムの解明が進歩しているにも関わらず、受容体の G タンパク質選択性がどの部位で、どのように決定付けられているかは未だ不明である。これまでに、G タンパク質共役能がすでに判明している GPCR の配列比較を行うことで、G タンパク質選択性に関与するアミノ酸の予測も行われてきたが (Muramatsu et al., 2006)、コンセンサス配列の特定には至っていない。そこで、ランダムな Ala 置換や 3 次元相同モデルを利用したアプローチ法が実施されてきたが、G タンパク質選択性を決定するアミノ酸残基を特定した例は限られている。本研究では、これらのアプローチ法とは異なり、自身の先行研究 (第 I 章) で得た結果である「哺乳類培養細胞発現系において、MCHR1 の G タンパク質選択性が哺乳類 (Gi/o 及び Gq) と魚類 (Gq) で異なる」ことを参考にした (Saito et al., 1999; Mizusawa et al., 2009; Hamamoto et al., 2011)。即ち、ラット MCHR1 のアミノ酸配列をキンギョの配列に順次置換することで、Gi/o 選択的共役に重要なアミノ酸の特定を試みた。その結果、i2\_6sub 及び i3\_6sub 置換体は Gq 活性に影響を与えることなく、Gi/o 活性を選択的に低下することを見出した。i2\_6sub は細胞内第 2 ループ領域のアミノ酸 6 残基を同時に置換した置換体であり、i3\_6sub は第 5 膜貫通領域のアミノ酸 2 残基と細胞内第 3 ループ領域のアミノ酸 4 残基の計 6 残基を同時に置換した置換体である。これらの置換箇所において、アミノ酸 4 残基置換体であっても Gi/o 活性低下を示さなかったことから、複数のアミノ酸から形成される立体構造が Gi/o との選択的共役に重要であることが推測された。加えて、統合的な細胞内応答を評価する DMR アッセイにおいても、i2\_6sub と i3\_6sub は Gi/o 活性低下が認められた。

サイトロピン受容体は Gq、Gs と共役するが、細胞内第 1 ループ領域の Leu440、Thr441、His443 が Gq 選択的な活性に関与すると報告された (Kleinau et al., 2010)。しかし一般的に、細胞内第 1 ループ領域は他の細胞内領域と比較して構成アミノ酸数が少ない傾向にあり、G タンパク質選択性に対する働きに関してはあまり注目されてこなかった。本研究においても、哺乳類 MCHR1 の細胞内第 1 ループ領域は Gi/o 活性に関与しないことが示された。一方、細胞内第 2、第 3 ループ領域においては、長さや配列が多様であり、この多様性が G タンパク質選択性の決定に寄与すると考えられている (Hermans et al., 2003; Katritch et al., 2012; Moreira et al., 2014)。しかしながら、細胞内第 2 ループ領域に関して述べると、Gq と選択的に相互作用する部位が示された GPCR がごくわずか存在するのみである。例えば、クラス A GPCR に属するプロテアーゼ活性化受容体 1 型において、細胞内第 2 ループ領域近位の R305A 置換は Gi/o 及び G<sub>12/13</sub> を介したシグナル系に影響を与えることなく Gq<sub>11</sub> 活性を選択的に低下させた (McCoy et al., 2012)。クラス B GPCR に属する副甲状腺ホルモン/副甲状腺ホルモン関連タンパク質受容体では、細胞内第 2 ループ領域中央に位置する Lys の Glu への置換は、通常通り Gs を介した cAMP 応答を示しながらも、Gq を介したホスホリパーゼの活性を選択的に抑制した (Iida-Klein et al., 1997)。従って、本研究で作製した i2\_6sub (S150R/S151F/T152N/K153H/K156T/S158C) は Gi/o 選択的な活性における細胞内第 2 ループ領域の重要性を示した初めての置換体である。興味深



いことに、MCHR1 の Lys156 に隣接する R155Q は受容体膜発現に影響を与えることなく、細胞内カルシウム濃度測定において、野生型と比較して EC50 値が 75 倍上昇、最大反応が 40% 低下した (Saito et al., 2005)。GTP $\gamma$ S 結合能測定においても R155Q の EC50 値は野生型より 14 倍増加し、Arg155 は Gi/o 及び Gq 両方を介したシグナル系に重要な役割を果たすことが示された。これらの結果は、細胞内第 2 ループ領域の遠位に位置する各アミノ酸は、哺乳類 MCHR1 の受容体活性や G タンパク選択性を決定付けるために、それぞれ異なる役割を担う可能性を示唆する。次に細胞内第 3 ループ領域について考察する。 $\alpha_{2A}$  アドレナリン受容体において、細胞内第 3 ループ領域の遠位に存在する塩基性のアミノ酸 2 残基 (Lys 及び Arg) を Ala に置換すると、Gi/o を介した cAMP 産生抑制は低下したが、Gs を介した cAMP 産生に影響を与えなかった (Wade et al., 1999)。その他の例として、ロイコトリエン B4 受容体 1 型が挙げられる。細胞内第 1、第 2、第 3 ループ領域においてアミノ酸 3 残基又は 4 残基をタンデムに Ala に置換することで、細胞内第 3 ループ領域の近位に存在する DIGR が G<sub>16</sub> ではなく Gi/o を介したシグナルに選択的に関与することが見出された (Kuniyeda et al., 2007)。本研究で作製した i3\_6sub (Y228F/V229F/R234N/A242L/S243P/T257M) では、細胞内第 3 ループ領域における遠位の塩基性アミノ酸は置換しておらず、また DIGR 配列もラット MCHR1 の細胞内第 3 ループ領域に存在しない。さらに、哺乳類 MCHR1 では細胞内第 3 ループ領域に加えて第 5 膜貫通領域を同時に置換することが Gi/o 活性に必要であった (表 8)。以上より、i2\_6sub 及び i3\_6sub は Gi/o を介した細胞内シグナリングに選択的に関与する新しいタイプの GPCR 置換体である。

G タンパク質選択性の決定には、細胞内第 2、第 3 ループ領域のみならず細胞内 C 末端領域も重要な役割を担うと考えられている (Hermans et al., 2003; Katritch et al., 2012; Moreira et al., 2014)。そこで MCHR1 の細胞内 C 末端領域にも注目し、当研究室で以前作製されたアミノ酸欠損体  $\Delta$ R321、 $\Delta$ S325、 $\Delta$ Q333 (Tetsuka et al., 2004) を用いて、細胞内カルシウム濃度測定により Gi/o 活性を評価した。 $\Delta$ S325 及び  $\Delta$ Q333 は Gi/o 活性低下を示さなかったが、 $\Delta$ R321 は PTX 感受性、即ち Gi/o 活性が低下する傾向が認められた。GTP $\gamma$ S 結合能測定においても、 $\Delta$ R321 の EC50 値は FMCHR1 と比較して 10.0 倍上昇、最大反応は 40% 低下し、Gi/o 活性低下が認められた。以上の結果から、 $\Delta$ S325 から  $\Delta$ R321 で切除される 322-325 番目のアミノ酸が Gi/o 活性に重要である可能性が考えられた。そこで、322-324 番目に存在するアミノ酸を Ala に置換した L322A/V323A/L324A の Gi/o 活性を評価したが、FMCHR1 と同程度であった。従って、 $\Delta$ S325 から  $\Delta$ R321 で切除される 322-324 番目のアミノ酸が Gi/o 活性に直接重要でないことが分かった。Arg321 は Helix 8 領域の中央部に位置しており、 $\Delta$ R321 は 322 番目以降のアミノ酸を切除することで Helix 8 の構造が著しく変化したと予想される。従って、細胞内 C 末端領域に存在する Helix 8 も Gi/o 選択性活性に関わると推測される。

これまで一つの受容体でありながら、結合するアゴニストの種類により優先的に共役する G タンパク質サブタイプが異なる場合があることが報告されている。このことから、特定のアミノ酸配列よりも、GPCR のコンフォメーションが G タンパク質選択性に重要であると推測される (Wong et al., 2003)。これまでに所属研究室において、ラット MCHR1 の 3 次元相同モデルを作製したところ、細胞内第 2、第 3 ループ領域が細胞内で露出し、膜貫通領域部分から細胞質側を向いた構造をしていることが示唆された (Saito et al., 2005; Nagata et al., 2013)。従って、

細胞内第 2、第 3 ループ領域は G タンパク質と容易に接近が可能であると示唆された。また、MCHR1 の i2\_6sub 及び i3\_6sub 置換体は、Gq との相互作用は野生型と同様に維持しながらも、Gi/o との空間的な相互作用が不安定になっている可能性を推測した。この根拠として、一連の置換体の解析 (表 8) を行っても、Gi/o 選択的共役に重要な単独のアミノ酸や連続したアミノ酸配列が特定されなかったことが挙げられる。そこで、置換体の 2 次構造及び Gi/o との 3 次元複合体構造の分子モデル構築を試みたが、多様なアミノ酸置換に由来する複雑さから作製は困難であった。分子モデル作製のためには、i2\_6sub 及び i3\_6sub におけるアミノ酸置換箇所を一つずつ野生型に戻した置換体を作製し、i3\_6sub における Ala242 のように置換が不要なアミノ酸を検証する必要がある。これにより、i2\_6sub 及び i3\_6sub において置換したアミノ酸が、どのように Gi/o との相互作用に影響を与えるかを解明することに繋がると期待される。

哺乳類 MCHR1 で見出された G タンパク質共役に重要なアミノ酸残基を参考に、生体内における細胞内環境でどのように MCHR1 が G タンパク質と共役しているかを解明する必要がある。哺乳類培養細胞発現系において、強制発現させた哺乳類 MCHR1 は Gi/o 及び Gq と共役し、Gq よりも Gi/o に対する親和性の方が高い (Saito et al., 1999; Hawes et al., 2000)。本研究で実施した cAMP 量測定 (Gi/o 選択的) の EC50 値は 0.04 nM を示し、PTX 添加時における細胞内カルシウム濃度測定 (Gq 選択的) の EC50 値は 12.12 nM を示した。従って、本研究においても野生型 MCHR1 は Gq よりも Gi/o に対する親和性が高いことが確認された。内在的に MCHR1 が発現した細胞株の研究によると、ヒトメラノーマ細胞 SK-MEL-37 及びヒト神経芽細胞腫 Kelly において MCHR1 は Gi/o と共役する (Saito et al., 2001b; Schlumberger et al., 2002)。一方、ヒト神経芽細胞腫 IMR32 では MCH は主に Gq を活性化する (Fry et al., 2006)。予想外なことに末梢血単核細胞では 100 nM 以上の MCH で一日刺激すると、cAMP 量が約 2 倍増加し、Gs 共役が示唆された (Verlaet et al., 2002)。in vivo の視床下部外側野のニューロンでは、MCH 刺激によりシナプス活性の強い抑制が引き起こされる。この現象は PTX 添加により完全にブロックされ、視床下部外側野に発現する MCHR1 は Gi/o 共役選択的であることが示された (Gao et al., 2001)。従って、受容体が発現する細胞内環境に依存して、MCHR1 の G タンパク質選択性は変化する場合がある。本研究で作製した i2\_6sub 及び i3\_6sub は Gi/o 活性が低下し、Gq 活性が優勢な置換体である。i2\_6sub 置換部位と i3\_6sub 置換部位を同時に置換することで、さらに Gi/o 活性が低下して Gq 活性特異的な置換体が作製出来ると予想される。この偏りを活用し、MCHR1 を介したシグナルバランスが Gq に寄っている i2\_6sub 及び i3\_6sub のノックインマウスの作出や、摂食及びうつ不安に対する行動解析は、新たな知見を我々にもたらすであろう。また、MCHR1 は海馬、扁桃核、側座核といったいくつかの脳領域に高発現しているが (Saito et al., 2001a)、それぞれの脳領域で特徴的な Gi/o-Gq のシグナルバランスを有する可能性が考えられる。これに関しても、ウイルスを介して i2\_6sub 及び i3\_6sub を過剰発現させることで、個々の脳領域における Gi/o-Gq のシグナルバランスを調整することが可能であり、当該現象の突破口となり得る。以上より、i2\_6sub 又は i3\_6sub を利用することで、MCHR1 における Gi/o-Gq シグナルバランスの生理的役割の理解に繋がることが期待される。

in vivo において、Gi/o-Gq 間のシグナルバランスが統合失調症等の精神病を制御するという報告が存在していることから (Fribourg et al., 2011)、GPCR と G タンパク質サブタイプ間の

選択的共役メカニズムの解明は特に重要な課題である。結論として、ラット MCHR1 の細胞内第 2 ループ領域 (i2\_6sub) と第 5 膜貫通領域及び細胞内第 3 ループ領域 (i3\_6sub) における置換体は、Gq 活性に影響を与えずに Gi/o 選択的に活性低下を示すことを明らかにした。従って、これら置換体は Gq 選択的なシグナリングを引き起こすバイアスリガンドの探索に役立つツールとなり得る。本研究により、これまで不明であった Gi/o を選択的に活性化する起点として働く細胞内領域が、ラット MCHR1 に独立して 2 箇所存在することを見出した。今後は、i2\_6sub 及び i3\_6sub において Gi/o 活性に重要な鍵となるアミノ酸をさらに絞り込み、どのようにこれらのアミノ酸が MCHR1 のコンフォメーションを活性化するかを調べる必要がある。MCHR1-Gi/o 間の選択的相互作用部位を示した本研究成果は、200 種類程度存在するクラス A ファミリーに所属する他の GPCR において、G タンパク質選択性の仕組みの理解に貢献することが期待される。

### 第Ⅲ章 哺乳類 MCHR1 における NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフの機能解析

---

**Mutation of Phe318 within the NPxxY(x)<sub>(5,6)</sub>F motif in melanin-concentrating hormone receptor 1 results in an efficient signaling activity.**

Hamamoto A., Horikawa M., Saho T., Saito Y.  
Frontiers in Endocrinology 3, 147, 2012.

---

### Ⅲ-1：序論

これまで哺乳類 MCHR1 において、リガンド結合、糖鎖付加、シグナル伝達、膜移行、受容体インターナリゼーションといった受容体機能に重要なアミノ酸領域及びアミノ酸残基が報告されてきた (MacDonald et al., 2000; Saito et al., 2003, 2004, 2005; Fan et al., 2005)。しかし、MCH が結合した受容体がどのような構造変化を起こした後に、G タンパク質を活性化するかという構造ダイナミクスに関する知見を得るには至っていない。そのため、MCHR1 活性型への構造変化に関わるアミノ酸領域の特定が必要とされていた。また、GPCR 研究の根底である G タンパク質選択性が、どのように決定付けられるかも未だ不明であった。

GPCR の細胞内 C 末端領域は、受容体の輸送 (Bermark et al., 2001; Venkatesan et al., 2001; VanLeeuwen et al., 2003) やシグナル伝達 (Namba et al., 1993; Lyu et al., 2000; Pankevych et al., 2003)、受容体インターナリゼーション (Böhm et al., 1997) に重要な役割を果たすことが報告されている。また、ウシロドプシンの分子構造解析により、細胞内 C 末端領域に短い両親媒性のらせん構造が存在することが明らかになった。これは GPCR における第 8 の Helix として、Helix 8 と名づけられた。多くの GPCR で、Helix 8 はパルミトイル化により細胞膜に固定され、受容体発現や機能に関与する (Chini et al., 2009)。加えて、B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> ブラジキニン受容体において、Helix 8 が受容体インターナリゼーションやシグナル伝達に重要な役割を担うことが示された (Faussner et al., 2005)。ロドプシンでは、Helix 8 の N 末端側の一部はトランスデューシンの C 末端と結合し、 $\beta\gamma$  サブユニットを制御する (Ernst et al., 2000; Marin et al., 2000)。また、M<sub>1</sub> ムスカリン性アセチルコリン受容体の Helix 8 に存在する Phe425、Arg426、Thr428、Leu432 が G タンパク質との結合及びシグナル伝達に重要であり、G $\alpha$  の C 末端に位置するヘリックスと結合することが推測された (Kaye et al., 2011)。以上より、Helix 8 は、受容体機能に非常に重要な領域と考えられる。現在は、2 次構造予測ツールにより、多くの GPCR で Helix 8 構造の存在が予測されている。

ラット MCHR1 においても、細胞内 C 末端領域の膜近位に存在する 316-325 番目のアミノ酸が Helix 8 構造を形成すると予測され (図 17)、その領域に存在する Arg319 と Lys320 が Gi/o と Gq 両方の共役に重要であることが報告された (Tetsuka et al., 2004)。さらに、哺乳類 MCHR1 の Helix 8 領域には中間径フィラメント結合タンパク質であるペリプラキン、シナプス可塑性や神経突起の伸長に関与するニューロコンドリンが結合し、MCHR1 の細胞内シグナリングを阻害する (Murdoch et al., 2005; Francke et al., 2006)。従って、哺乳類 MCHR1 においても Helix 8 は、受容体活性に重要な領域であることが推測される。実際に先行研究から、Thr317 以降のアミノ酸を切断し Helix 8 構造を完全に欠失させた変異体は、MCH 結合能を維持しながらも細胞内カルシウム動員能が消失することが報告されている (Tetsuka et al., 2004)。しかしながら、Arg321 以降を欠損した変異体では細胞内カルシウム動員能が認められたので、318-321 間に存在する 4 つのアミノ酸残基 (Phe318、Arg319、Lys320、Arg321) が、受容体の機能発現に関与すると推測された。その後、実際に Arg319、Lys320、Arg321 が受容体の膜移行に、Arg319、Lys320 は受容体の細胞内カルシウム動員に重要であることが明らかになった。しかし、意外な

ことに、Phe318 を Ala に置換すると EC50 値が 0.25 倍に低下し、受容体機能が亢進する傾向が示された (Tetsuka et al., 2004)。

Phe318 は NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフを構成するアミノ酸であり、このモチーフは第 7 膜貫通領域から細胞内 C 末端領域にかけて存在する。NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフはロドプシンファミリー(クラス A) GPCR 間で高度に保存されることから (Gether, 2000; Huynh et al., 2009)、ファミリーを通して非常に重要な役割を担うことが予測される。実際、ロドプシンにおいて、このモチーフ内の Tyr や Phe がリガンド結合によるコンフォメーション変化の最適化に極めて重要であることが見出された (Acharya et al., 1996)。さらに、Phe は  $\beta$ 1 アドレナリン受容体、 $\alpha_{2B}$  アドレナリン受容体、A1 アデノシン受容体の小胞体を介した受容体輸送に関与することが報告された (Delos Santos et al., 2006; Duvernay et al., 2009; Málaga-Diéguez et al., 2010)。中でも、 $\alpha_{2B}$  アドレナリン受容体における Phe を Ala に置換すると、野生型と比べて細胞膜発現量が 91% も低下した (Duvernay et al., 2009)。対照的に、哺乳類 MCHR1 では Phe318 を Ala に置換しても機能低下を示さず、逆に機能亢進傾向を示すことを考慮すると、MCHR1 の Phe318 は興味深いアミノ酸である。そこで、哺乳類 MCHR1 の NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフ、特に Phe318 の機能を明らかにするために、NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフ内でアミノ酸置換体を作製し、細胞内カルシウム濃度測定による受容体機能の解析を行った。その結果、Phe318 を Lys に置換した F318K において有意な機能亢進が認められた。哺乳類 MCHR1 において、細胞内カルシウム動員は Gi/o、Gq のそれぞれと共役することにより引き起こされる (図 1)。そこでさらに、Gi/o 系に選択的な GTP $\gamma$ S 結合能測定を行うことで、F318K の機能亢進が Gi/o もしくは Gq どちらの活性に由来するのかを検証した。

MCHR1 の F318K のように GPCR の変異体が野生型よりも機能亢進を示す例は非常に稀であり、これまでアミノ酸置換により機能亢進を示した GPCR は数例しか報告されていない。その一つが、嗅覚受容体の第 6 膜貫通領域に存在する嗅覚受容体特異的モチーフである KAFSTC の Ser を Ala 又は Val に置換した例である (Kato et al., 2008)。他には、Neuropeptide S 受容体の細胞外第 1 ループ領域に位置する Asn107 を Ile に置換した N107I も機能亢進を示すという報告があるが (Clark et al., 2010)、これは受容体膜発現量の増加により機能亢進が起きたと考えられている。一方、MCHR1 における F318K は受容体膜発現量に変化はなかった。即ち、F318K の機能亢進は受容体発現量増加に起因せず、他の GPCR とは異なる分子メカニズムで生じたと考えられる。

そこで私は、F318K 機能亢進の分子メカニズム解明を目指した。先行研究により、哺乳類 MCHR1 において Tyr311 と Phe318 の相互作用が予測されている (Yasuda et al., 2009)。立体構造が判明しているロドプシン、 $\beta$ 1 アドレナリン受容体及び A<sub>2A</sub> アデノシン受容体においても、Tyr311-Phe318 相当部位の結合が示唆されている (Palczewski et al., 2000; Jaakola et al., 2008; Warne et al., 2008)。ウシロドプシンをテンプレートとした哺乳類 MCHR1 の立体構造予測によると、MCHR1 は Asp79-Tyr311 間で水素結合を形成し、F318K では Asp79-Lys318 間に水素結合が置き換わることにより受容体機能が亢進する可能性が示唆された (サントリー生命科学財団生物有機科学研究所 堀川学先生、私信)。この仮説を検証するために、アミノ酸置換体 D79L、D79N 及び D79L/F318K、D79N/F318K を作製し、受容体機能の解析を行った。さらにロドプシ

ンとトランスデューシンの相互作用における 3 次元モデル (Kleinau et al., 2010) を基に、哺乳類 MCHR1-Gq 及び MCHR1-Gi/o の 3 次元相同モデルを作製し、構造上の特徴についても調べた。

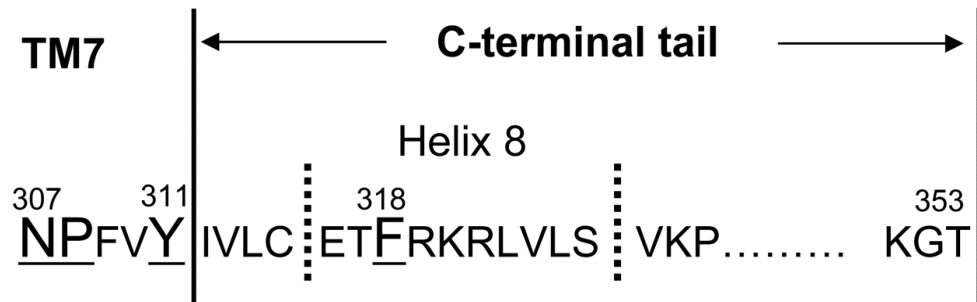


図 17. 哺乳類 MCHR1 における NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフ。NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフを含むラット MCHR1 の細胞内 C 末端領域周囲のアミノ酸配列を示す。細胞内 C 末端領域における 316-325 番目のアミノ酸は両親媒性らせん構造である Helix 8 構造を形成する。TM7 は第 7 膜貫通領域の略。

## Ⅲ-2：実験材料及び方法

### Ⅲ-2-1：MCHR1 変異体の作製

哺乳類細胞用発現ベクターである pcDNA 3.1(+)に、ラット FMCHR1 又はヒト MCHR2 を挿入した発現プラスミドを変異体作製の鋳型として用いた。

### プライマーデザインと PCR 反応

#### ・プライマーの配列

MCH 受容体の変異体作製のために用いたプライマーの配列を下表に示した。

プライマー名	Sequence
MCHR2 : F313K	5'-CTGAGTGGAAATAAGCAGAAACGTCTG-3'
MCHR2 : F313K-RV	5'-CAGACGTTTCTGCTTATTTCCACTCAG-3'
MCHR1 : D79L	5'-AACGTCCCCCTCATCTTCATC-3'
MCHR1 : D79L-RV	5'-GATGAAGATGAGGGGGACGTT-3'
MCHR1 : D79N	5'-CAACGTCCCCAACATCTTCATC-3'
MCHR1 : D79N-RV	5'-GATGAAGATGTTGGGGACGTTG-3'

変異体作製方法は第Ⅱ章 2-1 と同様に行った。

### Ⅲ-2-2：細胞培養及びトランスフェクション

方法は第Ⅰ章 2-1 及び第Ⅱ章 2-2 と同様に行った。細胞は HEK293T 細胞、CHO dhfr(-)細胞、COS-7 細胞を用いた。

### Ⅲ-2-3：ウエスタンブロット解析

方法は第Ⅱ章 2-3 と同様に行った

### Ⅲ-2-4：フローサイトメトリー解析

方法は第Ⅱ章 2-5 と同様に行った。

### Ⅲ-2-5：細胞免疫化学染色

方法は第Ⅱ章 2-4 と同様に行った。

受容体インターナリゼーション能の評価には、細胞を serum free medium で3時間培養した後、37°Cで 1  $\mu$ M MCH in HBSS/20 mM HEPES により 10、30 あるいは 60 分間刺激したサンプルを用いた。その後、上述と同様の方法で細胞固定及び膜透過処理、蛍光免疫染色を行った。

### Ⅲ-2-6：細胞内カルシウム濃度測定

方法は第Ⅰ章 2-2 と同様に行った。



### III-2-7: GTP $\gamma$ S 結合能測定

方法は第II章 2-8 と同様に行った。

### Ⅲ-3 : 結果

#### Ⅲ-3-1 : 高度保存 NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフの機能解析

クラス A ファミリー間で保存性の高い NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフの哺乳類 MCHR1 における機能を解析するために、各アミノ酸を Ala に置換した複数の置換体を作製した (図 17)。まず、リポフェクション法により FMCHR1 又は作製した各置換体を HEK293T 細胞に一過性発現させ、抗 Flag タグ抗体を用いたウエスタンブロット法により、糖鎖付加パターン及び発現量を調べた。先行研究と同様に、FMCHR1 発現細胞において N 型糖鎖付加の様式が異なると思われる複数のバンド (35, 44/45, 60 kDa) が検出された (図 18) (Saito et al., 2003, 2005; Tetsuka et al., 2004)。また、N307A、Y311A、F318A 置換体は FMCHR1 と同様の糖鎖付加パターン及び発現量を示した。しかしながら、P308A は 60 kDa の受容体発現量が著しく低下した (図 18、矢印)。これは P308A 置換によって糖鎖付加が欠損したためであり、この現象は以前に行った MCHR1 の糖鎖付加研究及び他の MCHR1 研究においても認められている (Saito et al., 2003; Aizaki et al., 2009)。さらに、細胞膜上における FMCHR1 及び置換体の発現量を定量するために、抗 Flag タグ抗体を用いた FACSscan flow cytometry 解析を行った。FMCHR1 と比較して、F318A の膜発現レベルは FMCHR1 と同程度であったが、N307A 及び Y311A の膜発現量はそれぞれ 23%、30% の低下を示した (表 9)。また、P308A は 90%以上膜発現量が減少し、細胞膜に運ばれることなく、主に細胞内に保持されている可能性が示唆された (図 18、表 9)。

次に、NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフの Ala 置換による受容体機能の変化を調べるために、細胞内情報伝達系の解析を行った。哺乳類 MCHR1 は MCH 刺激により、Gi/o 及び Gq を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させることが知られている (図 1)。そこで、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、FMCHR1 又は置換体が一過性に発現した HEK293T 細胞を MCH で刺激した際の細胞内カルシウム濃度測定を実施した。一般的に、DRY や NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフといった高度に保存されたアミノ酸を置換すると、受容体機能の低下を引き起こす。実際、P308A は細胞膜発現量が劇的に低下しており (表 9)、10  $\mu$ M MCH で刺激しても細胞内カルシウム動員を示さなかった (図 19、表 10)。N307A 及び Y311A は MCH 刺激により濃度依存的な細胞内カルシウム動員を示したが、FMCHR1 と比べて 20-30%最大反応が低下し、EC50 値 はそれぞれ 21 倍、8 倍上昇した (表 10)。しかしながら、MCHR1 の F318A は他の GPCR 研究における報告とは異なる性質を示し (Delos Santos et al., 2006; Duvernay et al., 2009; Málaga-Diéguez et al., 2010; Kaye et al., 2011)、EC50 値及び最大反応は FMCHR1 と同程度であった。これらの結果は、NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフ内の他のアミノ酸残基と比較して、Phe は MCHR1 において異なる特徴を有することを意味する。

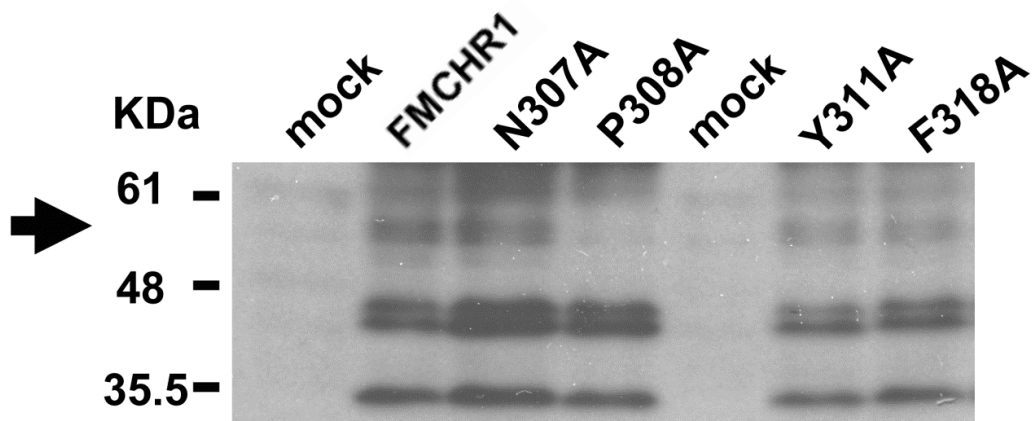


図 18. NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフにおける置換体の発現解析。FMCHR1 と NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフにおける Ala 置換体を HEK293T 細胞に一過性発現させ、糖鎖付加パターン及び発現量を、抗 Flag タグ抗体を用いてウエスタンブロット法で解析した。FMCHR1 をウエスタンブロット解析すると、35、44/45、60 kDa のバンドが検出される。矢印は P308A において発現低下が認められた 60 kDa のバンドを示す。

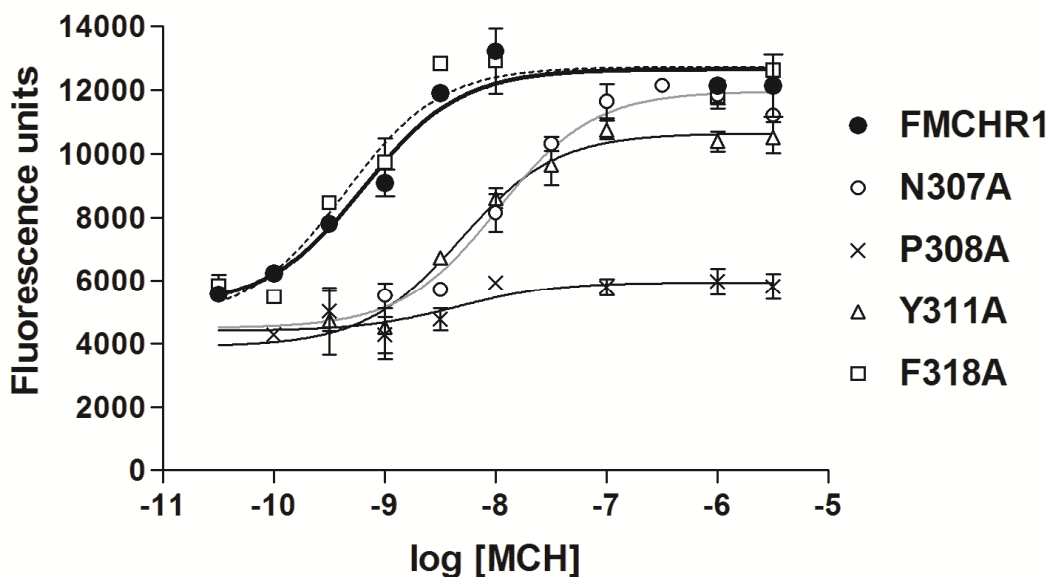


図 19. NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフにおける置換体の細胞内カルシウム動員能解析。FMCHR1 または NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフの Ala 置換体が一過性に発現した HEK293T 細胞の細胞内カルシウム濃度変化を示す。リガンドにはラット MCH を使用し、細胞内カルシウム濃度の変化は蛍光マイクロプレートリーダー Flexstation を用いて測定した。濃度反応曲線は duplicate で 3 回以上独立して実験を行った際の代表例を示す。

表 9. FMCHR1 及び置換体の受容体膜発現量解析。

Receptor	Cell surface expression (FACS, %)
<b>FMCHR1</b>	<b>100</b>
<b>N307A</b>	<b>77.3 ± 0.3<sup>b</sup></b>
<b>P308A</b>	<b>6.3 ± 1.0<sup>b</sup></b>
<b>Y311A</b>	<b>69.3 ± 9.2<sup>a</sup></b>
<b>F318A</b>	<b>91.0 ± 8.7</b>
<b>F318R</b>	<b>90.5 ± 9.5</b>
<b>F318K</b>	<b>96.2 ± 5.8</b>
<b>F318P</b>	<b>90.2 ± 9.1</b>

HEK293T 細胞に各受容体を一過性発現させて FACScan flow cytometry 解析を行った際の、受容体膜発現量を示す。

数値は triplicate で 3 回又は 4 回独立して実験を行った際の平均値±S.E.M を表す。

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01 significantly different from FMCHR1 by Student's *t*-test.

表 10. FMCHR1 及び NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフにおける置換体の細胞内カルシウム動員能解析。

Receptor	EC <sub>50</sub> of MCH (nM)	Maximum Response (%)
<b>FMCHR1</b>	<b>1.5 ± 0.4</b>	<b>100</b>
<b>N307A</b>	<b>32.5 ± 9.0</b>	<b>83.5 ± 5.4</b>
<b>P308A</b>	—	—
<b>Y311A</b>	<b>12.2 ± 2.3</b>	<b>77.3 ± 10.0</b>
<b>F318A</b>	<b>1.2 ± 0.3</b>	<b>101 ± 8.2</b>

HEK293T 細胞に各受容体を一過性発現させ、細胞内カルシウム濃度測定を行った際の EC<sub>50</sub> 値及び最大反応値を示す。P308A は MCH 刺激による細胞内カルシウム動員が認められなかった (—)。

数値は duplicate で 3 回以上独立して実験を行った際の平均値±S.E.M を表す。

### III-3-2 : Phe318 置換体の機能解析

NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフにおける Phe318 の機能をさらに調べるために、Phe318 を様々なアミノ酸に置換し解析を行った。具体的には、Helix 構造が破壊されることにより、受容体機能が劇的に変化することが予測される Pro と、正の電荷を有する Arg 及び Lys に置換した。抗 Flag タグ抗体を用いたウエスタンブロット解析の結果、F318A、F318P、F318R、F318K は FMCHR1 と同様の糖鎖付加パターンを示し、発現量も変化しなかった (図 20)。次に、これら置換体の受容体発現を詳細に解析するために、受容体膜発現量の定量と細胞内局在の観察を行った。FACSscan flow cytometry 解析の結果、FMCHR1 と比較して F318A、F318P、F318R、F318K はいずれも受容体膜発現量において有意差は認められなかった (表 9)。また、細胞免疫化学法によると、膜透過処理を行っていない細胞において、F318A、F318P、F318R、F318K はいずれも細胞膜上に局在しており、蛍光強度は FMCHR1 と比べておよそ等しかった (図 21 上部)。Triton X-100 による膜透過処理を行った細胞においても、FMCHR1 と同様に全ての置換体は主に膜上に発現していた (図 21 下部)。以上の結果より、NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフにおける Phe318 の置換は、受容体膜発現量と細胞内局在のどちらにも影響を与えないことが認められた。この結果は、Phe を置換することで膜輸送が劇的に低下した、 $\alpha_{2B}$  アドレナリン受容体をはじめとする他の GPCR 変異体の結果と著しく異なる (Delos Santos et al., 2006; Duvernay et al., 2009; Málaga-Diéguez et al., 2010)。さらに、ラット MCHR1 は MCH 刺激後 30 分で十分な受容体インターナリゼーションを引き起こすことから (Saito et al., 2004)、蛍光顕微鏡を用いて置換体のインターナリゼーション能を調べた。先行研究と同様に、FMCHR1 は 30 分間の MCH 刺激により膜上における発現が消失し、細胞内に FMCHR1 を含んだ小胞が観察された。この現象は 60 分間 MCH 刺激した場合においても観察された。F318K 発現細胞を用いて同様に実験を行ったところ、FMCHR1 と同様の受容体インターナリゼーション能を示した (図 22)。従って、Phe318 は受容体インターナリゼーションに関与しないことが分かった。

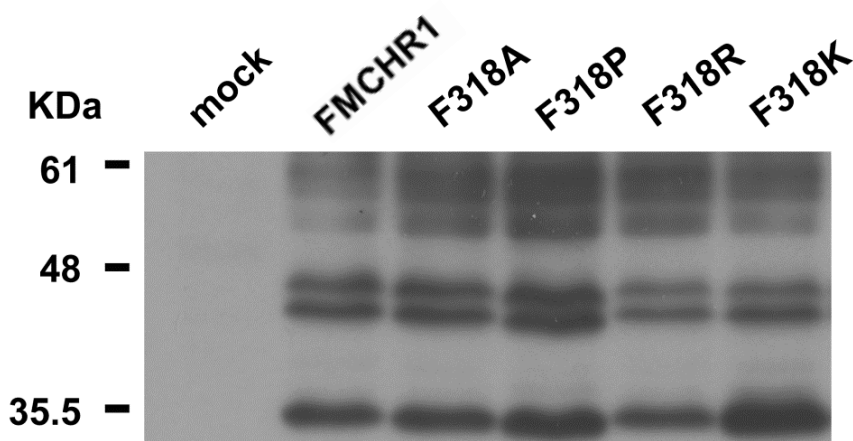
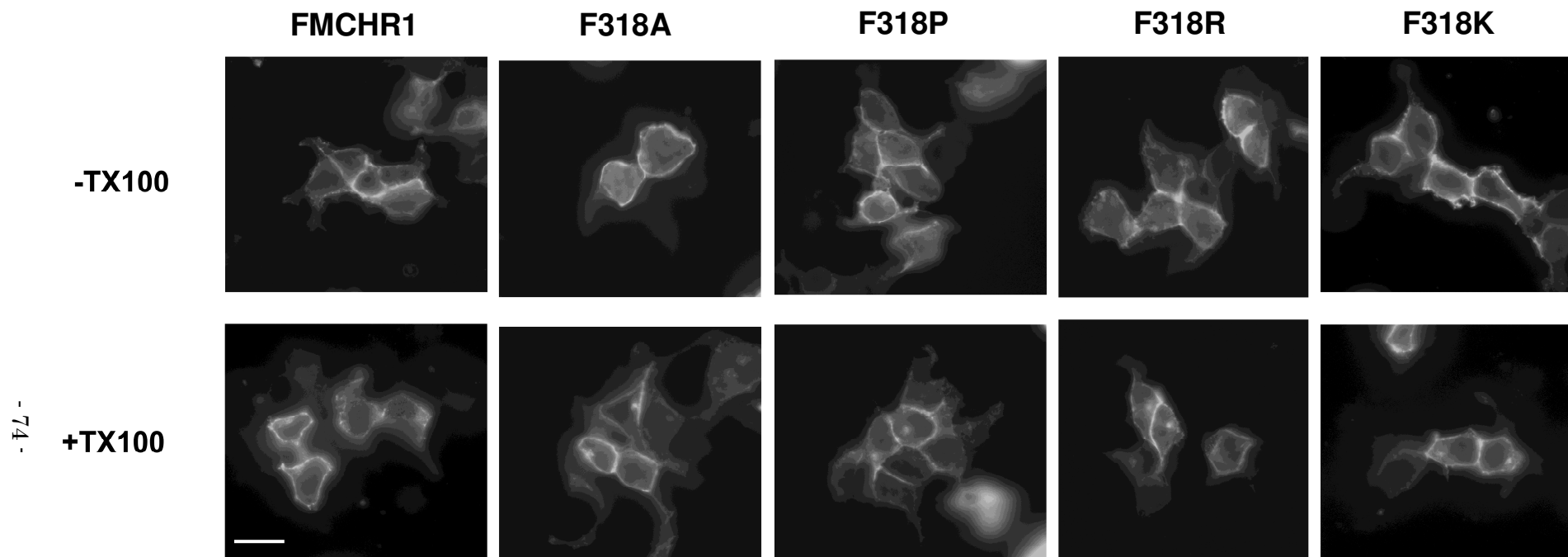
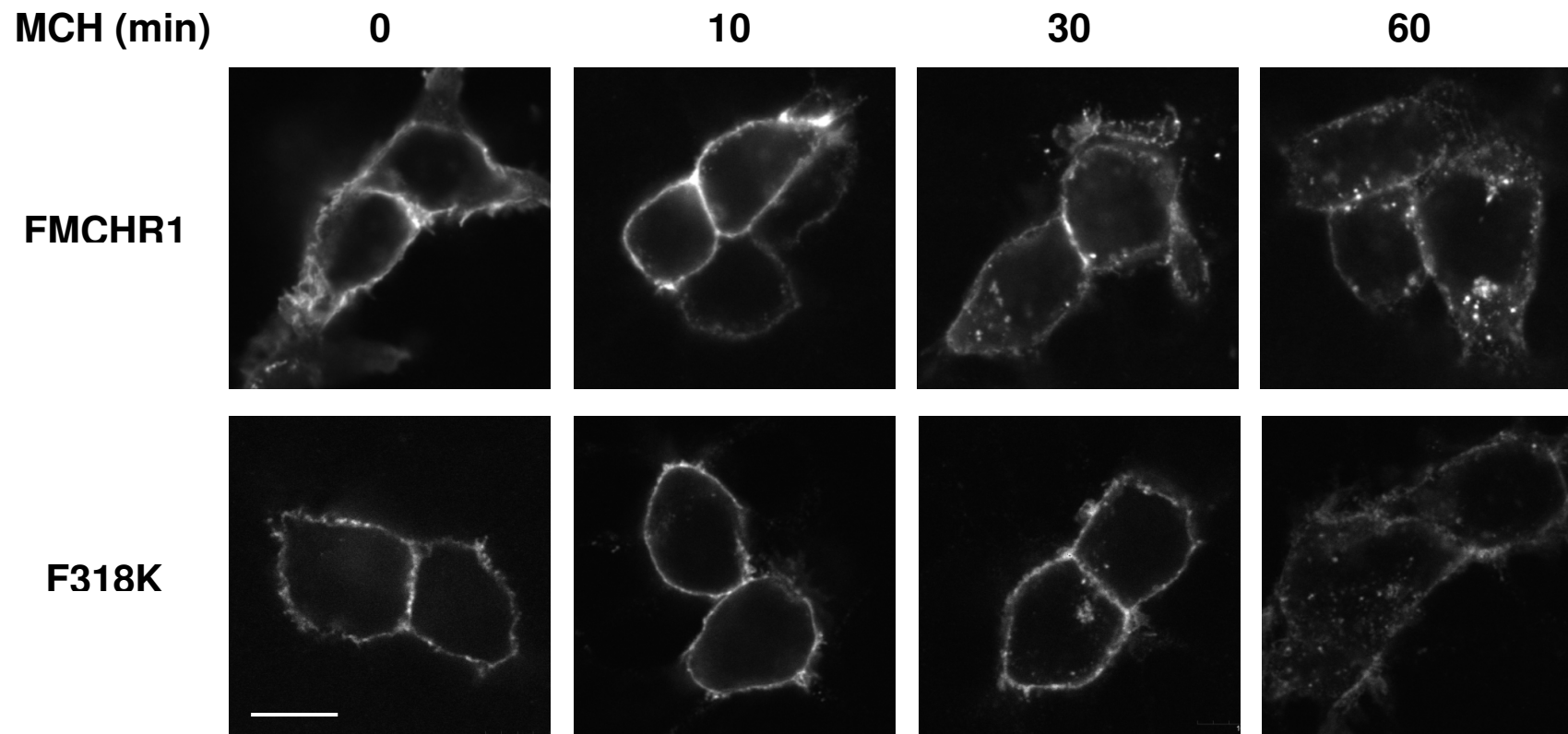


図 20. Phe318 置換体の受容体発現解析。HEK293T 細胞に一過性発現した FMCHR1 と Phe318 置換体の糖鎖付加パターン及び発現量を、抗 Flag タグ抗体を用いてウエスタンブロット法で解析した。FMCHR1 をウエスタンブロット解析すると、35、44/45、60 kDa のバンドが検出される。



-74-

図 21. Phe318 置換体の細胞内局在解析。 HEK293T 細胞に一過性発現させた FMCHR1 又は Phe318 置換体の細胞内局在を、抗 Flag タグ抗体を用いて細胞免疫化学染色法で解析した。-TX100（上部）は膜透過処理を行ってない細胞を、+TX100（下部）は膜透過処理を行った細胞を示す。細胞の観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いた。Bar, 10 $\mu$ m。



- 75 -

図 22. F318K の受容体インターナリゼーション能解析。Serum Free 処理 3 時間後、FMCHR1 又は F318K を一過性に発現させた HEK293T 細胞に 1  $\mu$ M MCH を各時間添加し、免疫化学染色を行った。Bar, 10 $\mu$ m。

次に、Phe318 置換体の細胞内カルシウム動員能を調べた (表 11、図 23)。いずれの置換体も濃度依存的に細胞内カルシウム動員を示し、F318P 及び F318R の EC50 値はそれぞれ 7.8 nM、0.8 nM、最大反応は FMCHR1 と同程度であった。そして興味深いことに、F318K の EC50 値は  $0.4 \pm 0.1$  nM を示し、FMCHR1 ( $2.5 \pm 0.8$  nM) と比較して細胞内カルシウム動員能が有意に亢進した (表 11)。最大反応に関しては、両者の間で有意差は認められなかった。そこで、さらに Phe318 を極性の持たないアミノ酸 (Gly、Ser、Cys) や疎水性アミノ酸 (Trp)、塩基性アミノ酸 (His) に置換した。同様に細胞内カルシウム動員能を測定したが、いずれの置換体も機能亢進を示さなかった (表 11)。以上より、作製した置換体の中で、F318K と F318R は有意に細胞内カルシウム動員能が亢進し、特に F318K の方が F318R よりも EC50 値が低い傾向があることから、高い応答を引き起こすことが分かった。また、MCH 以外に、哺乳類 MCHR1 に親和性の高いアゴニストである Compound.15 (Bednarek et al., 2002a) をリガンドとして同様に実験を行った。その結果、Compound.15 刺激時においても、FMCHR1 よりも F318K の方が EC50 値が有意に低下した (EC50 値 : FMCHR1 =  $1.3 \pm 0.4$  nM、F318K =  $0.15 \pm 0.10$  nM)。F318K の MCH 刺激に対する細胞内カルシウム応答の亢進は、CHO dhfr(-)細胞及び COS-7 細胞一過性発現時においても認められた (図 24)。CHO dhfr(-)細胞において、F318K の EC50 値は FMCHR1 の 0.3 倍 (図 24A)、COS-7 細胞においても 0.3 倍を示した (図 24B)。従って、F318K の機能亢進はある細胞のみに特異的に起こる現象ではないことが確認された。

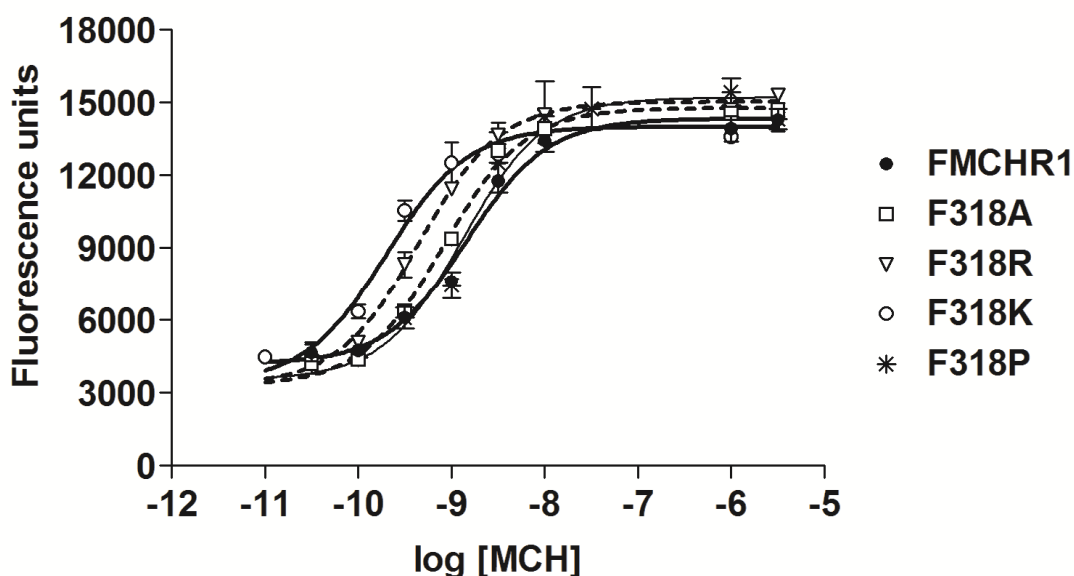


図 23. Phe318 置換体の細胞内カルシウム動員能解析。FMCHR1 または Phe318 置換体が一過性に発現した HEK293T 細胞の細胞内カルシウム濃度変化を示す。実線は FMCHR1 (●)、F318K (○)、F318P (\*) を、破線は F318A (□)、F318R (▽) の濃度反応曲線を表す。リガンドにはラット MCH を使用し、細胞内カルシウム濃度の変化は蛍光マイクロプレートリーダー Flexstation を用いて測定した。濃度反応曲線は duplicate で 3 回以上独立して実験を行った際の代表例を示す。



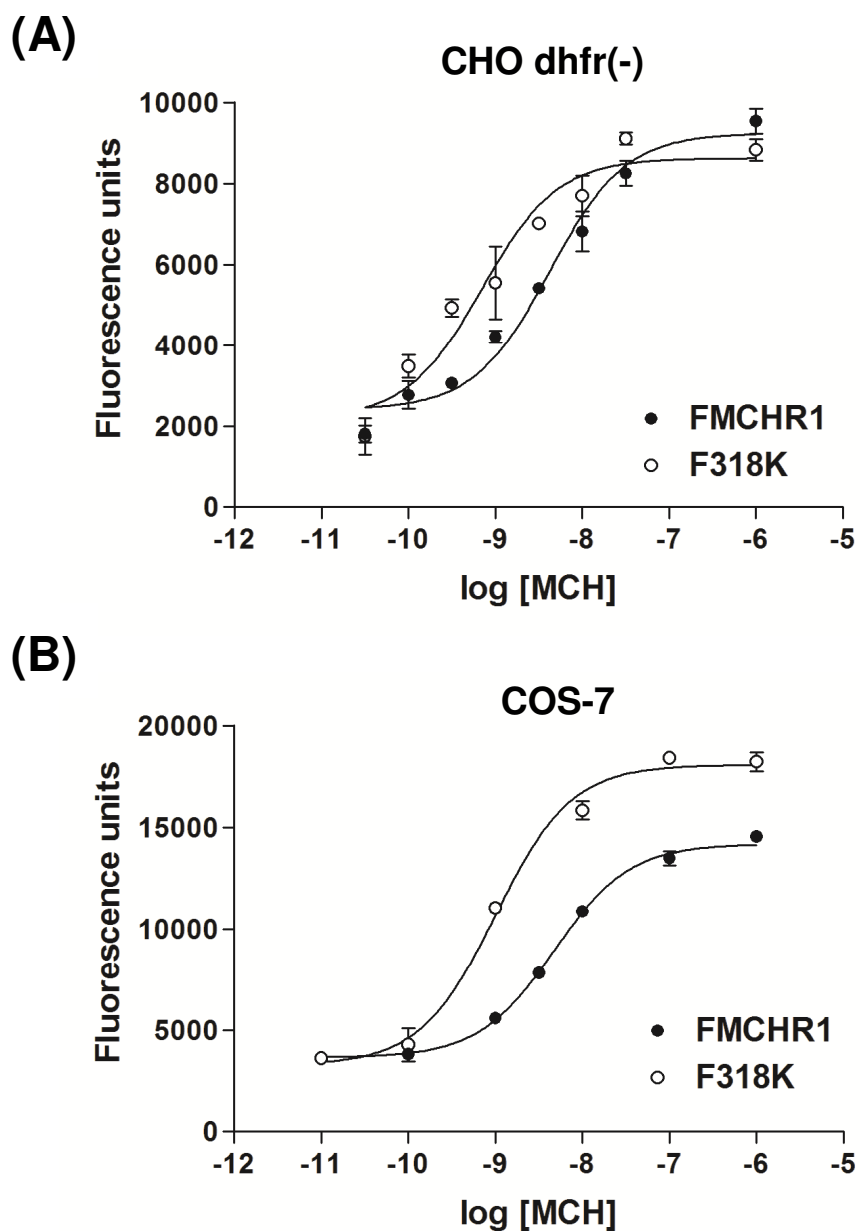


図 24. 様々な細胞株発現時における F318K の細胞内カルシウム動員能解析。FMCHR1 または F318K が一過性に発現した (A) CHO dhfr(-)細胞、(B) COS-7 細胞の細胞内カルシウム濃度変化を示す。リガンドにはラット MCH を使用し、細胞内カルシウム濃度の変化は蛍光マイクロプレートリーダーFlexstation を用いて測定した。濃度反応曲線は duplicate で 3 回以上独立して実験を行った際の代表例を示す。

表 11. FMCHR1 及び Phe318 置換体における細胞内カルシウム動員能解析。

Receptor	EC <sub>50</sub> of MCH (nM)	Maximum Response (%)
<b>FMCHR1</b>	<b>2.5 ± 0.8</b>	<b>100</b>
<b>F318A</b>	<b>1.2 ± 0.2</b>	<b>92.4 ± 7.2</b>
<b>F318P</b>	<b>7.8 ± 3.2<sup>a</sup></b>	<b>93.7 ± 11.4</b>
<b>F318R</b>	<b>0.8 ± 0.3<sup>b</sup></b>	<b>99.4 ± 3.0</b>
<b>F318K</b>	<b>0.4 ± 0.1<sup>b</sup></b>	<b>102.0 ± 8.0</b>
-----		
<b>F318G</b>	<b>2.3 ± 0.9</b>	<b>99.6 ± 9.8</b>
<b>F318S</b>	<b>2.4 ± 0.7</b>	<b>104.7 ± 18.7</b>
<b>F318C</b>	<b>9.7 ± 1.2<sup>b</sup></b>	<b>101.3 ± 17.7</b>
<b>F318W</b>	<b>3.1 ± 1.3</b>	<b>102.6 ± 9.2</b>
<b>F318H</b>	<b>3.6 ± 0.7</b>	<b>92.3 ± 16.7</b>
<b>E316K</b>	<b>2.2 ± 0.5</b>	<b>99.7 ± 10.9</b>
<b>T317K</b>	<b>3.8 ± 0.9</b>	<b>82.6 ± 6.4<sup>a</sup></b>
<b>R319K/R321K</b>	<b>2.6 ± 0.5</b>	<b>84.8 ± 9.5<sup>a</sup></b>

HEK293T 細胞に各受容体を一過性発現させ、細胞内カルシウム濃度測定を行った際の EC50 値及び最大反応値を示す。

数値は duplicate で 3 回以上独立して実験を行った際の平均値±S.E.M を表す。

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01 significantly different from FMCHR1 by Student's *t*-test.

さらに Lys 置換による受容体機能亢進に関して、Phe318 の位置的な特異性を調べるため、Phe318 周辺のアミノ酸をそれぞれ Lys へ置換した (図 25A)。作製した置換体 (E316K、T317K、R319K/R321K) はいずれも、細胞内カルシウム動員能において機能亢進を示さなかった。T317K 及び R319K/R321K に関しては、最大反応が FMCHR1 よりも有意に低下した (表 11、図 25B)。以上より、細胞内カルシウム動員における MCHR1 の機能亢進は Phe318 に特徴的な現象であり、このことは Phe318 の位置に Lys が存在することが効率的な受容体コンフォメーションの変化やカルシウムを動員する G タンパク質との効率的な相互作用に重要であることを示唆する。

次に、MCHR1 のサブタイプであるヒト MCHR2 において、相同位置にある Phe について



表 12. MCHR2 及び F313K 置換体における細胞内カルシウム動員能解析。

Receptor	EC <sub>50</sub> of MCH (nM)	Maximum Response (%)
MCHR2	5.2 ± 2.5	100
F313K/MCHR2	5.2 ± 2.5	78.7 ± 7.7

ヒト MCHR2 における Phe313 はラット MCHR1 の Phe318 に相当する。

HEK293T 細胞に各受容体を一過性発現させ、細胞内カルシウム濃度測定を行った際の EC<sub>50</sub> 値及び最大反応値を示す。

数値は duplicate で 2 回独立して実験を行った際の平均値±S.E.M を表す。

### III-3-3 : F318K の G タンパク質選択性解明

先行研究において、受容体の機能亢進が観察された Neuropeptide S 受容体の置換体 N107I は、受容体の膜移行効率が上昇することで、細胞内シグナル伝達に影響を与えたと推測される (Clark et al., 2010)。一方、F318K の膜発現量は野生型と同程度でありながらも (図 20、21、表 9)、受容体機能が著しく亢進した (図 23、表 11)。この F318K の機能亢進には 2 つの理由が考えられる。それは F318K 変異による立体構造の変化により①MCH との結合能が上昇したため、もしくは②G タンパク質との親和性が上昇したためである。しかしながら、①の MCH 結合能に関しては、先行研究において、Thr317 以降の細胞内 C 末端領域を切除してもリガンド結合能測定で変化が見られなかったことから、Phe318 はリガンド結合に関与しないことが示唆された (Tetsuka et al., 2004)。従って、②G タンパク質に対する親和性の上昇により、F318K の受容体機能が亢進したと予想される。

哺乳類 MCHR1 において、細胞内カルシウムの動員は Gi/o、Gq 両方の G タンパク質と共役することで引き起こされる (図 1)。そこで、細胞内カルシウム濃度測定で観察された F318K の機能亢進が、Gi/o、Gq どちらのシグナル伝達系の活性化によるものかを調べた。まずは、Gi/o を特異的に不活性化する百日咳毒素 (PTX) を細胞に前処理して細胞内カルシウム濃度測定を行った。FMCHR1 発現細胞において PTX を添加すると、EC<sub>50</sub> 値は 1.1 ± 0.3 nM から 3.6 ± 0.6 nM に上昇し、+PTX/-PTX 比は 3.3 であった。次に、PTX 前処理による F318K 発現細胞の EC<sub>50</sub> 値の変化を解析したところ、PTX 未処理時の EC<sub>50</sub> 値は 0.13 ± 0.03 nM、PTX 処理時の EC<sub>50</sub> 値は 0.48 ± 0.08 nM であり、+PTX/-PTX 比は 3.7 を示した。F318K において、PTX は受容体の活性を低下させるが、完全には抑制しないことから、F318K は FMCHR1 と同様に Gi/o 及び Gq 両方を介して細胞内カルシウムを動員することが分かった。また、FMCHR1 と F318K 間で +PTX/-PTX 比が同程度であったことから、置換体の PTX 感受性、即ち Gi/o 活性は野生型と同程度であると解釈出来る。しかしながら、このような測定系では F318K の機能亢進がどの G タンパク質との共役亢進によるかを正確に判断するのは困難である。従って、その他のシグナル伝達系を解析する必要がある。

哺乳類 MCHR1 発現細胞に MCH を刺激すると Gi/o を介した経路でアデニル酸シクラーゼの活性を抑制し、cAMP 産生を抑制することが報告されている (Chambers et al., 1999; Saito et al., 1999; Hawes et al., 2000)。そこで、F318K の Gi/o 活性を測定するため、フォルスコリンを用いて cAMP 量測定を実施した。しかしながら、F318K 細胞が安定発現した HEK293T 細胞のクローン株を作製したが、そのシグナル系は一過性発現時と比べてかなり異なっていた。即ち、F318K のクローンは 100 nM MCH を添加しても、フォルスコリン誘発性の cAMP 産生を抑制しなかった (図 26)。これらの結果は、F318K 安定発現クローン株は Gi/o と共役する能力を消失していることを示す。ウエスタンブロット解析によると、置換体のタンパク質量及び糖鎖付加パターンは FMCHR1 と同程度であった (data not shown)。従って、F318K 安定発現細胞における Gi/o 活性の消失は、長期間に渡り抗生物質を投与したことによる細胞内環境や機能の異常によるものであると考えられる。

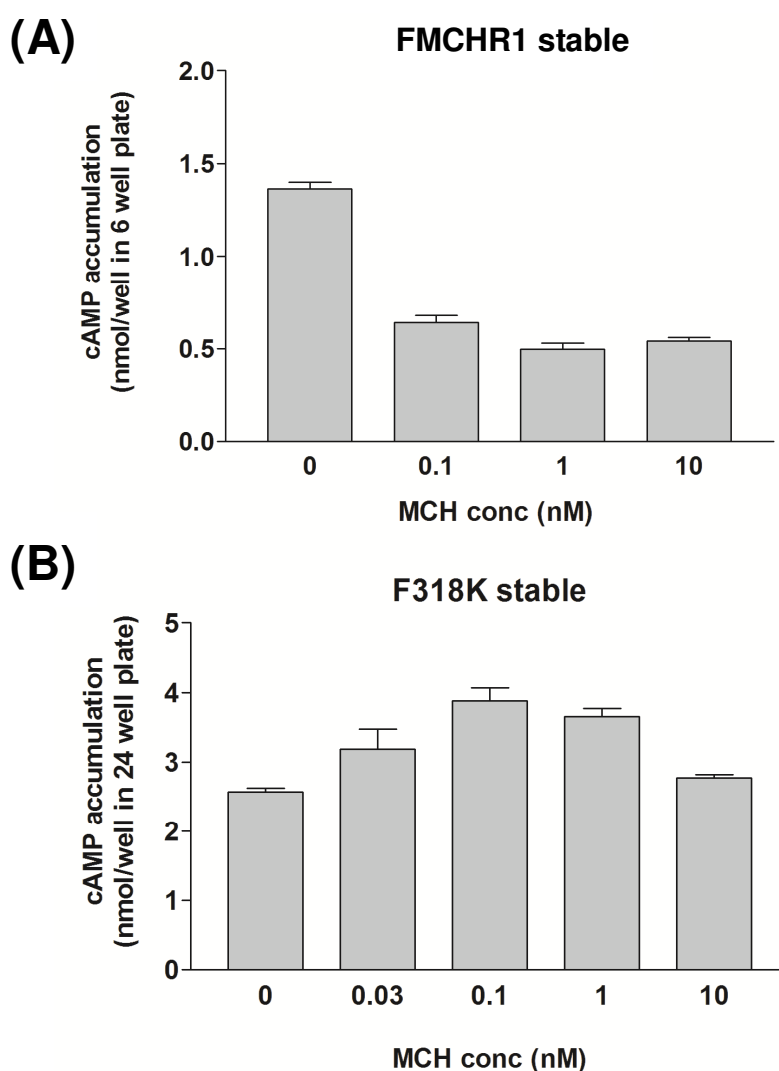


図 26. F318K における cAMP 量解析。(A) FMCHR1 または (B) F318K が安定発現した HEK293T 細胞において、1  $\mu$ M Forskolin 及び各濃度のラット MCH を 15 分間添加した際の cAMP 量 (6 又は 24 well plate における 1 well の総量) を示す。グラフはいずれも duplicate で 2 回以上独立して実験を行った際の代表例である。

以上のように F318K 安定発現細胞の cAMP 量測定が困難であることから、代わりに一過性発現系においても測定可能であり、なおかつ Gi/o 選択的なアッセイ系である GTP $\gamma$ S 結合能を解析した。GTP $\gamma$ S は加水分解抵抗性の GTP 類縁体である。G タンパク質  $\alpha$  サブユニットにおける GDP-GTP 交換反応の際、Gi/o は他のファミリーよりも高い割合で交換反応が生じる。従って、 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  に対する結合能を測定することで、受容体の Gi/o 活性の測定が可能になる (Milligan, 2003)。実際に、GTP $\gamma$ S 結合能測定は様々な GPCR において Gi/o 活性を測定するために広く利用されてきた。そこで、FMCHR1 又は F318K が一過性発現した HEK293T 細胞を用いて  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  結合能を測定した。その結果、FMCHR1 と F318K で同様に濃度依存的な GTP $\gamma$ S の結合が認められた (図 27)。FMCHR1 の EC<sub>50</sub> 値は  $0.23 \pm 0.07$  nM、最大反応は  $208.3 \pm 25.2\%$  を示した。一方、F318K の EC<sub>50</sub> 値は  $0.47 \pm 0.25$  nM、最大反応は  $190.6 \pm 20.3\%$  であった。F318K は EC<sub>50</sub> 値、最大反応共に FMCHR1 と比べて有意差は認められず、FMCHR1 と F318K は同程度の Gi/o 活性であることが判明した。リガンド非添加時の定常状態における GTP $\gamma$ S 結合量は両者の間で有意差はなかった (FMCHR1 : 100%、F318K :  $97.6 \pm 0.4\%$ )。以上より、細胞内カルシウム濃度測定で観察された F318K の機能亢進は、Gi/o ではなく Gq に対する選択的な親和性の上昇に由来すると予想される。

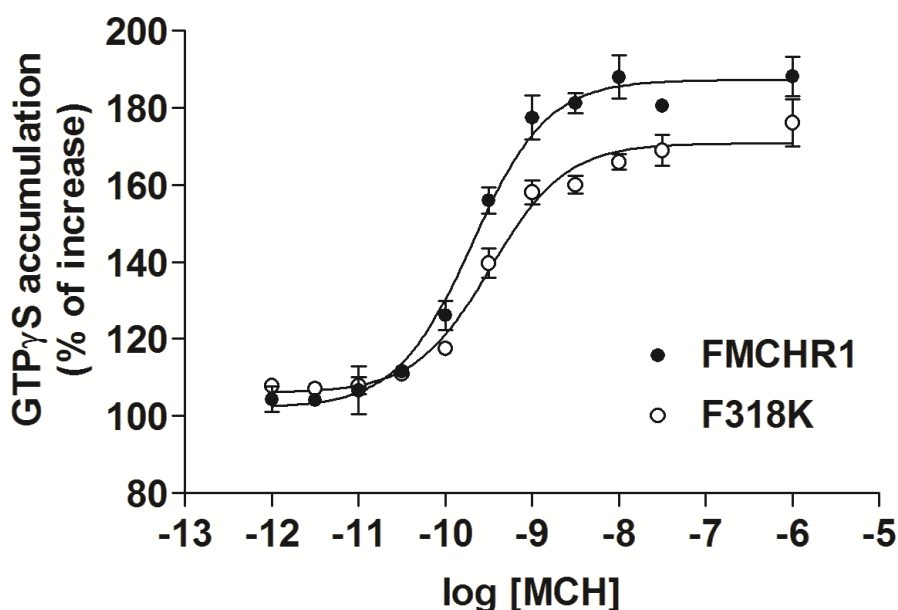


図 27. F318K 置換体の GTP $\gamma$ S 結合能解析。FMCHR1 (●) または F318K (○) が一過性に発現した HEK293T 細胞における GTP $\gamma$ S 結合量を示す。リガンドにはラット MCH を使用した。値は MCH 未添加時を 100% と設定した際の増加率 (%) を表す。濃度反応曲線は triplicate で 3 回以上独立して実験を行った際の代表例を示す。

### III-3-4 : F318K の機能亢進に関わる分子メカニズム

ウシロドプシンをテンプレートとした哺乳類 MCHR1 の立体構造予測(使用ソフト:Discovery Studio Visualizer、Accelrys) から、細胞内第 1 ループ領域に存在する 79 番目の Asp と第 7 膜貫通領域に存在する 311 番目の Tyr が水素結合することが推測された(サントリー生命科学財団生物有機科学研究所 堀川学先生、私信)。この Asp79-Tyr311 間の水素結合が、F318K の置換により Asp79-Lys318 に置き換わることで、F318K の機能亢進が起こると示唆された。そこで、Asp79 を中性で極性を持たない Leu に置換した際に、F318K の機能亢進にどのような影響を与えるかを検討した。また、同じファミリーに含まれるロドプシンでは Asp79 相同部位が Asn である可能性も考慮し、D79N の F318K に対する影響も調べた。

アミノ酸置換体 D79L、D79N を HEK293T 細胞に一過性に発現させて受容体発現の確認を行ったところ、どちらも野生型と比較して発現量、糖鎖付加パターンは同程度であった(図 28A)。D79L 又は D79N 発現細胞を用いて細胞内カルシウム濃度を測定したところ、FMCHR1 の EC50 値が 0.50 nM であるのに対し、D79L は 8.44 nM で、野生型と比較して 16.9 倍上昇した(図 28B)。また、最大反応も約 50% の低下を示し、D79L は受容体機能が著しく低下することが確認された。一方、D79N の EC50 値は 3.10 nM と 6.2 倍の上昇を示し、最大反応が約 20% 低下した。従って、D79L と比べると程度は小さいが、D79N も受容体機能が有意に低下することが分かった。

次に、アミノ酸置換体 D79L/F318K、D79N/F318K を作製した。いずれの置換体においても、発現量は若干低下したものの、糖鎖付加パターンは野生型 FMCHR1 と同様であった(図 29A)。細胞内カルシウム濃度測定の結果、F318K の EC50 値は 0.10 nM であり有意な活性亢進を示した。一方 D79L/F318K の場合、EC50 値は 0.47 nM で FMCHR1 と同程度であったが、最大反応は 81.7% と若干の機能低下を示した(図 29B)。D79N/F318K の場合、EC50 値は 0.11 nM で F318K と同様に受容体機能が亢進し、最大反応は 95.1% で有意差はなかった。以上より、D79L/F318K と D79N/F318K はそれぞれ D79L、D79N と比較して受容体機能が亢進していることが認められた。仮に F318K の活性亢進に Asp79 と Lys318 の水素結合が直接的に関与するならば、D79L と D79N に F318K の置換を加えても受容体機能は亢進しないはずである。従って、F318K の機能亢進の分子メカニズムに Asp79-Lys318 間の水素結合のみが直接的に関与する可能性は低いことが示唆された。

そこで、F318K の受容体機能亢進の分子メカニズムの詳細を理解するために、MCHR1-G タンパク質複合体の 3 次元相同モデルを作製した。その際、ロドプシンとトランスデューシンの C 末端 11 残基との活性型複合体結晶構造をテンプレートとして (Kleinau et al., 2010)、①ホモロジーモデリングにより MCHR1-Gq 及び MCHR1-Gi のモデル構造を構築し、②各構造の Phe318 を Lys318 に変換して、分子動力学シミュレーションにより各構造の最適化を堀川学先生に依頼した。そしてこの①、②を基に F318K-Gq と F318K-Gi の 3 次元相同モデル構造を比較した結果、MCHR1-Gq 間において潜在的なアミノ酸のコンタクトがいくつか存在することが見出された。特に、細胞内第 1 ループ領域と Helix 8 における相互作用が示唆され(図 30 左)、この 3 次元複合体モデルにおいても Lys318 と Asp79 の水素結合が予測された。そして、これら 2 つのアミノ酸残基は Gq に存在する Asn357 と近接し、細胞内相互作用を形成していた。しかしながら、先述の通り、Asp79 を Leu や Asn に置換しても F318K の機能亢進が認められたこ

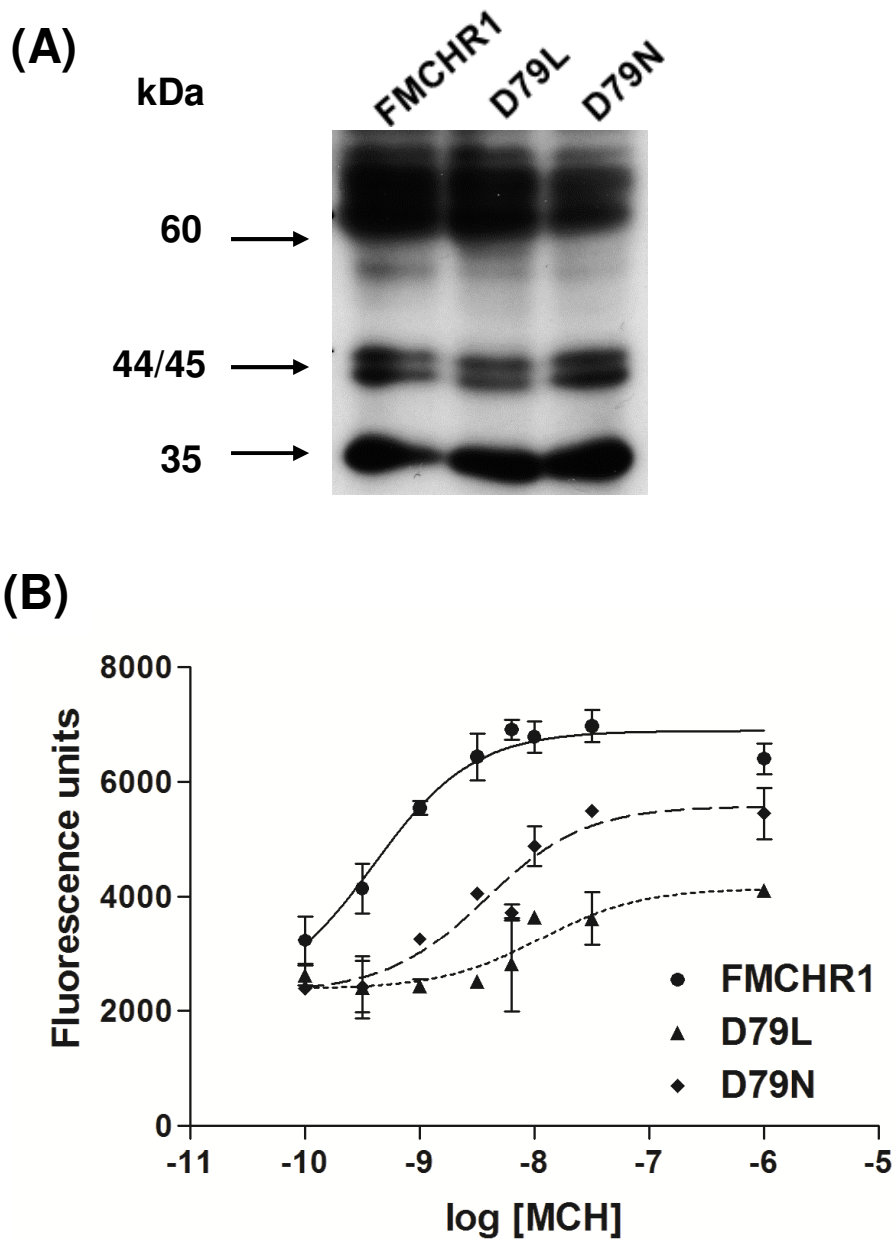


図 28. D79L、D79N の受容体機能解析。(A) HEK293T 細胞に一過性発現した FMCHR1 と D79L、D79N の糖鎖付加パターン及び発現量を、抗 Flag タグ抗体を用いてウエスタンブロット法で解析した。FMCHR1 をウエスタンブロット解析すると、35、44/45、60 kDa のバンドが検出される。(B) FMCHR1 または置換体が発現した HEK293T 細胞における細胞内カルシウム濃度変化を示す。リガンドにはラット MCH を使用し、細胞内カルシウム濃度の変化は蛍光マイクロプレートリーダー Flexstation を用いて測定した。濃度反応曲線は duplicate で 2 回以上独立して実験を行った際の代表例を示す。



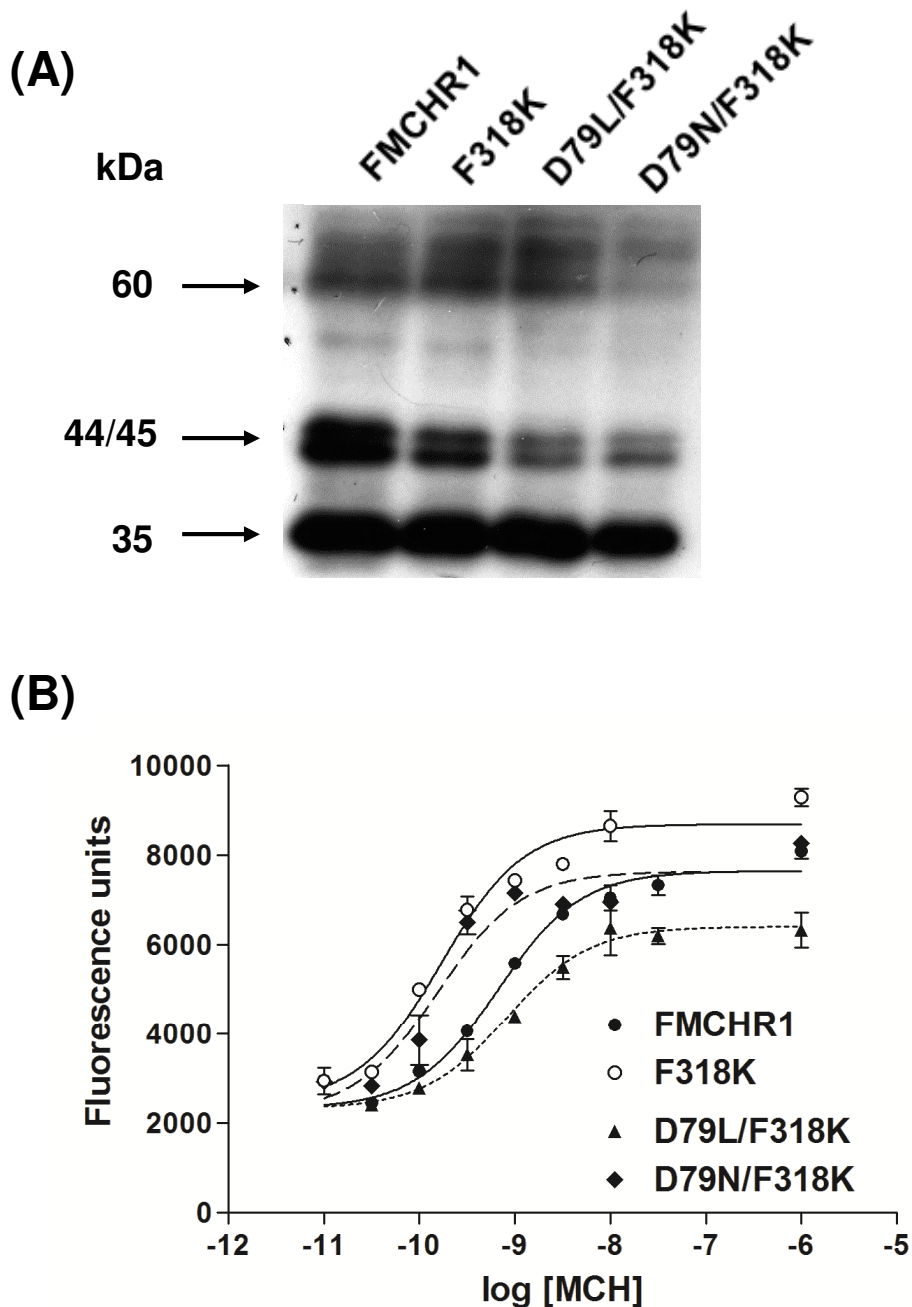


図 29. D79L/F318K、D79N/F318K の受容体機能解析。(A) HEK293T 細胞に一過性発現した FMCHR1 と置換体の糖鎖付加パターン及び発現量を、抗 Flag タグ抗体を用いてウエスタンブロット法で解析した。FMCHR1 をウエスタンブロット解析すると、35、44/45、60 kDa のバンドが検出される。(B) FMCHR1 または置換体が発現した HEK293T 細胞における細胞内カルシウム濃度変化を示す。リガンドにはラット MCH を使用し、細胞内カルシウム濃度の変化は蛍光マイクロプレートリーダー Flexstation を用いて測定した。濃度反応曲線は duplicate で 2 回以上独立して実験を行った際の代表例を示す。

とから (図 28B、29B)、Asp79 との相互作用だけでは Gq との相互作用に不十分であると判断した。また、ラット MCHR1 の細胞内第 1 ループ領域における Asp79 はヒト MCHR2 にも存在していたが、ヒト MCHR2 の F318K 置換は細胞内カルシウム動員において機能亢進を示さなかった (表 12)。即ち、Asp79-Lys318 との相互作用のみで F318K の機能亢進能は説明できない。

そこで、Gq に存在する Asn357 との相互作用に関する他の候補アミノ酸を調べるために、ラット MCHR1 とヒト MCHR2 を含めた他の GPCR でアミノ酸配列を比較した。この時、MCHR1 の Phe318 相当部位を置換しても受容体機能が亢進しない GPCR の配列を用いた (Fritze et al., 2003; Delos Santos et al., 2006; Anavi-Goffer et al., 2007; Duvernay et al., 2009; Málaga-Diéguez et al., 2010; Kaye et al., 2011)。Phe318 相当部位のアミノ酸置換で活性亢進を示さなかったロドプシン、アンギオテンシン II 受容体、 $\alpha_{2B}$  アドレナリン受容体、A1 アデノシン受容体、 $\beta 1$  アドレナリン受容体、及びヒト MCHR2 では細胞内第 1 ループ領域内のアミノ酸がラット MCHR1 と比べて 2-4 残基欠落していた (表 13)。特に、ラット MCHR1 のみに存在する細胞内第 1 ループ領域のアミノ酸配列には、かさ高い芳香族側鎖を持つ Trp73 が存在している。この Trp73 が G タンパク質の C 末端を包み込むようにタイトな相互作用を形成することで、MCHR1 における Lys318、Asp79 と Gq における Asn357 の相互作用がより強固になると予測された (図 30 左)。

一方、MCHR1-Gi 間の 3 次元相同モデルに着目すると、Gq における Asn357 は Gi において Gly351 に相当し、F318K の Lys318 と相互作用する側鎖が存在しないことが分かった (図 30 右)。このことは F318K が Gi/o 活性に対して機能亢進を示さなかった GTP $\gamma$ S 結合能測定の結果と一致する (図 27)。以上をまとめると、F318K-Gq の 3 次元予測モデルとアミノ酸配列アライメントの解析から、MCHR1-Gq 相互作用の鍵となるアミノ酸は MCHR1 における Trp73 と Asp79、Gq における Asn357 であると予測された。これらのアミノ酸から形成されるインターフェイスが受容体と Gq との親和性を亢進させることにより、F318K は機能亢進を示すと推測される。以上より、MCHR1 の F318K 置換による機能亢進が哺乳類 MCHR1 及び Gq 選択的な現象であることを支持する予測モデルを得た。

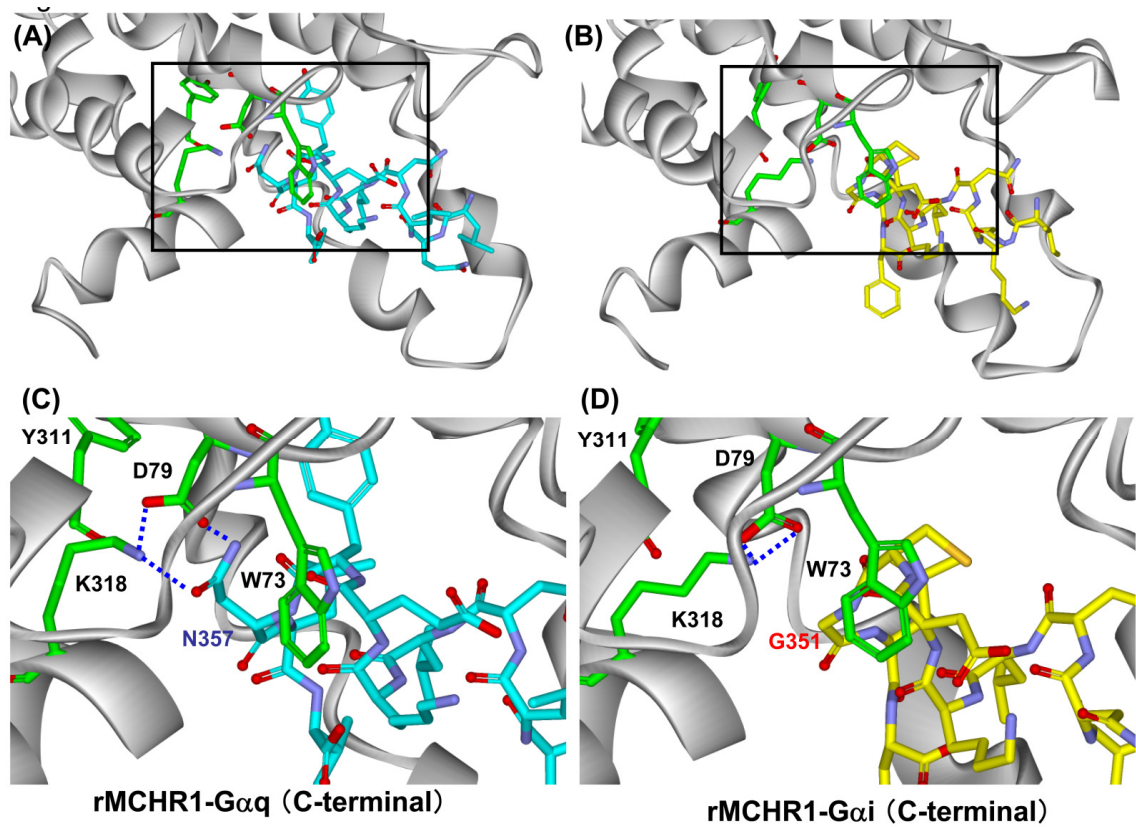


図 30. F318K-Gq 及び F318K-Gi 複合体の 3 次元相同モデル解析。ウシロドプシントランスデュースンの C 末端複合体の 3 次元相互作用モデルをテンプレートとして、ラット MCHR1 における F318K 置換体と G タンパク質間の 3 次元相同モデルを作製した。(A) F318K (灰色及び黄緑色) と Gq (水色) の複合体モデル、枠内の詳細は (C) で示す。(B) F318K (灰色及び黄緑色) と Gi (黄色) の複合体モデル、枠内の詳細は (D) で示す。各 G タンパク質は MCHR1 との相互作用が予測される C 末端 11 アミノ酸残基のみ示している。

表 13. MCHR1 及びその他 GPCR のアミノ酸配列比較。

	TM1	i1	TM2	extracellular loop 1	TM3
rMCHR1	38:---YINIIMPSVFGTICLLGIVGNSTVIFAVVKKSKLH	WCSNVPDIF	IINLSVVDLLF-LLGMPFMIHQ	LMGNGVWHFGETMCTLITAMDANSQFTSTYILTAMTIDRYL	143
hMCHR2	35:-----VILPSMIGIICSTGLVGNLIVFTIIRS	RKK	---TVPDIYICN	AVADLVH-IVGMPFLIHQWARGGEWVFGGPLCTIITS	133
rmAChR1	30:-----ITTGLSLATVTGNLLVLISFKVNT	ELK	---TVNNYFLLSLACADLIIGTFSMNLYTTYLLMG	-HWALGTLACDLWLALDYVASNASVMNLLISFD	125
rA1AR	15:-----IEVLIALVSVPGNVLVIWAVKVNQ	ALR	---DATFCFIVSLAVADVAVGALVIPLAILINIGPQTYFH	---TCLMVACPVLILTQSSILALLAIAVD	107
ra(2B)-AR	23:-----AITFLILFTIFGNALVILAVLTSR	SLR	---APQNLFLVSLAAADILVATLIIPFSLANELLG	-YWYFWRAWCEVYLALDVLFTSSIVHLCAISLDRYW	117
hb1AR	56:---QWTAGMGLLMALIVLLIVAGNVLVIVAI	AKTPRLQ	---TLTNLFIMSLASADLVMGLLVVFPFGATIVVWG	-RWEYGSFFCELWTSVDVLCVTASIE	158
bovineRho	35:---WQFSMLAAYMFLLIMLGFPINFLTLYVT	VQHKKER	---TPLNYILLN	AVADLFMVFGGFTTLYTSLHG-YFVFGPTGCNLE	137
hCB1	111:LNPSQQLAIAVLSLTLGFTVLENLLVLCVIL	HSRSLR	---CRPSYHFIGSLAVADLLGSVIFVYSFIDFHV	FHRKDSRNVFLFKLGG--VTASFTASVGS	216
	.	.*	.	..*	.*

MCHR1 及びその他 GPCR における細胞内第 1-第 3 膜貫通領域のアミノ酸配列を比較した。

\*は GPCR 間で共通、. は似た性質のアミノ酸残基を表す。

hMCHR2, human MCHR2; rmAChR1, rat muscarinic acetylcholine receptor M1; rA1AR, rat adenosine 1A receptor; ra(2B)-AR, rat  $\alpha$  2B adrenergic receptor ; hb1AR, human  $\beta$  1 adrenergic receptor ; bovineRho, bovine rhodopsin; hCB1, human cannabinoid receptor 1.

### Ⅲ-4：考察

最近の研究によると、第7膜貫通領域から Helix 8 にかけて存在する高度保存 NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフの中でも、特に Phe は受容体機能の鍵となる役割を担うことが報告されている (Palczewski et al., 2000; Fritze et al., 2003)。実際、この Phe は非常に保存性が高く、約 180 種類存在するクラス A GPCR ファミリーの内、135 種類で保存されている (Okuno et al., 2005)。ロドプシン及び M1 ムスカリン性アセチルコリン受容体において、当該 Phe の Ala への置換によりそれぞれトランスデューシン (Gt) 及び Gq との親和性が低下した (Fritze et al., 2003; Kaye et al., 2011)。さらに、 $\alpha_{2B}$  アドレナリン受容体では Phe から Ala への置換により、小胞体から膜への受容体移行が低下した (Duvernay et al., 2009)。これらのことから、NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフにおいて、特に Phe 残基は適切な受容体コンフォメーションの維持に重要であり、小胞体を介した受容体輸送にも関与することが想定される。一方、本研究において、ラット MCHR1 における Phe を Ala へ置換した F318A 置換体は、受容体の膜発現量や細胞内カルシウム動員能に影響を与えなかった。さらに作製した様々な置換体を用いて精査した結果、予想に反して、Phe から Lys への置換体 F318K が細胞内カルシウム動員を有意に亢進することを見出した。対照的に、F318K は Gi/o 選択的な GTP $\gamma$ S 結合能測定において、機能亢進を示さなかった。従って、F318K の細胞内カルシウム濃度変化における機能亢進は、Gi/o ではなく Gq 選択的な活性亢進に由来すると考えられる。GPCR 間で高度に保存されたアミノ酸残基を置換することで、機能亢進を示した本研究は非常に稀な例である。即ち、本研究成果は、NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフにおける Phe 残基の G タンパク質活性における重要性を理解する上で、新たな知見となり得る。以上より、Phe318 は受容体の構造や機能の鍵となるアミノ酸であるが、その効果は受容体と G タンパク質の相互作用形成に関与する各受容体特有の配列に依存すると予想される。

アミノ酸の置換で機能亢進が報告された Neuropeptide S 受容体の Asn107 は他の GPCR では、相同な位置が存在せず、Neuropeptide S 受容体に特異的に生じる機能獲得型変異と考えられる (Clark et al., 2010)。一方、本研究で見出した NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフの Phe のように、多くの GPCR 間で高度に保存されるアミノ酸を置換することによって、特定の受容体のみで機能亢進が起こることを示した研究は、我々の知る限り初めてである。また、これまで哺乳類 MCHR1 において、数多くの置換体や欠損体の機能が解析され、受容体機能を抑制する変異体がいくつか同定されてきたが (Saito et al., 2003, 2004; Tetsuka et al., 2004)、シグナル伝達において機能亢進を示す MCHR1 変異体は F318K が初のケースである。以上より、MCHR1 における Phe318 はこれまでの GPCR 研究上ほとんど例のない、特殊なアミノ酸であると考えられる。中でも MCHR1 の Phe318 を、正電荷を有する Lys や Arg に置換することが、細胞内カルシウム動員において効果的に機能亢進を示した。一方、生体条件下において正の電荷を持つ His に置換してもシグナルの増強は示さなかった (表 11)。このことから、電荷、極性、側鎖の大きさといったパラメーターを含む複雑で厳密な物理化学的特徴が、F318K の機能亢進に寄与していると推測される。

無差別にいくつかの G タンパク質サブタイプと結合する GPCR は、G タンパク質選択性を解

明するツールとして有用である。クラス A GPCR におけるほとんどの研究において、細胞内第 2、第 3 ループ領域及び細胞内 C 末端領域の膜近位が G タンパク質の活性に重要な役割を示すことが強く示唆されてきた (Anavi-Goffer et al., 2007; Kuniyeda et al., 2007; Kleinau et al., 2010)。これまでに、Gi/o 及び Gq 両方の活性に重要な MCHR1 の細胞内領域はいくつか同定されたが、本研究における NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフの Phe318 を Lys に置換すると Gq 選択的に機能亢進を示すことが見出された。Phe318 は細胞内 C 末端領域における Helix 8 の膜近傍に位置する。Helix 8 は GPCR により活性化された G タンパク質の活性制御に役割を担うと考えられているが、G タンパク質選択性に Helix 8 が関与するという報告は少ない。例を挙げると、カンナビノイド受容体 1 型は、MCHR1 における Phe318 相当部位が疎水性アミノ酸 (Leu404) であり、L404I 置換体では Gi/o グループの中でも Go<sub>A</sub> ではなく Gi<sub>3</sub> に対する活性が低下する (Anavi-Goffer et al., 2007)。また、甲状腺刺激ホルモン受容体の Helix 8 に存在する正に電荷した Arg687 が Gq との選択的相互作用に重要であることが示された (Kleinau et al., 2010)。そこで、MCHR1 の Phe318 近傍に存在するアミノ酸に着目すると、Helix 8 内に 3 連の塩基性アミノ酸残基 (Arg319、Lys320、Arg321) が存在する。しかし、これら正電荷を置換 (R319Q/R320Q/R321Q) すると、Gq のみならず Gi/o の活性も強力に抑制したことから、Helix 8 におけるこの塩基性アミノ酸領域は G タンパク質との選択的共役に関与しないと考えられる (Tetsuka et al., 2004)。以上より、MCHR1 の Helix 8 に存在するアミノ酸残基は、受容体活性や G タンパク質選択性を決定するためにそれぞれ異なる役割を有していると推測された。本研究で明らかにした Helix 8 上における Phe の重要性は、複数種の G タンパク質と共役する他の GPCR において同様に研究を行うことで、より理解が深まることが期待される。

リガンド刺激後 GPCR は構造変化を起こし、その結果として G タンパク質の活性化が生じる。この機構に関しては、ロドプシンや β2 アドレナリン受容体等で研究されており、特に光刺激によるロドプシンの構造変化は、結晶構造解析を始めとした一連の生物物理学的研究により詳細が解明されている。また、ロドプシンの NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフにおいて、Tyr306 と Phe318 間の疎水的相互作用は定常状態を安定化させることが報告された (Palczewski et al., 2000; Nygaard et al., 2009)。MCHR1 の分子動力学シミュレーションの比較においても、このモチーフ内の Tyr と Phe 間相互作用の消失が不活性型から活性型への転移において重要な過程である可能性が示唆されている (Vitale et al., 2004)。そこで、まずロドプシンにおいて重要とされる MCHR1 の相同部位の Tyr311 と Phe318 間に着目し、当該構造に基づく MCHR1 の不活性構造を維持するうえで重要な相互作用が、F318K 置換により破壊されることで機能亢進が生じた可能性を考えた。しかしながら、F318K と Gq 複合体の 3 次元相同モデル (図 30) によると、細胞内第 1 ループ領域における Phe318 と Asp79 の間に、さらに異なる相互作用部位が存在する可能性が示された。加えて、D79L 及び D79N 置換体や他の GPCR との配列を比較した解析によると、Phe318、Asp79、Asn357 の近接だけでは F318K で認められた機能亢進に不十分であり、細胞内第 1 ループ領域における Trp73 が効果的な MCHR1-Gq の結合及び活性の安定維持に重要であることが予測された。以上より、F318K と細胞内第 1 ループ領域におけるアミノ酸残基 (Trp, Cys, Ser) を組み合わせた一連の置換体を作製し、機能解析を行うことで、それぞれのアミノ酸の役割と重要性を明確にする必要がある (表 13)。MCHR1 と G タンパク質複合体の

結晶構造解析も我々の理解を促すために重要な情報となり得るが、本モデルのように、如何にして一つのアミノ酸置換 (F318K) が受容体と G タンパク質複合体の細胞内又は細胞間分子的相互作用を変え得るのかを理解することも、GPCR 活性化における分子メカニズムを理解するうえで重要であろう。

結論として、一連の置換体解析により、MCHR1 の NPxxY(x)<sub>5-6</sub>F モチーフにおける置換体 F318K が、受容体発現に影響を与えることなく、Gq 選択的に細胞内カルシウム動員を亢進することを初めて見出した。そして、Phe318 が受容体と G タンパク質の相互作用形成に関与し、G タンパク質との結合や活性を制御することが推測された。細胞内シグナルを有意に亢進する置換体は限られた数しか報告されておらず (Reinscheid et al., 2005; Kato et al., 2008)、F318K は内在的な受容体ダイナミクスの過程を理解するための手掛かりを提供することが期待される。しかしながら、Phe318 の役割が生理学的及び受容体の機能的重要性にどのような役割を持つかを明らかにするためには、更なる研究が望まれる。

## 総合考察

MCH-MCH 受容体システムは、哺乳類において摂食、エネルギー代謝、情動に関与しており、肥満・うつ不安のターゲットとして創薬の場においても注目を浴びている。本研究では、MCH 受容体に関して、哺乳類培養細胞発現系における細胞内情報伝達系及び構造活性相関（受容体の機能と構造の相関関係）に着目し、研究を行った。

第 I 章では、MCH の摂食行動に及ぼす作用がキンギョと哺乳類間で異なることに着目し、この差異が MCH 受容体の G タンパク質選択性の違いに起因すると予想した。そこで、脊椎動物における MCH システム理解の第 1 歩として、キンギョ MCH 受容体の情報伝達系の解析を行った。その結果、キンギョ MCHR1 は Gq 及び弱い Gs 共役能を、一方、キンギョ MCHR2 は Gi/o 及び Gq 共役能を有することを明らかにした。哺乳類 MCHR1 は Gi/o 及び Gq と共役し、哺乳類 MCHR2 は Gq と共役することから、哺乳類と魚類間で MCH 受容体の G タンパク質選択性が異なることが判明した。ペプチド受容体において、哺乳類と魚類間で G タンパク質選択性が異なるという例は当研究が初である。MCH は哺乳類において摂食亢進作用を示すが (Qu et al., 1996; Ito et al., 2003)、キンギョにおいては摂食抑制作用を示す (Matsuda et al., 2009)。本研究成果から、哺乳類と魚類間における MCH の摂食に対する効果の違いは G タンパク質選択性の違いに起因するという仮説が提唱される。MCH 受容体の G タンパク質選択性の違いが解明されることで、様々な生理作用と MCH システムの関係を解明する重要な糸口となることが期待される。また、当研究室において、両生類の *Xenopus tropicalis* に 4 種の MCH 受容体 (MCHR1a, 1b, 2a, 2b) が存在することが報告された (Kobayashi et al., 2014)。両生類を含めた MCH 受容体の分子系統解析及び G タンパク質共役能から、魚類から両生類への進化の過程において MCHR1 と MCHR2 でそれぞれサブタイプが生じ、両生類から哺乳類への進化の過程において各 MCH 受容体サブタイプ間で消失が生じ、それぞれ哺乳類へ継承されたと考えられた。現在、MCH 受容体は脊椎動物のみで同定されているが (Ji et al., 2009)、本研究における魚類に加えて、爬虫類や鳥類における MCH 受容体の同定及び機能解析を行うことで、MCH 受容体の分子進化と生理作用の網羅的な解析が可能となる。また、MCH システムは、体色調節能を有していない生物においても淘汰されず、かつ、G タンパク質共役能を変化させながらも霊長類まで継承されてきた。以上を考慮すると、本研究成果は、生物種を超えて MCH システムの重要性を示すと共に、当該システムが担う役割の系統進化的解明にも繋がるものである。

また、哺乳類 MCHR1 に対するアゴニスト Compound.15 はキンギョ MCHR1 の内在性リガンド同様に機能的なアゴニストとして働いた。また、キンギョ MCHR2 において、Compound.15 は Gq よりも Gi/o に選択的なバイアスアゴニストであることが分かった。一方、哺乳類 MCHR1 に対するアンタゴニスト Compound.30 はキンギョ MCHR1 において、親和性は低いですが細胞内カルシウム動員及び ERK1/2 リン酸化に対するアゴニストとして機能することが判明した。以上より、Compound.15 及び Compound.30 をはじめとしたバイアスリガンドを用いたキンギョの行動実験（摂食、生殖、情動、記憶に関する行動実験）を行うことで、今まで不明であったキンギョ MCHR1 及びキンギョ MCHR2 がそれぞれ担う生理機能の解明が可能となり、*in vivo* にお



ける MCH システムの理解が進むことが期待される。特に MCHR2 は、げっ歯類において発現していないこともあり、その生理機能は明らかでない。従って、本研究成果は MCHR2 の機能解明の手掛かりにもなり得る。

第 II 章では、哺乳類 MCHR1 における G タンパク質選択機構の解明を目指した。第 I 章で判明した哺乳類と魚類間における MCH 受容体の G タンパク質選択性の相違に着目し、ラット MCHR1 のアミノ酸配列をキンギョの配列に順次置換することで Gi/o 共役能が消失すると予測した。そこで、G タンパク質との共役に重要な細胞内領域を中心に置換体を作製し、Gi/o 活性を評価した。その結果、細胞内第 2 ループ領域に存在するアミノ酸 6 残基と、細胞内第 3 ループ領域及び第 5 膜貫通領域に存在するアミノ酸 6 残基が形成する受容体コンフォメーションがそれぞれ Gi/o との共役に重要であることが分かった。本研究成果は MCHR1-Gi/o 活性化の 3 次元モデル作製や、各 G タンパク質が担うシグナル伝達及び生理作用解明の手掛かりとなる。

第 III 章では、哺乳類 MCHR1 活性化における分子メカニズム解明を目的として、哺乳類 MCHR1 において NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフの機能解析を実施した。その結果、F318K 置換体は Gq 選択的に機能亢進を示すことを見出した。さらに、F318K 活性化における分子メカニズム解明のために、既に結晶構造が解明されているウシロドプシンとトランスデューシン複合体をテンプレートとして、MCHR1 と Gq 又は Gi 複合体の 3 次元相同モデルを構築した。その結果、F318K において Gq 選択的機能亢進に関わるアミノ酸の存在がいくつか予測された。当研究成果は受容体活性化に関する分子メカニズム解明において重要な知見となるであろう。

以上、第 II 章及び第 III 章で得られた結果は、どちらも GPCR の構造活性相関研究において非常に稀なものであった。NPxxY(x)<sub>5,6</sub>F モチーフはクラス A GPCR 間で高度に保存されることから (Gether, 2000; Huynh et al., 2009)、ファミリーを通して非常に重要な役割を担うことが予測される。特に Phe に関しては、細胞内シグナル伝達や受容体膜輸送に関与するという報告がいくつか存在する (Acharya et al., 1996; Delos Santos et al., 2006; Duvernay et al., 2009; Málaga-Diéguez et al., 2010)。しかし、哺乳類 MCHR1 は Phe318 を置換しても受容体発現に影響を与えず、逆に F318K は細胞内カルシウム動員能において機能亢進を示した。変異体が野生型よりも機能亢進を示す例は非常に稀である (Kato et al., 2008; Clark et al., 2010)。中でも、多くの GPCR 間で高度に保存されるアミノ酸を置換することによって、特定の受容体のみで機能亢進が起こることを示した研究は、我々の知る限り初めてである。MCHR1 のサブタイプであるヒト MCHR2 においても、Phe318 相当部位を置換しても、機能亢進は認められなかった。従って、MCHR1 における F318K はこれまでの GPCR 研究上ほとんど例のない、特殊な置換体であると考えられる。加えて、複数の G タンパク質が共役する GPCR において、G タンパク質選択性に関与するアミノ酸残基の特定が行われた研究は数例しか存在しない。G タンパク質選択機構の解明は非常に困難な課題であるにもかかわらず、i2<sub>6sub</sub> 及び i3<sub>6sub</sub> は Gi/o 選択的に機能低下を示し、F318K は Gq 選択的な機能亢進を示すことを見出した。i2<sub>6sub</sub> は Gi/o 選択的な活性における細胞内第 2 ループ領域の重要性を示した初めての置換体である。i3<sub>6sub</sub> も他の GPCR とは異なり、細胞内第 3 ループ領域に加えて第 5 膜貫通領域を同時に置換することが Gi/o 活性に重要であった。また、他の GPCR 研究において、G タンパク質選択的共役が低下した置換体は単独もしくは近接した数アミノ酸残基の置換で充分であったが、i2<sub>6sub</sub> と i3<sub>6sub</sub>

はどちらも複数のアミノ酸を同時に置換して初めて Gi/o 活性低下を示した。即ち、哺乳類 MCHR1 においては、特定のアミノ酸配列よりも GPCR のコンフォメーションが Gi/o 活性に重要であると推測される。以上より、本研究で得られた知見は、他の GPCR における構造活性相関研究の発展に貢献すると考えられる。

次に、本研究成果を踏まえて、各細胞内領域の役割を考察する。細胞内第 1 ループ領域において、i1\_7sub (S69N/L71F/H72R/W73A/C74Q/S75Q/N76T) は Gi/o 活性に関与しないことが判明した。一般的に、細胞内第 1 ループ領域は他の細胞内領域と比較して構成アミノ酸数が少ない傾向にある。ロドプシンや  $\beta 1$ 、 $\beta 2$  アドレナリン受容体を始めとして、これまでに立体構造が解明されている GPCR 間において、細胞内第 1 ループ領域は一つの Helix 構造を有する類似した骨格構造を示した (Katrich et al., 2012; Venkatakrishnan et al., 2013)。実際、変異体を用いた解析においても、他の細胞内ループ領域と比較して、細胞内第 1 ループ領域が G タンパク質共役に関わることを示す報告は少ない (Wong et al., 2002; Hermans et al., 2003; Moreira et al., 2014)。哺乳類 MCHR1 においても、3 次元相同モデルによると、細胞内第 1 ループ領域は C 末端の Helix 8 と相互作用しており、他のループ領域と比べて自由度が低いことが予測された。

一方、細胞内第 2 ループ領域は、哺乳類 MCHR1 において、中央部から C 末側に存在するアミノ酸 6 残基 (Ser150、Ser151、Thr152、Lys153、Lys156、Ser158) が Gi/o 選択的共役に重要なことを見出された。また、先行研究において、細胞内第 2 ループ領域の C 末側に位置する R155Q は受容体膜発現に影響を与えることなく、Gi/o 及び Gq 両方を介したシグナル系を著しく抑制した (Saito et al., 2005)。これらの結果は、細胞内第 2 ループ領域の遠位に位置する各アミノ酸が、哺乳類 MCHR1 の受容体活性や G タンパク質選択性を決定付けるために、位置特異的に異なる役割を担う可能性を示唆する。一般的に、細胞内第 2 ループ領域は GPCR と G タンパク質の相互作用や、G タンパク質活性化の効率に重要なことが良く知られている (Moreira et al., 2014)。複数の GPCR の結晶構造解析により、細胞内第 2 ループ領域は各受容体特有の Helix 構造や不定形の伸長構造等を形成し、多様性が高いことが報告されている (Katrich et al., 2012; Venkatakrishnan et al., 2013)。おそらくこの多様性が G タンパク質選択性を決定する一因となっており、実際に  $\beta 2$  アドレナリン受容体では、活性化後、細胞内第 2 ループ領域と G タンパク質の N 末端側が相互作用することが示された (Rasmussen et al., 2011)。そこで、ラット MCHR1 においても 3 次元相同モデルを作製したところ、細胞内第 2 ループ領域は細胞内で露出し、膜貫通領域部分から細胞質側を向いた構造をしており、G タンパク質と近接が容易に可能であると示唆された (Saito et al., 2005)。

細胞内第 3 ループ領域に関しては、第 5 膜貫通領域に存在するアミノ酸 2 残基を含む Tyr228、Val229、Arg234、Ala242 (Ala242 については必須ではない可能性が高い)、Ser243、Thr257 が Gi/o 選択的共役に重要であると示された。様々な GPCR の変異体解析から、細胞内第 3 ループ領域の特に細胞膜近位が G タンパク質の共役に重要であると考えられている。細胞内第 3 ループ領域は可動性の高さから、結晶構造解析の際に欠失、又は、構造安定化のための結合タンパク質に置換される場合が多い。しかし、ロドプシンにおいては構造が解明され、第 5 膜貫通領域の C 末側及び第 6 膜貫通領域の N 末側が、細胞質内においても伸長した  $\alpha$ -helix 構造を形成し、非常に高い可動性を持つことが見出された (Park et al., 2008)。この細胞内第 3 ループ領域

における高い可動性や、アミノ酸数及び配列の多様性が、G タンパク質選択性決定に寄与すると考えられる。哺乳類 MCHR1 の 3 次元相同モデルにおいても、細胞内第 2 ループ領域同様、細胞内第 3 ループ領域は G タンパク質と容易な接近が可能であることが示唆された (Nagata et al., 2013)。

GPCR の細胞内 C 末端領域において、短い両親媒性のらせん構造 Helix 8 が存在する。哺乳類 MCHR1 において、Helix 8 の N 末側に位置する Phe318 を Lys に置換すると、Gq 活性選択的に機能亢進を示すことが明らかになった。先行研究において、ラット MCHR1 の Helix 8 中央部に位置する Arg319 と Lys320 が Gi/o と Gq 両方の共役に重要であることが示された (Tetsuka et al., 2004)。従って、MCHR1 の Helix 8 に存在するアミノ酸残基は、受容体活性や G タンパク質選択性を決定するために位置特異的にそれぞれ異なる役割を担うと推測された。これまで多くの GPCR において、Helix 8 がシグナル伝達や膜移行、受容体インターナリゼーション等に重要な役割を担うことが報告されている。ロドプシンでは、Helix 8 の N 末端側の一部がトランスデュシンの C 末端と結合し、 $\beta\gamma$  サブユニットを制御する (Ernst et al., 2000; Marin et al., 2000)。ロイコトリエン受容体において、Helix 8 は G タンパク質活性化後に構造が変化することが示された (Okuno et al., 2003)。しかしながら、 $\beta 2$  アドレナリン受容体と Gs 複合体の構造解析において、Helix 8 と G タンパク質の相互作用は観察されなかった (Rasmussen et al., 2011)。細胞内 C 末端領域は可動性が高いため、結晶化の際に切除される場合が多いため、その構造に関しては未だ明確でない。そのため、Helix 8 の構造と機能解析に関して、更なる研究が必要である。

膜タンパク質の中でも特に GPCR は、その構造不安定性から結晶化が非常に困難であったが、近年の研究手法の発達により、結晶構造解析が急速に進展している。中でも、GPCR と G タンパク質複合体の結晶構造解析は、我々の GPCR 活性化メカニズムの理解を促すために重要な情報となり得る。近年、バイオインフォマティクスを駆使した、受容体立体構造を基にした薬物のデザインが盛んであり、肥満・うつ不安の治療ターゲットとして注目されている MCHR1 においても、Gq 及び Gi/o 複合体の結晶構造解明が望まれる。しかしながら、X 線結晶構造はダイナミックな挙動を示す GPCR の一場面を切り取ったスナップショット (静的な情報) であるため、より詳細な分子メカニズム解明には動的な情報を提供する構造活性相関を加えた、両者の情報融合が必須である。従って、本研究で明らかにした G タンパク質選択的共役に関与するアミノ酸残基の特定は、MCHR1 活性化の分子メカニズム解明において重要な知見を与えると考えられる。加えて、本研究で行った変異体解析を他の GPCR で実施することにより、GPCR 活性化における分子メカニズムの統合的な理解が発展すると考えられる。今後、GPCR の結晶構造解析と構造活性相関解析の継続により、GPCR-G タンパク質活性化の分子基盤が構築され、MCHR1 のみならず様々な GPCR が関与する疾患における創薬開発のためのツールとなるであろう。

最近、代謝型グルタミン酸受容体 2 型とセロトニン A2 受容体がヘテロ二量体を形成することで、Gi と Gq シグナルのバランスを調節し、統合失調症等の精神病を制御することが示唆されている (Fribourg et al., 2011)。従って、複数の G タンパク質と共役する GPCR に関しては、単純な受容体活性と不活性化現象のみならず、共役する G タンパク質シグナルのバランスに考

慮する必要がある。しかし、哺乳類 MCHR1 において、共役する Gi/o 又は Gq がそれぞれ担う下流の情報伝達系の詳細や、生理作用との相関関係は未だ解明されていない。この難題を解き明かす上で有用となるのが、Gi/o 又は Gq のどちらかと選択的に共役する変異体である。本研究では Gi/o 活性が選択的に低下することで、逆に Gq 活性が優勢となる i2\_6sub 及び i3\_6sub 置換体の作出に成功した。また、F318K も Gq 活性が有意に亢進した変異体である。これら MCHR1 置換体ノックインマウスを作製することで、今まではアプローチが困難であった、哺乳類 MCHR1 に共役する Gi/o と Gq がそれぞれ担うシグナル伝達の詳細や生理機能の解明に繋がることが期待される。さらに、Gi/o 又は Gq に選択的に作用するバイアスリガンドの開発も望まれる。哺乳類 MCHR1 において、リガンドの種類により Gi/o、Gq の活性を選択的に制御することが出来れば、ある生理現象のみ（肥満またはうつ等）により効果的で副作用の少ない治療薬開発に繋がる。従って、本研究成果は基礎研究として非常に重要である GPCR の G タンパク質選択機構解明のみならず、将来的に MCHR1 のシグナルを選択的に制御することで、肥満及びうつ不安の改善に貢献することも期待されるものである。

本研究では、哺乳類 MCHR1 における Gi/o 選択的共役に重要なアミノ酸領域と、Gq 選択的活性化に関わるアミノ酸を同定したが、*in vivo* では、発現する細胞によって受容体の G タンパク質選択性や親和性が異なることが報告されている。即ち、哺乳類培養細胞発現系 (HEK293T、CHO 細胞等) において、強制発現させた哺乳類 MCHR1 は Gi/o 及び Gq と共役するが (Saito et al., 1999; Hawes et al., 2000)、視床下部外側野において内在的に発現する MCHR1 は Gi/o 選択的であることが報告された (Gao et al., 2001)。MCHR1 が発現細胞により G タンパク質選択性が変化する現象に関しては、四つの可能性が考えられる。

一つ目は、細胞によって発現する G タンパク質の種類や量が異なることに起因する可能性がある。これに関しては、各種 G タンパク質の抗体が販売されているため、MCHR1 が発現する組織を用い、各 G タンパク質の発現を免疫化学染色やウエスタンブロット解析することで解釈が可能である。

二つ目の可能性は、細胞によって存在する内在性介在因子が異なることである。実際に、Gs 共役型の副甲状腺ホルモン受容体 1 型が、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体制御因子 (NHERF) と相互作用することにより、Gq 共役を示すことが報告された (Ritter et al., 2009)。即ち、GPCR の細胞内シグナルの調節には受容体と G タンパク質以外にも、多くの細胞内分子が関与する。例えば、G タンパク質制御 (RGS) タンパク質は活性型 Gα に結合し、GTPase 活性を増強することで、細胞内シグナルを停止させる作用を有する (Hollinger et al., 2002)。RGS8 のように、いくつかの RGS サブファミリーは特定の GPCR や G タンパク質の活性を選択的に制御することが知られている (Saitoh et al., 1997)。当研究室では以前、*in vitro* において RGS8 は MCHR1 の細胞内第 3 ループ領域 C 末側に存在する Arg253 及び Arg256 と直接相互作用し、MCHR1 の細胞内シグナルを抑制することを見出したが、G タンパク質共役における偏向性は認められなかった (Miyamoto-Matsubara et al., 2008)。一方、RGS2 は主に Gq の活性を抑制することで、MCHR1 の細胞内シグナルを制御することが示唆された (Miyamoto-Matsubara et al., 2010)。他にも哺乳類 MCHR1 の細胞内 C 末端領域の N 末側がペリプラキンやニューロコンドリンと相互作用することで、Gi/o 及び Gq を介する MCHR1 の細胞内シグナル伝達が減弱する例が知られている

(Murdoch et al., 2005; Francke et al., 2006)。また、一般的に GPCR の細胞内 C 末端領域は、G タンパク質共役型受容体キナーゼ (GRK) 等の各種キナーゼによってリン酸化を受けやすいことが報告されている (Ferquson et al., 2001)。受容体のリン酸化部位に  $\beta$  アレスチン等が会合することでシグナル伝達が停止するとともに、受容体の脱感作及びインターナリゼーションが惹起される。哺乳類 MCHR1 に関しては、細胞内 C 末端領域の C 末側に、 $\beta$  アレスチン II 及びダイナミン I が作用することで受容体インターナリゼーションに関与する (Saito et al., 2004)。他にも、哺乳類 MCHR1 の細胞内第 2 ループ領域には、ERK1/2 が結合することも見出された (所属研究室における未発表データ)。以上より、RGS など細胞内分子による細胞内シグナルの抑制が特定の G タンパク質共役に選択的に生じたり、副甲状腺ホルモン受容体 1 型のように細胞内因子が結合することで G タンパク質選択性が変化する可能性が考えられる。従って、視床下部外側野のニューロンと同様に MCHR1 の G タンパク質選択性が異なる細胞を用いて、RGS 等を含む細胞内因子の発現を確認する必要がある。その際に、MCHR1 と相互作用する細胞内因子の作用部位を特定するために、i2\_6sub や i3\_6sub をはじめとした当研究室でこれまで作製した変異体が役立つと思われる。

三つ目は、発現する細胞内区画によって受容体の構造や存在するタンパク質が変化する可能性が考えられる。細胞膜上には、コレステロールや脂質に富んだカベオラや脂質ラフトと呼ばれるマイクロドメインが存在し、これが G タンパク質選択性に影響を与えることが知られている (Wess et al., 1998)。実際、Gi/o 及び Gq と共役するスフィンゴシン 1 リン酸受容体が、カベオラにおいて主に Gi/o と共役することが報告されており (Means et al., 2008)、この選択性の変化が哺乳類 MCHR1 に当てはまる可能性が考えられる。哺乳類 MCHR1 も CHO 細胞発現系において、カベオラの構成タンパク質であるカベオリン 1 と脂質ラフトで相互作用する (Cook et al., 2008)。カベオラや脂質ラフトにおける MCHR1 の細胞内シグナルを解析するためには、メチル  $\beta$  シクロデキストリンを用いて脂質ラフトを破壊する方法が考えられる。他にも、MCHR1 とカベオリンの融合タンパク質の発現プラスミドを構築し、全ての MCHR1 をカベオラに局在するように操作することで解析可能である。また、他の細胞内区画として、マウスの神経細胞に存在する非運動性の一次繊毛において MCHR1 が検出された (Berbari et al., 2008)。当研究室では、MCHR1 の一次繊毛局在に必要な標的配列を同定したが (Nagata et al., 2013)、一次繊毛を介した情報伝達系の解析は困難であった。一次繊毛に局在するタンパク質は限定されていることから、独自のシグナル伝達機構を有する可能性がある。従って、通常の細胞膜ではなく、カベオラや一次繊毛という場における哺乳類 MCHR1 の情報伝達系の解析が望まれる。

最後に、MCHR1 の G タンパク質共役性に影響を及ぼす要因として受容体の多量体形成能を挙げる。GPCR はヘテロ二量体を形成し、リガンド親和性、シグナル伝達、受容体インターナリゼーションに影響を与えることが知られている (Satake, 2013)。興味深いことに、Gs 共役型の D1 及び Gi 共役型の D2 ドーパミン受容体がヘテロ二量体を形成することで、Gq<sub>11</sub> 共役型に変化することが報告された (Rashid et al., 2007)。MCHR1 ヘテロマー形成については通常の細胞膜における報告は見当たらないが、マウス脳の一次繊毛において、ソマトスタチン受容体 3 型と共局在し、ヘテロ二量体を形成する可能性が示唆された (Green et al., 2012)。従って、哺乳類 MCHR1 もヘテロ二量体を形成することで G タンパク質選択性が変動する可能性がある。

以上4つの可能性を考慮すると、MCHR1 高発現領域由来の初代培養細胞や脳スライスを用いることや、RGS タンパク質などの細胞内分子をニューロンへ共発現させることで、MCHR1 の G タンパク質選択性に与える影響を検討する必要がある。そして、F318K や i2\_6sub 及び i3\_6sub をアデノウイルスにより、初代培養細胞のニューロンへ強制発現させて機能解析を行い、本研究で受容体機能に関与することが示されたアミノ酸残基が、このような細胞内分子や特殊な細胞内区画において如何なる役割を担うのかを明らかにすることが必要であろう。

本研究によって、「魚類(キンギョ) MCH-MCHR 系の細胞内情報伝達系」及び「哺乳類 MCHR1 において Gi/o 又は Gq を選択的に活性化する際の構造動態の一端」を明らかにした。得られた解析結果はいずれも、他の GPCR における構造活性相関研究に多くの情報を提供するであろう。また、GPCR の中でも特に、哺乳類 MCHR1 は肥満・うつ不安治療の標的として注目を浴びる分子であり、本研究成果は基礎研究の発展のみならず、創薬研究においても貢献することが期待される。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始熱心かつ多大なる御指導と御助力を賜りました広島大学大学院総合科学研究科教授の斎藤祐見子先生に心から感謝の意を表します。また、本論文の執筆にあたり、学位審査委員として有益なご助言を頂きました、同研究科教授の古川康雄先生、石田敦彦先生、船瀬広三先生、ならびに、久留米大学分子生命科学研究科教授の児島将康先生に深謝の意を表します。また、丁寧なご助力を頂きました同研究科助教の小林勇喜先生、有意義な学生生活を共に過ごす事が出来た斎藤研究室の皆様に心より御礼申し上げます。加えて、哺乳類 MCHR1 の 3 次元相同モデルを作製して頂きました公益財団法人サントリー生命科学財団生物有機科学研究所の堀川学先生に深く感謝致します。

## 参考文献

- 佐保智子, 2008. 脳内摂食受容体 (MCH1R) の高度保存アミノ酸残基 Phe318 の活性化機構. 平成 20 年度特別研究論文.
- 船越結, 2009. 脳内摂食受容体 (MCH1R) の細胞内 C 末端による高度保存アミノ酸残基の解析. 平成 21 年度特別研究論文.
- 打田沙織, 2010. G タンパク質共役型受容体における Helix8 領域の役割. 平成 22 年度特別研究論文.
- Acharya, S., Karnik, S.S., 1996. Modulation of GDP release from transducin by the conserved Glu134-Arg135 sequence in rhodopsin. *J. Biol. Chem.* 271, 25406-25411.
- Aizaki, Y., Maruyama, K., Nakano-Tetsuka, M., Saito, Y., 2009. Distinct roles of the DRY motif in rat melanin-concentrating hormone receptor 1 in signaling control. *Peptides* 30, 974-981.
- Alon, T., Friedman, J.M., 2006. Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. *Neuron* 26, 389-397.
- An, S., Cutler, G., Zhao, J.J., Huang, S.G., Tian, H., Li, W., Liang, L., Rich, M., Bakleh, A., Du, J., Chen, J.L., Dai, K., 2001. Identification and characterization of a melanin-concentrating hormone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 7576-7581.
- Anavi-Goffer, S., Fleischer, D., Hurst, D.P., Lynch, D.L., Barnett-Norris, J., Shi, S., Lewis, D.L., Mukhopadhyay, S., Howlett, A.C., Reggio, P.H., Abood, M.E., 2007. Helix 8 Leu in the CB1 cannabinoid receptor contributes to selective signal transduction mechanisms. *J. Biol. Chem.* 282, 25100-25113.
- Bächner, D., Kreienkamp, H., Weise, C., Buck, F., Richter, D., 1999. Identification of melanin concentrating hormone (MCH) as the natural ligand for the orphan somatostatin-like receptor 1 (SLC-1). *FEBS Lett.* 457, 522-524.
- Baker, B.I., 1991. Melanin-concentrating hormone: a general vertebrate neuropeptide. *Int. Rev. Cytol.* 126, 1-47.
- Bednarek, M.A., Tan, C., Hreniuk, D.L., Palyha, O.C., MacNeil, D.J., van der Ploeg, L.H., Howard, A.D., Feighner, S.D., 2002a. Synthesis and biological evaluation in vitro of a selective, high potency peptide agonist of human melanin-concentrating hormone action at human melanin-concentrating hormone receptor 1. *J. Biol. Chem.* 277, 13821-13826.
- Bednarek, M.A., Hreniuk, D.L., Tan, C., Palyha, O.C., MacNeil, D.J., van der Ploeg, L.H., Howard, A.D., Feighner, S.D., 2002b. Synthesis and biological evaluation in vitro of selective, high affinity peptide antagonists of human melanin-concentrating hormone action at human melanin-concentrating hormone receptor 1. *Biochemistry* 41, 6383-6390.
- Barbari, N.F., Johnson, A.D., Lewis, J.S., Askwith, C.C., Mykityn, K., 2008. Identification of ciliary localization sequences within the third intracellular loop of G protein-coupled receptors. *Mol. Biol. Cell* 19, 1540-1547.



- Bermak, J.C., Li, M., Bullock, C., Zhou, Q.Y., 2001. Regulation of transport of the dopamine D1 receptor by a new membrane-associated ER protein. *Nat. Cell Biol.* 3, 492-498.
- Berman, J.R., Skariah, G., Maro, G.S., Mignot, E., Mourrain, P., 2009. Characterization of two melanin-concentrating hormone genes in zebrafish reveals evolutionary and physiological links with the mammalian MCH system. *J. Comp. Neurol.* 517, 695-710.
- Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J.L., Vale, W., Sawchenko, P.E., 1992. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J. Comp. Neurol.* 319, 218-245.
- Böhm, S.K., Khitin, L.M., Smeekens, S.P., Grady, E.F., Payan, D.G., Bunnett, N.W., 1997. Identification of potential tyrosine-containing endocytic motifs in the carboxyl-tail and seventh transmembrane domain of the neurokinin 1 receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 2363-2372.
- Borowsky, B., Durkin, M.M., Ogozalek, K., Marzabadi, M.R., DeLeon, J., Lagu, B., Heurich, R., Lichtblau, H., Shaposhnik, Z., Daniewska, I., Blackburn, T.P., Branchek, T.A., Gerald, C., Vaysse, P.J., Furray, C., 2002. Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nat. Med.* 8, 825-830.
- Butler, A.A., Cone, R.D., 2001. Knockout models resulting in the development of obesity. *Trends Genet.* 17, S50-54.
- Cánepa, M., Pozzi, A., Astola, A., Maggese, M.C., Vissio, P., 2008. Effect of salmon melanin-concentrating hormone and mammalian gonadotrophin-releasing hormone on somatolactin release in pituitary culture of *Cichlasoma dimerus*. *Cell Tissue Res.* 333, 149-159.
- Cerdá-Reverter, J.M., Canosa, L.F., Peter, R.E., 2006. Regulation of the hypothalamic melanin-concentrating hormone neurons by sex steroids in the goldfish: possible role in the modulation of luteinizing hormone secretion. *Neuroendocrinology* 84, 364-377.
- Cescato, R., Loesch, K.A., Waser, B., Mäcke, H.R., Rivier, J.E., Reubi, J.C., Schonbrunn, A., 2010. Agonist-biased signaling at the sst2A receptor: the multi-somatostatin analogs KE108 and SOM230 activate and antagonize distinct signaling pathways. *Mol. Endocrinol.* 24, 240-249.
- Challis, B.G., Coll, A.P., Yeo, G.S., Pincock, S.B., Dickson, S.L., Thresher, R.R., Dixon, J., Zahn, D., Rochford, J.J., White, A., Oliver, R.L., Millington, G., Aparicio, S.A., Colledge, W.H., Russ, A.P., Carlton, M.B., O'Rahilly, S., 2004. Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 4695-4700.
- Chambers, J., Ames, R.S., Bergsma, D., Muir, A., Fitzgerald, L.R., Hervieu, G., Dytko, G.M., Foley, J.J., Martin, J., Liu, W.S., Park, J., Ellis, C., Ganguly, S., Konchar, S., Cluderay, J., Leslie, R., Wilson, S., Sarau, H.M., 1999. Melanin-concentrating hormone is the cognate ligand for the orphan G-protein-coupled receptor SLC-1. *Nature* 400, 261-265.
- Chan, C.B., Leung, P.K., Wise, H., Cheng, C.H., 2004. Signal transduction mechanism of the seabream growth hormone secretagogue receptor. *FEBS Lett.* 577, 147-153.
- Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C.,

- Cobb, M.H., 2001. MAP kinases. *Chem. Rev.* 101, 2449-2476.
- Chen, Y., Hu, C., Hsu, C.K., Zhang, Q., Bi, C., Asnicar, M., Hsiung, H.M., Fox, N., Slieker, L.J., Yang, D.D., Heiman, M.L., Shi, Y., 2002. Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. *Endocrinology* 143, 2469-2477.
- Chen, X., Mihalic, J., Fan, P., Liang, L., Lindstrom, M., Wong, S., Ye, Q., Fu, Y., Jaen, J., Chen, J.L., Dai, K., Li, L., 2012. Discovery and characterization of a potent and selective antagonist of melanin-concentrating hormone receptor 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 363-366.
- Chini, B., Parenti, M., 2009. G-protein-coupled receptors, cholesterol and palmitoylation: facts about fats. *J. Mol. Endocrinol.* 42, 371-379.
- Chung, S., Funakoshi, T., Civelli, O., 2008. Orphan GPCR research. *Br. J. Pharmacol.* 153, S339-346.
- Chung, S., Saito, Y., Civelli, O., 2009. MCH receptors/gene structure-in vivo expression. *Peptides* 30, 1985-1989.
- Clark, S.D., Tran, H.T., Zeng, J., Reinscheid, R.K., 2010. Importance of extracellular loop one of the neuropeptide S receptor for biogenesis and function. *Peptides* 31, 130-138.
- Cook, L.B., Delorme-Axford, E.B., Robinson, K., 2008. Caveolae as potential mediators of MCH-signaling pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 592-595.
- Delos Santos, N.M., Gardner, L.A., White, S.W., Bahouth, S.W., 2006. Characterization of the residues in helix 8 of the human beta1-adrenergic receptor that are involved in coupling the receptor to G proteins. *J. Biol. Chem.* 281, 12896-12907.
- Duvernay, M.T., Dong, C., Zhang, X., Zhou, F., Nichols, C.D., Wu, G., 2009. Anterograde trafficking of G protein-coupled receptors: function of the C-terminal F(X)6LL motif in export from the endoplasmic reticulum. *Mol. Pharmacol.* 75, 751-761.
- Eberle, A.N., Mild, G., Schlumberger, S., Drozd, R., Hintermann, E., Zumsteg, U., 2004. Expression and characterization of melanin-concentrating hormone receptors on mammalian cell lines. *Peptides* 25, 1585-1595.
- Ernst, O.P., Meyer, C.K., Marin, E.P., Henklein, P., Fu, W.Y., Sakmar, T.P., Hofmann, K.P., 2000. Mutation of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin affects binding of transducin and peptides derived from the carboxyl-terminal sequences of transducin alpha and gamma subunits. *J. Biol. Chem.* 275, 1937-1943.
- Fan, J., Perry, S.J., Gao, Y., Schwarz, D.A., Maki, R.A., 2005. A point mutation in the human melanin concentrating hormone receptor 1 reveals an important domain for cellular trafficking. *Mol. Endocrinol.* 19, 2579-2590.
- Faussner, A., Bauer, A., Kalatskaya, I., Schüssler, S., Seidl, C., Proud, D., Jochum, M., 2005. The role of helix 8 and of the cytosolic C-termini in the internalization and signal transduction of B(1) and B(2) bradykinin receptors. *FEBS J.* 272, 129-140.
- Ferguson, S.S., 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in

- receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* 53, 1-24.
- Francis, K., Suzuki, M., Baker, B.I., 1997. Responses of melanin-concentrating hormone mRNA to salt water challenge in the rainbow trout. *Neuroendocrinology* 66, 195–202.
- Francke, F., Ward, R.J., Jenkins, L., Kellett, E., Richter, D., Milligan, G., Bächner, D., 2006. Interaction of neurochondrin with the melanin-concentrating hormone receptor 1 interferes with G protein-coupled signal transduction but not agonist-mediated internalization. *J. Biol. Chem.* 281, 32496-32507.
- Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.G., Schiöth, H.B., 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256-1272.
- Fredriksson, R., Schiöth, H.B., 2005. The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol. Pharmacol.* 67, 1414–1425.
- Fribourg, M., Moreno, J.L., Holloway, T., Provasi, D., Baki, L., Mahajan, R., Park, G., Adney, S.K., Hatcher, C., Eltit, J.M., Ruta, J.D., Albizu, L., Li, Z., Umali, A., Shim, J., Fabiato, A., Jr MacKerell, A.D., Brezina, V., Sealfon, S.C., Filizola, M., González-Maeso, J., Logothetis, D.E., 2011. Decoding the signaling of a GPCR heteromeric complex reveals a unifying mechanism of action of antipsychotic drugs. *Cell* 147, 1011-1023.
- Fritze, O., Filipek, S., Kuksa, V., Palczewski, K., Hofmann, K.P., Emst, O.P., 2003. Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 2290-2295.
- Fry, D., Dayton, B., Brodjian, S., Ogiela, C., Sidorowicz, H., Frost, L.J., McNally, T., Reilly, R.M., Collins, C.A., 2006. Characterization of a neuronal cell line expressing native human melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1290-1299.
- Gao, X.B., van den Pol, A.N., 2001. Melanin concentrating hormone depresses synaptic activity of glutamate and GABA neurons from rat lateral hypothalamus. *J. Physiol.* 533, 237-252.
- Georgescu, D., Sears, R.M., Hommel, J.D., Barrot, M., Bolaños, C.A., Marsh, D.J., Bednarek, M.A., Bibb, J.A., Maratos-Flier, E., Nestler, E.J., DiLeone, R.J., 2005. The hypothalamic neuropeptide melanin-concentrating hormone acts in the nucleus accumbens to modulate feeding behavior and forced-swim performance. *J. Neurosci.* 25, 2933-2940.
- Gether, U., 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* 21, 90-113.
- Green, J.A., Gu, C., Mykityn, K., 2012. Heteromerization of ciliary G protein-coupled receptors in the mouse brain. *PLoS One* 7, e46304.
- Gröneveld, D., Balm, P.H., Martens, G.J., Wendelaar Bonga, S.E., 1995a. Differential melanin-concentrating hormone gene expression in two hypothalamic nuclei of the teleost tilapia in response to environmental changes. *J. Neuroendocrinol.* 7, 527-533.
- Gröneveld, D., Balm, P.H., Wendelaar Bonga, S.E., 1995b. Biphasic effect of MCH on alpha-MSH

- release from the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) pituitary. *Peptides* 16, 945-949.
- Hamamoto, A., Mizusawa, K., Takahashi, A., Saito, Y., 2011. Signalling pathway of goldfish melanin-concentrating hormone receptors 1 and 2. *Regul. Pept.* 169, 6-12.
- Hamamoto, A., Horikawa, M., Saho, T., Saito, Y., 2012. Mutation of Phe318 within the NPxxY(x)(5,6)F motif in melanin-concentrating hormone receptor 1 results in an efficient signaling activity. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 3, 147.
- Hawes, B.E., Kil, E., Green, B., O'Neill, K., Fried, S., Graziano, M.P., 2000. The melanin-concentrating hormone couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways. *Endocrinology* 141, 4524-4532.
- Hermans, E., 2003. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* 99, 25-44.
- Hill, J., Duckworth, M., Murdock, P., Rennie, G., Sabido-David, C., Ames, R.S., Szekeres, P., Wilson, S., Bergsma, D.J., Gloger, I.S., Levy, D.S., Chambers, J.K., Muir, A.I., 2001. Molecular cloning and functional characterization of MCH2, a novel human MCH receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 20125-20129.
- Hollinger, S., Hepler, J.R., 2002. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol. Rev.* 54, 527-559.
- Huynh, J., Thomas, W.G., Aquilar, M.I., Pattenden, L.K., 2009. Role of helix 8 in G protein-coupled receptors based on structure-function studies on the type 1 angiotensin receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 302, 118-127.
- Iida-Klein, A., Guo, J., Takemura, M., Drake, M.T., Potts, J.T. Jr, Abou-Samra, A., Bringham, F.R., Segre, G.V., 1997. Mutations in the second cytoplasmic loop of the rat parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor result in selective loss of PTH-stimulated phospholipase C activity. *J. Biol. Chem.* 272, 6882-6889.
- Ishii, S., Shimizu, T., 2000. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog. Lipid Res.* 39, 41-82.
- Ito, M., Gomori, A., Ishihara, A., Oda, Z., Mashiko, S., Matsushita, H., Yumoto, M., Sano, S., Tokita, H., Moriya, M., Iwaasa, H., Kanatani, A., 2003. Characterization of MCH-mediated obesity in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284, E940-945.
- Jaakola, V.P., Griffith, M.T., Hanson, M.A., Cherezov, V., Chien, E.Y., Lane, J.R., Ijzerman, A.P., Stevens, R.C., 2008. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* 322, 1211-1217.
- Ji, Y., Zhang, Z., Hu, Y., 2009. The repertoire of G-protein-coupled receptors in *Xenopus tropicalis*. *BMC Genomics* 10, 263.
- Kato, A., Katada, S., Touhara, K., 2008. Amino acids involved in conformational dynamics and G protein coupling of an odorant receptor: targeting gain-of-function mutation. *J. Neurochem.* 107, 1261-1270.
- Katritch, V., Cherezov, V., Stevens, R.C., 2012. Diversity and modularity of G protein-coupled

- receptor structures, *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 17-27.
- Kawauchi, H., Kawazoe, I., Tsubokawa, M., Kishida, M., Baker, B.I., 1983. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature* 305, 321-323.
- Kawauchi, H., 2006. Functions of melanin-concentrating hormone in fish. *J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol.* 305, 751-760.
- Kaye, R.G., Saldanha, J.W., Lu, Z.L., Hulme, E.C., 2011. Helix 8 of the M1 muscarinic acetylcholine receptor: scanning mutagenesis delineates a G protein recognition site. *Mol. Pharmacol.* 79, 701-709.
- Kinoshita, M., Morita, T., Toyohara, H., Hirata, T., Sakaguchi, M., Ono, M., Inoue, K., Wakamatsu, Y., Ozato, K., 2001. Transgenic medaka overexpressing a melanin-concentrating hormone exhibit lightened body color but no remarkable abnormality. *Mar. Biotechnol. NY.* 3, 536-543.
- Kleinau, G., Jaeschke, H., Worth, C.L., Mueller, S., Gonzalez, J., Paschke, R., Krause, G., 2010. Principles and determinants of G-protein coupling by the rhodopsin-like thyrotropin receptor. *Plos One* 5, e9745.
- Kobayashi, Y., Hamamoto, A., Hirayama, T., Saito, Y., 2014. Molecular cloning, expression, and signaling pathway of four melanin-concentrating hormone receptors from *Xenopus tropicalis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* [Epub ahead of print] doi: 10.1016/j.ygcen.2014.03.005
- Kuniyeda, K., Okuno, T., Terawaki, K., Miyano, M., Yokomizo, T., Shimizu, T., 2007. Identification of the intracellular region of the leukotriene B4 receptor type 1 that is specifically involved in Gi activation. *J. Biol. Chem.* 282, 3998-4006.
- Lagerström, M.C., Hellström, A.R., Gloriam, D.E., Larsson, T.P., Schiöth, H.B., Fredriksson, R., 2006. The G protein-coupled receptor subset of the chicken genome. *PLoS Comput. Biol.* 2, e54.
- Lembo, P.M., Grazzini, E., Cao, J., Hubatsch, D.A., Pelletier, M., Hoffert, C., St-Onge, S., Pou, C., Labrecque, J., Groblewski, T., O'Donnell, D., Payza, K., Ahmad, S., Walker, P., 1999. The receptor for the orexigenic peptide melanin-concentrating hormone is a G-protein-coupled receptor. *Nat. Cell Biol.* 1, 267-271.
- Lin, X., Janovick, J.A., Cardenas, R., Conn, P.M., Peter, R.E., 2000. Molecular cloning and expression of a type-two somatostatin receptor in goldfish brain and pituitary. *Mol. Cell Endocrinol.* 166, 75-87.
- Logan, D.W., Bryson-Richardson, R.J., Pagan, K.E., Taylor, M.S., Currie, P.D., Jackson, I.J., 2003. The structure and evolution of the melanocortin and MCH receptors in fish and mammals. *Genomics* 81, 184-191.
- Ludwig, D.S., Tritos, N.A., Mastaitis, J.W., Kulkarni, R., Kokkotou, E., Elmquist, J., Lowell, B., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., 2001. Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 107, 379-386.
- Lyu, R.M., Germano, P.M., Choi, J.K., Le, S.V., Pisegna, J.R., 2000. Identification of an essential amino acid motif within the C terminus of the pituitary adenylate cyclase-activating

- polypeptide type I receptor that is critical for signal transduction but not for receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 275, 36134-36142.
- Macdonald, D., Murgolo, N., Zhang, R., Durkin, J.P., Yao, X., Strader, C.D., Graziano, M.P., 2000. Molecular characterization of the melanin-concentrating hormone/receptor complex: identification of critical residues involved in binding and activation. *Mol. Pharmacol.* 58, 217-225.
- Málaga-Diéguez, L., Yang, Q., Bauer, J., Pankevych, H., Freissmuth, M., Nanoff, C., 2010. Pharmacochaperoning of the A1 adenosine receptor is contingent on the endoplasmic reticulum. *Mol. Pharmacol.* 77, 940-952.
- Marin, E.P., Krishna, A.G., Zvyaga, T.A., Isele, J., Siebert, F., Sakmar, T.P., 2000. The amino terminus of the fourth cytoplasmic loop of rhodopsin modulates rhodopsin-transducin interaction. *J. Biol. Chem.* 275, 1930-1936.
- Marsh, D.J., Weingarh, D.T., Novi, D.E., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., Guan, X.M., Jiang, M.M., Feng, Y., Camacho, R.E., Shen, Z., Frazier, E.Z., Yu, H., Metzger, J.M., Kuca, S.J., Shearman, L.P., Gopal-Truter, S., MacNeil, D.J., Strack, A.M., MacIntyre, D.E., van der Ploeg, L.H., Qian, S., 2002. Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 3240-3245.
- Matsuda, K., Kojima, K., Shimakura, S., Takahashi, A., 2009. Regulation of food intake by melanin-concentrating hormone in goldfish. *Peptides* 30, 2060–2065.
- McCoy, K.L., Gyoneva, S., Vellano, C.P., Smrcka, A.V., Traynelis, S.F., Hepler, J.R., 2012. Protease-activated receptor 1 (PAR1) coupling to G(q/11) but not to G(i/o) or G(12/13) is mediated by discrete amino acids within the receptor second intracellular loop. *Cell. Signal.* 24, 1351-1360.
- Means, C.K., Miyamoto, S., Chun, J., Brown, J.H., 2008. S1P1 receptor localization confers selectivity for Gi-mediated cAMP and contractile responses. *J. Biol. Chem.* 283, 11954-11963.
- Metz, J.R., Peters, J.J., Flik, G., 2006. Molecular biology and physiology of the melanocortin system in fish: a review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148, 150-162.
- Milligan, G., 2003. Principles: extending the utility of [<sup>35</sup>S]GTP gamma S binding assays. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 87-90.
- Miyamoto-Matsubara, M., Saitoh, O., Maruyama, K., Aizaki, Y., Saito, Y., 2008. Regulation of melanin-concentrating hormone receptor 1 signaling by RGS8 with the receptor third intracellular loop. *Cell. Signal.* 20, 2084-2094.
- Miyamoto-Matsubara, M., Chung, S., Saito, Y., 2010. Functional interaction of regulator of G protein signaling-2 with melanin-concentrating hormone receptor 1. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1200, 112-119.
- Mizusawa, K., Saito, Y., Wang, Z., Kobayashi, Y., Matsuda, K., Takahashi, A., 2009. Molecular cloning and expression of two melanin-concentrating hormone receptors in goldfish. *Peptides*

- 30, 1990-1996.
- Mizusawa, K., Kobayashi, Y., Sunuma, T., Asahida, T., Saito, Y., Takahashi, A., 2011. Inhibiting roles of melanin-concentrating hormone for skin pigment dispersion in barfin flounder, *Verasper moseri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 171, 75-81.
- Mizusawa, K., Kawashima, Y., Sunuma, T., Hamamoto, A., Kobayashi, Y., Kodera, Y., Saito, Y., Takahashi, A., 2014. Involvement of melanin-concentrating hormone 2 in background color adaptation of barfin flounder *Verasper moseri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* [Epub ahead of print] doi: 10.1016/j.ygcen.2014.07.008.
- Moreira, I.S., 2014. Structural features of the G-protein/GPCR interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1840, 16-33.
- Mori, M., Harada, M., Terao, Y., Sugo, T., Watanabe, T., Shimomura, Y., Abe, M., Shintani, Y., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M., 2001. Cloning of a novel G protein-coupled receptor, SLT, a subtype of the melanin-concentrating hormone receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 1013-1018.
- Mul, J.D., Yi, C.X., van den Berg, S.A., Ruiter, M., Toonen, P.W., van der Elst, M.C., Voshol, P.J., Ellenbroek, B.A., Kalsbeek, A., la Fleur, S.E., Cuppen, E., 2010. Pmch expression during early development is critical for normal energy homeostasis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E477-488.
- Murakami, M., Kouyama, T., 2008. Crystal structure of squid rhodopsin. *Nature* 453, 363-367.
- Muramatsu, T., Suwa, M., 2006. Statistical analysis and prediction of functional residues effective for GPCR-G-protein coupling selectivity. *Protein Eng. Des. Sel.* 19, 277-283.
- Murdoch, H., Feng, G.J., Bächner, D., Ormiston, L., White, J.H., Richter, D., Milligan, G., 2005. Periplakin interferes with G protein activation by the melanin-concentrating hormone receptor-1 by binding to the proximal segment of the receptor C-terminal tail. *J. Biol. Chem.* 280, 8208-8220.
- Nagata, A., Hamamoto, A., Horikawa, M., Yoshimura, K., Takeda, S., Saito, Y., 2013. Characterization of ciliary targeting sequence of rat melanin-concentrating hormone receptor 1. *Gen. Comp. Endocrinol.* 188, 159-165.
- Naito, N., Nakai, Y., Kawauchi, H., Hayashi, Y., 1985. Immunocytochemical identification of melanin-concentrating hormone in the brain and pituitary gland of the teleost fishes *Oncorhynchus keta* and *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res.* 242, 41-48.
- Namba, T., Sugimoto, Y., Negishi, M., Irie, A., Ushikubi, F., Kakizuka, A., Ito, S., Ichikawa, A., Narumiya, S., 1993. Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. *Nature* 365, 166-170.
- Negishi, M., Namba, T., Sugimoto, Y., Irie, A., Katada, T., Narumiya, S., Ichikawa, A., 1993. Opposite coupling of prostaglandin E receptor EP3C with G<sub>s</sub> and G<sub>(o)</sub>. Stimulation of G<sub>s</sub> and inhibition of G<sub>(o)</sub>. *J. Biol. Chem.* 268, 26067-26070.
- Nunn, C., Feuerbach, D., Lin, X., Peter, R., Hoyer, D., 2002. Pharmacological characterisation of

- the goldfish somatostatin sst5 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 436, 173-186.
- Nygaard, R., Frimurer T.M., Holst, B., Rosenkilde, M.M., Schwartz, T.W., 2009. Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 249-259.
- Oka, Y., Saraiva, L., Kwan, Y.Y., Korsching, S.I., 2009. The fifth class of G $\alpha$  proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 1484-1489.
- Okuno, T., Yokomizo, T., Hori, T., Miyano, M., Shimizu, T., 2005. Leukotriene B4 receptor and the function of its helix 8. *J. Biol. Chem.* 280, 32049-32052.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., Miyano, M., 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.
- Pankevyeh, H., Korkhov, V., Freissmuth, M., Nanoff, C., 2003. Truncation of the A1 adenosine receptor reveals distinct roles of the membrane-proximal carboxyl terminus in receptor folding and G protein coupling. *J. Biol. Chem.* 278, 30283-30293.
- Park, J.H., Scheerer, P., Hofmann, K.P., Choe, H.W., Ernst, O.P., 2008. Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature* 454, 183-187.
- Pissios, P., Trombly, D.J., Tzamelis, I., Maratos-Flier, E., 2003. Melanin-concentrating hormone receptor 1 activates extracellular signal-regulated kinase and synergizes with G(s)-coupled pathways. *Endocrinology* 144, 3514-3523.
- Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pellemounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, R., Kanarek, R., Maratos-Flier, E., 1996. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviors. *Nature* 380, 243-247.
- Rashid, A.J., So, C.H., Kong, M.M., Furtak, T., El-Ghundi, M., Cheng, R., O'Dowd, B.F., George, S.R., 2007. D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 654-659.
- Rasmussen, S.G., DeVree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J.M., Shah, S.T., Lyons, J.A., Caffrey, M., Gellman, S.H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W.I., Sunahara, R.K., Kobilka, B.K., 2011. Crystal structure of the  $\beta$ 2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549-555.
- Reinscheid, R.K., Xu, Y.L., Okamura, N., Zeng, J., Chung, S., Pai, R., Wang, Z., Civelli, O., 2005. Pharmacological characterization of human and murine neuropeptide s receptor variants. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 1338-1345.
- Ritter, S.L., Hall, R.A., 2009. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 819-830.
- Rodriguez, M., Beauverger, P., Naime, I., Rique, H., Ouvry, C., Souchaud, S., Dromaint, S., Nagel, N., Suply, T., Audinot, V., Boutin, J.A., Galizzi, J.P., 2001. Cloning and molecular characterization of the novel human melanin-concentrating hormone receptor MCH2. *Mol. Pharmacol.* 60, 632-639.
- Rossi, M., Choi, S.J., O'Shea, D., Miyoshi, T., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 1997.



- Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. *Endocrinology* 138, 351-355.
- Sailer, A.W., Sano, H., Zeng, Z., McDonald, T.P., Pan, J., Pong, S.S., Feighner, S.D., Tan, C.P., Fukami, T., Iwaasa, H., Hreniuk, D.L., Morin, N.R., Sadowski, S.J., Ito, M., Bansal, A., Ky, B., Figueroa, D.J., Jiang, Q., Austin, C.P., MacNeil, D.J., Ishihara, A., Ihara, M., Kanatani, A., van der Ploeg, L.H., Howard, A.D., Liu, Q., 2001. Identification and characterization of a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-2R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 7564-7569.
- Saito, Y., Nothacker, H.P., Wang, Z., Lin, S.H., Leslie, F., Civelli, O., 1999. Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature* 400, 265-269.
- Saito, Y., Cheng, M., Leslie, F.M., Civelli, O., 2001a. Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 435, 26-40.
- Saito, Y., Wang, Z., Hagino-Yamagishi, K., Civelli, O., Kawashima, S., Maruyama, K., 2001b. Endogenous melanin-concentrating hormone receptor SLC-1 in human melanoma SK-MEL-37 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 44-50.
- Saito, Y., Tetsuka, M., Yue, L., Kawamura, Y., Maruyama, K., 2003. Functional role of *N*-linked glycosylation on the rat melanin-concentrating hormone receptor 1. *FEBS Lett.* 533, 29-34.
- Saito, Y., Tetsuka, M., Li, Y., Kurose, H., Maruyama, K., 2004. Properties of rat melanin-concentrating hormone receptor 1 internalization. *Peptides* 25, 1597-1604.
- Saito, Y., Tetsuka, M., Saito, S., Imai, K., Yoshikawa, A., Doi, H., Maruyama, K., 2005. Arginine residue 155 in the second intracellular loop plays a critical role in rat melanin-concentrating hormone receptor 1. *Endocrinology* 146, 3452-3462.
- Saito, Y., Hamamoto, A., Kobayashi, Y., 2013. Regulated Control of Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1 through Posttranslational Modifications. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 4, 154.
- Saitoh, O., Kubo, Y., Miyatani, Y., Asano, T., Nakata, H., 1997. RGS8 accelerates G-protein-mediated modulation of K<sup>+</sup> currents. *Nature* 390, 525-529.
- Satake, H., Matsubara, S., Aoyama, M., Kawada, T., Sakai, T., 2013. GPCR Heterodimerization in the Reproductive System: Functional Regulation and Implication for Biodiversity. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 4, 100.
- Schlumberger, S.E., Jäggin, V., Tanner, H., Eberle, A.N., 2002. Endogenous receptor for melanin-concentrating hormone in human neuroblastoma Kelly cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 54-59.
- Schröder, R., Janssen, N., Schmidt, J., Kebig, A., Merten, N., Hennen, S., Müller, A., Blättermann, S., Mohr-Andrä, M., Zahn, S., Wenzel, J., Smith, N.J., Gomeza, J., Drewke, C., Milligan, G., Mohr, K., Kostenis, E., 2010. Deconvolution of complex G protein-coupled receptor signaling in live cells using dynamic mass redistribution measurements. *Nat. Biotechnol.* 28, 943-949.
- Segal-Lieberman, G., Bradley, R.L., Kokkotou, E., Carlson, M., Trombly, D.J., Wang, X., Bates, S.,

- Myers, M.G. Jr., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., 2003. Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100, 10085-10090.
- Shearman, L.P., Camacho, R.E., Sloan Stribling, D., Zhou, D., Bednarek, M.A., Hreniuk, D.L., Feighner, S.D., Tan, C.P., Howard, A.D., van der Ploeg, L.H., MacIntyre, D.E., Hickey, G.J., Strack, A.M., 2003. Chronic MCHR1 receptor modulation alters appetite, body weight and adiposity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 475, 37-47.
- Shi, L.C., Wang, H.Y., Horwitz, J., Friedman, E., 1996. Guanine nucleotide regulatory proteins, Gq and Gi1/2, mediate platelet-activating factor-stimulated phosphoinositide metabolism in immortalized hippocampal cells. *J. Neurochem.* 67, 1478-1484.
- Shimada, M., Tritos, N.A., Lowell, B.B., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., 1998. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396, 670-674.
- Shimomura, Y., Mori, M., Sugo, T., Ishibashi, Y., Abe, M., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., Sumino, Y., Fujino, M., 1999. Isolation and identification of melanin-concentrating hormone as the endogenous ligand of the SLC-1 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 622-626.
- Siehl, S., Zupanc, G.K., Seuwen, K., Hoyer, D., 1999. Characterisation of the fish sst3 receptor, a member of the SRIF1 receptor family: atypical pharmacological features. *Neuropharmacology* 38, 449-462.
- Sugimoto, N., Takawa, N., Okamoto, H., Sakurada, S., Takawa, Y., 2003. Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G12/13-Rho and Gi pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform. *Mol. Cell Biol.* 23, 1534-1545.
- Sundström, L., Greasley, P.J., Engberg, S., Wallander, M., Ryberg, E., 2013. Succinate receptor GPR91, a  $G\alpha(i)$  coupled receptor that increases intracellular calcium concentrations through PLC $\beta$ . *FEBS Lett.* 587, 2399-2404.
- Takahashi, A., Tsuchiya, K., Yamanome, T., Amano, M., Yasuda, A., Yamamori, K., Kawauchi, H., 2004. Possible involvement of melanin-concentrating hormone in food intake in a teleost fish, barfin flounder. *Peptides* 25, 1613-1622.
- Takahashi, A., Kosugi, T., Kobayashi, Y., Yamanome, T., Schiöth, H.B., Kawauchi, H., 2007. The melanin-concentrating hormone receptor 2 (MCH-R2) mediates the effect of MCH to control body color for background adaptation in the barfin flounder. *Gen. Comp. Endocrinol.* 151, 210-219.
- Takase, K., Kikuchi, K., Tsuneoka, Y., Oda, S., Kuroda, M., Funato, H., 2014. Meta-analysis of melanin-concentrating hormone signaling-deficient mice on behavioral and metabolic phenotypes. *PLoS One.* 9, e99961.
- Takekawa, S., Asami, A., Ishihara, Y., Terauchi, J., Kato, K., Shimomura, Y., Mori, M., Murakoshi, H., Kato, K., Suzuki, N., Nishimura, O., Fujino, M., 2002. T-226296: a novel, orally active and selective melanin-concentrating hormone receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 438, 129-135.
- Tan, C.P., Sano, H., Iwaasa, H., Pan, J., Sailer, A.W., Hreniuk, D.L., Feighner, S.D., Palyha, O.C.,

- Pong, S.S., Figueroa, D.J., Austin, C.P., Jiang, M.M., Yu, H., Ito, J., Ito, M., Guan, X.M., MacNeil, D.J., Kanatani, A., van der Ploeg, L.H., Howard, A.D., 2002. Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. *Genomics* 79, 785-792.
- Tanaka, M., Azuma, M., Nejigaki, Y., Saito, Y., Mizusawa, K., Uchiyama, M., Takahashi, A., Shioda, S., Matsuda, K., 2009. Melanin-concentrating hormone reduces somatolactin release from cultured goldfish pituitary cells. *J. Endocrinol.* 203, 389-398.
- Tetsuka, M., Saito, Y., Imai, K., Doi, H., Maruyama, K., 2004. The basic residues in the membrane-proximal C-terminal tail of the rat melanin-concentrating hormone receptor 1 are required for receptor function. *Endocrinology* 145, 3712-3723.
- Tuziak, S.M., Volkoff, H., 2012. A preliminary investigation of the role of melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptors in appetite regulation of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Mol. Cell. Endocrinol.* 348, 281-296.
- VanLeeuwen, D., Steffey, M.E., Donahue, C., Ho, G., MacKenzie, R.G., 2003. Cell surface expression of the melanocortin-4 receptor is dependent on a C-terminal di-isoleucine sequence at codons 316/317. *J. Biol. Chem.* 278, 15935-15940.
- Vaughan, J.M., Fischer, W.H., Hoeger, C., Rivier, J., Vale, W., 1989. Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. *Endocrinology* 125, 1660-1665.
- Venkatakrishnan, A.J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C.G., Schertler, G.F., Babu, M.M., 2013. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* 494, 185-194.
- Venkatesan, S., Petrovic, A., Locati, M., Kim, Y.O., Weissman, D., Murphy, P.M., 2001. A membrane-proximal basic domain and cysteine cluster in the C-terminal tail of CCR5 constitute a bipartite motif critical for cell surface expression. *J. Biol. Chem.* 276, 40133-40145.
- Verlaet, M., Adamantidis, A., Coumans, B., Chanas, G., Zorzi, W., Heinen, E., Grisar, T., Lakaye, B., 2002. Human immune cells express ppMCH mRNA and functional MCHR1 receptor. *FEBS Lett.* 527, 205-210.
- Vitale, R.M., Pedone, C., de Benedetti, P.G., Fanelli, F., 2004. Structural features of the inactive and active states of the melanin-concentrating hormone receptors: insights from molecular simulations. *Proteins* 56, 430-448.
- Wade, S.M., Lim, W.K., Lan, K.L., Chung, D.A., Nanamori, M., Neubig, R.R., 1999. Gi activator region of  $\alpha_{2A}$ -adrenergic receptors: distinct basic residues mediate Gi versus Gs activation. *Mol. Pharmacol.* 56, 1005-1013.
- Wang, S., Behan, J., O'Neill, K., Weig, B., Fried, S., Laz, T., Bayne, M., Gustafson, E., Hawes, B.E., 2001. Identification and pharmacological characterization of a novel human melanin-concentrating hormone receptor, mch-r2. *J. Biol. Chem.* 276, 34664-34670.
- Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., Moukhametzianov, R., Edwards, P.C., Henderson, R., Leslie, A.G., Tate, C.G., Schertler, G.F., 2008. Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486-491.

- Wess, J., 1998. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol. Ther.* 80, 231-264.
- Wong, S.K., 2003. G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs. *Neurosignals* 12, 1-12.
- Yasuda, D., Okuno, T., Yokomizo, T., Hori, T., Hirota, N., Hashidate, T., Miyano, M., Shimizu, T., Nakamura, M., 2009. Helix 8 of leukotriene B4 type-2 receptor is required for the folding to pass the quality control in the endoplasmic reticulum. *FASEB J.* 23, 1470-1481.
- Zhang, C., Song, Y., Thompson, D.A., Madonna, M.A., Millhauser, G.L., Toro, S., Varga, Z., Westerfield, M., Gamse, J., Chen, W., Cone, R.D., 2010. Pineal-specific agouti protein regulates teleost background adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 20164-20171.