

摂食関連受容体MCHR1の細胞内分子メカニズム解明

濱本 明恵

広島大学大学院総合科学研究科

Molecular Mechanism of Melanin-Concentrating Hormone Receptor-Induced Intracellular Signaling

Akie HAMAMOTO

Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

論文の要旨

序論

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、脳内の広範囲に渡って投射する神経ペプチドである。MCH受容体 (MCHR) はMCHR1とMCHR2の二種類が存在し、Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) のクラスAに属する。GPCRは細胞膜を7回貫通する構造であり、細胞外ドメインにリガンドが結合すると立体構造が変化し、直ちに細胞内でGタンパク質と共役することで情報伝達を行う。Gタンパク質 α サブユニットは複数の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。遺伝子改変動物や選択的アンタゴニストを用いた行動実験から、MCH-MCHR1系は摂食行動やエネルギー代謝に加えて、うつ不安にも重要な役割を担うことが報告された。従ってMCHR1は、摂食や情動が関与する疾患に対する治療の創薬ターゲットとして注目を浴びている。

受容体を構成するどのアミノ酸残基が如何なる受容体機能を担うのかといった、受容体の構造と機能の相関関係を構造活性相関と呼ぶ。哺乳類

MCHR1において構造活性相関の解明が進展しているが、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、第I章では、キンギョ MCHRの細胞内情報伝達系を解析した。そしてキンギョで新規に見出した自身の研究成果を基に、第II章では哺乳類MCHR1におけるGi/o選択的共役に重要なアミノ酸、第III章ではGq選択的活性に重要なアミノ酸の解明を試みた。

第I章 魚類MCH受容体の情報伝達系解析

まず、Gタンパク質選択機構解明の礎となる研究として魚類MCHRの細胞内情報伝達系の解析を行った。魚類においてMCHは一般的に体色明化作用が知られている。またMCHの摂食調節能に着目すると、哺乳類 (摂食亢進) とキンギョ (摂食抑制) 間で反対の効果を示す。この要因の一つとして、MCHRの細胞内情報伝達系の違いが

想定された。そこで、キンギョ MCHR1又はキンギョ MCHR2が安定高発現したヒト胎児由来腎臓 (HEK293T) 細胞を用いて、細胞内情報伝達系を解析した。その結果、キンギョ MCHR1はMCH刺激により細胞内Ca²⁺濃度の上昇、ERK1/2のリン酸化及び弱いcAMP産生を示した。但し、cAMP量測定におけるEC50値は内在性リガンドに対する値としては非常に高いため、cAMP産生の起点となるGs共役の生理的意義については注意を要する。また、上述した各シグナル反応がGi/oを特異的に不活性化させる百日咳毒素 (PTX) に非感受性であったことから、キンギョ MCHR1は主にGqと共役することが判明した。一方、キンギョ MCHR2も細胞内Ca²⁺濃度の上昇、ERK1/2リン酸化を示したが、cAMP産生抑制及びPTX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MCHRのGタンパク質選択性が異なることを明らかにした。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と考えられる。さらに哺乳類MCHR1のアゴニスト及びアンタゴニストの魚類MCHRに対する効果の検討も試みた。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、活性は弱いが選択的な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、キンギョ MCHRが担う、それぞれの生理機能の解明が期待される。本研究成果は、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。

第二章 哺乳類MCHR1におけるGタンパク質選択機構の解明

多くのGPCRは、複数種のGタンパク質を介して活性化される。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生じ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特定のアミノ酸残基の予測は非常に難しく、実験により明らかにされた例も数例しか存在しない。哺乳類MCHR1においても構造活性相関の研究が進んでいるにも拘らず、未だ解決されていない課題が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。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、ラットMCHR1のアミノ酸配列をキンギョの配列に置換することで、Gi/o共役能が消失する可能性を考えた。そして、細胞内ループ領域近傍に着目した置換体を作製し、それぞれをHEK293T細胞に一過性発現させてGi/o活性を評価した。その結果、Gq活性に影響を与えることなく、Gi/o活性低下を示す2つの置換体 (i2_6sub, i3_6sub) を同定した。i2_6subは細胞内第2ループ領域のアミノ酸6残基を、i3_6subは細胞内第3ループ領域の4残基及び第5膜貫通領域の2残基を同時に置換した置換体である。これらは細胞内Ca²⁺動員能測定においてPTX感受性低下を示し、Gi/o活性低下が示唆された。さらに、Gi/o活性選択的なGTPγS結合能測定及びcAMP量測定、統合的な細胞内応答を評価するDynamic mass redistribution (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。置換体の置換箇所の内、アミノ酸4残基の置換では活性低下を示さないことから、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と推測された。本研究成果は、MCHR1-Gi/o相互作用の3次元モデル作製や、他のGPCRにおける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。

第三章 哺乳類MCHR1におけるNPxxY(x)_{5,6}Fモチーフの機能解析

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)_{5,6}Fモチーフ、第2、4-7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。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ており、実際に哺乳類MCHR1において、DRYとProは細胞内シグナル伝達などに重要であることが示されている。しかしながら、哺乳類MCHR1におけるNPxxY(x)_{5,6}Fモチーフの役割は不明であったため、当該モチーフの機能解析を行った。NPxxY(x)_{5,6}FモチーフをそれぞれAlaに置換し、HEK293T細胞に一過性発現させて細胞内Ca²⁺濃度測定を行った結果、F318Aのみ機能低下を示さなかった。さらに、Phe318を様々なアミノ酸に置換し、同様に実験を行ったところ、F318Kは有意な機能亢進を示すことを見出した。次に、Gi/o活性選択的なGTPγS結合能測定において、F318Kは機能亢進を示さなかったため、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。さらに、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選択的な機能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。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)_{5,6}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、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。

総合考察

本研究により、「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、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であろう。さらに、本研究ではGq活性が優勢となるMCHR1置換体3種類の作出に成功した。これら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を期待される。リガンドの種類によりGi/o、Gqの活性を選択的に制御出来れば、ある生理現象のみ（肥満又はうつ等）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、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。