

【要約】

Analysis of potent inhibitory effects of RGS8 on intracellular calcium
responses of angiotensin II receptor
(アンジオテンシン受容体の細胞内カルシウム応答に対する RGS8 の強力な抑制
効果の解析)

千葉大学大学院医学薬学府
先端生命科学専攻
(主任：粕谷善俊 准教授)
宋 丹

1. 研究の背景

GPCR に作用する多くのホルモン・神経伝達物質の機能調節には、リガンド側の調節と共に GPCR 情報伝達の細胞内調節機構も同等に重要であり、GPCR のリン酸化やインターナリゼーションに加えて、RGS 蛋白質による調節の重要性が明らかになりつつある。RGS 蛋白質は、GPCR 情報伝達を抑制する細胞内調節因子ファミリーで、その RGS ドメインが $G\alpha$ サブユニットと相互作用して、 $G\alpha$ の GTP 加水分解活性を促進して不活性化を促す (GTPase activating protein=GAP) 活性により、GPCR 情報伝達を抑制する。RGS 蛋白質のうち、R4/B サブファミリーの RGS 蛋白質は、一つの RGS ドメインを持ち N 末側に短い領域がある分子量の小さい RGS 蛋白質の一群である。我々は、心血管系に多く発現する RGS のなかで、以前から RGS5 について研究を進め、RGS5 の GAP としての特性解析や、C キナーゼによるリン酸化と機能調節、腫瘍血管での発現亢進、酸素センサー分子としての特性などを報告してきた。

近年、RGS5 ノックアウトマウスは低血圧になることが報告された。一方、RGS2 のノックアウトマウスは強度の高血圧になること、その高血圧症はアンジオテンシン受容体拮抗薬で抑えられることが報告された。同じ血管平滑筋に存在する、RGS2 と RGS5 の各ノックアウトマウスの特徴が大きく異なることに着想を得て、我々は、アンジオテンシン AT1 受容体の情報伝達に対し、RGS2 が選択的に強い抑制効果を持つことを見出した。そして、RGS2 の強い活性には、N 末端後半部の GPCR 認識部位が特に重要な役割を持つことを明らかにした。また、血管平滑筋には、7 種類の R4/B サブファミリー RGS が存在することを明らかにした (Cell Signal, 2011)。しかし、心臓や血管を含めて、一般に細胞には複数種の RGS タンパク質が発現しているため、個々の RGS タンパク質の生理的・病態生理的意義を把握することには困難が付きまとう。それに対する一つのアプローチは、使用する活性測定系で特に強い活性をあらわす RGS 分子種を特定し解析することであろう。

2. 研究の目的

本研究は、血管平滑筋に存在する 7 種類の R4/B サブファミリー RGS 蛋白質による、アンジオテンシン AT1 受容体及びエンドセリン ETA 受容体シグナルの抑制効果について比較検討し、特に RGS8 に焦点を当て、強い抑制効果がなぜ生じるかを分子レベルで解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RGS plasmids の作製 :

R4/B サブファミリー RGS 蛋白質について、① 全長 7 種類 (RGS1、RGS2、RGS3、RGS4、RGS5、RGS8、RGS16)、② RGS ドメイン 4 種類 (RGS2D、RGS3D、RGS5D、RGS8D)、③ キメラ RGS ドメイン (RGS8 と RGS5 の RGS ドメイン部分の 3 種類のエキソン部分を相互置換したキメラ R588D、R858D、R885D、R558D) を作製した。

(2) 安定発現細胞の作製と細胞内カルシウム濃度変化の測定 :

マウス AT1a 受容体及びヒト ETA 受容体を安定発現させた 293T 細胞を作製して使用した。その安定発現細胞に、種々の RGS を一過性に発現させ、Fura-2 試薬を用いて、アンジオテンシン II または ET-1 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定した。

(3) RGS の細胞内発現量の測定 :

Western blotting 法で N 末端部を myc 標識した RGS の細胞内発現量を測定した。RGS 蛋白質の抑制効果の違いを正確に検出するために、種々の濃度のリガンド刺激に対する、種々の発現量の RGS 蛋白質の効果の詳細に検討した。RGS 発現量はウェスタン解析により半定量的にモニターし、常にそれぞれほぼ同等の細胞内発現量の時の各 RGS の抑制効果を比較するように配慮した。

4. 研究成果及び考察

(1) AT1 受容体及び ETA 受容体を介する情報伝達に対する全長 RGS タンパク質の抑制効果:

マウス AT1a 受容体及びヒト ETA 受容体を安定発現させた 293T 細胞に、RGS1、RGS2、RGS3、RGS4、RGS5、RGS8、RGS16 を一過性に様々な発現量で発現させ、Fura-2 を用いて、アンジオテンシン II (Ang II)、エンドセリン-1 (ET-1) 刺激による細胞内 Ca^{2+} 応答を測定し、AT1 受容体及び ETA 受容体を介する情報伝達に対する各 RGS タンパク質の抑制効果について比較検討した。上記 2 種類のどの受容体についても、RGS2、RGS3、RGS8 が各リガンドの全濃度において強い抑制効果を示した。RGS1、RGS4、RGS5 及び RGS16 の抑制効果はそれよりも弱く、特に、高濃度リガンド刺激の場合に、その差が顕著に認められた。

(2) 各 RGS の N 末端部分と RGS ドメイン部分の機能的役割の検討 :

AT1a 受容体及び ETA 受容体シグナル抑制効果の強かった RGS2、RGS3 及び RGS8 について、それぞれの全長 RGS タンパク質と N 末端部を欠く RGS ドメイン部分のみの変異体の抑制効果を、上記と同様の方法で検討した。RGS2 は N 末端部を欠くと抑制効果が著明に減弱したので、RGS2 の N 末端部には、その RGS 効果を増強させる役割があると考えられた。これに対して、RGS3 と RGS8 の場合は、N 末端部を欠く RGS ドメイン部分のみでも全長とほぼ同等の強い効果がみられた。従って、RGS3 と RGS8 の強い抑制活性はその RGS ドメイン部分の特性に依存していることがわかった。

(3) RGS8 タンパク質の強い GPCR シグナル抑制活性を担う RGS ドメイン中の分子内領域の検討 :

RGS3 と RGS8 は RGS ドメイン自体で GPCR シグナルを強く抑制することが明らかになったので、活性の弱い RGS5 の RGS ドメインと活性の強い RGS8 の RGS ドメインとの様々なキメラ変異体を作製した。R4/B サブファミリーの RGS ドメインは共通して 3 個のエクソンからなっている。そこで、エクソンは一つのモジュールとして機能することがありうる (Go M, Nature, 1981) との考えを取り入れて、一つの RGS ドメインをエクソンごとに 3 部分に分けてその一部分ごとに置換した RGS8 と RGS5 のキメラ RGS ドメイン (R588D、R858D、R885D、R558D) を作製し、RGS5D=RGS555D 及び RGS8D=RGS888D と抑制能がいかに変化するかを比較した。

AT1a 受容体安定発現細胞を用いて、それぞれのキメラの GPCR シグナル抑制活性を検討したところ、R588D、R858D、R558D は強い抑制活性を保持していたが、RGS8 の C 末端部の第三エクソン部分を RGS5 の対応する部分と置換したキメラ R885D は、抑制活性が極めて弱かった。従って、RGS8 の強い GPCR シグナル抑制活性には、その RGS ドメインの C 末

端第三エクソン部分が非常に重要な役割を担っていると考えられた。

(4) RGS8 の EN 変異体を用いた実験 : G タンパク質の $G\alpha$ サブユニットと RGS ドメインとの結合の必要性に関する検討

RGS8 の RGS ドメインの C 末端第三エクソン部分がどのような機能的役割を担っているのかは上記の結果からは不明である。RGS ドメインと $G\alpha$ サブユニット複合体の立体構造の解析から、一般に、RGS ドメインは 9 個存在する α ヘリックスの中で、① $\alpha 3-\alpha 4$ ループ部位、② $\alpha 5-\alpha 6$ ループ部位、③ $\alpha 7-\alpha 8$ 部位の 3 カ所で活性化状態または遷移状態の $G\alpha$ サブユニットと結合するとされている。本研究で重要性が示された C 末端第三エクソン部分は $\alpha 6\sim\alpha 9$ を含み、上記の 3 番目の結合部位 ($\alpha 7-\alpha 8$ 部位) を含んでいるので、この部位の結合性の強弱や抑制活性の強弱に関わっている可能性が考えられる。一方、C 末端第三エクソン部分が独自に、RGS 機能とは別の何らかの抑制効果を現している可能性も否定できない。そこで、上記の第 1 番目の結合部位とされている RGS8 の Glu81Asn82 (E81N82) を Ala81Ala82 (81A82A) に置換した変異体を作製して、その抑制効果を検討した。その結果、この EN 変異体 (AA 置換体) では C 末端第三エクソン部分は完全に保存されているにもかかわらず抑制活性が激減した。RGS2 と RGS3 の EN 変異体 (AA 置換体) でも結果は同様であった (予備的結果)。従って、C 末端第三エクソン部分は、独自に新たな強い抑制活性を持つものではなく、RGS としての機能を増強するという役割を担っていると考えるのが妥当であろうと思われた。

アンジオテンシン II とエンドセリン-1 は、血管収縮のみならず、動脈硬化、心筋のリモデリングなど病態生理学的に重要な作用をもつ。本研究では、AT1a 受容体及び ETA 受容体に対して RGS2、RGS3、RGS8 が強い抑制活性を持つことが明らかになった。RGS2 はアンジオテンシンの関与する血圧調節機構に重要な役割を果たしていることが示されているが、高血圧のみならず、動脈硬化・虚血性心疾患・心不全・腎疾患・糖尿病等、様々な疾患の発症進展に、これら 2 つの血管作動性ペプチドは非常に重要であることから、RGS2、RGS3、あるいは RGS8 の細胞内存在量を増加させる薬物、あるいはその RGS 活性を増強する薬物が開発されれば、これらの病態の改善に有用と考えられる。実際、RGS2 については、その細胞内存在量を増加させる薬物が報告されるなど、RGS を標的とする治療応用が視野に入ってきている。本研究で得られた結果を土台として、RGS2、RGS3、あるいは RGS8 を標的とする新しい治療薬の開発のために、さらなる研究を進めることが望まれる。

5. 結語

- (1) RGS2、RGS3、RGS8 は AT1a 受容体シグナルを強く抑制する。
- (2) RGS3 と RGS8 が強いのは各々の RGS ドメインの抑制が強いからである。
- (3) RGS8 ドメインの強い抑制活性は C 末端第三エクソン部の RGS 活性を増強する特性により現れることが明らかになった。

Journal of Receptors and Signal Transduction
2015年6月18日投稿中