

G蛋白質シグナル調節蛋白質（RGS）を介する
新しい耐性/逆耐性調節機構の解析

課題番号 11670082

平成11年度～平成12年度科学研究費補助金
（基盤研究（C）（2））
研究成果報告書

平成13年3月

研究代表者 諸井佳代子
（千葉大学大学院医学研究科助手）

平成 11 年度～12 年度科学研究費補助金（基盤研究費 C（2））
研究報告書

1. 課題番号 11670082

2. 研究課題

G 蛋白質シグナル調節蛋白質（RGS）を介する新しい耐性/
逆耐性調節機構の解析

3. 研究組織

研究代表者 諸井佳代子（千葉大学大学院医学研究科 助手）
研究分担者 西山真理子（千葉大学大学院医学研究科 助手）
木村 定雄（千葉大学大学院医学研究科 教授）
門田 朋子（千葉大学医学部 助教授）

4. 研究経費

平成 11 年度	2、200 千円
平成 12 年度	1、200 千円
計	3、400 千円

5. 研究発表

(1) 学会誌等

Shibasaki, T., Moroi, K., Nishiyama, M., Zhou, J., Sakamoto, A., Masaki, T., Ito, K., Haga, T. and Kimura, S.: Characterization of the carboxyl terminal-truncated endothelin B receptor coexpressed with G protein-coupled receptor kinase 2. **Biochem. Mol. Biol. Int.** 47,569-577, 1999.

Usui, H., Nishiyama, M., Moroi, K., Shibasaki, T., Zhou, J., Ishida, J., Fukamizu, A., Haga, T. Sekiya, S. and Kimura, S.: RGS domain in the amino-terminus of G protein-coupled receptor kinase-2 inhibits Gq-mediated signaling. **Int. J. Mol. Med.** 5, 335-340, 2000.

Zhou, J., Moroi, K., Nishiyama, M., Usui, H., Seki, N., Ishida, J., Fukamizu, A. and Kimura, S.: Characterization of RGS5 in regulation of G protein-coupled receptor signaling. **Life Sciences** **68**, 1457-1469, 2001.

(2) 口頭発表

西山真理子、諸井佳代子、碓井和宏、周静、関直彦、石田純治、深水昭吉、木村定雄

G蛋白質シグナル調節蛋白質、RGS5の基本特性および機能の解析

第72回日本生化学会大会、平成11年10月9日（横浜）

生化学、71巻8月号、1060p（1999）

碓井和宏、西山真理子、諸井佳代子、柴崎忠雄、周静、石田純治、深水昭吉、芳賀達哉、関谷宗英、木村定雄

G_{RK2}のキナーゼドメインをふくまないN末端部はG_qシグナルを抑制する

第72回日本生化学会大会、平成11年10月9日（横浜）

生化学、71巻8月号、1061p（1999）

碓井和宏、西山真理子、諸井佳代子、柴崎忠雄、周静、石田純治、深水昭吉、芳賀達哉、関谷宗英、木村定雄

RGS domain in the amino terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 inhibits G_q-mediated signaling.

第73回日本薬理学会年会、平成12年3月23日（横浜）

Jpn. J. Pharmacol. 82 (Suppl.I) 54 p（2000）

周静、諸井佳代子、西山真理子、碓井宏和、関直彦、石田純治、深水昭吉、木村定雄

Characterization of RGS5 in regulation of G protein-coupled receptor signaling

第73回日本薬理学会年回、平成12年3月23日（横浜）

Jpn. J. Pharmacol. 82 Suppl.I 145 p（2000）

諸井佳代子、西山真理子、碓井宏和、周静、佐藤素子、木村定雄
G蛋白質シグナル調節蛋白質RGS5のPKCによるリン酸化
第73回日本生化学会大会、平成12年10月13日（横浜）
生化学、72巻、8月号、911p（2000）

諸井佳代子、西山真理子、佐藤素子。碓井和宏、木村定雄
Phosphorylation of RGS5 by protein kinase C
第74回日本薬理学会年会、平成13年3月22日（横浜）
Jap. J. Pharmacol. 85 Suppl. 178p（2001）

研究成果

緒言

G蛋白質共役受容体を介する情報伝達系では受容体をリガンドで連続刺激の後、速やかにその機能が減弱する、いわゆる脱感作が観察される。我々は、リガンド刺激後観察される脱感作（耐性発現）現象を解明するため、G蛋白質共役受容体であるエンドセリン B 受容体を発現した培養細胞において、受容体のリン酸化と脱感作との関連を検討してきた。その結果、本受容体の脱感作が受容体キナーゼ（GRK）によるリン酸化と密接な関連を持つことが明らかになったが、リン酸化だけでは説明できず、他の情報伝達系を調節する因子の関与が考えられた。最近発見された3量体G蛋白質を調節するG蛋白質シグナル調節蛋白質（RGS）は、活性型G蛋白質のGTPの加水分解を促進してG蛋白質を不活性化し、最終的には受容体機能を低下（脱感作）させるものである。現在まで20種以上のRGSが報告され、G蛋白質共役受容体情報の新しい調節因子として報告され始めている。そこで本研究ではG蛋白質共役7回膜貫通型受容体の脱感作（耐性発現）におけるG蛋白質シグナル調節蛋白質(RGS)の関与を、エンドセリン受容体で検討し、それら受容体の脱感作（耐性発現）機構を解明することとした。

方法

(1) 蛋白質シグナル調節蛋白質（RGS）及び受容体発現vectorの調製；

ラットRGS(4、5)をコードするcDNAを調整、そのまま又はc-mycやHisタグを結合させたのち、発現vectorに組み込み、培養細胞（HEK293）に一過性に発現させた。発現効率の検討は、c-myc抗体によるウエスタンブロットングで行った。またHisタグつき蛋白質は大腸菌より調製後HPLCで精製した。さらに、G蛋白質共役受容体キナーゼ（GRK2～6）とエンドセリン受容体の発現vectorおよびRGSのN末欠損体やセリン残基やシステイン残基を変えたmutantRGS、RGS domainも調製した。

(2) G蛋白質シグナル調節蛋白質（RGS）の特異的抗体の作製

精製RGS5をウサギに免疫して特異的抗体を作製しウエスタンブロットングおよび免疫組織化学によるRGSの細胞内分布の検討並びに、免疫沈降によるG蛋白質/RGS複合体の検出と定量化を行った。

(3) RGS発現組織におけるRGS蛋白の細胞内分布の検討

RGS5/4及びGRKのRGS domainを発現した細胞をホモジナイズ後、膜お

よび可溶性成分を分離調整し、それぞれの抗体または抗 myc 抗体を用いるウェスタンブロットングにてRGSの細胞内分布を検討した。

(4) 細胞内Ca²⁺濃度に対するRGSの効果の検討

エンドセリン/アンジオテンシン受容体を発現している細胞 (HEK293) にRGSを発現後、細胞に Fura を負荷し、リガンド刺激で生ずる Ca²⁺量を測定することで、リガンド刺激後生ずる細胞内Ca²⁺上昇に対するRGS 4/5/およびGGRのRGS domain の効果を観察した。

(5) 蛋白質との結合

His タグつきRGS蛋白質を HEK 膜とインキュベート後コール酸で可溶化した。Ni-NTA agarose を用いてRGS吸着、SDS/PAGE、transfer 後、G蛋白質 α サブユニットの抗体を用いるウェスタンブロットングにてRGSに結合するG蛋白質 α サブユニットを同定した。

(6) GAP活性測定

精製 Gi3 蛋白質を 32P-GTP でラベル後RGSを加えて、遊離する 32Pを測定してGAP活性を検討した。

(7) RGS 5蛋白質のリン酸化

RGS 5蛋白質を 32P-ATP の存在下、HEK 細胞の膜及び可溶性分画とインキュベート後、SDS/PAGE でリン酸化蛋白質を分離、リン酸化量を定量した。また HEK 細胞に発現後 32Pリン酸でラベル後抗RGS抗体で免疫沈降、SDS/PAGE してリン酸化RGS 5を同定した。

結果

1. RGS蛋白質の細胞内分布

RGS 4、RGS 5およびN末にRGS domain をもつ受容体キナーゼ (GRK) と、それぞれのN末欠損型cDNAを HEK 細胞に発現し、その細胞内分布をそれぞれに対する抗体を用いて解析したところ、RGS 5野生型はその 60%が膜画分に分布するのに対して、N末欠損型RGS 5はほぼ全量が可溶性画分に分布した。RGS 4は野生型、N末欠損型とも膜画分と可溶性画分両方に分布した。

2. RGS蛋白質とG蛋白質 α サブユニットの結合

His-タグ付精製RGS 4/5蛋白質は野生型およびN末欠損型蛋白とも GDP/AlF₄⁻の存在下、Gi3 α 、Go α およびGq α サブユニットと結合した。Gsaサブユニットとは結合しなかった。GRKのN末はGq α サブユニットと結合する事が観察された。

3. RGS蛋白質のGAP活性

RGS 4およびRGS 5は、N末欠損体ともGi3 α -サブユニットに対して同等のGAP活性を示したが、GRKはGi3 α -サブユニットに対してのGAP活性を示さなかった。

4. 細胞内Ca²⁺の移動量に対するRGSの効果

RGS 4、RGS 5、およびそれぞれのN末欠損体をHEK細胞に発現させ、アンジオテンシン及びエンドセリン刺激で起きる細胞内Ca²⁺の移動量の変化を検討した結果、細胞内Ca²⁺の移動量は、RGSの発現により容量依存的に抑制されることが観察された。N末欠損体RGS 4では野生型に比べて抑制活性が弱い、N末欠損型RGS 5は膜結合が見られないにも関わらず高い抑制活性を示した。GRKN末でも細胞内Ca²⁺の移動量が減少した。

5. RGS 5蛋白質のリン酸化

RGS 5蛋白質はHEK細胞内でリン酸化された。また精製RGS 5はHEK細胞成分によりリン酸化を受けた。そしてRGS 5のリン酸化によりRGSのGAP活性、G蛋白質結合能が減弱することが観察された。

考察

本研究で、RGS 4、RGS 5、およびRGS domain をN末に持つGRKはエンドセリン受容体のリガンド刺激によって引き起こされる細胞内Ca²⁺濃度の上昇を抑えることが示された。精製RGS蛋白質をもちいてのG蛋白質との結合実験やGAP活性測定結果から、その機構としてRGS 4、5はそれら蛋白質がG蛋白質 α サブユニットと結合してG蛋白質のGTPaseを促進する、すなわちGAP活性を介して働いていることが示唆された。GRKにおいてはGq蛋白質との結合は見られるものの、GAP活性がみられないことから、Gq蛋白質との結合を介してその機能を阻害している可能性が高い。またRGS 5はリン酸化され、そのG蛋白質調節作用が修飾されることが観察された。

結語

エンドセリン/アンジオテンシン受容体におけるG蛋白質情報伝達系がRGS 4、RGS 5およびGRKN末により負に調節されていることが示され、RGSが脱感作(耐性)における新しい調節機構として働いていることが推察された。

共同研究者

西山真理子、碓井宏和、周静、佐藤素子、柴崎忠雄、石田純治（筑波大学）、深水昭吉（筑波大学）、関直彦（放射能医学研究所）、芳賀達哉（東京大学）、関谷宗英（千葉大学医学部）、門田朋子（千葉大学医学部）、木村定雄

(別紙様式 14)

**ABSTRACTS OF RESEARCH PROJECT, GRANT-IN-AID
FOR SCIENTIFIC RESEARCH (2000)**

1. RESEARCH INSTITUTION NUMBER: 12501
2. RESEARCH INSTITUTION: CHIBA UNIVERSITY
3. CATEGORY: Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (2)
4. TERM OF PROJECT: (1999~2000)
5. PROJECT NUMBER: 11670082
6. TITLE OF PROJECT: ANALYSIS OF REGULATORY MECHANISM OF RGS ON
DESENSITIZATION
AND TOLERANCE.

Resisterd Number	Name	Institution	Department,	Title of position
7: Head investigator :80110352	Moroi, Kayoko	Chiba Univ.	Guraduate school,	assistant
			of Medicine	
8:Investigators: (1) 00092081	Nishiyama, mariko,	Chiba Univ.	Guraduate School	Assistant
			of Medicine	
(2)40134225	Kimura, Sadao	Chiba Univ.	Guraduate School	Proffessor
			of Medicine	
(3)00089864	Kadota, Tomoko	Chiba Univ.	School of Medicine	Assistant

Professor

9:SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

In this study, we determine the effect of RGS (Regulator of G-protein signaling) proteins on desensitization of G protein-coupled receptor signaling. To analyze the effect of RGSs, we prepared several plasmids encoding RGS5, RGS4, GRK and the N-terminal amino acid-deleted mutant (dNRGSs) c-DNA. In addition, 6-his-tagged RGSs proteins were purified from E-coli systems.

1. Wild RGS4 and 5, and their dNRGSs bound to Gi3a, Goa, Gqa subunits and accelerated the catalytic rate of GTP hydrolysis of Gi3a subunit (GAP activity).
2. N-terminus of GRK also bound to Gqa subunit, but did not have any GAP activity against Gi3a.
3. Subcellular distribution of RGSs in HEK293 cells transfected with cDNA encoding RGSs was analyzed using the specific antibodies against RGSs. RGS5 was located in the membrane and cytosolic fractions, while dNRGS5 was localized almost exclusively in the cytosolic fraction. RGS4 and dNRGS4 located both in the membrane and cytosolic fractions.
4. RGS5, RGS4, dNRGS4 and dNRGS5 expressed in HEK cells suppressed angiotensin(AngII) and endothelin(ET)-1-induced intracellular Ca²⁺ transients in

concentration dependent manner. N-terminus of GRK also suppressed intracellular Ca²⁺ transients induced by Ang-II and ET-1.

These results indicated that RGSs serve as GAP for Gi3a subunits and suppress the AngII and ET-1 induced intracellular Ca²⁺ transients, suggesting that RGSs negatively regulate the G-protein coupled receptor signaling.

10. KEY WORD

(1) REGULATOR OF G-PROTEIN SIGNAL (RGS) (2) G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR SIGNALING

(3) ENDOTHELIN RECEPTOR (4) ANGIOTENSIN RECEPTOR (5) INTRACELLULAR CA²⁺-TRANSIENT

(6) DESENSITIZATION (TOLERANCE)/REVERSE TOLERANCE

11. REFERENCES

AUTHORS, TITLE OF ARTICLE, JOURNAL, VOLUME-NUMBER PAGES CONCERNED, YEAR

Zhou, J., Moroi, K., Nishiyama, M. et al. : Characterization of RGS5 in regulation of G protein-coupled receptor signaling. The Japanese Journal of Pharmacology **82**supl,145p, 2000

Usui, H., Nishiyama, M., Moroi, K. and Kimura, T. et al: RGS domain in the amino-terminus of G protein-coupled receptor kinase-2 inhibits Gq-mediated signaling. International Journal of Molecular Medicine. **5**, 335-340, 2000

Zhou, J., Moroi, K. et al.: Characterization of RGS5 in regulation of G protein-coupled receptor signaling. Life Science **68**, 1457—1469, 2001

