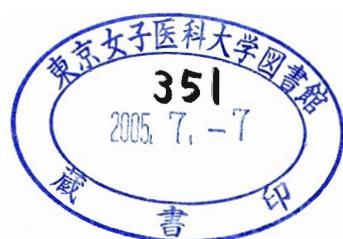


α_1 受容体サブタイプ別細胞内局在の細胞虚血時における 機能的意義の解析

15590192

平成 15 年度～平成 16 年度科学技術研究費補助金 (基盤研究 (C)) 研究成果報告書



平成 17 年 03 月

研究代表者 淡路 健雄
(東京女子医科大学医学部)



はしがき

心筋虚血時に、患者の予後を決定する要因として不整脈をあげることができ。この虚血性の不整脈発生に、正常心筋ではほとんど作用を示さないアドレナリン α 1受容体の感受性亢進が報告されている。しかし、虚血時におけるこの受容体機能亢進のメカニズムは現在知られていない。この三量体G蛋白質共役型の α 1アドレナリン受容体は、現在、 $\alpha_{1a,b,d}$ の3つのサブタイプが報告されている。このサブタイプはアンタゴニストに対する感受性で区別されるが、情報伝達の下流であるG蛋白質は同一のものを利用することが報告されている。我々はこれらサブタイプ間での違いとして、細胞内局在が異なり、薬剤に対する感受性が細胞内局在の違いにより説明できることを報告してきた。しかし、サブタイプの違いが存在する生物学的意義や細胞内局在の差を生み出す分子メカニズム・機能的意義は不明である。

心筋虚血時に、大きく動く細胞内環境として水素イオン(H⁺)をあげることができ。正常時には弱アルカリ環境である細胞質は虚血になると速やかに酸性化することが知られている。近年、この細胞内水素イオン濃度により三量体G蛋白質共役型受容体の細胞内局在が調節されてきている報告がなされている。 α 1受容体の細胞内局在は極めて動的であり、生理的リガンドであるノルエピネフリンの投与により、速やかに細胞内に移行することを報告してきた。この細胞内移行した受容体はリガンドを取り除くことにより速やかに形質膜へ再分布することも知られており、この再分布過程において、細胞内水素イオン濃度調節が重要な働きを示していることが報告されている。

水素イオン濃度は細胞レベルでの機能維持に重要な役割を演じていることは異論が無いと考えられるが、その細胞生理的役割の検討は困難であった。これは、一つには細胞内pHの定量化が困難であること、また同時に引き起こされている細胞機能を同時記録することが困難であるからにほかならない。しかし、近年 Green Fluorescent Protein(GFP)変異体がpH依存的蛍光強度変化を起こす事を利用して細胞内pHを測定する試みが為され始めている。しかし単なる蛍光変化の場合定量が困難であった。我々は、異なるpH感受性と励起・蛍光スペクトルを持つGFP変異体を二つ融合することにより細胞内pHが定量化可能となり、同時に機能タンパクの細胞内局在・移行の時空間的解析が可能とするプローブを開発し、報告してきた。

本研究では、我々が開発したGFP利用の細胞内水素イオン濃度センサーと α_1 各サブタイプ受容体との融合遺伝子を作成し、1. 受容体局在と細胞内pHの同時測定が可能な安定発現細胞の確立。2. 受容体各サブタイプの局在と水素イオン濃度連関の比較・検討。3. 虚血モデルによる、水素イオン濃度と受容体局在の変化の可視化解析。最終的には4. ラット初代心筋培養細胞における、局在変化の可視化解析を行い、受容体の細胞内局在調節機構を各サブタイプごとに明らかにすることにより、受容体サブタイプが存在する細胞レベルでの機能的意義を明らかにし、虚血モデルより受容体局在変化の病

態生理的意義を同時に明らかにすることを目標とした。

pH 定量プローブ融合による受容体調節過程の新しい時空間的解析法は、困難であった情報伝達過程での機能蛋白の受ける影響とその移動・局在を同時直接測定を可能とする独創的な方法である。現在、不明である各サブタイプ間での生物学的機能意義を明らかにすることは、受容体機能に対する興味のみならず、薬物作用のメカニズム理解や病態生理の理解に多大な貢献をすることが期待しうると考えられる。

また、受容体調節機構の解析は疾患の理解、薬物治療の至適化並びに創薬への応用が期待され、内外の多くの研究者により行われている。また、受容体サブタイプの存在は、選択的治療の一つとして多くの興味をもたれる分野である。しかし、細胞内局在の違いやサブタイプ存在の正常・病態における機能的意義は、不明である。これまで本研究者は、可視化解析の受容体への応用によりアドレナリン α_1 受容体の解析に大きな貢献をしてきている。しかし、これまでの受容体可視化解析は、その局在・移動の解析にとどまっている。 α_1 受容体各サブタイプは同一のカスケードで細胞内情報伝達を行っているが、その細胞内局在は大きく異なるという、細胞レベルでの空間情報が生体機能へどのようにつながっていくのか解析するよいモデルと考えられる。このモデルを使い、プローブ開発と受容体への融合により、受容体の移動・局在ならびにその受容体がおかれるイオン環境の時空間的情報が同時に得られる方法論を病態モデルに適応していくことは、単なるこれまでの細胞レベルでの時空間的機能解析ではなく、受容体調節過程から生体反応理解につながる極めて先進的な研究であると考えている。

研究組織

研究代表者：淡路健雄（東京女子医科大学医学部講師）
研究分担者：平澤明（京都大学大学院薬学研究科ゲノム創薬科学分野
助教授）

交付決定額

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	2800,000	0	2800,000
平成 16 年度	800,000	0	800,000
総計	3600,000	0	3600,000

研究発表

(1) 学会誌等

Hirasawa, A., K. Tsumaya, T. Awaji, S. Katsuma, T. Adachi, M. Yamada, Y. Sugimoto, S. Miyazaki, and G. Tsujimoto. 2005. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med.* 11:90-4.

Yoda, A., S. Oda, T. Shikano, Z. Kouchi, T. Awaji, H. Shirakawa, K. Kinoshita, and S. Miyazaki. 2004. Ca²⁺ oscillation-inducing phospholipase C zeta expressed in mouse eggs is accumulated to the pronucleus during egg activation. *Dev Biol.* 268:245-57.

(2) 口頭発表

淡路 健雄、微小環境 pH よりみた、各アドレナリン α_1 受容体サブタイプの局在機構の検討、第 26 回日本分子生物学会、2003 年 12 月 11 日

淡路 健雄、 α_1 受容体の局在と近傍の pH のサブタイプによる差違、第 81 回日本生理学会大会、2004 年 06 月 02 日

(3) 出版物

なし

研究成果

(1) GFP 利用 pH プローブの改良。

方法

我々が、本研究以前に開発した蛍光プローブは、2つの励起・蛍光スペクトル並びに水素イオン感受性の異なる Green Fluorescent Protein(GFP) 変異体を用いることにより感度域が生理的 pH としては酸性側で、クロライド感受性が無いもの、生理的 pH レンジを測定可能であるがクロライド感受性が高いものの2種類が利用可能であった。より高精度かつ検出力の高いプローブ作成のため、より生理的 pH レンジが測定可能で、クロライド感受性が無いプローブの作出を目指し、クロライド並びに水素イオン感受性がほとんど存在しないことが報告されている GFP 変異体である Venus(理化学研究所宮脇研より供与) の改変を行った。遺伝子工学的手法を用い Venus の発色団近傍にアミノ酸変異を導入した遺伝子から大腸菌で GST 融合リコンビナントタンパクを作成した。任意の pH 並びにクロライド濃度を持つ溶液にプローブ蛋白を溶解し、日立 FL2500 蛍光分光光度計にて pH 依存的蛍光強度変化ならびにクロライド依存的蛍光変化を測定し、目的の pH 感度域をもち、クロライド感受性が無いクローンを複数選択した。

結果

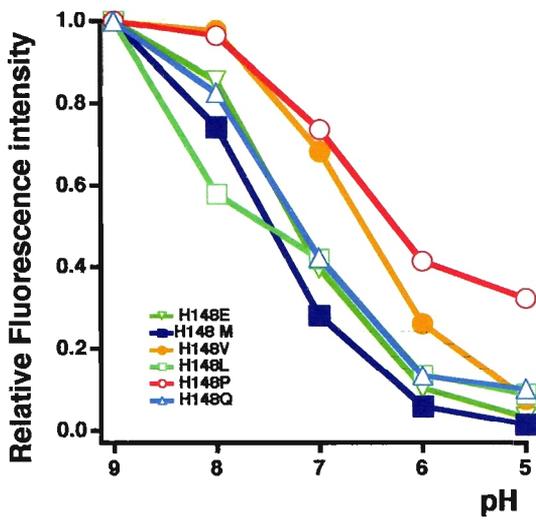
148 番目のヒスチジンをほかのアミノ酸に変えることにより、効率よく水素イオンに対する感受性を変えることが可能であった。また、この際にクロライドに対する感受性は試みた変異の中では認められなかった。図 1 に、変異を行った pH プローブの水素イオン・蛍光比の連関を示す。グルタミン酸への変異を行ったプローブが一番アルカリ側で感受性を示し、プロリンに変異を行ったプローブが一番酸性側で感受性を示した。生理的レンジで一番感受性の高い、バリン変異体とメチオニン変異体を以下の実験に供した。図 2 に、代表例であるバリン変異体の水素イオンによる 520nm の蛍光で見た励起スペクトルの変化を示す。390nm の励起に於いては pH 5 から 10 の範囲で蛍光強度の優位な変化は認められなかった。また 490nm の励起では pH に依存して蛍光強度の増大が認められた。

考察

これまで、報告されてきた方法とは異なる、2つの蛍光蛋白を組み合わせることにより、自由な pH 感受性をもつ蛍光プローブの作成に成功した。この方法はより特性の異なる GFP 変異体を組み合わせることにより他の生体内物質の定量プローブの prototype となりうる方法論であると考えられた。

in vitro pH dependency of venus mutant

Change of pH sensitivity on mutation of Venus.



pH dependent fluorescence of H148V mutant

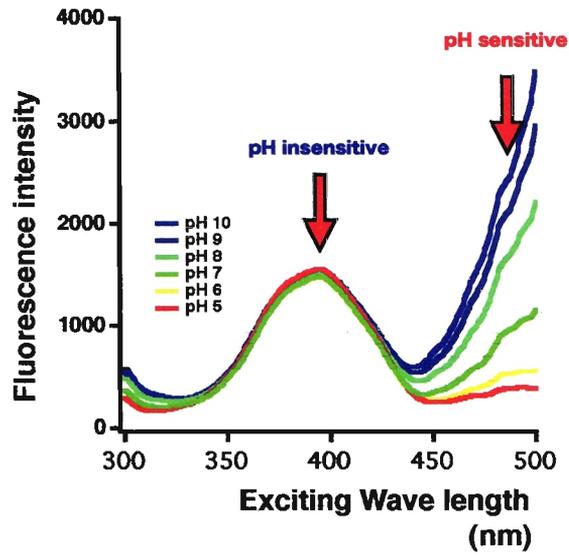


图 .1

(2) 培養細胞での pH プローブの評価

方法

上記で作成したプローブを、真核発現細胞用のベクターに組み込み、CHO-K1 並びに COS7 細胞に導入を行った。測定にはオリンパス製 IX70 顕微鏡を使い、励起光フィルターとして $390\text{nm} \pm 10\text{nm}$ ならび $480\text{nm} \pm 10\text{nm}$ のオメガ社製フィルターを利用し光路切り替え装置 OSP-10 を利用した。ダイクロイックミラーは 505nm を利用し蛍光フィルターとして $520 \pm 10\text{nm}$ のフィルターを利用し、SPD-CCD カメラを利用し画像の取得をおこなった。細胞内の pH は水素イオンイオノフォアである nigericin/monensin および電子共役系の阻害薬である CCCP 存在下に外液の pH を変えることによりコントロールした。

結果

H148V プローブ導入細胞における外液 pH を変えることにより細胞内 pH を変えた結果を図 2 に示す。pH 依存的に蛍光比は変化し、その pKa は約 7.1 であった。図 2 に大腸菌で合成した蛋白の結果との比較をしめす。In vitro での結果と細胞内でのプローブの pH 感受性には優位な差が認められなかった。

考察

今回作成した pH プローブは細胞内でも *in vitro* と同様な特性を示し、生理的範囲で十分な感度を持つことが示された。同様に H148M プローブも *in vitro* ならび *in vivo* での差は認められず、生理的範囲で十分な感度を持つことが示された。また、これまで我々が開発してきた EYFP ベースのプローブに比べ蛍光強度も高く、S/N の改善並びに検出力の改善が認められクロライド感受性も認められず有用な細胞内 pH プローブと考えられた。

pH dependency of H148V pH probe

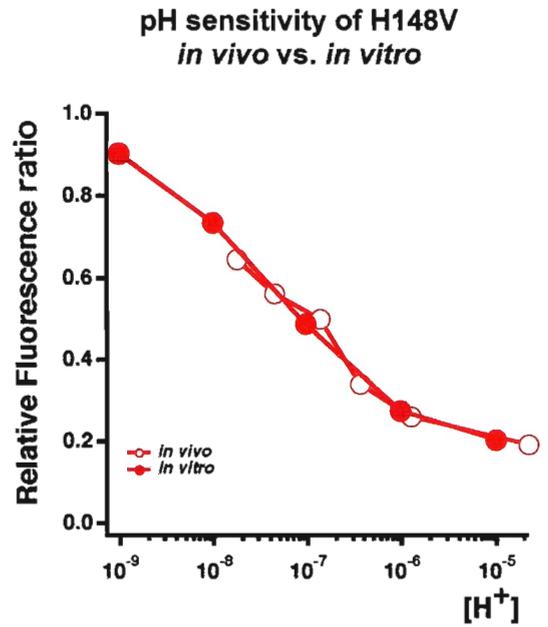
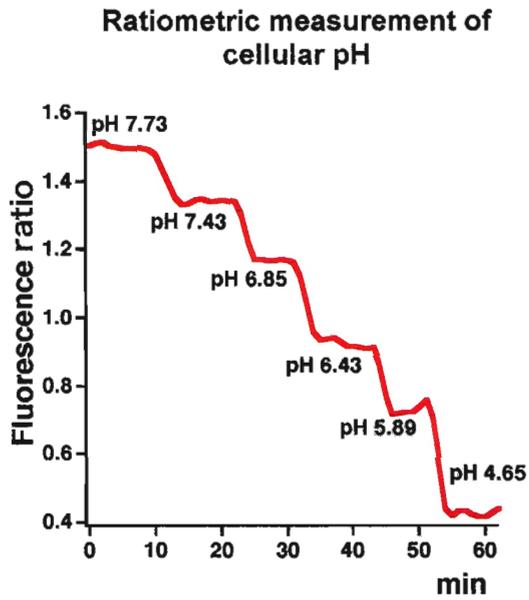


Figure 2

(3) α_1 各サブタイプ融合プローブ遺伝子の作成・ α_1 受容体融合 pH プローブ安定発現細胞の作出

方法

上記成果より、H148MならびにH148V変異体利用プローブ（以下MFpH・VFpH）をヒトアドレナリン α_1 受容体C端に融合した遺伝子の作成を試みた。安定発現細胞の親株としては、使用経験が豊富であり、これまでヒトアドレナリン α_1 受容体の局在並びにシグナルトランスダクションの検討での報告の多いCHO-K1細胞を利用した。安定発現細胞の作出において、測定が容易な細胞を選択するために、セルソーターによる選択を行ってきたが、今回プローブの蛍光強度の上昇が期待でき、安定に全長の発現並びに、発現量の導入部位による差違比較を容易にするため、今回Flp-in systemを利用し、CHO細胞に一遺伝子導入された各 α_1 受容体サブタイプ融合pHプローブ安定発現細胞を作成した。

結果と考察

これまでの一般的な、薬物選択による安定発現細胞の作出と比較して、今回利用したリコンビネースを利用したFlp-in systemでは、作成が困難であった α_{1D} 受容体の安定発現細胞が作出が可能となった。また、蛍光強度も古典的安定発現細胞に比べ増強していた。（図3に各受容体発現細胞を示す。）また、複数のコロニーを比較しても蛍光強度のばらつきはほとんど認められなかった。また、これまで作成したYFPベースのプローブ安定発現細胞に比べ、どちらの方法で作成した細胞も蛍光強度が高くなり検出が容易であった。プローブ融合アドレナリン α_1 受容体各サブタイプ安定発現細胞の作出を試みた。Flp-in systemによる安定発現細胞の作成法ならびに、プローブの改良は、今後、他の受容体やタンパク機能・局在の検討に有用であると考えられた。

Subcellular localization and microenvironment pH of α_1 -AR subtypes

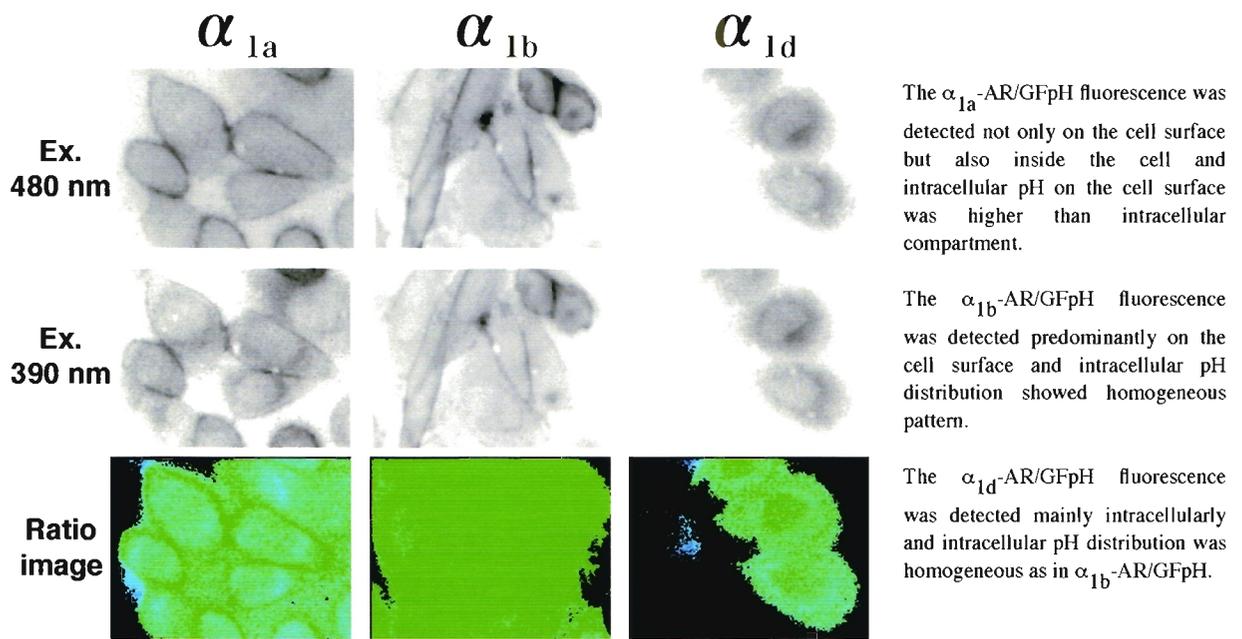


图 3

(4) α_1 各サブタイプ融合プローブの薬理学特性の解析

方法

GFP 利用 pH プローブは分子量がかなり大きいため、薬物結合特性・シグナル伝達・局在・移動に影響を与える可能性が考えられる。このため、受容体の基本的性質である薬物結合特性・アドレナリン α_1 受容体シグナル伝達の下流であるカルシウム反応ならびに局在を野生型と比較検討を行った。

薬物結合特性は、プローブ融合受容体安定発現細胞並びに野生型受容体発現細胞より膜標本を調整し、放射性ヨウ素標識リガンドを用いて代表的なアゴニストである、エピネフリン・ノルエピネフリンまた、アンタゴニストであるプラゾシン並びに各受容体の選択的阻害薬と報告されている薬物を利用し、結合特性を測定した。

上記、顕微鏡システムを用い細胞内カルシウム測定試薬 Fura2-AM にて染色を行ったプローブ融合受容体安定発現細胞並びに野生型受容体発現細胞にノルエピネフリン $10^{-7}M$ の投与を行い、カルシウム反応を記録した。

局在は各受容体の特異抗体を利用し、免疫組織化学的に共焦点顕微鏡にて比較検討を行った。

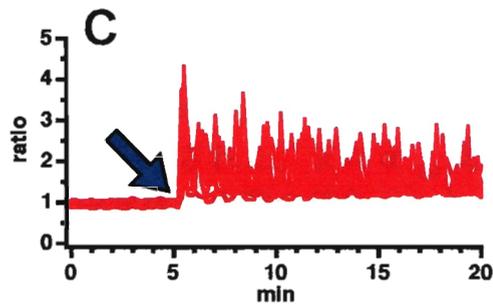
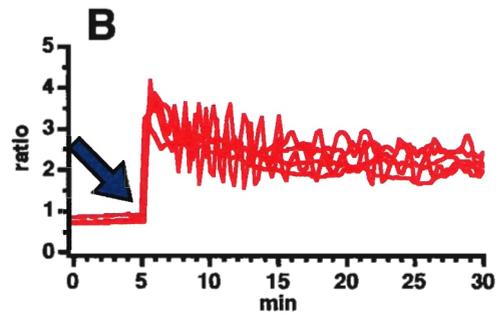
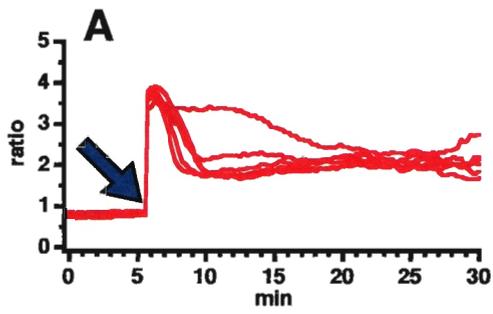
結果と考察

放射性リガンドによる結合実験では、アゴニスト並びにアンタゴニストに対する親和性はすべてのサブタイプにおいて、受容体単独・GFP 融合受容体・pH センサー融合受容体で同じであった。

カルシウム反応のパターン並びに強さも、受容体単独の場合と GFP 融合受容体・pH センサー融合受容体で同じであった。(図 4)

薬物結合特性並びに下流の情報伝達機構に対する影響は認められず、pH センサー融合は受容体単独に比べ、局在・移動並びに局在部位の性質を同時にモニターし、多くの細胞生理学的情報を得られる手段であると考えられた。

Change in $[Ca^{2+}]$ upon application of NE(1 μ M)



A: α_{1b} -AR/VFpH

B: α_{1b} -AR/VFpH

C: α_{1d} -AR/VFpH

图 .4

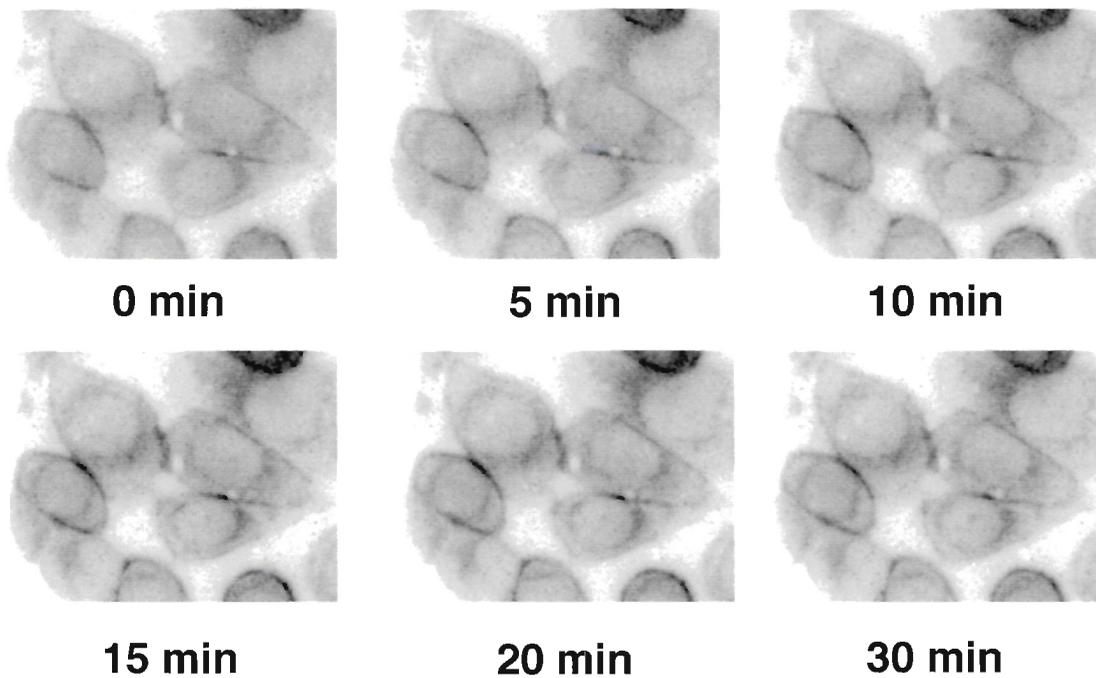
(5) α_1 各サブタイプ融合プローブの局在とリガンドによる移動の解析方法

pH と局在の同時測定を行うため、測定にはオリンパス製 IX70 顕微鏡を使い、励起光フィルターとして $390\text{nm} \pm 10\text{nm}$ ならび $480\text{nm} \pm 10\text{nm}$ のオメガ社製フィルターを利用し光路切り替え装置 OSP-10 を利用した。ダイクロイックミラーは 505nm を利用し蛍光フィルターとして $520 \pm 10\text{nm}$ のフィルターを利用し、SPD-CCD カメラを利用し画像の取得をおこなった。静止時の局在並びに pH の測定の後アドレナリン α_1 受容体のリガンドであるノルエピネフリンの投与を行い、局在の変化ならびに pH の変化を記録した。

結果と考察

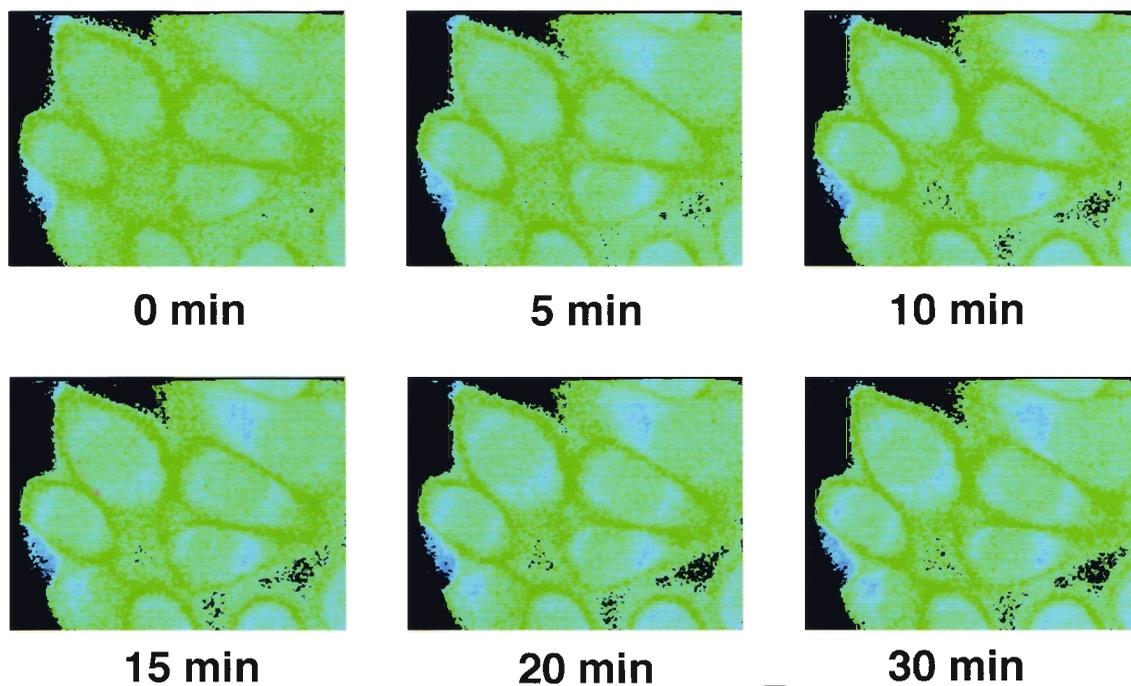
α_{1A} 受容体と α_{1B} 受容体は細胞膜近傍の蛍光の集積が認められ、細胞膜近傍に受容体が存在していることが示唆された。しかし、 α_{1D} 受容体はほとんどの蛍光が細胞膜内側からのみ認められ細胞膜への受容体の集積はほとんど認められなかった。一方、pH の分布を見ると、膜近傍の pH は大きな差が見いだされなかったが $\alpha_{1B} > \alpha_{1A}$ となっていた、細胞膜内側の pH は $\alpha_{1B} > \alpha_{1A}$ となっており、細胞膜内側での受容体の局在部位が異なる可能性が示唆された。また α_{1D} 受容体近傍の細胞質中の pH は α_{1A} 受容体と α_{1B} 受容体の中間の値を示した。NE 10^{-7}M の刺激により α_{1A} および α_{1B} の細胞では pH が低下した。 α_{1A} 受容体は NE 存在下では pH は低下したままであった。しかし、 α_{1B} 受容体の pH の低下は一過性であり直ちに pH は上昇に転じ、細胞内への受容体の有意な集積を認めた。pH の上昇を示さない α_{1A} 受容体では 1 時間観察しても細胞内への有意な集積は認められなかった。また、 α_{1D} 受容体は、pH の上昇を認めたが、局在の変化は認められなかった。これまで、GFP 並びに抗体を利用した研究によりサブタイプ間での局在の違いは報告されていたが、光顕レベルでの検討であり、細胞内コンパートメントの違いに踏み込んだ検討は未だなされていない。今回、pH プローブの融合により局在部位に機能的違いがあることが示唆された。また、急性期の実験であるが、局在の変化に先行して pH の変化があり、虚血時における局在変化のメカニズムを示していると考えられた (図 4-11・表 1)。

NE (1 μ M) mediated translocation of α_{1a} -AR



☒ .5

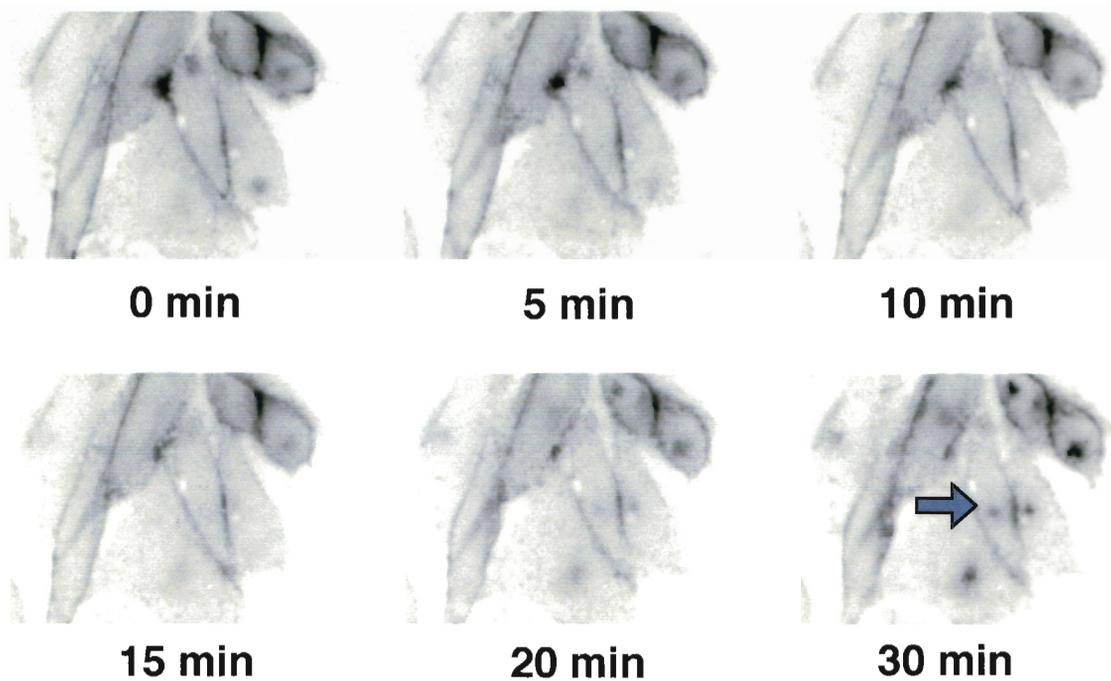
NE (1 μ M) mediated pH change of α_{1a} -AR



cytoplasmic pH ↓

☒ .6

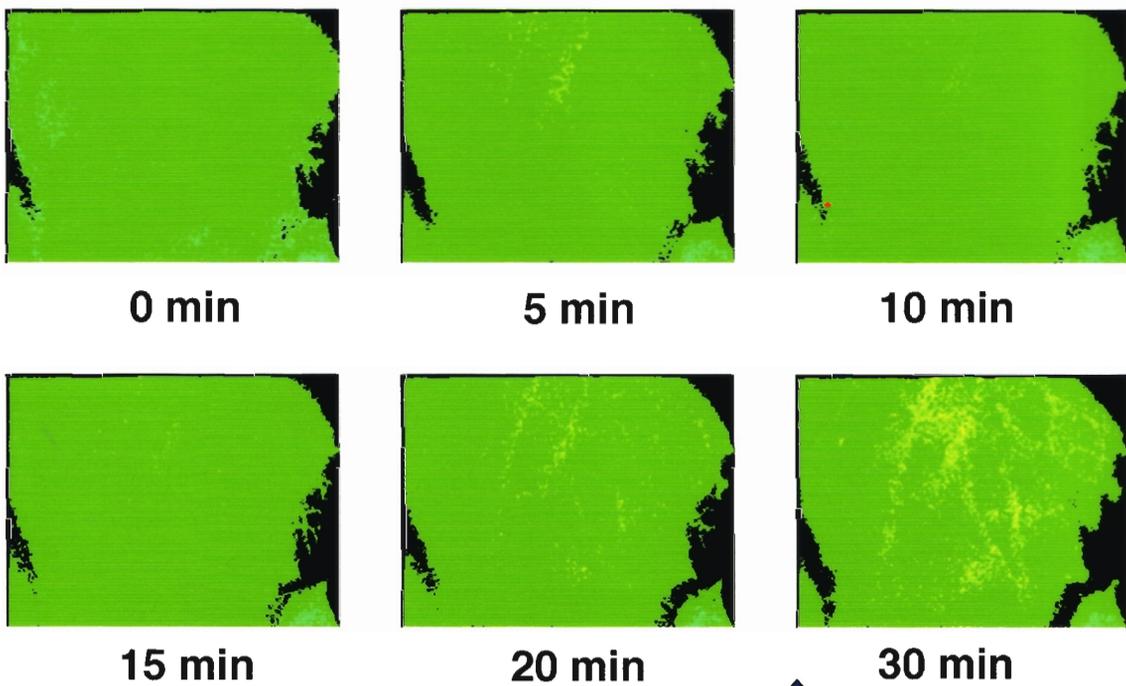
NE (1 μ M) mediated translocation of α_{1b} -AR



Internalization

☒ .7

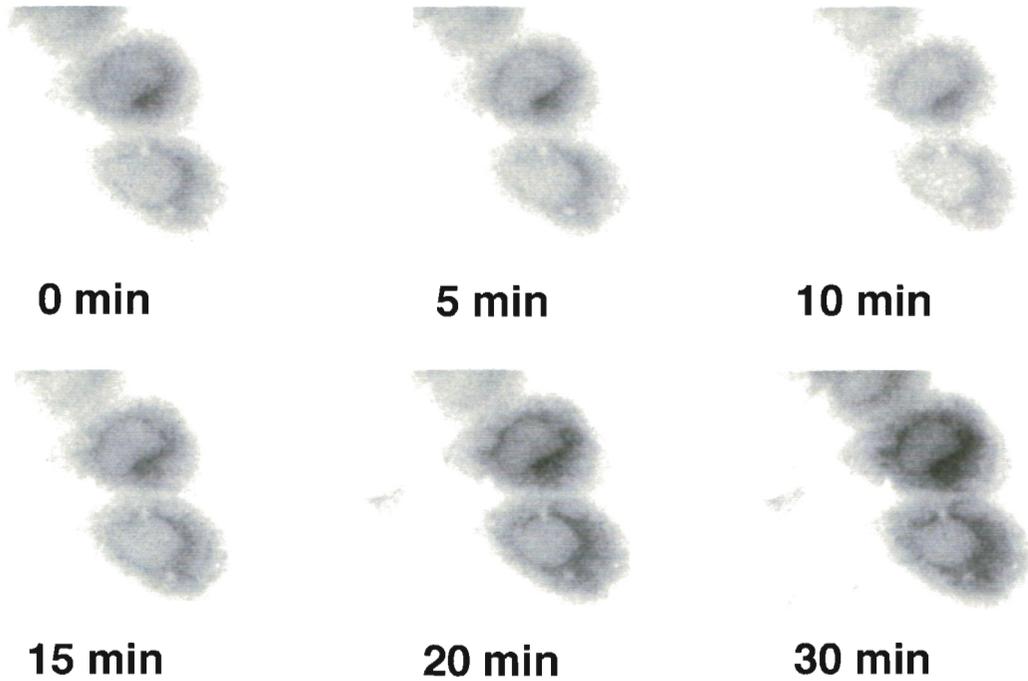
NE (1 μ M) mediated pH change of α_{1b} -AR



pH of whole cell ↑

☒ .8

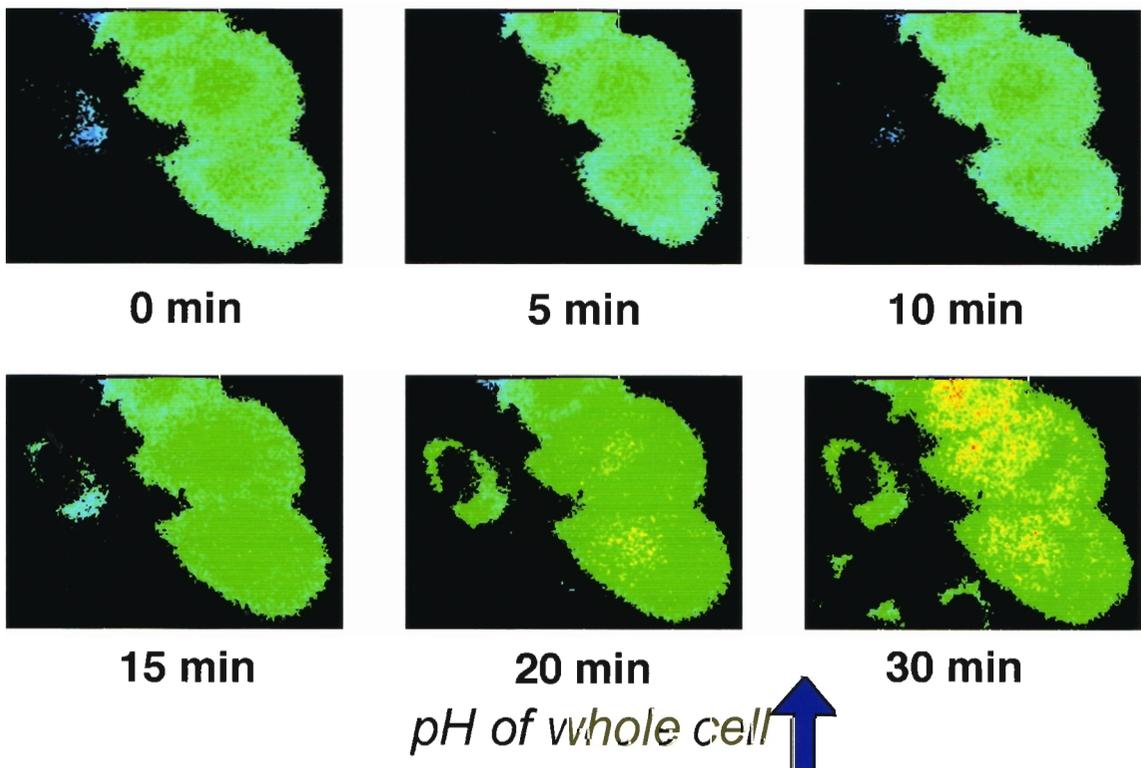
NE (1 μ M) mediated translocation of α_{1d} -AR



No remarkable distribution change.

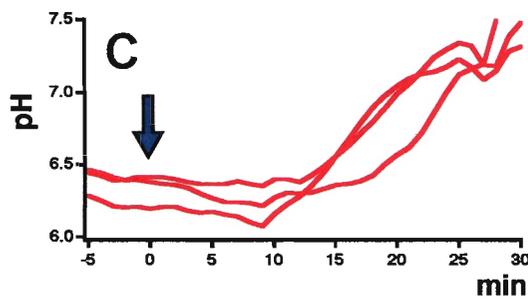
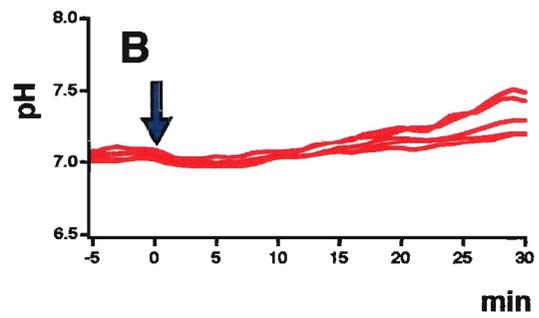
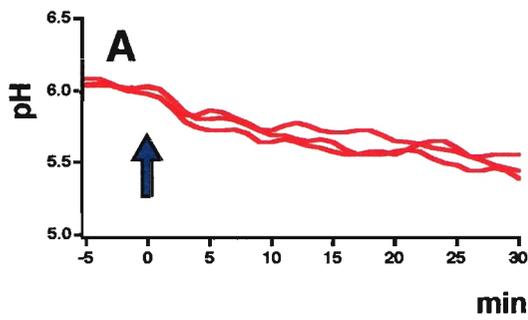
☒ .9

NE (1 μ M) mediated pH change of α_{1d} -AR



☒ .10

Change in pH upon application of NE(1 μ M)



A: α_{1b} -AR/VFpH

B: α_{1b} -AR/VFpH

C: α_{1d} -AR/VFpH

图 .11

Summary of α_1 -AR subtypes

	vicinity pH	localization	translocation	intracellular pH change	Ca Oscillation
α_{1a}	heterogeneous	membran(+) cytoplasm(+)	-	↓	-
α_{1b}	homogeneous	membran(+) cytoplasm(\pm)	internalization	↗	+
α_{1d}	homogeneous	membrane(-) cytoplasm(+)	-	↑	+

表 .1

(6) 細胞内水素イオンによる α_1 各サブタイプ融合プローブの局在調節の解析

方法

細胞膜局在型受容体である α_{1B} ・細胞膜・細胞質局在型である α_{1A} ・細胞質局在型 α_{1D} 受容体それぞれの局在調節に関わる細胞内 pH の影響を解析するため、細胞外液に NH_4Cl 10mM 並びに乳酸 1mM を加えたバッファーで灌流することにより細胞内 pH を変化させた。

結果と考察

NH_4Cl の投与により、細胞内 pH は直ちに上昇し、ほぼ一定の pH を観察時間維持していた。 α_{1B} ・ α_{1A} 受容体は pH の上昇に引き続き細胞内への移行を示した。またその細胞内移行の程度は、 α_{1B} 受容体ではリガンド刺激による移行に比べて軽度 (~40%) であったが、 α_{1A} 受容体では受容体刺激による細胞内移行は認められなかったが、pH 上昇により細胞内移行を認め、異なるメカニズムにより局在が制御されていることが示唆された。一方、 α_{1D} 受容体は pH の上昇による細胞内局在の明らかな変化は受容体刺激の時と同様に認められなかった。また、乳酸 1mM の投与により、細胞内 pH は直ちに低下し、ほぼ一定の pH を観察時間維持していた。 α_{1B} ・ α_{1A} 受容体は pH の低下に引き続き、細胞内から細胞膜への移行を示した。 α_{1D} 受容体は細胞内 pH の低下による細胞内局在の明らかな変化は pH 上昇時と同様に認められなかった。細胞内 pH を変えることにより、局在が pH により制御されているサブタイプが存在し、制御機構がサブタイプ毎に異なる事が示された。

今後の展開

1. これまでの実験により、 α_1 アドレナリン受容体サブタイプ毎に、pH からみた局在部位が異なりかつ、その局在・移動の制御メカニズムが異なることが示唆される。特に細胞内局在部位が不明であり、制御機構の理解は現在の光顕レベルでは困難である。このため、局在マーカーとの彙発現実験と平行して、GFP 抗体を利用した免疫電顕を行い現在より仔細な局在部位の決定を行っている。
2. シアン灌流による、虚血時のモデル構築のため、シアン灌流量と細胞内 pH の測定を行い、より至適な測定条件の設定を行い、虚血時の受容体局在を明らかにする。

3. これらの実験をふまえ、ラット新生児心筋細胞へのプローブ遺伝子導入を行い、虚血心筋での α_1 アドレナリン受容体の局在変化と随伴する機能変化を明らかにする予定である。