

摂食受容体 MCHR1 におけるインターナリゼーション機構

Molecular Mechanisms of Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1 Internalization

濱本 明恵^{a, b}, 蜜山 聖夏^a, 小林 勇喜^a, 斎藤祐見子^a

Akie Hamamoto, Seika Mitsuyama, Yuki Kobayashi and Yumiko Saito

^a広島大学大学院総合科学研究科 生命科学領域^b現所属 久留米大学分子生命科学研究所 遺伝情報研究部門

要旨 G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は細胞膜 7 回貫通型の蛋白質であり, 創薬標的として頻繁に利用されている. 特異的リガンドが GPCR に結合すると, 細胞内で G 蛋白質と受容体が共役することで各種シグナル (cAMP 量の増減, Ca²⁺ 上昇, キナーゼ亢進など) を生じる. この活性化の減衰機構の 1 つがインターナリゼーション過程であり, 過剰な応答を生じさせないための生体防御と考えられている. すなわち, リガンド結合により活性化した各種キナーゼにより GPCR 自身がリン酸化され, そのリン酸化部位へ β アレスチンを含めたアダプター蛋白質が結合することにより GPCR は膜から細胞内部へと移行 (インターナリゼーション) する. GPCR の中でもメラニン凝集ホルモン (MCH) の受容体 MCHR1 は摂食・情動に対して重要な役割を担うことが知られている. そこで, 本稿ではまず, GPCR の基本的なインターナリゼーション機構について述べ, 次に MCHR1 におけるインターナリゼーションに関する最新知見を紹介する.

キーワード: G 蛋白質共役型受容体 (GPCR), インターナリゼーション, リン酸化, メラニン凝集ホルモン (MCH), 摂食

1. G 蛋白質共役型受容体の活性化機構及びインターナリゼーション機構

G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は, 哺乳類のゲノムにおいて, 最大の遺伝子ファミリーを形成している膜蛋白質である. GPCR は 7 回の膜貫通 α ヘリックスで構成され, 細胞外にリガンド結合部位, 細胞内に G 蛋白質結合部位を有する. GPCR はヒトにおいて 791 種類存在し¹⁾, 光, 匂い, 神経伝達物質, ホルモン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. GPCR にリガンドが結合すると GPCR の立体構造が変化し, 細胞内においてヘテロ 3 量体 G 蛋白質が共役することで, G 蛋白質の α サブユニットにおいて GDP-GTP 交換反応が促進される. GTP 結合型へ変換した α サブユニットは 3 量体 G 蛋白質から分離し, 効果器に作用することで細胞内シグナル伝達を活性化する. 遊離した $\beta\gamma$ 2 量体サブユニットもイオンチャンネルに作用する. G 蛋白質 α サブユニットは Gs, Gi/o, Gq, G_{12/13} ファミリーに大きく分類され, それぞれ下流の情報伝達系が異なる. 今日, 医療の現場で使われている約 50% 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.

GPCR にリガンドが結合して細胞内シグナルを伝達した

後, この反応を取束する手段の 1 つとして受容体インターナリゼーションが挙げられる (図 1). これは, 細胞膜上から細胞内へと受容体移行し, 脱感作を引き起こす現象であり, GPCR 不活性化のメカニズムの鍵として注目されている. 具体的には, ①細胞外において受容体にリガンドが結合すると, ②細胞内で 3 量体 G 蛋白質が共役する. ③活性型 G 蛋白質はセカンドメッセンジャーを介して, プロテインキナーゼ A (PKA), プロテインキナーゼ C (PKC), G 蛋白質共役型受容体キナーゼ (GRK) 等の細胞内キナーゼを活性化し, これにより受容体自身の Ser/Thr 残基がリン酸化される. ④次に, そのリン酸化部位を調節蛋白質 β アレスチンが認識・結合することによって G 蛋白質との再会合を阻害し, 細胞内シグナルは減衰する. ⑤ GPCR- β アレスチン複合体はアダプター蛋白質 AP-2 を介して複数のクラスリンの重合から成る格子構造のクラスリン被覆ピットと結合し, 100–150 nm の陥没構造を形成する. そして最終的に GTPase であるダイナミンがネック部分にリクルートされることで膜が切断され, GPCR は細胞内へ移行 (インターナリゼーション) する. ⑥インターナライズした受容体はユビキチン化により分解, または脱リン酸化により再利用される. この①–⑥の過程は, 研究が進展しているいくつかの GPCR から導かれた典型例である²⁾. 従って, すべての GPCR に対して適用できるとは限らない. 例えば, ある GPCR のインターナリゼーションには β アレスチンやクラスリン以外の蛋白質が関与することが報告されている^{3,4)}.

^a 〒739-8521 広島県東広島市鏡山 1-7-1

E-mail: yumist@hiroshima-u.ac.jp

2016 年 1 月 5 日受付

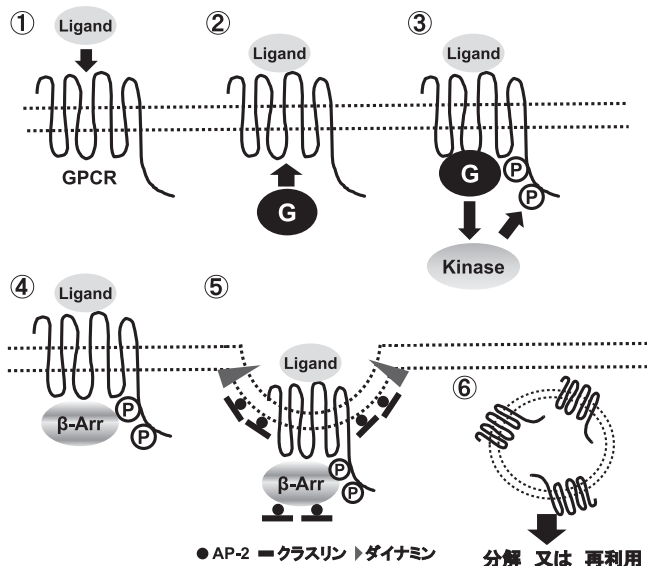


図1 GPCRの活性調節オフの基本的概念

①細胞外でGPCRにリガンドが結合すると、②G蛋白質が共役し、効果器を経たシグナルを伝達する。③続いて活性化された各種キナーゼによりGPCRがリン酸化され、④リン酸化部位をβアレスチン(β-Arr)が認識し、結合することでシグナルは減衰する。⑤GPCR-βアレスチン複合体(AP-2、クラスリン、ダイナミン)はエンドソームへと内部移行する(インターナリゼーション)。最終的に⑥インターナリゼーションした受容体は分解又は再利用される。GPCRの種類によってインターナリゼーションの時間経過と移行程度に大きな幅がある。例えば、細胞膜に発現するM1とM3ムスカリン性アセチルコリン受容体を比べた場合、前者はカルバコール添加後60分で受容体の約60%が内在化するが、後者はほとんど細胞内には入らない³¹⁾。

長い間、受容体インターナリゼーションは受容体の応答を負に制御すると考えられていた。しかし、近年、分子薬理的手法により、ある種のGPCRは細胞内エンドソーム近辺において、①βアレスチンによる足場上で細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)を活性化する、②細胞膜に存在した状態とは異なる「第2波のシグナル伝達」を誘発する、などのデータが提出されている^{5,6)}。最近では、ライブセルイメージングにより、β2アドレナリン受容体は初期エンドソームに取り込まれた状態でもGsによる活性化は持続的に起きていることが示された⁷⁾。以上より、GPCRのインターナリゼーションは細胞内シグナル伝達の不活性化ばかりではなく、活性化制御にも重要かつ複雑な役割を担っている可能性がある。従って、GPCRを介した網羅的なシグナル伝達解析及び生理作用解明のためには、細胞膜上の活性化機構だけでなく受容体インターナリゼーション機構の詳細を調べる必要がある。

2. MCH-MCHR1の生理作用

メラニン凝集ホルモン(MCH)は、サケ脳下垂体から抽出された皮膚体色変化に係る神経ペプチドである⁸⁾。哺乳類MCHは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⁹⁾。ラットMCHは摂食中枢として知られて

いる視床下部外側野ニューロンに高発現し、脳内の広範囲へと投射している¹⁰⁾。MCHの示す多彩な生理作用の中で特に注目を集めたのは摂食との関係であり、その脳室内投与は急性、慢性共に摂食増加作用を持つ¹¹⁾。更にMCH欠損マウスは摂食量が低下し、体重が減少する「ヤセ」形質を示した¹²⁾。この論文から1年後、MCHの受容体はGPCRに属するSLC-1(=MCHR1)であることが報告された^{13,14)}。MCHR1のサブタイプMCHR2もヒト脳から単離同定された¹⁵⁾。MCHR2は魚類、両生類、霊長類では存在するが、げっ歯類では機能発現していない。従って、げっ歯類におけるMCHの受容体はMCHR1のみである。MCHR1 mRNAは海馬、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¹⁶⁾。現在では、MCHR1欠損マウスも「ヤセ」の形質を示すなど、MCH-MCHR1系は摂食調節に関与する証拠が揃ってきた。他の遺伝子改変動物—MCH欠損ラット、MCH過剰発現マウス、MCH/アタキシン-3過剰発現マウス—なども作製され、MCH-MCHR1系はエネルギー代謝にも関与することが判明している。現在では数多くのMCHR1選択性アンタゴニストが開発され、MCHによる高脂肪食による肥満を抑制するなど、MCH系の摂食調節・エネルギー代謝への関与について、より直接的な証拠が提出されている。

MCHR1系はストレス応答に重要な視床下部一下垂体—副腎系の制御にも関与することが知られている。実際、MCHR1欠損マウスでは野生型に比べ、いくつかの行動評価系において抗不安行動が観察された。さらに、MCHR1アンタゴニストSNAP-7941は上述のように高脂肪食による肥満を防いだ上、抗うつ不安作用も示した¹⁷⁾。ここ数年はMCHシステムと睡眠に関する研究が活発化している。ヒトにおいて扁桃体内MCHレベルが睡眠開始時に最大値を示し¹⁸⁾、ラット・マウスにおいてもMCHニューロンはレム睡眠時に最も活発化することが報告された¹⁹⁾。さらに、MCHニューロンを光遺伝学により短時間活性化するとレム睡眠時間が延長し²⁰⁾、抑制するとノンレム睡眠が短縮した。以上より、MCH-MCHR1系は摂食以外にも情動、覚醒にも重要であり、うつ不安・睡眠障害における治療の創薬ターゲットとして期待できる。

3. MCHR1の活性調節—オンとオフ

哺乳類培養細胞へMCHR1発現プラスミドを遺伝子導入した場合、MCHR1はGi/o及びGqと共役し、細胞内Ca²⁺濃度の上昇、ERK1/2のリン酸化、cAMP産生の抑制を引き起こす^{13,14)}。哺乳類MCHR1の構造活性相関(受容体の構造と機能の相関関係)研究も進展し、種々の受容体活性(糖鎖付加、細胞膜へのトラフィッキング、G蛋白質共役、MCH結合)に関わる責任アミノ酸残基がそれぞれ明らかにされている。GPCRシグナルの強度及び持続時間は細胞内シグナル発生と終結のバランスに依存するため、我々はMCHR1インターナリゼーション機構についても解析を進めている。

MCHR1が一過性に高発現したヒト胎児由来腎臓細胞(HEK293)において、ほとんどすべての受容体は細胞膜に

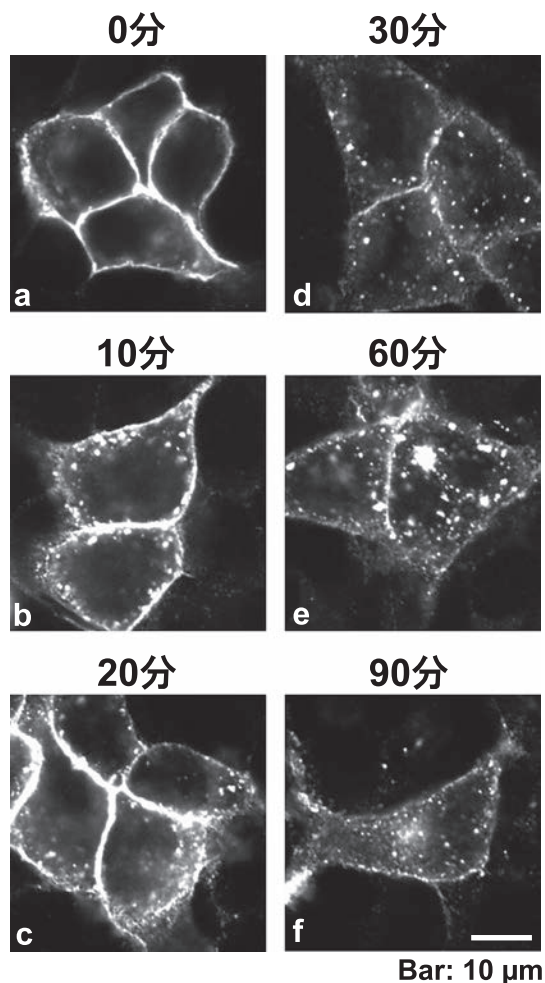


図2 MCH添加によるMCHR1局在の時間的・空間的变化（インターナリゼーション）
 ラットMCHR1のN末端にFlag付加した発現プラスミドを構築し、HEK293T細胞に対して一過性導入を行った。この発現細胞に1μM MCHを添加することにより、受容体の時間的・空間的局在が変化する様子を観察した。細胞の固定（パラホルムアルデヒド）—膜透過（TritonX-100）—抗Flag抗体/二次抗体処理後、共焦点レーザー顕微鏡（FLUOVIEW FV1000, Olympus）を用いてMCHR1発現部位を検出した。MCH添加前ではほとんどすべてのMCHR1は細胞膜上に発現しているが（a）、MCH添加により受容体が細胞膜から細胞内へと徐々に移行していく様子を捉えることができる（b-f）。Bar = 10 μm。

局在する（図2a）。この細胞へMCHを加えた場合、その数分後まではMCHR1は膜に局在し、共焦点顕微鏡により観察する限り、特にダイナミックな変動は検出できない。しかし、MCH添加10分後には一部の受容体が細胞内へと移行し（インターナリゼーション）、明瞭な顆粒状構造が確認できる（図2b）。MCH添加30分後には細胞膜上の受容体発現が大きく低下し、細胞内により多くの顆粒状の構造物が認められる（図2d）。このようなMCHR1が細胞内へと移行した状態は、図2e、fで示すように、MCH添加60-90分経過においても持続する。さらに、MCHR1が安定高発現したHEK293細胞を用いてフローサイトメトリーによる一連の定量的解析

を行った²¹。MCHを30分間添加すると、受容体膜発現が約45%低下し、60分後もこの状態は継続した。また、PKCの選択的シグナル阻害剤Go6850処理により受容体インターナリゼーションが部分的に抑制され、さらに、クラスリン格子形成を妨げる酢酸処理、βアレステチン2及びダイナミンIのdominant-negative遺伝子導入によりインターナリゼーションがそれぞれ顕著に阻害された。つまり、MCHR1のインターナリゼーションはPKC、βアレステチン2、ダイナミンI、クラスリン依存性である。βアレステチン関与ということは受容体のリン酸化が起きているはずである。そこで、PKCを含めた各種キナーゼによる予測リン酸化アミノ酸配列を基に置換体を作製した。まず、MCHR1の細胞内C末端領域内に位置する予測リン酸化部位をAlaに同時置換（T317A/S325A/T342A）したところ、受容体蛋白質の膜発現量及びCa²⁺動員能にはまったく影響を与えなかった。しかし、受容体インターナリゼーションは有意に抑制されたことから、これらの3つのアミノ酸のリン酸化は受容体インターナリゼーションに大切な役割を担うことが示された。この研究では細胞内C末端領域に焦点が当てられたが、他のGPCR（ドーパミンD2受容体やM1ムスカリン性アセチルコリン受容体）では、細胞内第2、第3ループ領域が受容体インターナリゼーションに関わることが報告されている^{22,23}。実際、哺乳類MCHR1には細胞内第2ループ領域に2箇所、細胞内第3ループ領域に4箇所の予測リン酸化部位が存在する²⁴。そこで、当研究室では、細胞内C末端領域、細胞内第2、第3ループ領域に存在する予測リン酸化部位を様々に組み合わせさせたAla置換体を数多く作製し、受容体インターナリゼーション能を解析中である。今後は予測リン酸化部位が実際にリン酸化されているかを確認するため、フォスタグを利用したゲルシフト電気泳動法、[³²P]orthophosphateを用いたオートラジオグラフィー、リン酸化特異的なMCHR1抗体の作製が望まれる。この結果、MCHR1のリン酸化能とインターナリゼーションの直接的な関係が明らかとなるだろう。

4. 今後の展望

これまで培養細胞発現系及びアミノ酸置換体を用いたMCHR1のインターナリゼーションについて解析を行ってきたが、今後は本現象の基盤となる受容体リン酸化の空間的・時間的情報を把握することが重要である。例えば、ソマトスタチン受容体sst2Aは発現細胞によりインターナリゼーションに関わるリン酸化アミノ酸残基が異なり²⁵、さらに、同じ細胞でも添加するリガンドにより、リン酸化部位と受容体の内部移行程度が変動する場合もある²⁶。さらに、リン酸化特異的抗体を用いてsst2Aリン酸化の経時的変化を解析したところ、部位ごとにリン酸化及び脱リン酸化されるタイミングが異なることがわかった²⁷。また、記憶に重要な役割を担う長期増強及び長期抑圧において、GluR_{A1}のリン酸化及び脱リン酸化が関与することは広く知られている。しかしごく最近、海馬組織においてリン酸化状態のGluA1は全体の1%にも満

たないという予想外の結果が報告された²⁸⁾。従って、MCHR1を始めたGPCRにおけるリン酸化とそれに連動するインターナリゼーション機構を正確に解析するためには、過剰発現した培養細胞系だけでなく、初代培養など受容体が内在性に発現した細胞を用いることで理解が進むであろう。

ここ数年、MCHR1研究は新たな展開を見せている。一般的に、GPCRの大半は細胞膜上に局在すると考えられている。しかし、マウス海馬及び視床下部神経細胞において、その1次繊毛膜にMCHR1が選択的に発現することが報告された²⁹⁾。1次繊毛とは、ほとんど全ての脊椎動物細胞が有する不動性の微小管構造である。1次繊毛の膜は通常の細胞膜とは異なったリン脂質組成を持ち、限られた膜タンパク質のみが選別されて輸送される。繊毛膜には特定のセンサー蛋白質や受容体蛋白質が局在し、細胞外の情報を感知するアンテナとして重要な機能を持つことが推測されている。実際、1次繊毛の形成不全は腎不全、肥満、精神遅滞などの多様な症状を引き起こすことが知られている。MCHによるMCHR1インターナリゼーションは通常の細胞膜上のみに限った現象ではなく、1次繊毛膜上に発現したMCHR1にMCHを添加した場合においても、添加後の早い段階で受容体インターナリゼーションを起こしていることを確認した³⁰⁾。現段階において、*vivo*の1次繊毛に発現することが確実な非嗅覚型GPCRは限られている。そこで、1次繊毛という特殊な膜環境におけるMCHR1を介した細胞内シグナル及び受容体インターナリゼーションについて研究することで、新しい事実が明らかとなるかもしれない。

これまで述べてきたように、MCH-MCHR1は中枢を中心とした多様な生理的役割を担うシステムである。MCHR1を含めたGPCRのインターナリゼーションはシグナル調節に2次的3次的な影響を与える可能性を持つため、本研究は薬物の持続時間や副作用といった面からも新薬開発において今後ますます重要な研究課題となるだろう。

文 献

- 1) Bjarnadóttir, T.K., Gloriam, D.E., Hellstrand, S.H. *et al.*: *Genomics*, **88**, 263–273 (2006)
- 2) Williams, J.T., Ingram, S.L., Henderson, G. *et al.*: *Pharmacol. Rev.*, **65**, 223–254 (2013)
- 3) Wan, M., Zhang, W., Tian, Y. *et al.*: *Sci. Rep.*, **5**, 11408 (2015)
- 4) Holliday, N.D., Holst, B., Rodionova, E.A. *et al.*: *Mol. Endocrinol.*, **21**, 3100–3112 (2007)
- 5) Hothersall, J.D., Brown, A.J., Dale, I. *et al.*: *Drug Discov. Today*, **21**, 90–96 (2016)
- 6) Tsvetanova, N.G., Irannejad, R., von Zastrow, M.J. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **290**, 6689–6696 (2015)
- 7) Irannejad, R., Tomshine, J.C., Tomshine, J.R. *et al.*: *Nature*, **495**, 534–538 (2013)
- 8) Kawauchi, H., Kawazoe, I., Tsubokawa, M. *et al.*: *Nature*, **305**, 321–323 (1983)
- 9) Vaughan, J.M., Fischer, W.H., Hoeger, C. *et al.*: *Endocrinology*, **125**, 1660–1665 (1989)
- 10) Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C. *et al.*: *J. Comp. Neurol.*, **319**, 218–245 (1992)
- 11) Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S. *et al.*: *Nature*, **380**, 243–247 (1996)
- 12) Ludwig, D.S., Tritos, N.A., Mastaitis, J.W. *et al.*: *J. Clin. Invest.*, **107**, 379–386 (2001)
- 13) Saito, Y., Nothacker, H.P., Wang, Z. *et al.*: *Nature*, **400**, 265–269 (1999)
- 14) Chambers, J., Ames, R.S., Bergsma, D. *et al.*: *Nature*, **400**, 261–265 (1999)
- 15) An, S., Cutler, G., Zhao, J.J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **98**, 7576–7581 (2001)
- 16) Saito, Y., Cheng, M., Leslie, F.M. *et al.*: *J. Comp. Neurol.*, **435**, 26–40 (2001)
- 17) Borowsky, B., Durkin, M.M., Ogozalek, K. *et al.*: *Nat. Med.*, **8**, 825–830 (2002)
- 18) Blouin, A.M., Fried, I., Wilson, C.L. *et al.*: *Nat. Commun.*, **4**, 1547 (2013)
- 19) Tyhon, A., Lakaye, B., Grisar, T. *et al.*: *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **88**, 446–455 (2008)
- 20) Jego, S., Glasgow, S.D., Herrera, C.G. *et al.*: *Nat. Neurosci.*, **16**, 1637–1643 (2013)
- 21) Saito, Y., Tetsuka, M., Li, Y. *et al.*: *Peptides*, **25**, 1597–1604 (2004)
- 22) Lan, H., Liu, Y., Bell, M.I. *et al.*: *Mol. Pharmacol.*, **75**, 113–123 (2009)
- 23) Lameh, J., Philip, M., Sharma, Y.K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **267**, 13406–13412 (1992)
- 24) Saito, Y., Hamamoto, A. and Kobayashi, Y.: *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **4**, 154 (2013)
- 25) Liu, Q., Bee, M.S., Schonbrunn, A. *et al.*: *Mol. Pharmacol.*, **76**, 68–80 (2009)
- 26) Kao, Y.J., Ghosh, M., Schonbrunn, A. *et al.*: *Mol. Endocrinol.*, **25**, 1040–1054 (2011)
- 27) Ghosh, M. and Schonbrunn, A.: *J. Biol. Chem.*, **286**, 13561–13573 (2011)
- 28) Hosokawa, T., Mitsushima, D., Kaneko, R. *et al.*: *Neuron*, **85**, 60–67 (2015)
- 29) Berbari, N.F., Johnson, A.D., Lewis, J.S. *et al.*: *Mol. Biol. Cell*, **19**, 1540–1547 (2008)
- 30) Hamamoto, A., Yamato, S., Katoh, Y. *et al.*: *Cell Signalling*, **28**, 572–584 (2016)
- 31) Uwada, J., Yoshiki, H., Masuoka, T. *et al.*: *J. Cell Sci.*, **127**, 3131–3140 (2014)