

博士論文

論文題目 新しい部分型腎性尿崩症の機能解析と
 新たな治療薬の可能性
 ～GPCRにおける protean agonism～

氏 名 矢嶋 由紀

目次

要旨	1
序文	3
方法	26
結果	33
考察	57
謝辞	65
引用文献	66

要旨

V2 受容体 (V2R) の不活化変異は、抗利尿ホルモンである AVP の腎臓での抵抗症による先天性腎性尿崩症 (NDI) の原因となる。我々は臨床的に部分型 NDI と診断される少年から新たな V2R 変異 (T273M) を発見し、その機能解析を行った。また同時に、最近、非ペプチド性 V2R アゴニストである OPC5 が、細胞内小胞体に局在する変異 V2R をその場で活性化し、この新規活性化機構では V2R は分解されずシグナルは脱感作されないとの興味深い報告がなされたため、T273M 変異を含む複数の変異体で検討した。

正常 V2R は細胞膜で機能するが、本変異 V2R の一部は細胞内に局在した。さらに、我々の検討では、細胞膜でのみ作用する AVP と OPC5 は変異 V2 受容体を同程度に活性化し、同様に細胞膜で作用するペプチドアンタゴニストが AVP や OPC5 による cAMP 蓄積と ERK1/2 リン酸化を抑制したことから、OPC5 は小胞体に留まる変異受容体ではなく、細胞膜に局在する変異受容体を活性化してシグナルを作動させると推定された。更に、OPC5 はアゴニストとして細胞膜に局在する変異 V2R を活性化し、脱感作を生じるが、その一方で、小胞体に留まる変異 V2R を成熟させ、細胞膜へ輸送させる pharmacochaperone としても作用することが示された。少なくとも今回解析した変異体に対してではあるが、OPC5 の長期作用は、各々の正常 / 変異受容体に対する

pharmacochaperone 効果と脱感作効果のバランスで規定される結果、AVP に比して持続的活性化を可能にすることが示された。また、正常／変異受容体の種類によって下流のシグナルが変化する protean agonism の一例と考えられた。

治療の観点では、OPC5 の有する脱感作を相殺する pharmacochaperone 効果は機能喪失性変異 V2R を介する持続的シグナル作動を可能にし、V2 受容体変異のうち最も高頻度で見られる蛋白の折り畳み異常が原因となる変異受容体が原因の NDI の治療薬として有望な選択肢となることと期待される。

序文

G タンパク質共役受容体

G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptors : GPCRs) は感覚・認知、循環調節、ホルモン作用、生体防御など多様な細胞外シグナルを細胞内へ伝える役割をしている。哺乳類では最初の GPCR が発見されてから 1000 以上の GPCR が見つかっており、ゲノム中で最大のファミリーの 1 つである。GPCR を介する基本的なシグナル経路は GPCR、G タンパク質、エフェクターから成る(1-5)。

GPCR を通じてシグナルを伝える内因性因子は多岐にわたり、ホルモンや神経伝達因子、イオン、アミノ酸、ペプチド、糖タンパク、脂質、ヌクレオチドなど様々な細胞外因子が挙げられる。この他に光、匂い、味などの外因性刺激も GPCR を通じてシグナルを伝えており、GPCR は実に多種多様なシグナルを受容している。この GPCR は少なくとも 16 種類の $G\alpha$ 、6 種類の $G\beta$ 、12 種類の $G\gamma$ からなる G タンパク質に共役し、8 種類の 100 近いエフェクター群の活性を制御している。この著しい多様性の一方で、GPCR と G タンパク質の作用機構は進化を超えて保存されている。

GPCR は 7 回膜貫通 α ヘリックス構造を共通構造として持つタンパク質である。アゴニストが受容体に結合すると、7 回膜貫通部位の間の相互作用を変化させ、G タンパク質に変化が伝わる。G タンパク質の α サブユニット ($G\alpha$) が

GDP 結合部位付近に高次構造変化を起こし、 $\beta\gamma$ サブユニット ($G\beta\gamma$) が回転することで、GDP の放出が促進される。その後 GTP が α サブユニットに結合することで G タンパク質が活性化される。活性化された G タンパク質の α サブユニットは内因性の GTPase によって GTP が GDP に分解されることで不活性化型に戻る。またアゴニストによる持続的な刺激によって、刺激に対する応答が減弱する脱感作現象が起こることが知られている。この少なくとも一部は細胞膜に存在する GPCR の細胞内への移行による細胞表面受容体発現レベルの低下に起因するものと説明されている。そのメカニズムの詳細は、(1) アゴニストを結合して活性化型となった GPCR を基質とする、G タンパク質共役型受容体キナーゼ (GRK) によるリン酸化、(2) アゴニストを結合して活性化型となりかつリン酸化された GPCR を認識する β arrestin 結合、(3) dynamin 依存性の GPCR の内在化 (internalization) のステップからなる(6)。こうした GPCR の構造と G タンパク質活性化機構は種を超えて進化上極めてよく保存されている。

また現在医療で使われる薬の約半数が GPCR をターゲットとし、アゴニスト、アンタゴニストやアロステリックモジュレーターとして作用することが示されている(7-9)。これらの薬剤は約 800 存在する GPCR の中のわずか約 30 程度をターゲットにしており、GPCR 分野で今後さらに多くの薬が開発される可能性を秘めている。

GPCR と G タンパク質の変異による疾患

この 20 年の間に、GPCR や G タンパク質の変異が内分泌疾患や他の一般的疾患の原因として特定されてきている(10-13)。これらの疾患の研究により GPCR を介する経路の生理学的制御や分子メカニズムが解明されてきた。例えば、LH、TSH、PTH、カルシウム感知受容体の機能亢進 (gain-of-function) 変異はそれぞれ男性思春期早発症、散発型機能亢進性甲状腺腫瘍、Jansen 骨幹端軟骨異形成症、常染色体優性低カルシウム血症を引き起こす。逆に GHRH、LH、FSH、TRH、TSH、ACTH、バソプレシン 2、PTH、カルシウム感知受容体、エンドセリン B 受容体の機能喪失 (loss-of-function) 変異はそれぞれ、家族性成長ホルモン欠損症、男性仮性半陰陽、高ゴナドトロピン性卵巣発育不全症、家族性中枢性甲状腺機能低下症、家族性甲状腺機能低下症、家族性コルチコトロピン抵抗症、腎性尿崩症 1 型、Blomstrand 軟骨異形成症、家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症、ヒルシュスプルング病の原因となる (表 1)。

GPCR の機能喪失変異 (loss of function) による疾患

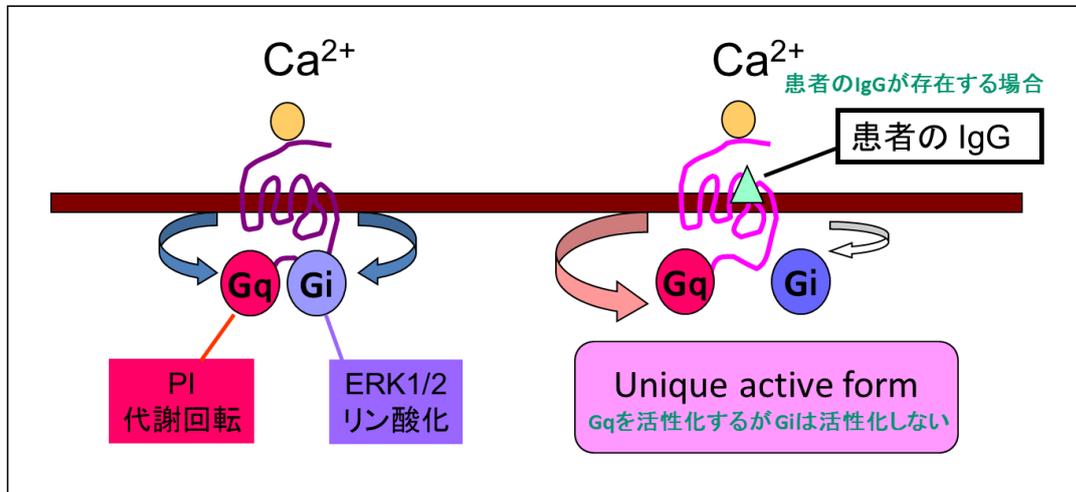
Receptor	Disease	Inheritance
Rhodopsin	網膜色素変性症	常染色体優性 常染色体劣性
Vasopressin(V2R)	腎性尿崩症	X染色体
ACTH	家族性コルチコトロピン抵抗症	常染色体劣性
LH	男性仮性半陰陽	常染色体劣性
Ca ²⁺ sensing	低カルシウム尿性高カルシウム血症	常染色体優性
Endothelin B	ヒルシュスプルング病	complex
TSH	家族性甲状腺機能低下症	常染色体劣性
TRH	家族性中枢性甲状腺機能低下症	常染色体劣性
GHRH	家族性成長ホルモン欠損症	常染色体劣性
GnRH	中枢性性腺機能低下症	常染色体劣性

表 1

GPCR に対する自己抗体による疾患

GPCR に対する刺激抗体や阻害抗体はそれぞれ GPCR の活性型変異、不活性化型変異と同様の疾患の原因となる。例えば TSH 受容体刺激抗体は Basedow 病を生じ、TSH 受容体阻害抗体は特発性甲状腺機能低下症を生じる。近年カルシウム感知受容体 (CaSR) に対する自己阻害抗体が後天性低カルシウム尿性高カルシウム血症 (acquired hypocalciuric hypercalcemia : AHH) を生じることが報告された(14)。この疾患は表現型の上では家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症と同じである(15, 16)。最近我々は AHH 患者から CaSR に対する通常の阻害抗体とは異なるユニークな自己抗体を発見した(17)。CaSR は Ca^{2+} で刺激されると、通常は Gq と Gi を活性化し、ホスファチジルイノシトール (PI) 代謝回転の亢進と ERK1/2 のリン酸化を生じる。我々が発見した AHH 患者の自己抗体でプライミングすると CaSR は Gq を活性化するが、Gi は活性化しないユニークな活性型をとった。この結果は CaSR には少なくとも高次構造の異なる 2 つの活性型が存在することを意味し、本患者自己抗体は CaSR に対して機能選択的なアロステリック調節因子として作用することを示唆した(図 I)(17)。

Allosteric modulator



Makita, N et al. Proc Natl Acad Sci USA;2007;104,5443-5448

図 I

Ca 感知受容体の活性型には少なくとも 2 つの異なる高次構造が存在する。Ca²⁺を結合した通常の場合、Gq および Gi を活性化する (A)。一方 Ca²⁺と自己抗体が結合すると Gq を特異的に活性化するユニークな高次構造をとる (B)。

GPCR の multi-state モデル、functional selectivity、protean agonism

古典的な GPCR の two-state モデル(3, 9, 18)では GPCR は活性型と不活性型の間で平衡状態にあり、各 GPCR 作動薬はその平衡状態をシフトさせる方向からアゴニスト、インバースアゴニスト、アンタゴニストと分類されてきた。すなわちアゴニストは平衡を活性型へとシフトさせ、インバースアゴニストは平衡を不活性型へとシフトさせ、アンタゴニストはそれ自身この平衡をシフトさせず、アゴニストの作用を競合的に抑制するものとされる (図 II)。

しかし古典的な GPCR の two-state モデルでは説明のできない現象があることが明らかとなってきた。その一例がパーシャルアゴニストである。GPCR のアゴニストの中には大過剰を投与しても本来の生理的なりガンドが起こし得る生理活性化と比較して部分的な活性化しか示さないものがある。飽和濃度で 100%の生理活性をひき起こし得るものをフルアゴニスト、部分的活性化のみ生じるものをパーシャルアゴニストと呼ぶが、これはパーシャルアゴニストによる活性化構造がフルアゴニストによる活性化構造とは異なることを意味する。このような事象を背景に multi-state モデルが考えられるようになってきた。

multi-state モデルとは GPCR は活性型、不活性型いずれにおいても無数の高次構造を取り得ると考えるものである。このモデルでは各々の GPCR 作動薬は、それぞれに異なるユニークな GPCR の高次構造を認識して結合し、この高

GPCR の活性化モデル

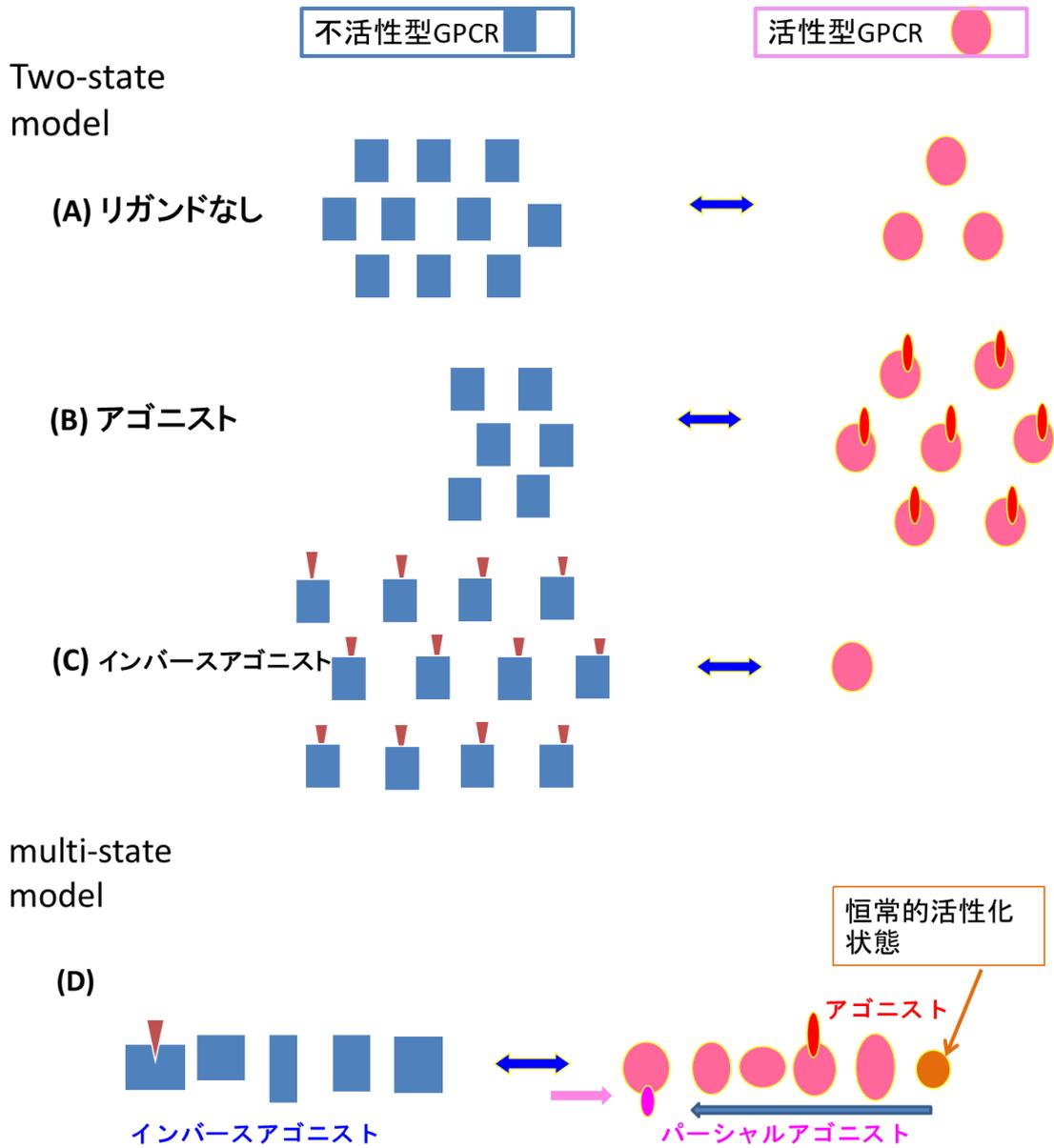


図 II

古典的な GPCR の two-state モデルでは GPCR は活性型 (●) と不活性型 (■) の間で平衡状態にある (A)。アゴニストは平衡を右の活性型へとシフトさせ (B)、インバースアゴニストは平衡を左の不活性型へとシフトさせる (C)。しかし最近、GPCR は活性型、不活性型いずれにおいても無数の高次構造を取り得ると考える multi-state モデルを支持するデータが集積してきている (D)。このモデルで

は各々の GPCR 作動薬は、それぞれに異なるユニークな GPCR の高次構造を認識して結合し、この高次構造を安定化させ、ある特異的な生物学的効果をもたらすと考えられる (functional selectivity, biased agonism)。functional selectivity の特殊型が protean agonism で、例えば静止状態の GPCR に対してはパーシャルアゴニストとして機能するリガンドが、恒常的活性化状態の GPCR に対してはインバースアゴニストとして機能する事象がこれにあてはまる。

次構造を安定化させると考えられている。すなわち、ある特別なアゴニストを用いると、本来複数のシグナル系を活性化する GPCR を介して、ある特異的なシグナル系のみを活性化できるとするものである。もしそうであれば、GPCR は数多くの高次構造の数だけ潜在的に異なる機能を発揮し得ると考えられ、機能選択性 (functional selectivity)、バイアスのある活性化 (biased agonism) とも呼ばれている(7, 8, 18)。

biased agonism の例を挙げると、PTH/PTHrP 受容体やショウジョウバエの D1 類似受容体において、異なる種類のアゴニストが異なるセカンドメッセンジャーを特異的に活性化すると報告された(19)。また、ヒト 5-HT_{2c} 受容体において、あるアゴニストがホスホリパーゼ C 系をより選択的に活性化するのに対し、別のアゴニストがホスホリパーゼ A₂ をより選択的に活性化すると報告された(20)。

また、PTH 受容体は G_s および G_q を活性化するが、アゴニストとして PTH(1-34)が作用すると両シグナルが活性化するのに対して、PTH (3-34) は G_q を介すると推測される MAP キナーゼを活性化するが G_s-cAMP 系を活性化しないと報告された(21)。

更に、過剰発現した $\beta 2$ アドレナリン受容体の系を用いて非常に興味深い報告がなされた。 $\beta 2$ アドレナリン作動薬である ICI118551 やプロプラノロールが

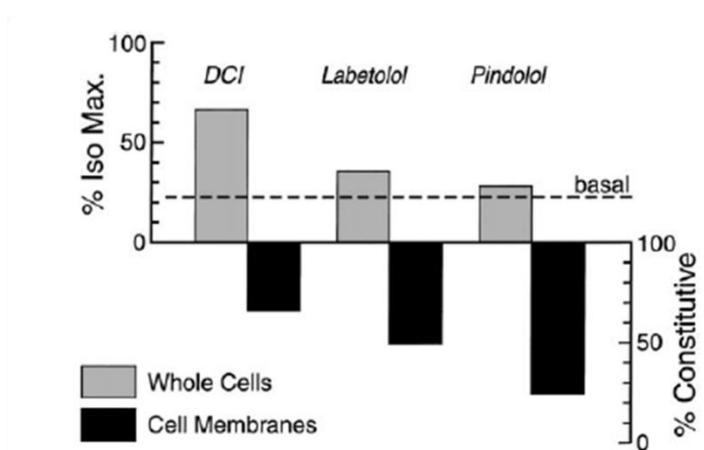
Gsを介するcAMPシグナルにおいてはインバースアゴニストとして作用すると同時にMAPキナーゼ系に対してはパーシャルアゴニストとして作用することが報告された(22)。これは、あるアゴニストがターゲットとするGPCRの1つのシグナル系を活性化し、別のシグナル系を抑制するという極端なbiased agonismの例である。

機能選択的活性化の中には、機能選択的リガンドと類似の作用を通常のアゴニストと特異なアロステリック調節因子が達成する例がある。我々が発見したAHH患者のCaSRに対するユニークな自己抗体も機能選択的なアロステリック調節因子として作用する(17)。

こうしたbiased agonismの特殊型がprotean agonismである。protean agonismはあるアゴニストが特定の状況下でその効果を変えるという事象を指し、自由自在に外見を変えられるギリシア神話の神プロテウスにちなんで命名され、Kenakinが最初にその例を報告した(23)。ある $\beta 2$ アドレナリン受容体作動薬(ジクロロイソプロテレノール、ラベタノール、ピンドロール)が細胞(whole cells: 恒常的活性化状態ではない)ではcAMP系に対してパーシャルアゴニストとして作用するのに対し、同じ作動薬が細胞膜(cell membranes: 恒常的活性化状態)ではcAMP系に対してインバースアゴニストとして作用していた(図III)。これに基づけば、各GPCR作動薬のアゴニスト活性、インバースアゴニス

ト活性、アンタゴニスト活性はその薬剤の特性として本来決定されているのではなく、それぞれの作用する環境に依存すると言える。

Protean agonism



Kenakin, T. FASEB J. 2001;15:598-611

図Ⅲ Protean agonism

GPCR の合成経路、molecular chaperone、quality control system

細胞内で働くハウスキーピング遺伝子とは異なり、細胞外へ分泌される酵素やホルモン、GPCR などの膜タンパク質の mRNA の先頭には、シグナルペプチドと呼ばれる共通のアミノ酸をコードする配列部分がある。翻訳が始まると、この先頭部分は粗面小胞体の表面に存在するシグナルペプチド受容体と結合する。伸長するポリペプチド鎖は受容体と結合した後、小胞体内へと取り込まれ、シグナルペプチドは取り除かれる。ポリペプチド鎖は折り畳まれ、小胞体内で必要に応じて糖鎖などが付加された後に、小胞体内を運ばれ、顆粒となって粗面小胞体を離れ、ゴルジ体と融合する。ゴルジ体でさらに必要に応じて糖鎖などが付加された後、分泌顆粒となって細胞内に蓄えられ、細胞外へ分泌あるいは細胞膜上へ輸送される。

なおポリペプチド鎖の折り畳み（フォールディング）に際し、かつてはポリペプチド鎖が自動的にエネルギー最小の状態に折り畳まれると考えられていたが(24)、実際はそうではないことが明らかとなってきた。細胞内にはタンパク質をはじめ多くの物質が存在するため、ポリペプチド鎖は折り畳み途中の中間体や熱で変性したタンパク質などと疎水相互作用で凝集しやすい。それを防いで正しく折り畳まれるのを助けるタンパク質が存在する。これが **molecular chaperone**（分子シャペロン）である(25)。

また小胞体には quality control system (QCS) があり、新たに合成されたタンパク質を精査し、正しく折り畳まれたもののみを分泌経路へ移行させる。基準を満たさなかったタンパク質は分解経路で分解される。小胞体の QCS は機能的基準ではなく構造的基準を基にタンパク質を精査しているため、タンパク質の構造のわずかな変化ですら異常と判断され、機能的には問題なくとも細胞内に留められ分解される。GPCR の 1 種であるヒト δ opioid 受容体では、合成されたタンパク質のうち完成して細胞膜へ輸送され発現するのは約 40% と言われている(26)。

Pharmacochaperone (Pharmacological chaperone)

GPCR の機能喪失型変異は多くの内分泌疾患や他の疾患を生じる(12, 27)。多くの変異では GPCR の発現が完全に阻害されるが、タンパク質の局在異常やタンパク質同士の相互作用異常などで機能喪失を起こす変異もある。部分的な機能喪失変異は少なくともタンパク質が一部発現しているため、その変異体の機能解析をおこなうことが可能となる。このような疾患の研究により GPCR の生理的な役割における新たな知見が得られてきた。

GPCR の折り畳み異常が原因の疾患では、その異常が本質的に機能的に問題なければ、折り畳みを正常に復して細胞膜へ輸送することができれば治療に有

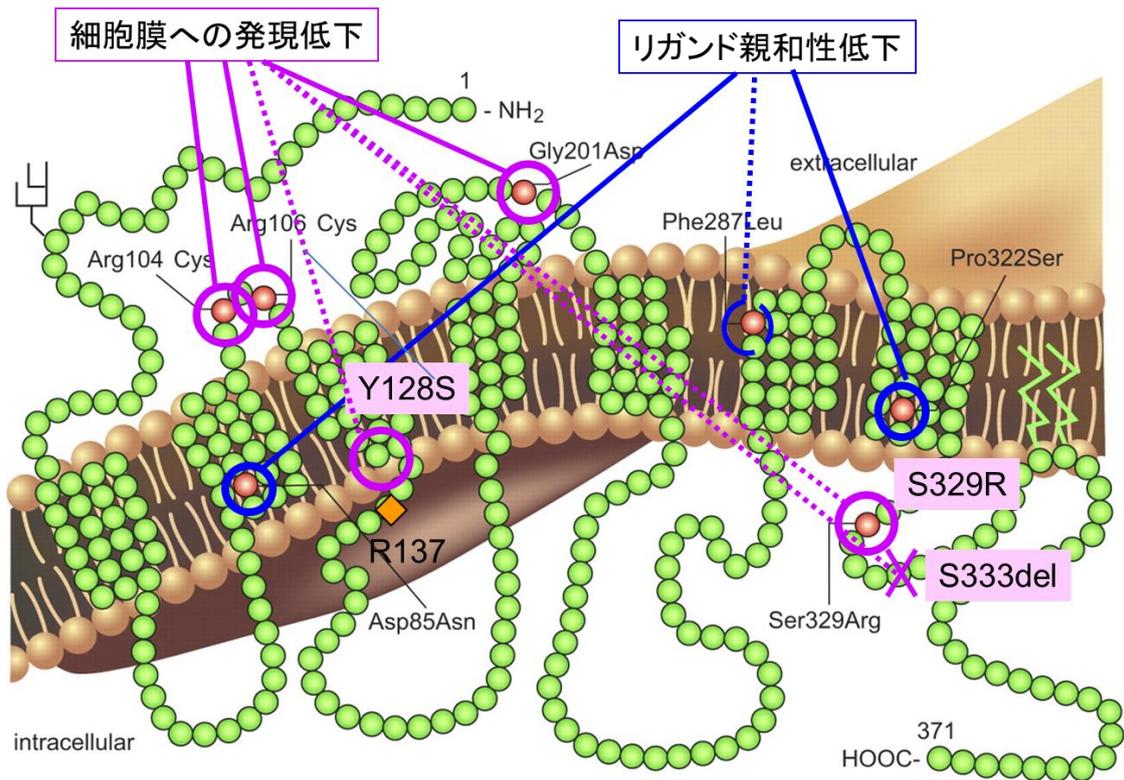
効と推定され、注目されている。そのような治療戦略のひとつが pharmacochaperone あるいは pharmacological chaperone と呼ばれるもので、生理的に存在する molecular chaperone と同様に、合成されたポリペプチド鎖が正しく折り畳まれるのを助ける薬剤を意味する(26)。腎性尿崩症 (NDI) を起こす V2 受容体 (V2R) では、非ペプチド V2R アンタゴニストが小胞体に留まる V2R 変異体 20 種のうち 12 種に対し、折り畳みを正常化し細胞膜へ輸送して受容体発現量を増やし、AVP 刺激に対する cAMP 蓄積を増加させることが報告された(28-31)。CaSR 変異(32)、rhodopsin 受容体変異(33, 34)などにも同様な戦略が適応され、研究が進められている。また、pharmacochaperone の中には正常の GPCR の細胞膜発現を増加させるものもあることが報告されているが(35-41)、正常の GPCR においても合成の過程で半数以上が成熟せずに分解されることを考えると当然といえる。

部分型腎性尿崩症 (partial nephrogenic diabetes insipidus : partial NDI)

腎性尿崩症 (NDI) は抗利尿ホルモンであるアルギニンバソプレシン (arginine vasopressin : AVP) の腎臓での抵抗症を原因とする疾患で、代償性に AVP の基礎分泌が亢進する(42, 43)。集合管細胞の血管側の細胞膜に存在する V2 受容体 (V2R : 結晶構造は未だ解明されていない) に AVP が結合すると、Gs、アデニ

ル酸シクラーゼ、A キナーゼ(PKA)を介し、細胞質内に存在する水チャネルであるアクアポリン 2 が管腔側細胞膜へ移動し、このアクアポリン 2 を通して尿濃縮作用が発揮される。V2 受容体 (V2R) の不活性化変異は先天性 NDI の約 90% の原因となり、X 染色体に連鎖しており、ほとんどの場合完全機能喪失型の表現型をとる。現在までに 200 以上の V2 受容体変異が発見されているが、部分型先天性 NDI を生じるものはごくわずかである(44-51)。

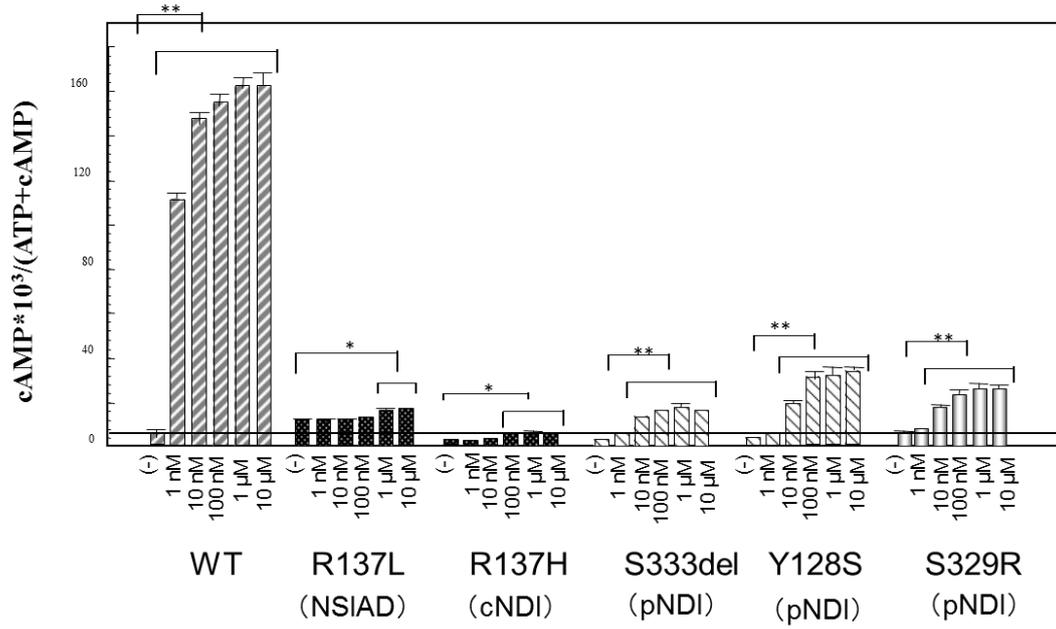
部分型先天性 NDI を起こす V2 受容体変異のマップを示した(50) (図IV)。137 番目のアミノ酸の変異は置換されるアミノ酸の違いによって、活性型変異、不活性型変異となることが報告されている(52)。



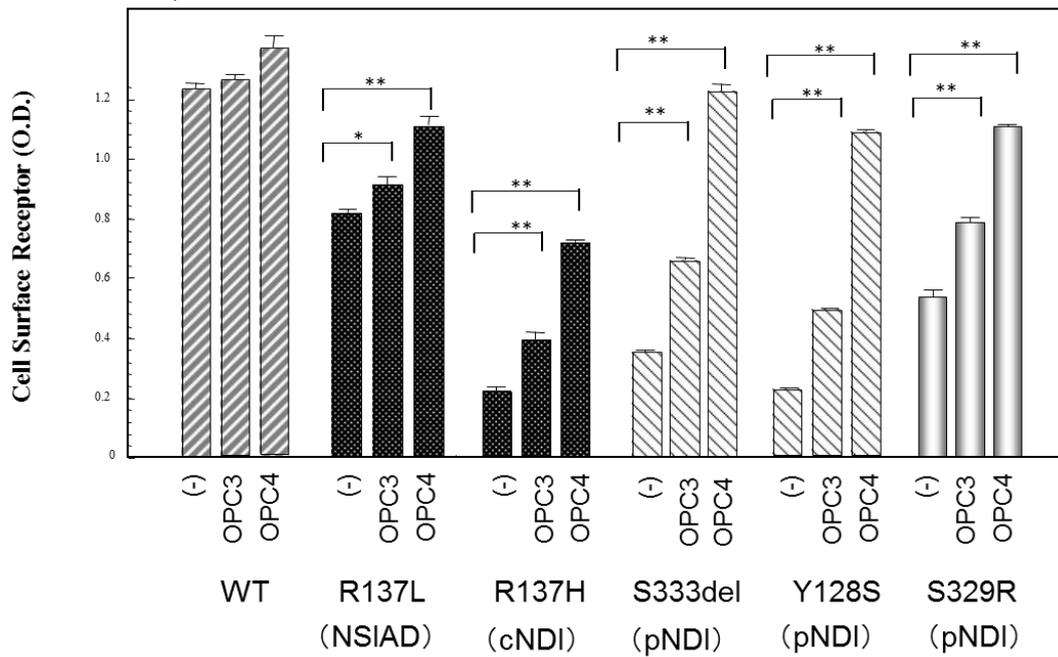
図IV 先天性部分型腎性尿崩症を起こすV2受容体変異のマップ

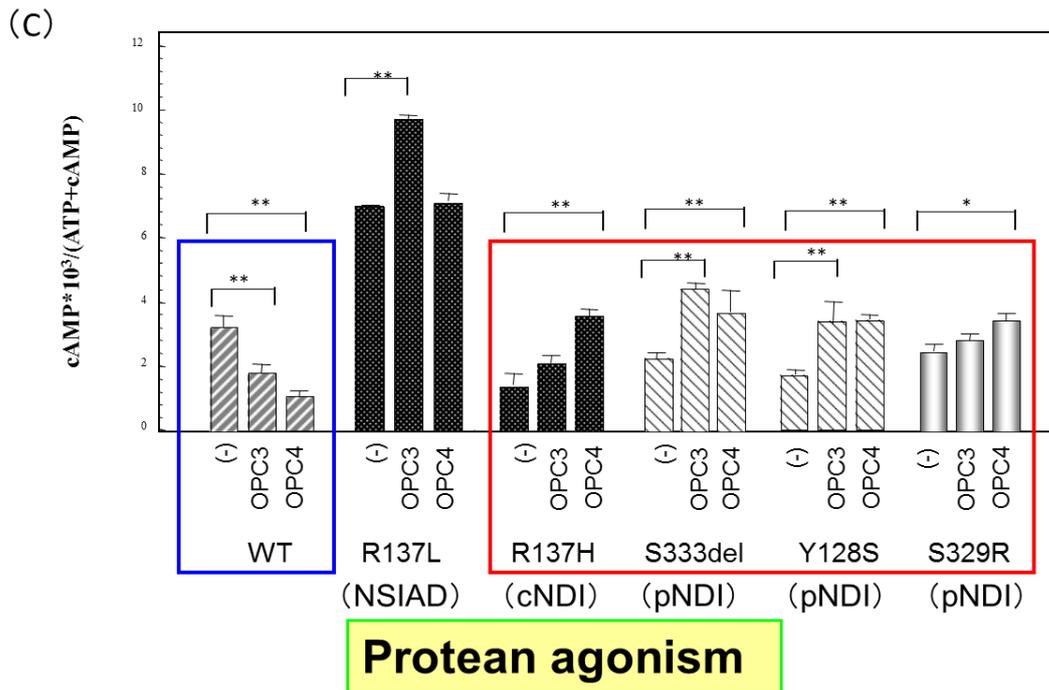
最近我々は部分型 NDI 患者から V2 受容体の C 末に位置する 333 番目のセリンの欠失による変異 (S333del) を発見した(53)。また他の患者から、これまで NDI の原因となる変異として報告された(54-56)が、部分型 NDI の原因となることは報告されていない変異 (Y128S) を発見した。これらの変異受容体では AVP 刺激による cAMP の蓄積の減弱が認められた。変異受容体の膜への発現は低下しており、主に小胞体に局在していた。その原因は受容体内在化の亢進ではなく、新たに合成された受容体の細胞膜への輸送障害と考えられた。これまでにいくつかの pharmacochaperone が報告されてきているが(42, 43)、 OPC31260 (OPC3) と OPC41061 (OPC4) (57, 58)という V2 受容体アンタゴニストがこれらの変異受容体の膜への輸送を助け、その結果 cAMP 蓄積が上昇することを報告した。一方で、OPC3 と OPC4 は野生型 V2 受容体にはインバーサゴニストとして機能して cAMP 蓄積を減らし、受容体によって異なる効果を示した (図 V) (53)。つまり OPC3 と OPC4 はターゲットによって異なる機能を発揮するということから、**protean agonism** の一例といえる。

(A)



(B)



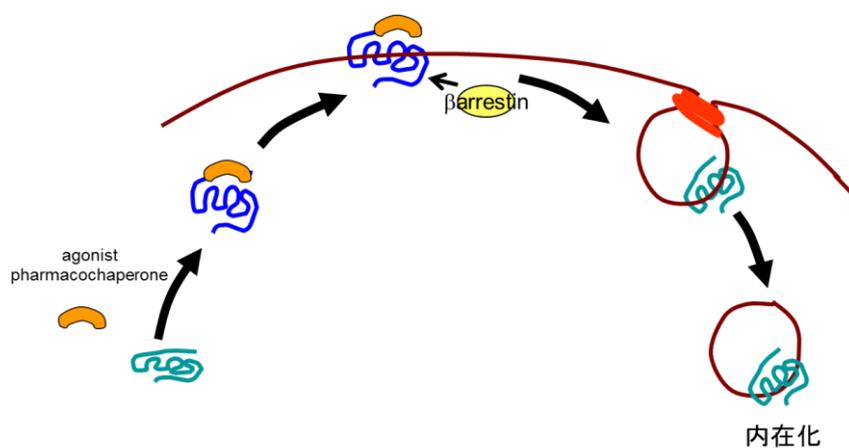


Takahashi, Makita, et al. JBC 2012 : 287(3)2099-2106

図 V

完全型腎性尿崩症 (cNDI) を起こす変異体では AVP 刺激による cAMP 蓄積がほとんど惹起されず、部分型腎性尿崩症 (pNDI) を起こす変異体では cAMP 蓄積の減弱が認められた (A)。また活性化変異体である R137L では基礎 AVP 分泌が亢進していた。OPC3 と OPC4 という V2 受容体アンタゴニストが変異受容体の膜への輸送を助け (B)、その結果 cAMP 蓄積が上昇することを見つけた (赤枠) (C)。一方 OPC3 と OPC4 は野生型 V2 受容体にはインバースアゴニストとして機能して cAMP 蓄積を減らし (青枠)、受容体によって異なる効果を示した。

しかし、臨床的な観点からすると、OPC3 も OPC4 も強力に AVP を阻害するため、少なくとも上述で報告した変異受容体患者の治療には使えない。NDI の治療薬としては、親和性の弱いアンタゴニスト pharmacochaperone か、アゴニスト pharmacochaperone (図VI) か、AVP 結合部位ではなくアロステリックに作用する pharmacochaperone などが期待される。



図VI agonist pharmacochaperone の働きの想定図

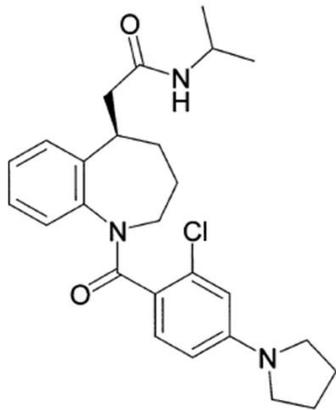
細胞内の変異受容体を成熟させて細胞膜へ輸送する pharmacochaperone 効果を持つと同時に、アゴニストとして働く。

部分型 NDI の原因となる新たな変異の発見

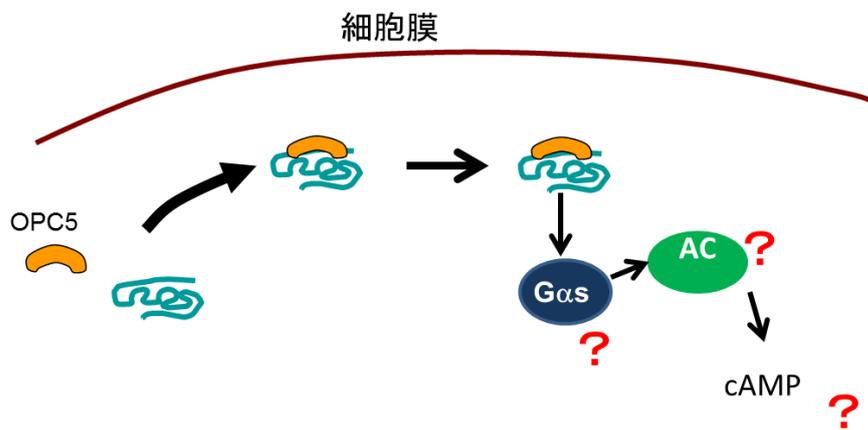
最近非ペプチドアゴニストである OPC51803 (OPC5) (59-62)が小胞体に留まる変異 V2 受容体を細胞内で活性化すると報告された (図VII) (63)。疾患の原因となる GPCR 遺伝子変異の 40%以上で、折り畳み異常を伴う受容体を生じ、これが小胞体で留まることを考えると、小胞体に留まる変異 GPCR を細胞内で活性化することは、非常に魅力的な治療戦略である。

今回我々は、基礎 AVP 分泌が高いことから部分型 NDI と診断された 4 歳の少年から新たな V2R 変異を発見した。この変異体の一部は小胞体内に存在していた。OPC5 は小胞体内に留まる変異体に対して有望な治療戦略となると推定し、この新たな変異 V2 受容体の機能解析と OPC5 の効果検討を行った。

(A)



(B)



図VII

(A) OPC5 の構造式

(B) OPC5 が細胞内で変異受容体を成熟させることなく、その場で活性化するという想定図 (63)。

方法

Pharmacochaperones とリガンド

OPC3、OPC4、OPC5 は大塚製薬株式会社から提供された。AVP、ペプチドアンタゴニスト [Adamantaneacetyl]¹, O-Et-D-Tyr², Val⁴, Aminobutyryl⁶, Arg^{8,9}]-Vasopressin は Sigma より購入した。

DNA constructs、細胞培養

N 末に Myc-tag を付した野生型 V2R(64)は M.Bouvier (Université de Montreal, Canada) から譲渡され、NDI の原因となる各変異体はマニュアルに従って作成した(Stratagene, La Jolla, CA)。COS7 細胞、MDCK 細胞、HEK293 細胞は 10% (vol/vol) の牛胎児血清を含む DMEM 存在下で培養した。

Transfection

COS7 細胞、MDCK 細胞に DNA constructs をトランスフェクションする際はアデノデキストラン法で行った。細胞をディッシュに必要量 (1.6× 10⁶ 個/6 cm dish、0.8× 10⁶ 個/35 mm dish) をまき、2 時間後に Medium、serum free medium、DNA、8mg/ml のデキストラン、アデノウイルスを混ぜたウイルス液を作成し、細胞に感染させた。その 2 時間後に 10%DMSO/PBS で洗浄し反応

を終了し、Medium に入れ替えて培養した。約 24 時間後に細胞を 12well あるいは 24well のディッシュにまき直し、assay に使用した。

HEK293 細胞の場合は DNA constructs は Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用してトランスフェクションを行った。

cAMP assay

野生型 V2R と各 V2R 変異体を一過性発現させた COS7 細胞での cAMP 蓄積を cAMP アッセイで検討した(65-68)。トランスフェクション 1 日後に細胞を 24 well にまき直し、 $[^3\text{H}]$ adenine (2 $\mu\text{Ci/ml}$)を添加した。薬剤の長期処理効果を検討する実験ではアッセイの 16 時間前に AVP と OPC5 を添加した。細胞まき直し 24 時間後に細胞を洗浄し、1 mM のイソブチルメチルキサンチン (IBMX) を含む 0.5 ml のアッセイメディウムで培養した。その際に必要な well に AVP か OPC5 を各実験で示す濃度添加した。30 分後培養液を除去し、1 mM ATP と 1 mM cAMP を含む 5%トリクロロ酢酸 (TCA) を添加して反応を終了させた。産生された $[^3\text{H}]$ cAMP と $[^3\text{H}]$ ATP を AG 50W-X4 Dowex、 alumina カラムを用いて分離し、cAMP 蓄積量を $[^3\text{H}]$ cAMP / $[^3\text{H}]$ cAMP + $[^3\text{H}]$ ATP で表示した。

Cell Surface ELISA

Myc-tag 付き野生型 V2R や各 V2R 変異体を一過性発現させた COS7 細胞の細胞表面での受容体発現は ELISA 法で定量化した(29, 69)。トランスフェクション 1 日後に、細胞を 24 well にまき直し、必要な場合は assay の 16 時間前に AVP、OPC3、OPC4、OPC5 を必要濃度添加した。24 時間後、氷冷した 1% BSA/PBS で 2 度洗浄し、氷上に 5 分静置し、1%BSA/PBS で希釈した抗 myc 抗体液 (1 : 4000) を添加して室温で 1 時間静置した。その後 1%BSA/PBS で 2 度洗浄し、4%パラホルムアルデヒド/PBS で 15 分固定し、1%BSA/PBS で 2 度洗浄した。次に 1%BSA/PBS で希釈した HRP 付き抗 mouse 二次抗体液 (1 : 12000) を添加して室温で 1 時間静置した。その後 1%BSA/PBS で 2 度洗浄し、更に PBS で洗浄した。最後に基質 (o-phenylenediamine dihydrochloride, Sigma) を室温で 5 分反応させ、同量の 2.5N HCl を加えて反応を停止した。プレートリーダー (Bio-Rad) を使って 492nm の吸光度を測定した。

免疫染色

トランスフェクションさせた COS7 細胞をカバーガラスの上にまいた。アッセイの 16 時間前に必要濃度の OPC4 あるいは OPC5 を添加した。その後 PBS で 2 度洗浄し、氷冷した 100%メタノールで -20°C、2 分間固定処理を行い、細

胞全体での受容体発現を評価した（細胞膜透過処理あり）。PBS で更に 2 度洗浄し、室温で 20 分間 Block Ace を使ってブロッキング処理をした後、20%Block Ace/PBS で希釈した抗 myc 抗体液(1:4000)あるいは抗 PDI(protein disulfide isomerase、小胞体マーカー) 抗体液 (1 : 4000) を添加して 4°Cで一晩静置した。細胞は 20%Block Ace/PBS で 2 度洗浄し、20%Block Ace/PBS で希釈した抗 mouse 抗体 488 液（抗 myc 抗体用）と抗 rabbit 抗体 594 液（抗 PDI 抗体用）を添加して室温で 1 時間静置した。0.1% Tween20/PBS で 2 度洗浄し、PBS で 1 回洗浄した後、プレパラートに乗せて顕鏡した。

膜分画 assay

60 mm dish にまいた COS7 細胞に GFP tag を付した β arrestin2 と myc tag を付した野生型 V2R や V2R 変異体をトランスフェクションした。48 時間後、1 μ M の AVP あるいは 10 μ M の OPC5 で 20 分間処理した細胞を回収した。400g、4°C、5 分間の遠心後に細胞を hypotonic buffer (20mM Tris-HCl, pH7.5、20mM NaCl、2mM MgCl₂, 1 mM EGTA, proteinase inhibitors) で 10 分間処理して溶解させ、ダウンス型ホモジナイザーで 15 回処理し細胞を破砕した。核分画と破壊されていない細胞は 800g、4°C、5 分間の遠心で除去した。上清を超遠心 (160000 g、4°C、30 分) にかけて、沈渣を細胞膜分画とし、lysis buffer (40 mM

Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, and proteinase inhibitors)を加えて 4°Cで 1 時間溶解し、遠心した (200g, 4°C、5 分)。次に上清に等量の 2x Laemmli sample buffer を添加し、5 分間煮沸した。作成したサンプルを SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写、モノクローナル抗 GFP 抗体 (1 : 10000) で免疫ブロットした。

MAPK assay

12 well dish にまいた COS7 細胞に myc tag 付き野生型 V2R とそれぞれの V2R 変異体をトランスフェクションし、36 時間培養した後、12-16 時間無血清培地で培養した。その後 1 μM AVP あるいは 10 μM OPC5 を添加し、5 分後に 200 μl の 2×SDS サンプル buffer (6.25 mM TrisCl(pH 6.8)、2%SDS、25%グリセロール、0.01%BPB、5%βME) で反応を停止させ、10 分間煮沸したものをサンプルとした。タンパク質抽出物を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜へ転写した後、モノクローナル抗 pERK 抗体 (Cell Signaling) で免疫ブロットした。

Immunoblotting (Western blotting)

タンパク質抽出物サンプルを SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に移した。膜はブロッキング buffer (1%無脂肪ドライミルク、0.2%の Tween20 を含む PBS)

で室温 1 時間ブロッキングした。その後 1 次抗体を添加して一晩 4℃環境下で振とうした。その後 PVDF 膜を 0.2%の Tween20 を含む PBS で 3 回洗浄し、0.2%の Tween20 を含む PBS で希釈した HRP を付した 2 次抗体を加えて室温で 1 時間振とうした。PVDF 膜を更に洗浄し、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE healthcare biosciences Co) でシグナルを検出した。

患者の V2 受容体遺伝子 (AVPR2) の遺伝解析

V2 受容体遺伝子の遺伝解析は東京大学の審査委員会の承認のもとで施行した。患児の両親から書面での同意書を得た後、DNA 分離キットを用いて末梢血白血球から genomic DNA を調整した。PCR ダイレクトシーケンス法で AVPR2 の全エキソンを解析した。

水制限試験

試験開始前は自由に水分摂取できるが、試験中飲食は禁止した。開始前後で体重、尿浸透圧、血中 AVP 濃度を測定した。

バソプレシン負荷試験

水制限試験に引き続き、DDAVP (5 単位/kg) を皮下注射し、尿量、尿浸透圧

を測定した。

統計分析

Dunnet の多重比較を使った。用量反応の評価にはウィリアムの多重比較を使った。3つの独立した実験の平均データを示し、エラーバーは平均±S.D.を示している。これらはマイクロソフトエクセルで行った。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

結果

部分型腎性尿崩症の患者で新たな V2 受容体変異の発見

多飲、多尿を呈し、部分型腎性尿崩症（NDI）を疑われた 4 歳男児に、水制限試験とバソプレシン負荷試験を施行した。AVP の基礎分泌は増加し、AVP 抵抗性が存在すると推定された。一方、完全型腎性尿崩症ではほとんど反応しないバソプレシン負荷に対して反応を示したことから、臨床的に部分型腎性尿崩症と診断された。（図 1-A）。その後 V2R 遺伝子（AVPR2）のミスセンス変異 T273M（3 番目の細胞内ループにある 273 番目のアミノ酸をスレオニンからメチオニンに置換する変異）を同定した（図 1-B）。ほとんどの NDI は完全型 NDI として報告されているが、この症例は臨床的に部分型 NDI であった。部分型 NDI として遺伝子変異まで同定されているケースは非常に稀であり、われわれの報告した S333del 変異と Y128 変異も加えて、本例は 15 例目で(51)、これまで報告されていない新規の変異であった。

A

	control	water dep.	pitressin
ADH (pg/ml)	66.7	66.8	
Urine osmolarity (mOsm/kg H ₂ O)	<200	<200	636

B

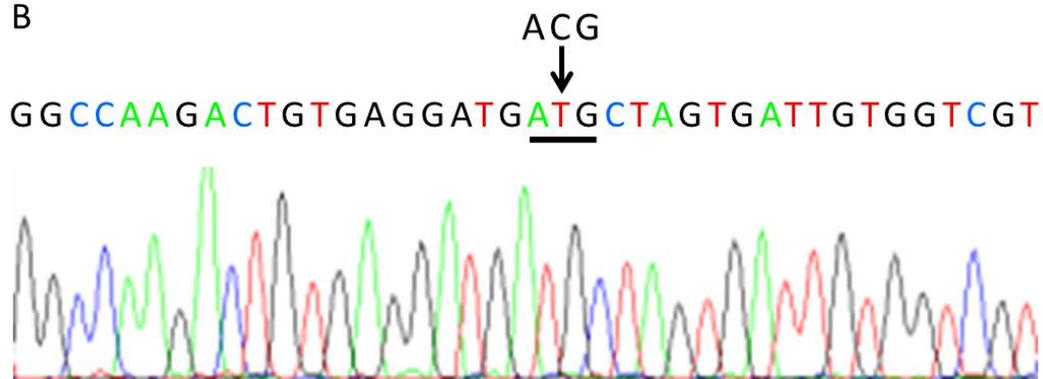


図 1

患者の臨床検査所見と V2 受容体遺伝子プロファイル

- (A) 水制限試験とバソプレシン負荷試験
- (B) 患者の V2 受容体遺伝子変異

共焦点顕微鏡を用いた V2R-T273M 変異体の局在解析

まず T273M 変異体が細胞膜に発現するかを検討した。Myc tag を付した野生型 V2R を一過性発現させた COS7 細胞 (COS-WT)、Myc tag を付した T273M-V2R を発現させた COS7 細胞 (COS-T273M)、Myc tag を付した Y128S-V2R を発現させた COS7 細胞 (COS-Y128S) と Myc tag を付した Ser-333del-V2R を発現させた COS7 細胞 (COS-S333del) を共焦点顕微鏡で顕鏡すると、野生型 V2R は細胞膜に局在するのに対し、既に報告した通り Y128S 変異体と S333del 変異体は細胞内に存在し、小胞体 (ER) マーカー protein disulfide isomerase と共局在していた (図 2-A) (53)。新たな変異体 T273M は anti-myc で細胞膜が弱く染色されるが、野生型 V2R のように鮮明ではなく、Y128S 変異体や S333del 変異体と同様に anti myc 抗体シグナルと ER マーカーが共局在していた。OPC5 が ER にとどまる変異 V2R を細胞内で活性化するの興味深い論文があり (63)、OPC5 が本患者も含めてわれわれの同定した部分 NDI 患者の治療に貢献する可能性を想定し、検討を行った。特に Y128S 変異は両検討いずれでも解析の対象となっており、重要である。

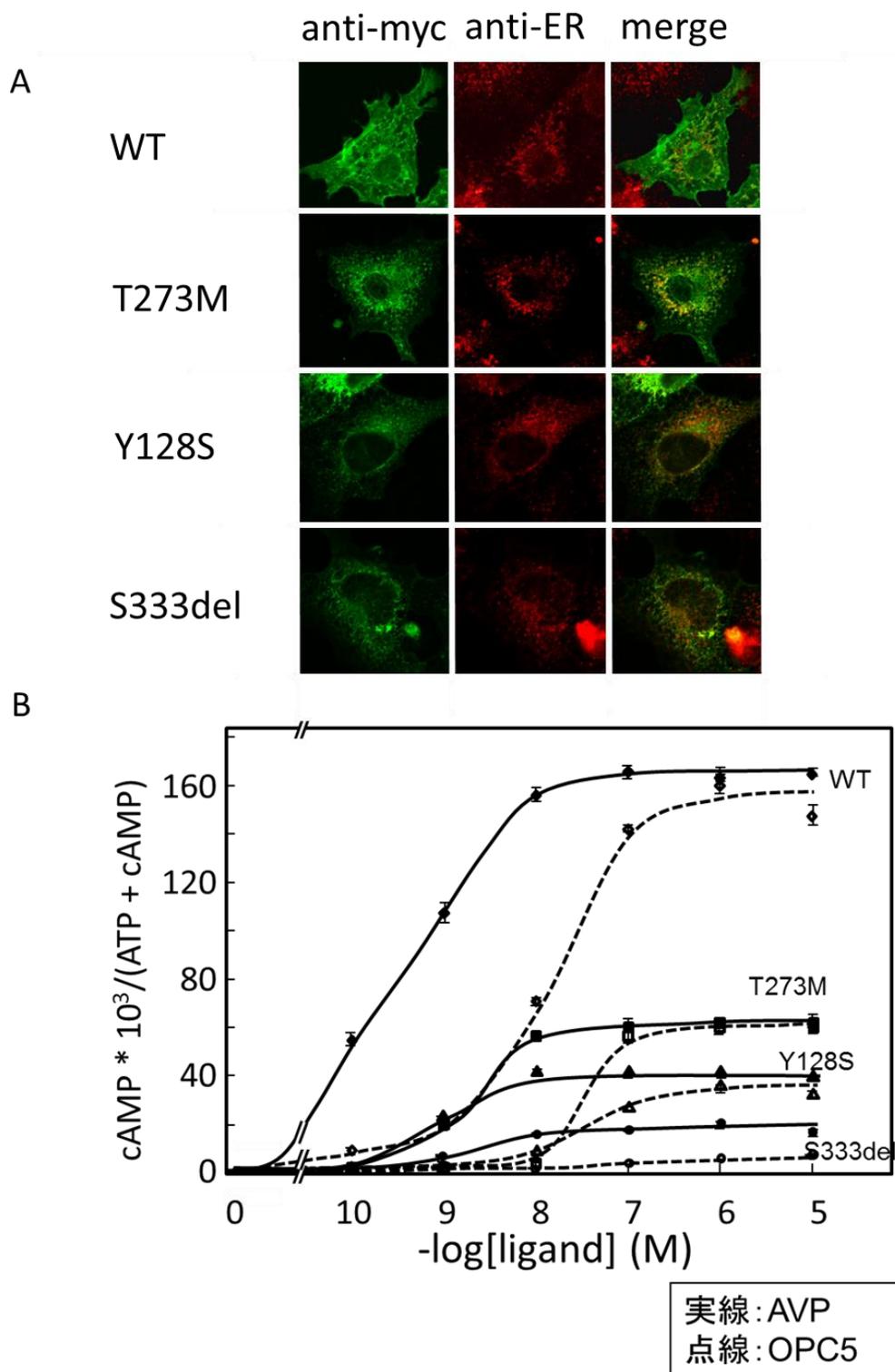


図 2

野生型 V2R と V2R 変異体発現細胞の免疫染色と cAMP 蓄積

(A) myc tag を付した野生型 V2R や V2R 変異体を一過性発現させた COS7 細胞

の免疫染色を共焦点顕微鏡で顕鏡した。実験方法に記述したように抗 myc 抗体あるいは抗 protein disulfide isomerase (小胞体マーカー) 抗体で染色した。myc tag 付き V2R-T273M、V2R-Y128S、V2R-S333del は小胞体マーカーと共存した。

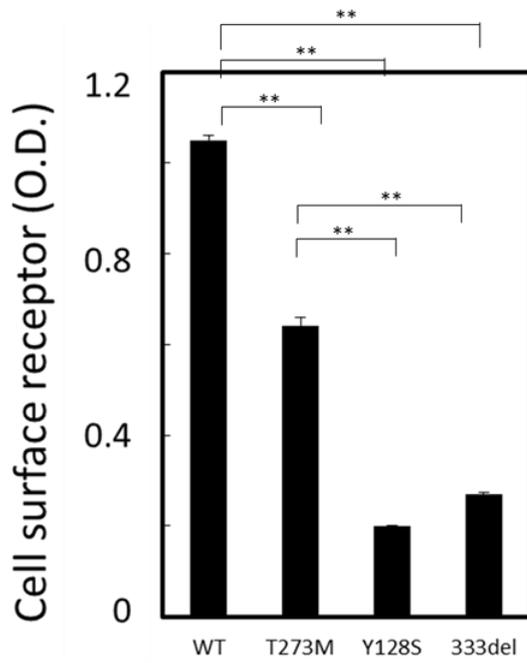
(B) 部分型 NDI 患者の V2R と野生型 V2R での AVP もしくは OPC5 刺激による cAMP 蓄積。COS7 細胞 (1.6×10^6 個) に野生型 V2R (ダイヤモンド型)、V2R 変異体 (V2R-T273M ; 四角、V2R-Y128S ; 三角、V2R-S333del ; 丸) を一過性発現させた。それぞれの myc tag 付き V2R を含む pcDNA3 を $0.4 \mu\text{g}$ ずつトランスフェクションした。24 時間後に細胞を 1 well あたり 0.33×10^5 個で 24 well ディッシュにまき直し、 $[3\text{H}]$ adenine ($2 \mu\text{Ci}/\text{ml}$, GE healthcare) を添加した。48 時間後に 1 mM の IBMX を加えた assay medium で洗浄し、 1 nM から $10 \mu\text{M}$ までの各濃度の AVP あるいは OPC5 を添加し 37°C で 30 分間無血清培地で温置した。AVP は中黒の記号・実線、OPC5 は中の透けた記号・点線で示してある。cAMP 蓄積は実験方法に記載したように測定した。データは triplicate 実験から得られ、平均 \pm SD で示した。

野生型と 3 つの部分型 NDI 変異体での cAMP 蓄積

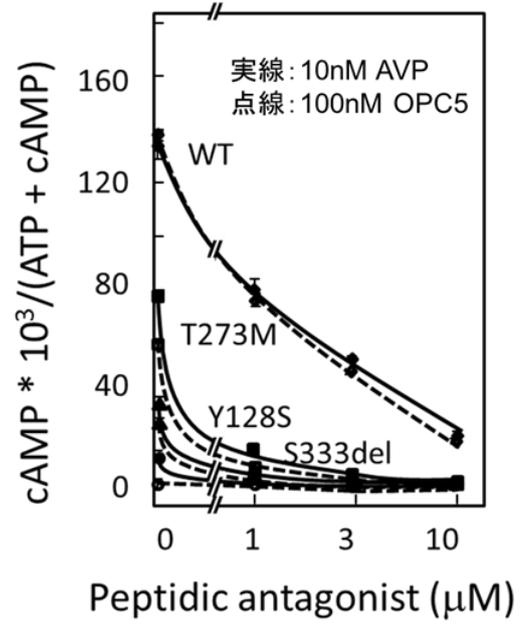
新たな変異体の特徴を明らかにし、OPC5 のアゴニスト活性を明らかにするため、COS-WT、COS-T273M、COS-Y128S、COS-S333del で AVP と OPC5 による cAMP の蓄積を検討した (図 2-B)。COS-WT は OPC5 により AVP に対するのと同様の用量依存性の cAMP 蓄積を示した (Emax 値は AVP の Emax 値とほぼ同様) が、その用量反応曲線は AVP のものと比較して約一桁右にシフトしていた。一方、COS-Y128S、COS-S333del に加えて COS-T273M では COS-WT に比べて AVP にも OPC5 にも部分的な用量依存性の cAMP 蓄積を呈した。COS-WT と同様 OPC5 への反応は AVP への反応より右にシフトしていた。COS-T273M での最大反応は COS-WT のものより低かったが、COS-Y128S、COS-S333del よりは高かった。COS-T273M、COS-Y128S、COS-S333del が、細胞膜において作用する AVP が cAMP 蓄積を生じた事実は、免疫染色では検出困難であるものの、各変異体の少なくとも一部が細胞膜に発現していることを示唆する。このため各変異体の膜発現レベルを ELISA で定量化した。ELISA での検討で各変異体は少なくとも一部細胞膜に存在することが示された (図 3-A)。さらに、AVP の Emax と OPC5 の Emax がほぼ等しいという実験結果 (検討した範囲で OPC5 が飽和濃度に達していない S333del 変異を除く) は、過去の報告と異なり、変異体においても、OPC5 が細胞膜に存在する V2R を活

性化して cAMP 蓄積を生じていることを強く示唆している。

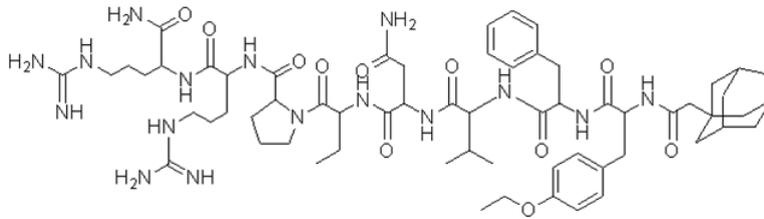
A



B



C



D

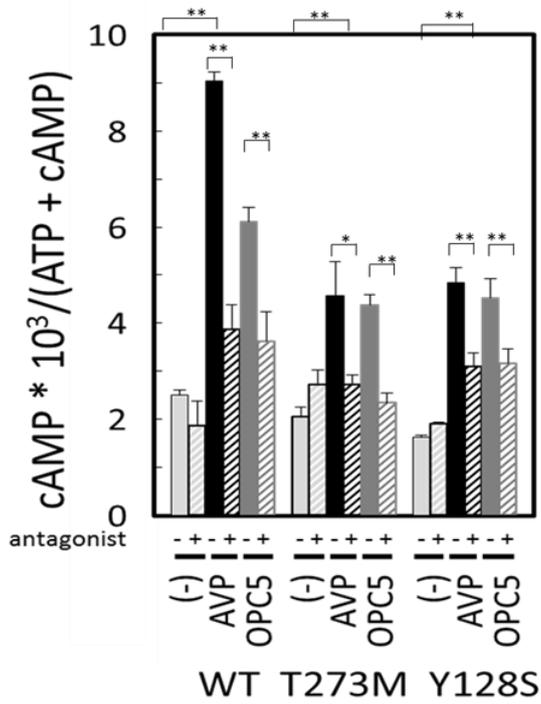


図 3

(A) ELISA による野生型 V2R と V2R 変異体の細胞膜での受容体発現量測定。COS7 細胞 (0.8×10^6 個) に野生型 V2R と V2R 変異体を一過性発現させた。それぞれの myc tag 付き V2R を含有する pcDNA3 を $0.2 \mu\text{g}$ ずつトランスフェクションした。24 時間後に細胞を 1 well あたり 0.33×10^5 個で 24 well ディッシュにまき直し、48 時間後に実験方法に記載されたやり方で細胞表面 ELISA によって細胞膜での各々の受容体タンパクの発現レベルを測定した。データは triplicate 実験から得られ平均 \pm SD で示した。

(B) 野生型 V2R と V2R 変異体を発現した COS7 細胞での AVP あるいは OPC5 による cAMP 蓄積に対するペプチドアンタゴニストの効果。野生型 V2R (ダイヤモンド型)、V2R 変異体 (V2R-T273M ; 四角、V2R-Y128S ; 三角、V2R-S333del ; 丸) を発現した COS7 細胞を図 2-B のように調整した。48 時間後に 1 mM の IBMX を入れた assay medium で洗浄し、10 nM AVP あるいは 100 nM OPC5 と、 $1 \mu\text{M}$ から $10 \mu\text{M}$ までの各濃度のペプチドアンタゴニスト (図 3-C) を含んだ無血清培地で 37°C で 30 分間温置した。cAMP 蓄積は実験方法に記載のように測定した。データは triplicate 実験から得られ平均 \pm SD で示した。

(C) ペプチドアンタゴニストの構造式。

(D) 野生型 V2R と V2R 変異体を一時的発現させた MDCK 細胞での AVP あるいは OPC5 による cAMP 蓄積に対するペプチドアンタゴニストの効果。野生型 V2R と V2R 変異体を一過性発現させた MDCK 細胞 (MDCK-WT、MDCK-T273M、MDCK-Y128S) を図 2-B のように調整した。48 時間後に 1 mM の IBMX を入れた assay medium で洗浄し、MDCK-WT と MDCK-T273M には 10 nM AVP あるいは 100 nM OPC5 と $10 \mu\text{M}$ のペプチドアンタゴニスト、MDCK-Y128S には 100 nM AVP あるいは $1 \mu\text{M}$ OPC5 と $10 \mu\text{M}$ のペプチドアンタゴニストを含んだ無血清培地で 37°C で 30 分間温置した。cAMP 蓄積は実験方法記載のように測定した。データは triplicate 実験から得られ平均 \pm SD で示した。

ペプチドアンタゴニストは OPC5 による cAMP 蓄積をほぼ完全に抑制する

OPC5 による cAMP 蓄積が細胞膜で惹起されていることをさらに確認するため、ペプチドアンタゴニスト [Adamantaneacetyl]¹, O-Et-D-Tyr², Val⁴, Aminobutyryl⁶, Arg^{8,9}]-Vasopressin (図 3-C) の有無での cAMP 蓄積を検討した。このアンタゴニストは 10 nM AVP あるいは 100 nM OPC5 による cAMP 蓄積を用量依存性に阻害した。10 μ M の濃度では COS-WT、COS-T273M、COS-Y128S、COS-S333del いずれでも AVP あるいは OPC5 による cAMP 蓄積をほぼ完全に阻害した (図 3-B)。OPC5 が細胞内で変異受容体をそのまま活性化していると報告した論文(63)では、同様の実験を MDCK 細胞で行っていた。細胞の種類によって結果の差異が生じた可能性を除外する目的で、MDCK 細胞においてもペプチドアンタゴニストの cAMP 蓄積への効果を検討した。Myc tag を付した野生型 V2R (WT-V2R)、T273M-V2R、Y128-V2R を発現した MDCK 細胞でも同様の結果が得られた (図 3-D)。しかし S333del-V2R を発現した MDCK 細胞では AVP によっても OPC5 によっても cAMP 蓄積が見られなかったため、cAMP 蓄積阻害は確認できなかった。これは少なくとも一部、MDCK 細胞では、より高濃度のアゴニストを必要としたことによると推測された。

COS7 細胞での結果と、WT-V2R、T273M-V2R、Y128S-V2R を発現した MDCK 細胞での結果は、OPC5 が野生型 V2R のみならず V2R 変異体を細胞膜

で活性化していることを強く示唆する。

OPC5 は pharmacochaperone として V2R 変異体の成熟を促進させる

膜透過性の非ペプチドリガンドの中には pharmacochaperone として ER に留まる V2 変異体を成熟させ細胞膜へ輸送させるものがあることが、これまで報告されている(42, 43)。最近我々の研究室では OPC3 と OPC4 が antagonist pharmacochaperone として NDI 変異体を成熟させることを報告した(53)。

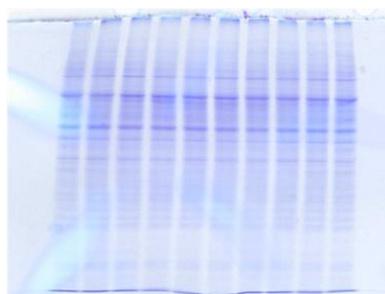
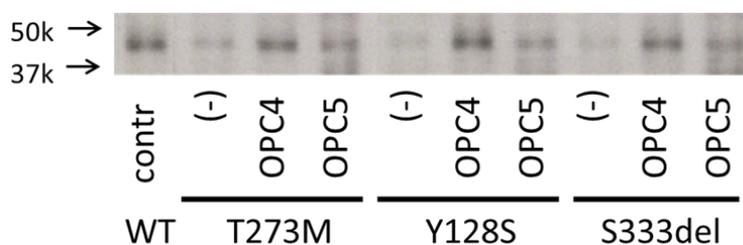
OPC5 も膜透過性の V2R リガンドの一つであることから、pharmacochaperone として作動する可能性を考え検討した。

myc tag を付した WT-V2R を過剰発現させ、可溶化したサンプルの immunoblotting では、約 50kDa の GPCR の位置に成熟 V2R タンパクと想定されるバンドが検出されるが、myc tag 付き V2R 変異体ではこのバンドは検出困難だった。この各変異体に OPC4 で長期間処理すると劇的に約 50kDa のバンドが増強された。それよりは弱いですが、OPC5 で長期間処理すると約 50kDa のバンドが有意に増強された (図 4-A)。成熟タンパク質より小さい未成熟タンパクは約 36~40kDa の位置に存在するとの報告があるため(70)、OPC4 と OPC5 処理による未成熟タンパクの減少を検討したが、同部位周辺は広範囲にバンドが広がっており、特定のバンドは同定困難であった。COS7 細胞や HEK293 細胞、

より生理的な MDCK 細胞に一過性発現あるいは安定発現させて同様の実験を繰り返したが、未成熟タンパクのバンドを鮮明には検出できなかった。

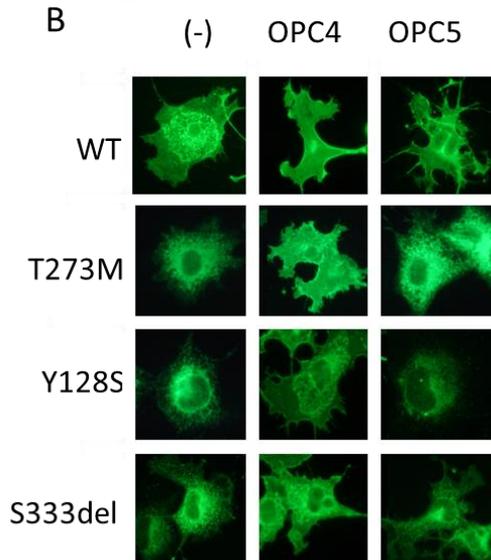
成熟度を評価するには不十分な結果であったが、図 4-A の実験ではクマシー染色で各サンプルのタンパク量がほぼ同じに見え、OPC4 や OPC5 処理によって細胞全体で合成タンパク量が増えた可能性は除外され、抗 myc 抗体で免疫ブロットしていることから、約 50kDa の GPCR の位置は V2R と推定される。これは OPC5 が少なくともこの 3 つの変異体で成熟した V2 受容体変異体タンパクを増加させるという考えを支持するデータと推測された。

A



クマシー染色
サンプルは同上

B



C

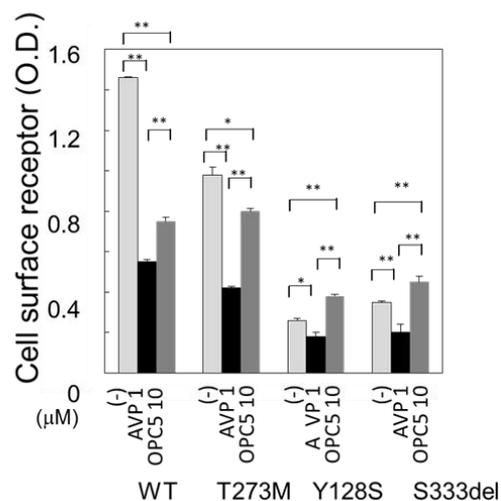


図 4

(A) OPC4 と OPC5 の変異 V2R に対する成熟効果。HEK293 細胞に lipofectamine 2000 を使って myc tag 付き野生型 V2R あるいは V2R 変異体をトランスフェクションした。これらの細胞に 10 μM OPC4、10 μM OPC5 あるいは溶媒のみ (0.1% DMSO) を加えて 16 時間 37°C で培養した。細胞溶解物は実験方法に記載したように抗 myc 抗体で免疫ブロットして分析した。

(B) 野生型 V2R と V2R 変異体を発現した COS7 細胞の免疫染色。染色開始の 16 時間前に $10\ \mu\text{M}$ OPC4 か $10\ \mu\text{M}$ OPC5 か溶媒を加え、野生型 V2R と V2R 変異体を発現した COS7 細胞の免疫染色を行った。抗 myc 抗体で染色した。

(C) AVP あるいは OPC5 長期投与の、V2R 変異体の細胞膜発現への影響。野生型 V2R や V2R 変異体を発現した COS7 細胞を図 3-A のように用意し、32 時間後に $1\ \mu\text{M}$ AVP あるいは $10\ \mu\text{M}$ OPC5 を添加し、48 時間後から実験方法に記載したように ELISA で各受容体の細胞膜での発現量を調べた。データは triplicate 実験から得られ平均 \pm SD で示した。

免疫染色では OPC5 処理で V2R 変異体の膜発現は明らかな増加を呈さない

OPC5 で変異体 V2R が成熟するならば、OPC5 処理で細胞膜へ輸送された結果、変異体の細胞膜での発現が増えることが推測される。しかし OPC4 と異なり OPC5 では免疫染色で本効果は明らかでなかった (図 4-B)。そこで、定量解析のため細胞表面の ELISA を施行した。AVP を長時間処理すると WT-V2R もいずれの V2R 変異体も細胞膜での発現が減少した (図 4-C)。これは AVP の長時間処理で、脱感作経路が作動し受容体が内在化(internalization)したためと推定される。OPC5 を長時間処理すると WT-V2R の細胞膜発現は減少した。T273M-V2R では細胞膜発現は減少したが、AVP 処理より有意に軽度の減少であった。一方 Y128S-V2R と S333del-V2R では細胞膜発現は増加していた。これは OPC5 が AVP と同様に脱感作経路を作動させるが、その脱感作効果を相殺する pharmacochaperone 効果があるという考えを支持するデータである。これと異なる考えとして、OPC5 による脱感作効果が AVP の脱感作効果に比べて弱いという可能性があるため、次に OPC5 の脱感作効果について検討を行った。

OPC5 は AVP と同様に β arrestin を細胞膜へ動員する

脱感作経路の重要なステップである細胞膜への β arrestin の動員に注目した。受容体にアゴニストが結合して活性化すると、G タンパク質共役型受容体キナ

一ゼによって受容体の C 末端近傍がリン酸化され、そこに β arrestin が結合し、さらに受容体内在化機構が集合し、受容体の内在化が進行する。AVP 処理と同様 OPC5 処理すると COS-WT と COS-T273M の膜分画で β arrestin は著明に増加した(図 5-A)。COS-Y128S と COS-S333del でも同様の現象が惹起された。各受容体で AVP と OPC5 による β arrestin の動員はほぼ同程度であり、同程度に脱感作作用を生じると推定される。なお図 4-C で WT-V2R に対する AVP と OPC5 による細胞膜発現減少の程度が有意に異なるが、これは pharmacochaperone の中には野生型の GPCR に対しても細胞膜での発現を増加させるものがあることが報告されており(35-41)、OPC5 が WT-V2R に対しても pharmacochaperone 効果を有する可能性を示唆している。AVP と OPC5 の脱感作効果が異なる可能性よりは、上述のように β arrestin の動員量がほぼ同程度であり、脱感作効果は同様であるが、OPC5 にはそれを相殺する pharmacochaperone 効果があるという考えを支持するデータと推測される。

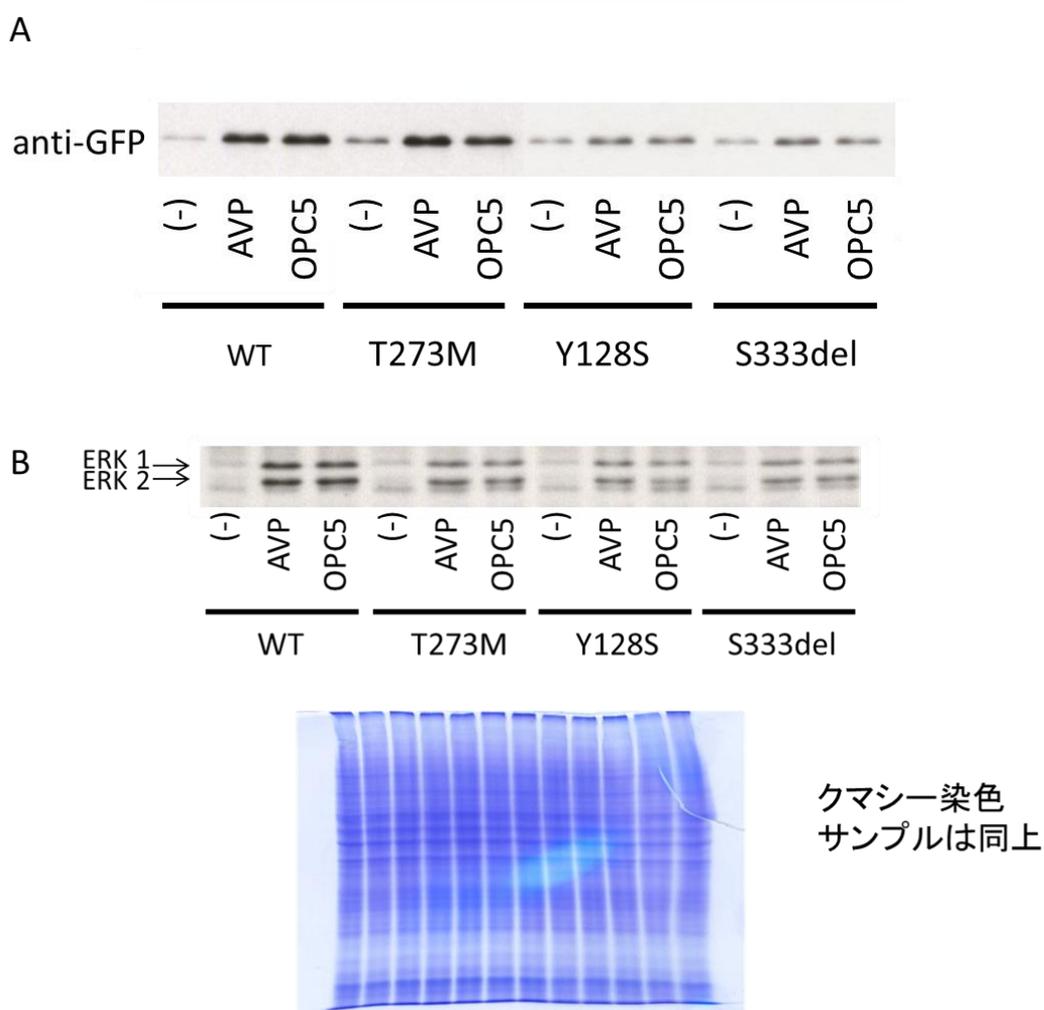


図 5

(A) AVP あるいは OPC5 刺激による β arrestin の膜分画への移動。COS7 細胞 (1.6×10^6 個) に野生型 V2R と V2R 変異体を一過性発現させた。それぞれの myc tag 付き V2R を含む pcDNA3 $0.4 \mu\text{g}$ ずつと GFP tag 付き β arrestin $0.04 \mu\text{g}$ をトランスフェクションした。48 時間後に $1 \mu\text{M}$ AVP か $10 \mu\text{M}$ OPC5 で 20 分間処理し、実験方法に記載したように細胞を回収した。

(B) 野生型 V2R と V2R 変異体での AVP あるいは OPC5 刺激による ERK1/2 リン酸化。12 well のディッシュにまいた COS7 細胞 (0.4×10^6 個) に野生型 V2R と V2R 変異体 (それぞれの myc tag 付き V2R を含む pcDNA3 1 ng ずつ) をトランスフェクションした。32 時間後に無血清培地に変えて培養し、48 時間後に $1 \mu\text{M}$ AVP あるいは $10 \mu\text{M}$ OPC5 で刺激した。サンプルは集められ、実験方法で記載したように免疫ブロットした。

OPC5 は AVP と同様に ERK1/2 をリン酸化する

次に OPC5 処理によって他のシグナル経路はどうなるのか検討した。1 μ M の AVP のみならず、10 μ M の OPC5 は COS-WT、COS-T273M、COS-Y128S、COS-S333del で ERK1/2 をリン酸化する (図 5-B)。COS-WT、COS-T273M に対して、10 μ M のペプチドアンタゴニストは 10 nM の AVP と 100 nM の OPC5 による ERK1/2 リン酸化を部分的に阻害した。一方 COS-Y128S、COS-S333del では 10 nM の AVP と 100 nM の OPC5 では ERK1/2 のリン酸化を認めなかったため、ペプチドアンタゴニストによる阻害を確認できなかった (データ非掲載)。COS-WT、COS-T273M でペプチドアンタゴニストが OPC5 による ERK1/2 リン酸化を部分的に阻害したことは、OPC5 が細胞膜で作用していることを支持する。

AVP 刺激による ERK1/2 のリン酸化がどのような経路で起こるかは未だ解明されていない。私が実験で主に使用した COS7 細胞に関しては Gs 経路で生じた cAMP が ERK1/2 をリン酸化させることが明らかとなっているが、Gs 由来の β γ サブユニットが関与しているかどうかなどその下流シグナルについてはほとんど解析されていない。また COS-WT に対し百日咳毒素 (PTX : Gi の α サブユニットを ADP リボシル化し、受容体との相互作用を遮断することで Gi を選択的に抑制する) を処理しても、AVP (10nM、100nM)、OPC5 (100nM、1

μM) による ERK1/2 のリン酸化は阻害されなかった。すなわち、COS7 細胞においては ERK1/2 のリン酸化に Gi 経路は関与しないと推定された。しかし、CHO 細胞に野生型 V2R を一過性発現させて同様の実験を行うと AVP 10 nM では 80%、AVP 100 nM では 60%、OPC5 100 nM、1 μM で 50%程度まで ERK1/2 のリン酸化が抑制され、CHO 細胞においては Gi 経路 ($\beta\gamma$ 含む) が一部関与していることが示唆された。一方、HEK293 細胞を使った実験系で、 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_i$ 、 $G\alpha_q$ 、 $G\beta\gamma$ のいずれも ERK1/2 のリン酸化には関与しておらず、 β arrestin が関与しているという結果を報告した研究グループも存在するが、研究途上である (71, 72)。このように細胞の種類によって関与している経路が異なり、実際の生理的条件下ではどの経路が関与しているかはまだほとんど解明されていない。

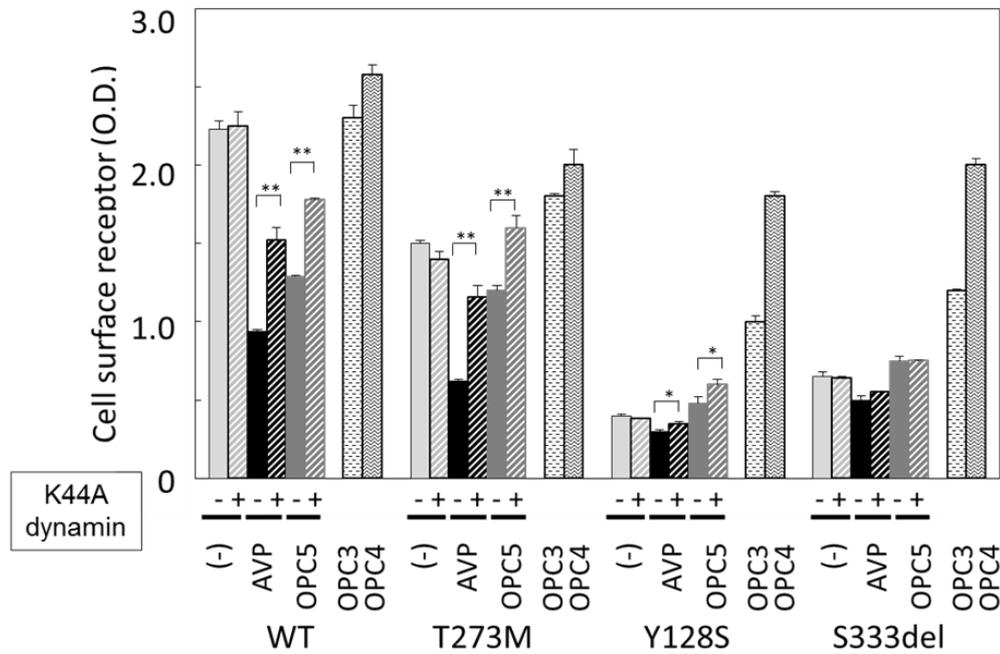
また、V2R を介する ERK1/2 のリン酸化はアクアポリン 2 のリン酸化や細胞増殖、アポトーシスなどに関与しているとも報告されているが(71, 73)、正確に *in vivo* でどのような役割をしているかはいまだ未解明である。最近、多発性嚢胞腎の発達において V2R が関与していることや、種々の腫瘍細胞で V2R の発現が認められていることから、異常な細胞増殖や分化に関わっている可能性も想定される(72)。

OPC5 は WT-V2R のみならず V2R 変異体の脱感作と内在化を惹起する

これまでのデータに基づくと、OPC5 は pharmacochaperone 作用を持つと同時にアゴニストとして作用し、WT-V2R だけでなく V2R 変異体の脱感作と内在化をもたらすと推定される。OPC5 の脱感作作用を裏付けるため、COS7 に K44A dynamin (dominant negative dynamin) を WT-V2R や V2R 変異体と共発現させることでアゴニストによる受容体内在化を阻害できるかを検討した。dynamin は受容体が脱感作されて内在化する際のエンドサイトーシスの出芽を担う。Dominant negative dynamin である K44A dynamin は受容体内在化機構の集合を阻害することなく、エンドサイトーシス小胞の pinching-off を阻害することで、アゴニスト刺激あるいは恒常的な受容体内在化を阻害することが示されている(74, 75)。

AVP 処理、OPC5 処理いずれの場合においても、WT-V2R、T273M-V2R、Y128S-V2R の細胞膜での発現減少を K44A dynamin は少なくとも部分的に回復させた (図 6-A)。一方で、S333del-V2R についてはこの効果は明らかでなかった。以上の結果は OPC5 が WT-V2R、T273M-V2R、Y128S-V2R を脱感作させて内在化をもたらすことを意味している。S333del-V2R では有意差がなく、受容体内在化の裏付けができなかったが、AVP による WT-V2R の膜発現減少を K44A dynamin が完全には抑制しなかったことから、K44A dynamin による受

A



B

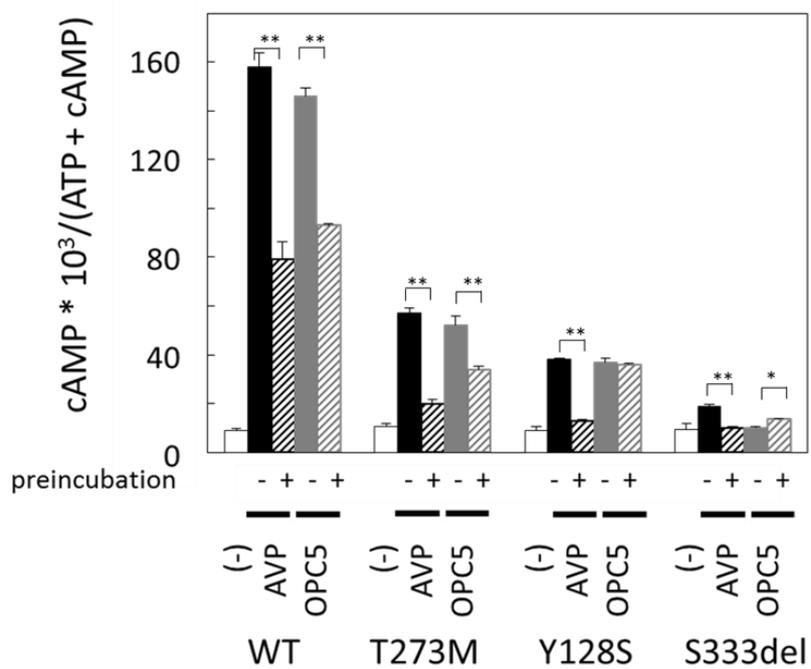


図 6

(A) V2R 変異体に長期間 1 μ M AVP、10 μ M OPC5、OPC3、OPC4 を添加した際の細胞膜 V2R 発現と、dominant negative dynamin K44A の効果。図 3-A のように V2R を一過性発現させた COS7 細胞を調整した。この際 0.02 μ g の K44A dynamin を

同時にトランスフェクションしたものとしていないものを調整した。32 時間後に上述の濃度の AVP、OPC5 を添加し、48 時間後から実験方法に記載したように ELISA で各受容体の細胞膜での発現量を検討した。データは triplicate 実験から得られ平均±SD で示した。

(B) AVP または OPC5 の前処理の有無による AVP、OPC5 刺激による cAMP 蓄積への影響。COS7 細胞 (1.6×10^6 個) に野生型 V2R と V2R 変異体を、それぞれの myc tag を付した V2R を含む pcDNA3 を $0.4 \mu\text{g}$ ずつトランスフェクションした。24 時間後に細胞を 1 well あたり 0.33×10^5 個で 24 well ディッシュにまき直し、 $[\text{H}]$ adenine ($2 \mu\text{Ci/ml}$, GE healthcare) を加えた。32 時間後に、 $1 \mu\text{M}$ AVP あるいは $10 \mu\text{M}$ OPC5 を添加した。48 時間後に 1mM の IBMX を含む assay medium で洗浄し、 $1 \mu\text{M}$ AVP あるいは $10 \mu\text{M}$ OPC5 を加えた無血清培地で 37°C 、30 分間温置した。cAMP 蓄積は実験方法に記載したように測定した。データは triplicate 実験から得られ平均±SD で示した。

容体内在化の抑制が部分的であることによる可能性が考えられる (図 6-A)。また、各受容体で K44A-dynamin の阻害効率が異なっている可能性も推測される。

OPC5 は V2R 変異体の持続的 cAMP シグナルを作動させる

以上の結果に基づくと、V2R 変異体への OPC5 の効果は pharmacochaperone 効果と脱感作効果のバランスを反映すると推測される。そこで、NDI 患者への治療の観点から、OPC5 を長期間処理した後の cAMP 蓄積に注目した。長期間処理した際の cAMP 蓄積が臨床的に水チャネルを管腔側へ輸送させると想定される。COS-WT では AVP、OPC5 いずれにおいても長期間処理後の再投与により cAMP 蓄積が減少した。これは薬剤の前投与による脱感作で受容体の細胞膜発現量が減少したことに一部起因していると考えられる。COS-T273M では AVP も OPC5 も前投与により cAMP 蓄積が減少したが、AVP に比して OPC5 による減少は軽度であった。COS-Y128S では AVP 処理の場合前投与があると有意に cAMP 蓄積が減少したが、OPC5 処理では前投与の有無で cAMP 蓄積量は変化しなかった。COS-S333del では AVP 処理の場合前投与があると有意に cAMP 蓄積が減少したが、OPC5 処理では前投与で cAMP 蓄積が増加した (図 6-B)。これらの結果から AVP とは異なり、OPC5 は少なくとも一部の V2R 変異体に対して長期間処理による持続的な cAMP シグナルを惹起させることを可能

にするといえる。これは NDI 患者の少なくとも一部にとって効果が期待される
治療オプションとなろう。

考察

本研究において、基礎 AVP 分泌が高値であることを端緒に部分型 NDI と診断された 4 歳の患者から新たな V2R 変異を同定した。また、新たな V2R 変異体の機能を分析する過程で、OPC5 という V2R リガンドの agonist pharmacochaperone という新たな側面を明らかにした。最近、OPC5 は小胞体内に留まる NDI の原因の変異 V2R を、成熟を助ける作用は有さないまま、細胞内で変異受容体を活性化すると、通常の GPCR 作用機構のドグマとは異なる興味深い報告がなされていた(63)。今回の新たな変異体はすでに報告した二つの変異体(53)と同様に小胞体にも存在するため、OPC5 がこの変異体の治療に有望であることが期待された。しかしながら、我々の検討では、実際新規の変異体を含む 3 つの部分型 NDI 変異を発現させた細胞で OPC5 は cAMP を蓄積させたが、ペプチドである AVP による cAMP 蓄積とほぼ同程度であった。さらに、細胞内に移行しないペプチドアンタゴニストが 3 つの変異 V2R を発現させた細胞で OPC5 による cAMP 蓄積を用量依存性に阻害したことは、OPC5 が AVP と同様に細胞膜に存在する V2R を活性化して cAMP シグナルを作動させ得ることを示していた。更に、OPC5 は細胞膜に発現した V2R 変異体を脱感作する非ペプチドアンタゴニストとして機能するのみならず、小胞体に留まる変異体を成熟させ細胞膜に輸送する pharmacochaperone として機能することが明らかとなった。臨床的な治療の視点からすると、脱感作効果を相殺する

pharmacochaperone 効果こそが、V2R 変異体のシグナルを持続させると考えられた。

V2R 変異は細胞膜発現低下と機能の質的低下をもたらす

図 3-A では新たに発見した変異体 T273M の細胞膜発現量は WT-V2R の 6 割ほどあるが、図 2-B で T273M の cAMP 蓄積量は WT-V2R の 5 割弱である。また図 3-A では Y128S-V2R よりも S333del-V2R の方が細胞膜発現量は多いにも関わらず、図 2-B の cAMP 蓄積量は S333del の方が少ない。このことは、各変異体は細胞膜での発現が減少しているが、それ以外に変異受容体の機能が質的にも低下していることを示唆する。Binding assay 等による検討は行っていないが、アゴニストの親和性低下や G 蛋白質との共役障害など、他の要因も二次的に関与することが予想される。

OPC5 は V2R 変異体の治療選択肢として期待される

Pharmacochaperone 効果の観点から、OPC5 は OPC4 よりもその効果は弱い。しかし、OPC5 がアゴニストとして機能する点は NDI 患者の治療には有利であることも推測される。Antagonist pharmacochaperone である OPC3 と OPC4 は affinity が高いため、V2R 変異体を成熟させ細胞膜へ移動させた後に、AVP

で容易には置換できない(57, 58)。

OPC5 には pharmacochaperone 作用とアゴニスト作用があるが、その pharmacochaperone 効果とアゴニストとしての脱感作効果のバランスを考察することは重要である。図 4-A から 3 つの変異体で pharmacochaperone 効果に特に大きな差はないこと、脱感作効果は各受容体の残存機能と関連して見えることから、OPC5 はより弱い変異体に相対的により強い pharmacochaperone 効果をもたらす、強い変異体には相対的に pharmacochaperone 効果が弱いと考えられる。詳しく述べると、T273M-V2R は cAMP 蓄積の観点では最も強い機能があり、OPC5 の長期投与で最も脱感作され、結果的に pharmacochaperone 効果は相対的に弱く表現される。一方 Y128S-V2R や S333del-V2R では cAMP 産生能力が弱い、OPC5 ではほとんど脱感作されず、結果的に pharmacochaperone 効果が強くあらわれる。他の NDI 変異ではこの脱感作と pharmacochaperone 効果のバランスは評価していないが、少なくともこの 3 つの変異体での傾向は治療戦略の観点で重要であるかもしれない。すなわち、pharmacochaperone 効果が脱感作効果を相殺することで、V2R 変異体のシグナルが持続可能となると期待される。

現在腎性尿崩症の根治治療は困難であり、経験的にサイアザイド系利尿薬やインドメタシンなどの非ステロイド系抗炎症薬が併用されており、大量の

dDAVP でごくわずかな治療効果がみられるものもあるが、十分な効果は得られていない。OPC5 は動物実験の段階(59-62)で、開発が中断している状況のため、ヒトへの臨床応用はまだ未定であるが、図 6-B で OPC5 の長時間処理により Y128S 変異体の cAMP シグナルがベースラインの約 3 倍を維持していることから、少なくとも一部の V2R 変異体に対しては、OPC5 あるいは類似の V2R agonist pharmacochaperone が有望な治療選択肢になりうると考えられる。本研究の検討では COS7 細胞に変異受容体を一過性に過剰発現させており、実際の NDI 患者での受容体発現状況とは異なる可能性があり、また OPC5 の投与量によっては副作用が出る可能性もあるが、実際の治療応用への足掛かりになることを期待したい。

OPC5 は protean agonism を呈する

OPC5 はより弱い変異体に相対的により強い pharmacochaperone 効果をもたらしていたが、これは OPC5 が WT-V2R や各々の V2R 変異体に対して薬理的に異なる作用をしていることを意味し、protean agonism の一例と言える(7, 8, 18, 76)。protean agonism のコンセプトは作用する相手により望ましいシグナルを出させ、望ましくないシグナルを出させない適切なリガンドの開発において重要と考えられる。

Limitations

OPC5 の pharmacochaperone 効果としてタンパクの成熟を評価する実験 (図 4-A) で、私の検討では未成熟タンパクのバンドが検出困難であり、また成熟タンパクのバンド自体も他の実験グループの結果(64, 70)よりも不明瞭であった。transfection 効率の違い、抗体の違いなどの影響が考えられ、条件を変えて再検する余地がある。また、成熟タンパクは複雑に糖鎖が修飾されているのに対し、未成熟タンパクは高マンノース糖鎖付加である。このことから、他の研究グループでは Endo H (高マンノースのキトビオースコア内部や N 結合型ハイブリッドオリゴ糖内部を切断するグリコシダーゼ) 処理で成熟タンパクは切断されずに量が変わらないのに対し、未成熟タンパクは切断されて量が減ることを検討し報告している(64, 70)。未成熟タンパクのバンドが検出できなかったためこの実験は行わなかったが、グリコシダーゼ処理によりバンド分布が劇的に変化するれば、そこから未成熟タンパクを特定できる可能性もあり、今後施行を検討したい。

GPCR の変異について

最後に、我々の研究室ではこれまでいくつか GPCR の変異を報告しているが、個別の変異から GPCR の変異全体について考察されることを述べる。

GPCR の変異について 2 つの概念が重要と考えている。①活性化は必然的に不安定性を生む。②活性化と不活性化は同一のもの。これは軽いゆらぎは活性化を生み、強いゆらぎは不安定性のために不活性化を生むということを意味する。すなわち、野生型の正常な受容体は安定して存在しているが、変異の存在により少しその構造にゆらぎが生じると活性化し、ゆらぎが大きすぎると不安定となり、分解され、発現量が減少して不活性化変異になるのではないかと推測している。

部分型 NDI を起こす種々の変異についても、これまでその原因について親和性の低下や細胞膜発現の低下の可能性などが報告されているが(50)、こうした解釈は必ずしも真実を示しているとは限らないことも考えられる。例えば、実験でアゴニストの用量反応曲線が図 7-A のようになると、親和性の低下と考えられがちで、図 7-B のようになると受容体発現量の減少が考えられがちである。しかし、現実には受容体はエフェクターを活性化するのに必要な量よりも大過剰が存在するため、効果は見かけ上飽和し、本来は変異体の発現量が減少していても、実験結果では親和性の低下のように見えてしまうことがあり得る (図

7-C)。また、単一の原因でなく、受容体の数も質も低下している可能性があり、GPCR の変異を実験結果から画一的に分類したり、変異の起こった場所から原因を推定したりするのはあまり意味がないとも推測される。むしろ GPCR の変異については、軽いゆらぎは活性化を生み、強すぎるゆらぎは不活性化を生むという概念でとらえるのが良いと思われる。先に同じ部位での変異である R137 が変異の仕方によって活性化変異と不活性化変異を起こすことを述べたが(52)、これはその例である可能性も考えられる。活性化変異と不活性化変異は逆のベクトルなのではなく、同一のものと言える (図 7-D)。

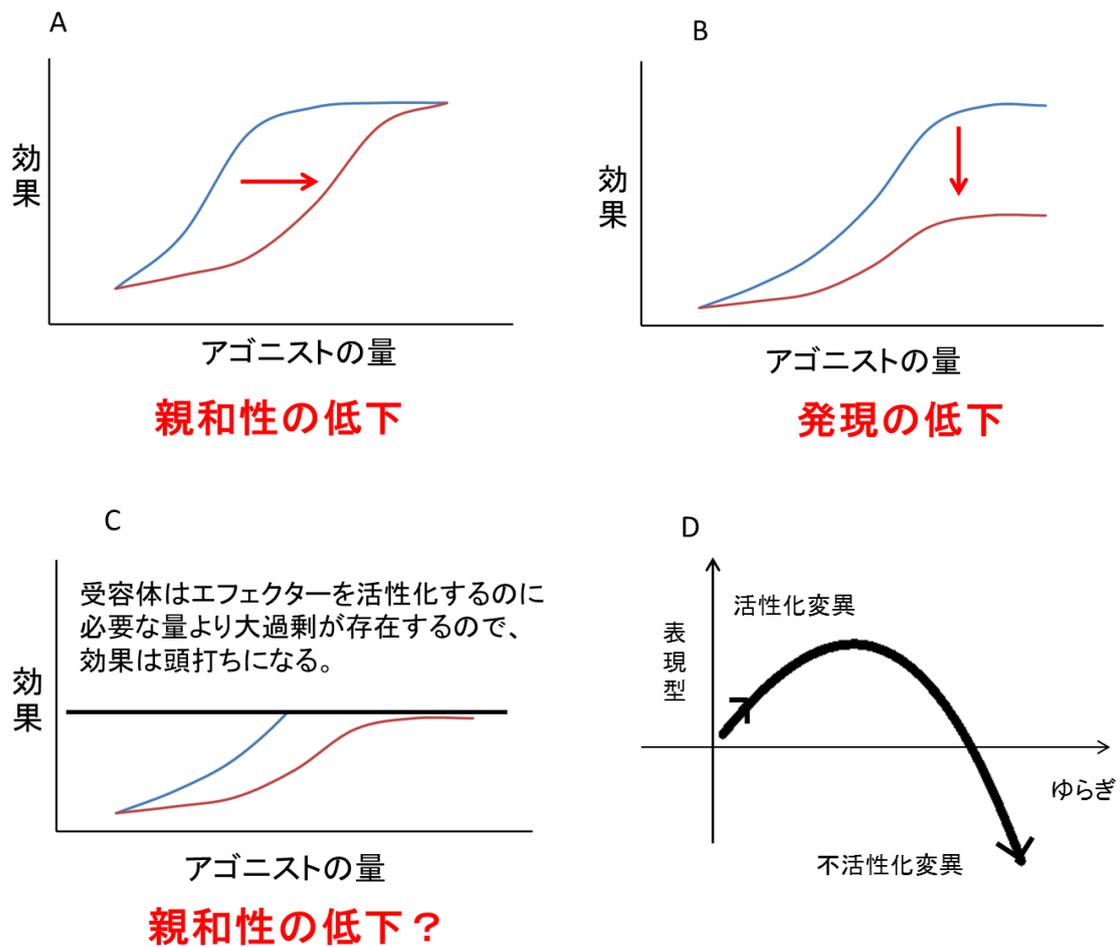


図 7

- (A) ~ (C) アゴニストの用量反応曲線
- (D) GPCR の活性化変異と不活性化変異の概念図

謝辞

本研究の遂行にあたり終始ご指導を頂いた飯利太朗先生、槇田紀子先生、橋本真紀子氏、佐藤潤一郎氏、大石篤郎氏、間中勝則氏に心から感謝いたします。

また共著者である弘前大学小児科の佐藤知彦先生に厚くお礼申し上げます。本研究を行う機会を与えてくださった腎臓内分泌内科南学正臣教授に厚くお礼申し上げます。

引用文献

1. Bourne HR. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 9(2): 134-142, 1997.
2. Iiri T, Farfel Z, Bourne HR. G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. *Nature.* 394(6688): 35-38, 1998.
3. Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* 21(1): 90-113, 2000.
4. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(9): 639-650, 2002.
5. Lefkowitz RJ. A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 52(25): 6366-6378, 2013.
6. Johnson M. The beta-adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med.* 158(5 Pt 3): S146-153, 1998.
7. Hill SJ. G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1: S27-37, 2006.
8. Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Christopoulos A, Sexton PM, Miller KJ, Spedding M, Mailman RB. Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther.* 320(1): 1-13, 2007.
9. Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 28(8): 382-389, 2007.
10. Farfel Z, Bourne HR, Iiri T. The expanding spectrum of G protein diseases. *N Engl J Med.* 340(13): 1012-1020, 1999.
11. Seifert R, Wenzel-Seifert K. Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 366(5): 381-416, 2002.
12. Tao YX. Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: structure-function insights and therapeutic implications. *Pharmacol Ther.* 111(3): 949-973, 2006.
13. Lania AG, Mantovani G, Spada A. Mechanisms of disease: Mutations of G proteins and G-protein-coupled receptors in endocrine diseases. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2(12): 681-693, 2006.
14. Pallais JC, Kifor O, Chen YB, Slovik D, Brown EM. Acquired hypocalciuric hypercalcemia due to autoantibodies against the calcium-sensing receptor. *N Engl J Med.* 351(4): 362-369, 2004.

15. Pollak MR, Brown EM, Chou YH, Hebert SC, Marx SJ, Steinmann B, Levi T, Seidman CE, Seidman JG. Mutations in the human Ca(2+)-sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell*. 75(7): 1297-1303, 1993.
16. Riccardi D, Brown EM. Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 298(3): F485-499, 2010.
17. Makita N, Sato J, Manaka K, Shoji Y, Oishi A, Hashimoto M, Fujita T, Iiri T. An acquired hypocalciuric hypercalcemia autoantibody induces allosteric transition among active human Ca-sensing receptor conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(13): 5443-5448, 2007.
18. Kenakin T. Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Mol Pharmacol*. 72(6): 1393-1401, 2007.
19. Reale V, Hannan F, Hall LM, Evans PD. Agonist-specific coupling of a cloned *Drosophila melanogaster* D1-like dopamine receptor to multiple second messenger pathways by synthetic agonists. *J Neurosci*. 17(17): 6545-6553, 1997.
20. Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P, Clarke WP. Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol*. 54(1): 94-104, 1998.
21. Swarthout JT, Doggett TA, Lemker JL, Partridge NC. Stimulation of extracellular signal-regulated kinases and proliferation in rat osteoblastic cells by parathyroid hormone is protein kinase C-dependent. *J Biol Chem*. 276(10): 7586-7592, 2001.
22. Azzi M, Charest PG, Angers S, Rousseau G, Kohout T, Bouvier M, Pineyro G. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(20): 11406-11411, 2003.
23. Kenakin T. Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *FASEB J*. 15(3): 598-611, 2001.
24. Anfinsen CB, Harrington WF, Hvidt A, Linderstrom-Lang K, Ottesen M, Schellman J. Studies on the structural basis of ribonuclease activity. 1955. *Biochim Biophys Acta*. 1000: 200-201, 1989.
25. Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature*. 328(6129): 378-379, 1987.
26. Leskela TT, Markkanen PM, Pietila EM, Tuusa JT, Petaja-Repo UE. Opioid receptor pharmacological chaperones act by binding and stabilizing newly synthesized receptors in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 282(32): 23171-23183, 2007.

27. Spiegel AM, Weinstein LS. Inherited diseases involving G proteins and G protein-coupled receptors. *Annu Rev Med.* 55: 27-39, 2004.
28. Morello JP, Salahpour A, Laperriere A, Bernier V, Arthus MF, Lonergan M, Petaja-Repo U, Angers S, Morin D, Bichet DG, Bouvier M. Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants. *J Clin Invest.* 105(7): 887-895, 2000.
29. Tan CM, Nickols HH, Limbird LE. Appropriate polarization following pharmacological rescue of V2 vasopressin receptors encoded by X-linked nephrogenic diabetes insipidus alleles involves a conformation of the receptor that also attains mature glycosylation. *J Biol Chem.* 278(37): 35678-35686, 2003.
30. Bernier V, Lagace M, Lonergan M, Arthus MF, Bichet DG, Bouvier M. Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059. *Mol Endocrinol.* 18(8): 2074-2084, 2004.
31. Robben JH, Sze M, Knoers NV, Deen PM. Rescue of vasopressin V2 receptor mutants by chemical chaperones: specificity and mechanism. *Mol Biol Cell.* 17(1): 379-386, 2006.
32. Cavanaugh A, McKenna J, Stepanchick A, Breitwieser GE. Calcium-sensing receptor biosynthesis includes a cotranslational conformational checkpoint and endoplasmic reticulum retention. *J Biol Chem.* 285(26): 19854-19864, 2010.
33. Saliba RS, Munro PM, Luthert PJ, Cheetham ME. The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation. *J Cell Sci.* 115(Pt 14): 2907-2918, 2002.
34. Noorwez SM, Kuksa V, Imanishi Y, Zhu L, Filipek S, Palczewski K, Kaushal S. Pharmacological chaperone-mediated in vivo folding and stabilization of the P23H-opsin mutant associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *J Biol Chem.* 278(16): 14442-14450, 2003.
35. Janovick JA, Maya-Nunez G, Conn PM. Rescue of hypogonadotropic hypogonadism-causing and manufactured GnRH receptor mutants by a specific protein-folding template: misrouted proteins as a novel disease etiology and therapeutic target. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(7): 3255-3262, 2002.
36. Fan J, Perry SJ, Gao Y, Schwarz DA, Maki RA. A point mutation in the human melanin concentrating hormone receptor 1 reveals an important domain for cellular trafficking. *Mol Endocrinol.* 19(10): 2579-2590, 2005.
37. Petaja-Repo UE, Hogue M, Bhalla S, Laperriere A, Morello JP, Bouvier M. Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta

- opioid receptor maturation. *EMBO J.* 21(7): 1628-1637, 2002.
38. Wuller S, Wiesner B, Loffler A, Furkert J, Krause G, Hermosilla R, Schaefer M, Schulein R, Rosenthal W, Oksche A. Pharmacochaperones post-translationally enhance cell surface expression by increasing conformational stability of wild-type and mutant vasopressin V2 receptors. *J Biol Chem.* 279(45): 47254-47263, 2004.
 39. Van Craenenbroeck K, Clark SD, Cox MJ, Oak JN, Liu F, Van Tol HH. Folding efficiency is rate-limiting in dopamine D4 receptor biogenesis. *J Biol Chem.* 280(19): 19350-19357, 2005.
 40. Chen Y, Chen C, Wang Y, Liu-Chen LY. Ligands regulate cell surface level of the human kappa opioid receptor by activation-induced down-regulation and pharmacological chaperone-mediated enhancement: differential effects of nonpeptide and peptide agonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 319(2): 765-775, 2006.
 41. Fortin JP, Dziadulewicz EK, Gera L, Marceau F. A nonpeptide antagonist reveals a highly glycosylated state of the rabbit kinin B1 receptor. *Mol Pharmacol.* 69(4): 1146-1157, 2006.
 42. Robben JH, Knoers NV, Deen PM. Cell biological aspects of the vasopressin type-2 receptor and aquaporin 2 water channel in nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol.* 291(2): F257-270, 2006.
 43. Bichet DG. Nephrogenic diabetes insipidus. *Adv Chronic Kidney Dis.* 13(2): 96-104, 2006.
 44. Ala Y, Morin D, Mouillac B, Sabatier N, Vargas R, Cotte N, Dechaux M, Antignac C, Arthus MF, Lonergan M, Turner MS, Balestre MN, Alonso G, Hibert M, Barberis C, Hendy GN, Bichet DG, Jard S. Functional studies of twelve mutant V2 vasopressin receptors related to nephrogenic diabetes insipidus: molecular basis of a mild clinical phenotype. *J Am Soc Nephrol.* 9(10): 1861-1872, 1998.
 45. Chen CH, Chen WY, Liu HL, Liu TT, Tsou AP, Lin CY, Chao T, Qi Y, Hsiao KJ. Identification of mutations in the arginine vasopressin receptor 2 gene causing nephrogenic diabetes insipidus in Chinese patients. *J Hum Genet.* 47(2): 66-73, 2002.
 46. Faerch M, Christensen JH, Corydon TJ, Kamperis K, de Zegher F, Gregersen N, Robertson GL, Rittig S. Partial nephrogenic diabetes insipidus caused by a novel mutation in the AVPR2 gene. *Clin Endocrinol (Oxf).* 68(3): 395-403, 2008.
 47. Inaba S, Hatakeyama H, Taniguchi N, Miyamori I. The property of a novel v2 receptor mutant in a patient with nephrogenic diabetes insipidus. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(1): 381-385, 2001.

48. Pasel K, Schulz A, Timmermann K, Linnemann K, Hoeltzenbein M, Jaaskelainen J, Gruters A, Filler G, Schoneberg T. Functional characterization of the molecular defects causing nephrogenic diabetes insipidus in eight families. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(4): 1703-1710, 2000.
49. Sadeghi H, Robertson GL, Bichet DG, Innamorati G, Birnbaumer M. Biochemical basis of partial nephrogenic diabetes insipidus phenotypes. *Mol Endocrinol.* 11(12): 1806-1813, 1997.
50. Faerch M, Christensen JH, Rittig S, Johansson JO, Gregersen N, de Zegher F, Corydon TJ. Diverse vasopressin V2 receptor functionality underlying partial congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol.* 297(6): F1518-1525, 2009.
51. Neocleous V, Skordis N, Shamma C, Efstathiou E, Mastroiannopoulos NP, Phylactou LA. Identification and characterization of a novel X-linked AVPR2 mutation causing partial nephrogenic diabetes insipidus: a case report and review of the literature. *Metabolism.* 61(7): 922-930, 2012.
52. Feldman BJ, Rosenthal SM, Vargas GA, Fenwick RG, Huang EA, Matsuda-Abedini M, Lustig RH, Mathias RS, Portale AA, Miller WL, Gitelman SE. Nephrogenic syndrome of inappropriate antidiuresis. *N Engl J Med.* 352(18): 1884-1890, 2005.
53. Takahashi K, Makita N, Manaka K, Hisano M, Akioka Y, Miura K, Takubo N, Iida A, Ueda N, Hashimoto M, Fujita T, Igarashi T, Sekine T, Iiri T. V2 vasopressin receptor (V2R) mutations in partial nephrogenic diabetes insipidus highlight protean agonism of V2R antagonists. *J Biol Chem.* 287(3): 2099-2106, 2012.
54. Bichet DG, Arthus MF, Lonergan M, Hendy GN, Paradis AJ, Fujiwara TM, Morgan K, Gregory MC, Rosenthal W, Didwania A, et al. X-linked nephrogenic diabetes insipidus mutations in North America and the Hopewell hypothesis. *J Clin Invest.* 92(3): 1262-1268, 1993.
55. Bichet DG, Birnbaumer M, Lonergan M, Arthus MF, Rosenthal W, Goodyer P, Nivet H, Benoit S, Giampietro P, Simonetti S, et al. Nature and recurrence of AVPR2 mutations in X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Hum Genet.* 55(2): 278-286, 1994.
56. Arthus MF, Lonergan M, Crumley MJ, Naumova AK, Morin D, De Marco LA, Kaplan BS, Robertson GL, Sasaki S, Morgan K, Bichet DG, Fujiwara TM. Report of 33 novel AVPR2 mutations and analysis of 117 families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol.* 11(6): 1044-1054, 2000.
57. Macion-Dazard R, Callahan N, Xu Z, Wu N, Thibonnier M, Shoham M.

- Mapping the binding site of six nonpeptide antagonists to the human V2-renal vasopressin receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 316(2): 564-571, 2006.
58. Robben JH, Sze M, Knoers NV, Deen PM. Functional rescue of vasopressin V2 receptor mutants in MDCK cells by pharmacochaperones: relevance to therapy of nephrogenic diabetes insipidus. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292(1): F253-260, 2007.
 59. Nakamura S, Yamamura Y, Itoh S, Hirano T, Tsujimae K, Aoyama M, Kondo K, Ogawa H, Shinohara T, Kan K, Tanada Y, Teramoto S, Sumida T, Nakayama S, Sekiguchi K, Kambe T, Tsujimoto G, Mori T, Tominaga M. Characterization of a novel nonpeptide vasopressin V(2)-agonist, OPC-51803, in cells transfected human vasopressin receptor subtypes. *Br J Pharmacol.* 129(8): 1700-1706, 2000.
 60. Nakamura S, Hirano T, Yamamura Y, Itoh S, Kondo K, Mori T, Kambe T. Effects of OPC-51803, a novel, nonpeptide vasopressin V2-receptor agonist, on micturition frequency in Brattleboro and aged rats. *J Pharmacol Sci.* 93(4): 484-488, 2003.
 61. Nakamura S, Hirano T, Onogawa T, Itoh S, Hashimoto A, Yamamura Y, Kondo K, Mori T, Kambe T. Antidiuretic effects of a novel nonpeptide vasopressin V(2)-receptor agonist, OPC-51803, administered orally to dogs. *J Pharmacol Sci.* 94(4): 426-433, 2004.
 62. Nakamura S, Hirano T, Tsujimae K, Aoyama M, Kondo K, Yamamura Y, Mori T, Tominaga M. Antidiuretic effects of a nonpeptide vasopressin V(2)-receptor agonist, OPC-51803, administered orally to rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 295(3): 1005-1011, 2000.
 63. Robben JH, Kortenoeven ML, Sze M, Yae C, Milligan G, Oorschot VM, Klumperman J, Knoers NV, Deen PM. Intracellular activation of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus by nonpeptide agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(29): 12195-12200, 2009.
 64. Terrillon S, Durroux T, Mouillac B, Breit A, Ayoub MA, Taulan M, Jockers R, Barberis C, Bouvier M. Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Mol Endocrinol.* 17(4): 677-691, 2003.
 65. Iiri T, Herzmark P, Nakamoto JM, van Dop C, Bourne HR. Rapid GDP release from Gs alpha in patients with gain and loss of endocrine function. *Nature.* 371(6493): 164-168, 1994.
 66. Iiri T, Farfel Z, Bourne HR. Conditional activation defect of a human Gsalpha mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(11): 5656-5661, 1997.

67. Iiri T, Bell SM, Baranski TJ, Fujita T, Bourne HR. A G α mutant designed to inhibit receptor signaling through Gs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(2): 499-504, 1999.
68. Makita N, Sato J, Rondard P, Fukamachi H, Yuasa Y, Aldred MA, Hashimoto M, Fujita T, Iiri T. Human G(salpa) mutant causes pseudohypoparathyroidism type Ia/neonatal diarrhea, a potential cell-specific role of the palmitoylation cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(44): 17424-17429, 2007.
69. Bernier V, Morello JP, Zarruk A, Debrand N, Salahpour A, Lonergan M, Arthus MF, Laperriere A, Brouard R, Bouvier M, Bichet DG. Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol*. 17(1): 232-243, 2006.
70. Jean-Alphonse F, Perkovska S, Frantz MC, Durroux T, Mejean C, Morin D, Loison S, Bonnet D, Hibert M, Mouillac B, Mendre C. Biased agonist pharmacochaperones of the AVP V2 receptor may treat congenital nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol*. 20(10): 2190-2203, 2009.
71. Oligny-Longpre G, Corbani M, Zhou J, Hogue M, Guillon G, Bouvier M. Engagement of beta-arrestin by transactivated insulin-like growth factor receptor is needed for V2 vasopressin receptor-stimulated ERK1/2 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(17): E1028-1037, 2012.
72. Charest PG, Oligny-Longpre G, Bonin H, Azzi M, Bouvier M. The V2 vasopressin receptor stimulates ERK1/2 activity independently of heterotrimeric G protein signalling. *Cell Signal*. 19(1): 32-41, 2007.
73. Rinschen MM, Yu MJ, Wang G, Boja ES, Hoffert JD, Pisitkun T, Knepper MA. Quantitative phosphoproteomic analysis reveals vasopressin V2-receptor-dependent signaling pathways in renal collecting duct cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(8): 3882-3887, 2010.
74. Suzuki J, Ohnsihi H, Shibata H, Wada A, Hirayama T, Iiri T, Ueda N, Kanamaru C, Tsuchida T, Mashima H, Yasuda H, Fujita T. Dynamin is involved in human epithelial cell vacuolation caused by the *Helicobacter pylori*-produced cytotoxin VacA. *J Clin Invest*. 107(3): 363-370, 2001.
75. Baldassarre M, Pompeo A, Beznoussenko G, Castaldi C, Cortellino S, McNiven MA, Luini A, Buccione R. Dynamin participates in focal extracellular matrix degradation by invasive cells. *Mol Biol Cell*. 14(3): 1074-1084, 2003.
76. Neubig RR. Missing links: mechanisms of protean agonism. *Mol Pharmacol*. 71(5): 1200-1202, 2007.