

## 論文の内容の要旨

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

### 要旨

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。GPCRを介する経路はGPCR、Gタンパク質、エフェクターから成る。哺乳類では1000以上のGPCRが見つかり、この受容体が少なくとも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。この多様性の一方で、GPCRとGタンパク質の作用機構は進化上極めてよく保存されている。

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。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。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り、この概念は機能選択性(functional selectivity)、バイアスのある活性化(biased agonism)とも呼ばれている。biased agonismの特殊型がprotean agonismで、これはある特定のアゴニストが特定の状況下でその効果を変えることである。あるアゴニストが静止状態のGPCRに対してパーシャルアゴニストとして機能する一方、恒常的活性化状態の同じGPCRに対してはインバースアゴニストとして機能する例がprotean agonismの最初の例として報告されている。

またここ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。GPCRの機能獲得型変異や機能喪失型変異の他、GPCRに対する自己抗体は様々な疾患の原因となっている。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。

V2受容体の不活化変異は、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(nephrogenic diabetes insipidus : NDI)を起こす。最近我々は部分型NDI患者から2つの変異体(S333delとY128S)を発見した。これらの変異受容体ではAVP刺激によるcAMPの蓄積が減

弱していた。変異受容体の膜発現は低下し、主に小胞体に存在していた。その原因は新たに合成された受容体の細胞膜への輸送障害であった。これまでにいくつかのpharmacochaperone（折り畳み異常が原因で細胞膜へ輸送されないタンパク質に対して、折り畳みを正常に復して細胞膜への輸送を助ける薬剤）が報告されているが、OPC31260（OPC3）とOPC41061（OPC4）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見つけた。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、受容体によって効果が異なった。つまりOPC3とOPC4はprotean agonismの一例といえる。しかし臨床的な点ではOPC3もOPC4もアンタゴニストとしてAVPを阻害するため、上述で報告した変異受容体患者の治療には使えない。

今回我々は部分型NDIの少年から新たなV2受容体変異（T273M）を発見し、この変異体の一部が小胞体内に存在していることを確認した。最近他の研究グループが非ペプチドアゴニストであるOPC51803（OPC5）が小胞体内に留まる変異V2受容体を細胞内で活性化すると報告しており、OPC5がこの新たな変異受容体の治療薬になりうると考え、T273Mの機能解析とOPC5の機能評価を行った。

多飲、多尿を呈する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の基礎分泌は亢進しており、臨床的にNDIと診断された。その後V2R遺伝子のミスセンス変異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変える変異）を確認した。ほとんどのNDIは完全型NDIとして報告されているが、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、本例は15番目のケースで、これまで報告されていない新たな変異であった。

まずこのT273M変異受容体が正しく発現するか確認した。Myc tagのついた野生型V2Rを一過性発現させたCOS7細胞（COS-WT）、myc tagのついたT273M-V2Rを発現させたCOS7細胞（COS-T273M）、Myc tagのついたY128S-V2Rを発現させたCOS7細胞（COS-Y128S）とMyc tagのついたS333del-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、Y128SとS333del変異体は主に小胞体に局在し、T273Mも一部は小胞体に局在するように見えた。次に新たな変異体の特徴を明らかにし、OPC5の活性を調べるため、COS-WT、COS-T273M、COS-Y128S、COS-S333delでAVPとOPC5によるcAMPの蓄積を調べた。COS-WTではOPC5の用量反応曲線はAVPのものより1桁右にシフトしているが、AVPとほぼ同様な用量依存性のcAMP蓄積を示した。COS-T273M、COS-Y128S、COS-S333del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蓄積しか示さなかった。しかし細胞膜で作用するAVPに反応したということは、免疫染色では明らかではなかったが、各変異受容体の一部が細胞膜に発現していることを示唆した。このため各変異体の膜発現レベルをELISAで定量化したところ、ELISAでは各変異体の一部は細胞膜に存在していた。このことと、cAMP蓄積の実験でAVPとOPC5のEMaxがほぼ等しいという結果は、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示唆した。OPC5によるcAMP蓄積がどこで起こっているかを調べるため、ペプチドアンタゴニストを加えてcAMP蓄積を評価した。

ペプチドアンタゴニストはAVPあるいはOPC5によるcAMP蓄積をほぼ完全に阻害した。これはCOS7細胞に一過性発現させた場合のみならず、既報で使用されているMDCK細胞に一過性に発現させた場合でも同様だった。またOPC5はAVPと同様、WT-V2RやV2変異体を一過性発現させたCOS7細胞でERK1/2をリン酸化させるが、ペプチドアンタゴニストはこれを阻害した。以上の結果はOPC5が細胞膜に発現しているV2R変異体を活性化していることを示す。

膜透過性の非ペプチドリガンドの中には小胞体に留まっているV2変異体を成熟させ細胞膜へ輸送させるものがあると、これまで報告されている。我々もOPC3とOPC4がpharmacochaperoneとしてNDI変異体を成熟させるという報告したが、OPC5もまた膜透過性のV2Rリガンドの一つであることから、pharmacochaperoneとして働く可能性がないか検討した。

HEK293細胞にmyc tagつきのWT-V2Rを過剰発現させると、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つきV2R変異体では検出困難だった。この各変異体にOPC4処理すると劇的に約50kDaのバンドが増強し、それよりは弱いですが、OPC5処理するとこのバンドが有意に増強した。これはOPC5が少なくともこの3つの変異体の成熟を促進させることを支持する。次に、OPC5で変異体が成熟するのならば、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か検討した。しかしOPC4と異なりOPC5では免疫染色でその効果は見えなかった。そこで細胞表面のELISAを施行した。AVP処理ではWT-V2RもいずれのV2R変異体も細胞膜での発現が減少した。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したためと推定される。OPC5処理では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処理よりは有意に軽度の減少であり、Y128S-V2RとS333del-V2Rでは細胞膜発現は増加した。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した。

脱感作経路の重要なステップである細胞膜への $\beta$  arrestinの動員に注目した。AVP処理、OPC5処理共にCOS-WTとCOS-T273Mの膜分画で $\beta$  arrestinは著明に増加した。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 $\beta$  arrestinの動員はほぼ同様であり、同程度に脱感作作用を生じると推定される。AVPとOPC5の脱感作効果は同程度であるが、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。

OPC5の脱感作作用を裏付けるため、COS7細胞に受容体内在化を阻害することが示されている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検討した。K44A dynaminはAVP処理、OPC5処理ともにWT-V2R、T273M-V2R、Y128S-V2Rの膜での発現減少を部分的に回復させた。これはOPC5がこれらの受容体の内在化をもたらすことを意味している。

OPC5がアゴニストとしてV2R変異体を脱感作させる一方、pharmacochaperoneとして成熟させることが判明したが、治療の観点からはそのpharmacochaperone効果と脱感作効果のバランスを

考えるのは重要であり、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もOPC5も長期間各々の薬剤で処理した後の2回目の投与によりcAMP蓄積が減少した。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処理で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処理で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。すなわちOPC5は、Y128SやS333delのようなcAMP蓄積の点で機能の弱い変異体には脱感作効果が少なく相対的にpharmacochaperone効果が強くなり、T273Mのように機能の強い変異体には脱感作効果が強く、相対的にpharmacochaperone効果が弱くなっていた。pharmacochaperone効果が脱感作効果を相殺すると、V2R変異体のシグナルが持続可能と言え、NDI患者の少なくとも一部にとって見込みのある治療オプションになりうる。

また野生型V2受容体、各変異変異体によってOPC5のpharmacochaperone効果、アゴニストとしての脱感作効果の程度が異なっていたが、これはprotean agonismの一例である。こ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りガンドの開発において重要である。