Ca 感知受容体の機能選択的活性化： まれな疾患からのヒント

飯利 太郎, 槇田 紀子

要約：古典的な G タンパク質共役受容体 (GPCR) の two-state モデルでは, GPCR は活性型と不活性型と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性からアゴニスト, インバーサアゴニスト, アンタゴニストと分類されてきた. 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いる. このモデルでは, 各作動薬はそれぞれユニークな GPCR の高次構造を認識して結合しこれを安定化させると考えられる. GPCR の個々の高次構造において潜在的にそれぞれ異なる機能を発揮すると考えられる. この考えに基づけば, あるユニークなアゴニストあるいは通常のアゴニストとアロステリックに作用する調節因子の作用のもとに, 本来複数の G タンパク質を活性化する GPCR を介して, あるシグナル系のみを特異的に活性化 (機能選択的活性化) することも夢ではない. 今回, 我々が疾患で発見解析した Ca 感知受容体に作用する自己抗体は, こうした機能選択的活性化を可能にするアロステリックに作用する調節因子であった. このきわめてまれな疾患の解析結果は, 同様な機能選択的な活性化が生理的にも作動していることを暗示しているのかもしれない. さらに, GPCR の機能選択的な調節をターゲットとする薬剤の開発は, 今後の GPCR 作動薬分野の創薬における新しく重要な方向性を示していると考えられる.

はじめに

Gタンパク質共役受容体 (GPCR) は, 認知・感覚, 内分泌代謝, 循環調節, 生体防御などのきわめて多様な細胞外シグナルを受容し, 細胞内のシグナルへと変換する役割を担っている (1). 基本的なシグナル系は, GPCR, G タンパク質, エフェクターから構成されている. GPCR には, 1000 以上の遺伝子が存在しゲノ

ム中最大のファミリーのひとつを形成している. 共役する G タンパク質は, 少なくとも 16 種類の $G\alpha$, 6 種類の $G\beta$, 12 種類の $G\gamma$ からなり, 潜在的には約 1000 種類の多様性を有し, これが約 100 のエフェクタータンパク質の活性を制御している. この多様性の一方で, GPCR の細胞膜を 7 回貫通する構造と機能は, 種を超えて保存されている.

この 20 年の間に GPCR や G タンパク質の活性型/不活性型変異が疾患の原因として次々に発見されてきた. それらの解析は個々の疾患メカニズムを明らかにするとともに, しばしばこれらシグナル分子に進化上保存されている普遍的な作用機構をも明らかにしてきた (2-5).

1. GPCR シグナルネットワークの特異性と機能選択性

GPCR シグナルネットワーク (図 1) は, 基本的に GPCR, G タンパク質, エフェクターからなる (6). ある場合には, 複数のシグナル系が並列的にそれぞれ独立に作動する (図 1A). 一方, 複数の GPCR 刺激が単一の G タンパク質を活性化に収束 (convergence) することもある (図 1B).

また, ひとつの GPCR が複数の G タンパク質を活性化することでシグナルが分岐 (divergence) する例も多く知られている (図 1C). このような場合において, 古典的モデルでは, あるアゴニストが, 複数のシグナル系を活性化する GPCR に結合すると, 下流のシグナルが同程度に活性化されると考えられてきた. いずれにしても, あるシグナル系のみを活性化させるためには, その系に関与する G タンパク質を特異的に活性化する GPCR とアゴニストの組み合わせの存在が必要となる.

一方で, この古典的モデルとは異なる概念も想定されてきた. すなわち, ある特別なアゴニストを用いる

キーワード: Gタンパク質, Gタンパク質共役受容体, Ca 感知受容体, 機能選択性, 疾患
 東京大学 大学院医学系研究科 腎臓・内分泌内科 (〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1)
 E-mail: tiiri-tky@umin.ac.jp 原稿受領日: 2009 年 7 月 30 日, 依頼原稿

Title: Functionally selective activation in Ca-sensing receptor: a hint from a rare disease. Author: Taroh Iiri, Noriko Makita

図1 GPCR シグナルネットワーク

GPCR シグナルネットワークは、GPCR (R), Gタンパク質 (G), エフェクター (E) からなる。それらは、場合によって、互いに並列 (A), 収束 (B), 分岐 (C) する。(C) では古典的には下流のシグナルは同程度に活性化される。あるユニークなアゴニストあるいは通常のアゴニストとアロステリックに作用する調節因子の作用のもとでは GPCR の機能選択的活性化が生じる (D)。

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 (図 1D) (7, 8)。このような調節には、アゴニスト、GPCR など視点の若干の違いにより、機能選択性 (functional selectivity)、バイアスのある活性化 (biased agonism) など種々の名称が付けられている。

さらに高次の特異的活性化モデルも想定されている。すなわち、GPCR に対してスイッチオンを担う活性化因子としてのアゴニストと、アゴニストとは別の部位にアロステリックに作用する調節因子 (allosteric modulator) を組み合わせることで、通常のアゴニストの作用においても、シグナルを増強/抑制したり、あるシグナル系だけを特異的に活性化できる可能性があるというものである (図 1D) (9, 10)。

もしこうした選択的なシグナルの活性化制御が可能であれば、特異的シグナルの数だけ必要である、膨大な数のアゴニストと GPCR のペアを大幅に減らすことが可能となる。また、これらによって、細胞特異的な、あるいは状況に応じた、シグナルの特異性の微調節が可能となり、事実報告されているそのような現象が説明可能となると考えられる。

2. Two-state モデルと multi-state モデル

古典的な GPCR の活性化機構モデルは、GPCR の高次構造が活性型と不活性型との間で平衡状態を形成しているとする two-state モデルである (11)。現在でも、簡便に多くの GPCR に関連する事象を説明する際によく用いられている。このモデルによれば、

GPCR は静止状態でも、一定の頻度で活性型をとることから、GPCR が発現するだけで basal activity を有することをよく説明できる。また、アゴニストはこの平衡を活性型へとシフトさせ、インバースアゴニスト (12) は平衡を不活性型へとシフトさせる GPCR 作動薬と定義される。また、アンタゴニスト (特に neutral antagonist) とは、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。

しかしながら、最近になって、GPCR は、活性型/不活性型いずれにおいても多くの高次構造を取り得るとする multi-state モデルを支持するデータが蓄積してきている (7, 13, 14)。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。もしそうであるなら、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る。こうした概念は、多面性を有するギリシャ神話の神プロテウスにちなんで Protean agonism と命名され、また Agonist trafficking, Functional selectivity などとも呼ばれている。

3. GPCR の機能選択的な活性化

GPCR の機能選択的な活性化を示唆する報告は、この 10 年ほどの間に、少しずつ蓄積されてきた。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 (15)。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 (16)。しかしながら、初期の報告群に対しては、異なるアゴニスト群の作用点が唯一その受容体だけであるのかという疑問が呈されてもきた。

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を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 (17)。 α_{1B} アドレナリン受容体の異なる活性型変異体は、異なるリン酸化とインターナリゼーションを受けることから、複数の活性型が存在すると推測された (18)。

GPCR の機能選択性の歴史においてエポックとなった報告は、Bouvier のグループによって 2003 年になされた。彼らは、過剰発現した β_2 アドレナリン受容体を用いて、作動薬剤である IC118511 やプロプラノロールが、G_s を介する cAMP シグナルにおいてはインバースアゴニスト (inverse agonist) 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 (partial agonist) として作用することを報告した(19). この極端な例は, ある種の GPCR 作動薬が, 単一の GPCR を介して, シグナルの種類によってはオンとオフという正反対の作用を示すことすらあり得ることを示しておりきわめて興味深い.

最近, GPCR の機能選択的活性化を示唆する報告は, さらに GLP-1 受容体に対する oxyntomodulin (20), D_2 ドパミン受容体に対する aripiprazole (21), β_2 アドレナリン受容体に対する cavedilol (22) などへと広がりを見せている.

4. Ca 感知受容体の生理作用と疾患

血清中の Ca^{2+} イオンは, 副甲状腺および腎尿細管に存在する Ca 感知受容体を活性化することで自らの濃度を調節する (23, 24). 血清中の Ca^{2+} イオン濃度が上昇すると, これをアゴニストとする Ca 感知受容体は, G_q および $G_{i/o}$ を活性化し, 古典的には G_q を主な経路とするものの詳細は未だに不明のメカニズムで, 主に副甲状腺からの副甲状腺ホルモン (PTH) の分泌を抑制して Ca^{2+} を低下させる. 一方, Ca^{2+} 濃度が低下すると, PTH 分泌を刺激して Ca^{2+} を上昇させる.

当然のことながら, Ca^{2+} 濃度の低下と同様な変化は, Ca 感知受容体シグナルの抑制によっても生じる. これらには, (1) Ca 感知受容体アンタゴニスト, (2) Ca 感知受容体の不活性型変異, (3) Ca 感知受容体のブロック型抗体が挙げられる. Ca 感知受容体の不活性型変異をヘテロに有すると, 軽度の血清 Ca 上昇と尿中 Ca の低下を特徴的な表現型とする家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症 (familial hypocalciuric hypercalcemia: FHH) という遺伝子疾患を生じる. また, 同様の病態が, Ca 感知受容体のブロック型自己抗体によっても生じることが Brown らのグループから報告され, 後天性低カルシウム尿性高カルシウム血症 (acquired hypocalciuric hypercalcemia: AHH) と命名された (25).

5. Ca 感知受容体の特徴

Ca 感知受容体は GPCR ファミリー C に属し, このファミリーの他のメンバーである代謝性グルタミン酸受容体, 味覚 (sweet/umami) 受容体などと同様に, G タンパク質との共役など GPCR 共通の機能を担う細胞膜を 7 回貫通するドメイン (heptahelical domain) とアゴニストをトラップする特徴的な大きな細胞外ドメイン (venous flytrap domain) を有している (26, 27). Cys129/131 の分子間 S-S 結合によりおそらく恒常的にダイマーを形成し, それが機能の発揮にとって必須と考えられている.

アロステリックな制御の存在は Ca 感知受容体の重要な特徴である (24, 28). アゴニストである Ca^{2+} の結合部位とは異なる細胞膜貫通ドメイン (特に第 6 および第 7 細胞膜貫通ドメイン) 付近に作用して Ca^{2+} の作用を正, 負に制御するアロステリックな調節因子が発見/作成され, それぞれ calcimimetics, calcilytics と呼ばれている. 特に calcimimetics は, 透析患者などでの低カルシウム血症によって引き起こされる二次性副甲状腺機能亢進症における PTH 上昇と骨代謝異常を抑制・治療する目的で広く用いられている. Calcimimetics は, Ca^{2+} なしには Ca 感知受容体を活性化しないが, Ca^{2+} に対する感受性を上昇させるというメカニズムで作用する.

6. 機能選択性を有する Ca 感知受容体自己抗体の発見と解析

我々は, 高カルシウム血症を示す興味深い症例を経験した (図 2) (29). 過去に血清カルシウム正常の時期があることから後天性疾患と考えられ, 表現型は, PTH 上昇と尿中カルシウムの低下を伴い FHH 類似であった. 以上から唯一 Brown らが報告していた, Ca 感知受容体に対するブロッキング抗体を原因とする AHH ではないかと推定した. 検討したところ, 確かに血清中に, Ca 感知受容体を発現した HEK-293 細胞に特異的に反応する自己抗体が検出された (図 3). しかしながら, その Ca 感知受容体を介するシグナルへの影響を検討したところ, G_q シグナルであるホスファチジルイノシトール代謝回転を指標とすると Brown らの示したブロッキング抗体と異なり, Ca^{2+} によるシグナルに対して増強作用を示した. 具体的には, 自己抗体単独では G_q シグナルを作動させないが, Ca^{2+} によるシグナルの濃度依存性を左へシフトさせることがその作用メカニズムであった. これは, Ca 感知受容体に対して正のアロステリックな調節因子 (positive allosteric modulator) として作用することが知られている薬剤である calcimimetics と同様の機序であった. 一方, 興味深いことに, $G_{i/o}$ シグナルの下流の MAP キナーゼに対しては, 抑制的に作用していた (図 4). 対照的に, calcimimetic は, G_q シグナルに対するのと同様に, $G_{i/o}$ シグナルに対しても増強作用を示した.

以上から, 以下の 3 点が考察される. (1) 今回発見された Ca 感知受容体に対する自己抗体は, G_q シグナルに対しては正のアロステリックな調節因子として作用する一方, G_i シグナルに対しては負のアロステリックな調節因子 (negative allosteric modulator) として作用することで, Ca 感知受容体を機能選択的に調節していることが明らかとなった (図 4). (2) Ca

図2 Ca 感知受容体自己抗体を有する症例の経過
後天性に高カルシウム血症，低リン血症を呈した。本文参照。

図4 自己抗体による Ca 感知受容体の機能選択的活性化
Ca 感知受容体の活性化型には少なくともふた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、G_q および G_{i/o} を活性化する (A)。一方、Ca²⁺と自己抗体が結合すると、G_q を特異的に活性化するユニークな高次構造をとる (B)。

図3 Ca 感知受容体自己抗体の免疫染色データ
免疫染色でのシグナルは、ヒト Ca 感知受容体を発現させた培養細胞に患者血清を添加した場合 (A) のみに観察され、コントロール (B, C, D) では観察されなかった。

感知受容体の活性化型には、少なくともふたつの異なる高次構造が存在することが明らかとなった。すなわち、Ca²⁺の結合した、G_q および G_{i/o} と共役する活性化型と、Ca²⁺と今回発見された自己抗体が結合した、G_q と特異的に共役する活性化型である (図4)。さらに(3)疾患の表現型と実験結果から、Ca 感知受容体の生理的なシグナルにおいて、古典的に重要であるとされる G_q シグナル以外に G_{i/o} シグナルも重要な役割を担っていることが推測された。

おわりに

今回の解析結果から得られる結論を一般的に表現すると、疾患で発見された自己抗体が、G_q および G_{i/o} 共役受容体である Ca 感知受容体を強力な特異的 G_q 共役受容体へとスイッチすることを示していたと言える。すなわち、GPCR の機能選択性とアロステリック

な調節が、生体内で少なくとも病態メカニズムとして作動していることを示す一例であると言えよう。この事実は、このような GPCR の高次の制御が生理的な調節機構として作動している可能性を暗示しているのかもしれない。

GPCR シグナルのこのような高次調節機構の解明はまだ端緒についたばかりである。今回示されたような GPCR の機能選択的な調節を可能にする薬剤の、新しいコンセプトに基づく開発とスクリーニングは、今後の創薬において重要な方向性を示していると考えられる。

文 献

- 1) Oldham WM, et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9:60-71.
- 2) Iiri T, et al. Nature. 1998;394:35-38.
- 3) Farfel Z, et al. N Engl J Med. 1999;340:1012-1020.
- 4) Spiegel AM, et al. Annu Rev Med. 2004;55:27-39.
- 5) Lania AG, et al. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2006;2:681-693.
- 6) Ross EM. Neuron. 1989;3:141-152.
- 7) Hill SJ. Br J Pharmacol. 2006;147 Suppl 1:S27-S37.
- 8) Urban JD, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2007;320:1-13.
- 9) Kenakin T. Nat Rev Drug Discov. 2005;4:919-927.
- 10) Leach K, et al. Trends Pharmacol Sci. 2007;28:382-389.
- 11) Gether U. Endocr Rev. 2000;21:90-113.
- 12) Bond RA, et al. Trends Pharmacol Sci. 2006;27:92-96.
- 13) Kenakin T. Trends Pharmacol Sci. 1995;16:232-238.
- 14) Vauquelin G, et al. Fundam Clin Pharmacol. 2005;19:45-56.
- 15) Reale V, et al. J Neurosci. 1997;17:6545-6553.
- 16) Berg KA, et al. Mol Pharmacol. 1998;54:94-104.
- 17) Swarthout JT, et al. J Biol Chem. 2001;276:7586-7592.
- 18) Mhaouty-Kodja S, et al. Mol Pharmacol. 1999;55:339-347.
- 19) Azzi M, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100:11406-11411.
- 20) Jorgensen R, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2007;322:148-154.
- 21) Urban JD, et al. Neuropsychopharmacology. 2007;32:67-77.
- 22) Wisler JW, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:16657-16662.
- 23) Brown EM, et al. Physiol Rev. 2001;81:239-297.
- 24) Makita N, et al. AfCS Nature Molecule Pages. 2008. doi:10.1038/mp.a004000.004001.
- 25) Pallais JC, et al. N Engl J Med. 2004;351:362-369.
- 26) Pin JP, et al. Biol Cell. 2004;96:335-342.
- 27) Pin JP, et al. FEBS J. 2005;272:2947-2955.
- 28) Nemeth EF, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:4040-4045.
- 29) Makita N, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:5443-5448.