エンドセリン受容体のユビキチン化 ユビキチン化によるエンドセリン受容体の 細胞内トラフィック制御

寺田 晃士, 堀之内孝広, 東 恒仁, Prabha Nepal, 三輪 聡一

要約: エンドセリン-1 (ET-1) の受容体 (ETR) は A 型 (ET_AR) と B 型 (ET_BR) の 2 種類が存在する. 両受容体は相同性が高いにも関わらず, ET-1 による刺激後の運命が大きく異なる. すなわち, 両受容体とも細胞膜上で ET-1 により刺激されると細胞内移行するが, その後 ET_AR は細胞膜にリサイクルされるのに対し, ET_BR はリソソームに輸送されて分解される. このような, 異なる ETR 運命のメカニズムは明らかにされていないが, 今回我々は, 受容体のユビキチン化が ETR 運命の選択に重要な役割を果たすことを見出した. ET_BR は ET-1 の刺激によりユビキチン化されたが, ET_AR はされなかった. ET-1 刺激による細胞内移行および分解の速度は, ET_AR より ET_BR のほうが早かった. C 末端領域の 5 つのリシン残基をアルギニンに置換した変異型 ET_BR (ET_BR 5KR) は, ET-1 刺激によるユビキチン化を受けず, 細胞内移行および分解の速度が低下して ET_AR とほぼ同様となった. 共焦点顕微鏡を用いた解析では, ET_AR および ET_BR 5KR とリサイクリング小胞のマーカーである Rab11 との共局在が観察され, ET_BR は後期エンドソーム/リソソームのマーカーである Rab7 との共局在が観察された. ET-1 による刺激の後に ET-1 を含まない培地に交換後しばらく後の ET-1 による刺激 (ET-1 の繰り返し刺激) では, ET_BR 5KR による ERK のリン酸化レベルや細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇の程度が, 野生型 ET_BR のそれらよりも大きかった. これらのことから, ユビキチン化は ET_BR の細胞内トラフィック経路 (リサイクリングか分解か) を制御し, その結果 ET_BR による細胞内シグナルに影響を与えることが示された.

1. はじめに

エンドセリン-1 (endothelin-1: ET-1) は, 1988 年に柳沢らによって, 血管収縮を引き起こす生理活性ペプチドとして単離された(1). その後 ET-1 は, 血管の収縮および弛緩の制御だけでなく, 細胞増殖の亢進などの生理作用を有すること, 一方で, 高血圧症, 動脈硬化症, 心不全, 脳血管攣縮, 肺高血圧症などの心血管系病態の発症・進展においても重要な役割を果たすことなどが示されている. ET-1 の作用を細胞に伝達する ET 受容体 (endothelin receptor: ETR) には A 型受容体 (endothelin type A receptor: ET_AR) (2) と B 型受容体 (ET_BR) (3) の 2 種類があり, どちらも細胞膜上に存在する. それら ETR は, G protein-coupled receptor (GPCR) ファミリーに属し, ET-1 が結合すると, G タンパク質をはじめとする細胞内シグナル伝達分子を活性化して, 細胞応答を引き起こす(4, 5). ET_AR は主に血管平滑筋細胞に発現し, ET-1 による ET_AR の活性化は血管平滑筋細胞の細胞内カルシウム濃度の上昇を誘発して血管平滑筋の収縮をきたし, 血管の収縮を誘発する. 一方 ET_BR は主に血管内皮細胞に発現し, ET-1 の刺激による ET_BR の活性化は一酸化窒素の合成および分泌を介して血管平滑筋の収縮を抑制して, 血管の弛緩を誘発する. ET_BR は, ET-1 のクリアランス受容体としても知られ, 血管中を循環している ET-1 と結合して一緒に細胞内に取り込まれることにより, ET-1 の血中濃度を低下させる役割を担うと考えられている(6).

ET-1 のラットへの投与では, 一時的に血圧が低下するがその後血圧の上昇が認められ, 上昇した状態が 1 時間以上持続した(1). このことから, ET-1 は相反

する2つの作用をもつことと、それら2つの作用は持続時間が異なることが示された。今日、この相反する作用は、ET_AR（血管平滑筋細胞に発現して血圧の上昇に寄与）とET_BR（血管内皮細胞に発現して血圧の下降に寄与）という2種類の受容体によるものであることが知られている。一方、持続時間の違いは、それら受容体の脱感作に対する感受性の違いであると考えられる。脱感作に対するET_ARとET_BRの感受性の違いは、それぞれの受容体の、刺激後の細胞内トラフィッキング経路の違いを反映する（細胞内移行や細胞内の決められた標的小器官への輸送を細胞内トラフィッキングという）。リガンドであるET-1の結合後、どちらの受容体とも細胞内移行し、初期エンドソームに到達する。しかし、その後に辿るトラフィッキング経路は異なっている。ET_ARは、主に初期エンドソームから細胞膜へリサイクルされるのに対し、ET_BRは、後期エンドソームを経てリソソームへと輸送されて分解される(7, 8)。すなわち、ET-1による刺激後、ET_ARの細胞膜上に存在する受容体量の見かけ上の減少速度（細胞内移行とリサイクリングの総和 [さらに、新規合成も関与する]）は、ET_BRと比べて遅く、そのため作用が持続する。ET_ARとET_BRとの間でアミノ酸レベルでは、全体で約55%、膜貫通ドメインで約77%の相同性がある。このような比較的高い相同性を持ちながら、異なる経路の選択に関わるメカニズムの詳細は明らかにされていない。

一般的にGPCRでは、細胞質側にあるC末端領域が細胞内トラフィッキング経路の選択において重要な役割をもつことが知られている(9, 10)。ETRでも、C末端領域がET_ARとET_BRのそれぞれの細胞内トラフィッキング経路を決定することが示されている。すなわち、C末端領域をET_ARのそれと入れ替えたET_BRは、細胞内移行の後にET_ARのように細胞膜へリサイクルされ、逆に、C末端領域をET_BRのそれと入れ替えたET_ARは、細胞内移行の後にET_BRのように後期エンドソーム、リソソームへと輸送され、分解される(11, 12)。しかし、C末端領域のどのような違いがこのような細胞内トラフィッキング経路の違いを生み出すのかは明らかにされていない。我々は、このようなET_ARとET_BRの細胞内トラフィッキング経路の違いを生ずるメカニズムの解明を目標として、両受容体のユビキチン化について検討した。

2. ET_BRのユビキチン化

まず、ET_ARとET_BRがET-1刺激によりユビキチン化されるかどうか検討した。HEK293T細胞にHAタ

図1 ET-1の刺激によるET_BRのユビキチン化

HEK293TにHAタグで標識したET_AR (HA-ET_AR)あるいはHA-ET_BRおよびmyc標識化ユビキチン (myc-ub)を発現させ、30 nM ET-1で各時間刺激した。細胞を溶解した後、抗HA抗体を用いてHA-ETRを免疫沈降し、沈降物中のユビキチン化受容体を抗myc抗体を用いてウェスタンブロッティング法により検出した。(文献13より改変転載)

グ標識したET_AR (HA-ET_AR)あるいはHA-ET_BRおよびmycタグ標識したユビキチン (myc-ub)を発現させ、ET-1で細胞を処理して受容体を刺激した後に、各ETRを抗HA抗体で免疫沈降し、免疫沈降物中のユビキチン化受容体を、SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティング法によって、抗myc抗体を用いて検出した。ET_ARではユビキチン化が認められなかった。一方、ET_BRは、ET-1刺激前から弱くユビキチン化が認められ、そのユビキチン化はET-1刺激により増強され、少なくとも20分間は持続した(13) (図1)。

ユビキチン化は主にリシン残基におこる。ET_BRは細胞質側の部分に16個のリシン残基をもち、そのうち8個は膜貫通ドメイン同士をつなぐループ領域中にあり、8個はC末端領域中にある (図2A)。これまでに、複数のGPCRにおいて、C末端領域中のリシン残基がユビキチン化の標的となることが報告されている(14-17)。そこで、ET_BRのC末端領域の8つのリシン残基をアルギニンに置換した変異体を作製し、ユビキチン化されるかどうか検討したところ、変異ET_BRはユビキチン化されないことがわかった。ET_BRのC末端領域は、中ほどに存在する複数のシステイン残基により、2つの領域に分けられる。すなわち、これらのシステイン残基がパルミチル化され、C末端領域が細胞膜にアンカーされる結果(18)、ET_BRのC末端領域は、7番目の膜貫通ドメインとパルミチル化部位をつなぐループ状の領域と、パルミチル化部位以降の部分の2つの領域に分かれている (図2A)。ET_ARのC末端領域も同様な構造をもつが、ET_ARとET_BRの間で、パルミチル化部位から見てN末端側のループ領域同

図2 ET_BRはC末端領域のリシン残基でユビキチン化される

(A) HA タグ標識した ET_BR の C 末端領域の配列とパルミチル化部位。矢印で示された領域のシスチン (C) 残基がパルミチル化修飾をうける。アルギニンに置換した C 末端領域の 8 個のリシン (K) は図中では黒で示されている。パルミチル化部位以降の 5 つのリシン残基には番号 (411, 417, 422, 424 および 438) が付されている。(B) HA-ET_BR WT または HA-ET_BR 5KR を安定的に発現する HEK293T 細胞に myc 標識したユビキチン (myc-ub) を一過性に発現させて, 30 nM ET-1 で各時間刺激した。ユビキチン化受容体は図 1 で用いた方法で検出した。(文献 13 より改変転載)

士の相同性は約 84% と高いのに対し, パルミチル化部位以降では約 26% と低い。そのため, パルミチル化部位以降の C 末端領域が主なユビキチン化部位ではないかと考えた。パルミチル化部位以降の C 末端領域には, 5 個のリシン残基が存在するが, それらをアルギニンに置換した変異体 (ET_BR 5KR) ではユビキチン化されなかった (図 2B)。

3. ユビキチン化の ET_BR トラフィックにおける役割

ET_BR の細胞内トラフィックにおける, ET-1 の刺激誘発的なユビキチン化の役割を, ET_BR の細胞内移行と分解という点について検討した。ET-1 誘発的に起こる細胞内移行については, 細胞膜上の ETR の量をビオチン-ストレプトアビジン法を用いて測定して, それにより細胞膜上からの受容体の消失速度を求めることにより検討した。細胞表面上の ET_BR 量は ET-1 による刺激後に約 15 分間の半減期で減少した。ET_AR に関しては, 刺激後 10 分までは ET_BR と同様な速度で減少したが, その後は減少速度が小さくなり細胞膜上の受容体量はほとんど減少しなかった (図 3A, B)。ユビキチン化されない変異体である ET_BR 5KR に関しては, 刺激後 10 分までは ET_BR と同様な速度で減少したが, その後は, ET_AR と同様であった (図 3C, D)。次に, ユビキチン化の受容体分解における役割を検討した。タンパク質合成阻害薬存在下で新たな受容体の合成を抑制した状態で, ET-1 刺激後の受容体の消失速度を測定した。ET_BR の受容体量は, ET-1 刺激後 30 分間の間に時間と共に減少したが, ET_AR はほとんど

変化しなかった (図 4A, B)。ET_BR 5KR は, ET_BR WT と比較してゆっくりと減少し, その減少速度は ET_AR とほぼ同様であった (図 4C, D)。

4. ET_BR WT および ET_BR 5KR の細胞膜レベルの回復の時間経過

ET-1 刺激により細胞膜上の ET_BR WT の量は減少するが, ET-1 を除いた後どのような時間経過で細胞膜上の受容体量が回復するのか, ビオチン-アビジン法により解析した。ET-1 による刺激後, ET_BR WT と ET_BR 5KR の膜レベルは, それぞれ刺激する前のおよそ 30% と 70% 程度にまで減少し, ET-1 を除いた後も, 2 時間ほどは回復しなかった。

5. ETR のリサイクリングとユビキチン化の関係

ここまでの実験では, 受容体の細胞内移行の速度を, ある一定時間内に細胞表面上から消失した受容体の量に基づいて求めてきた。この場合受容体の細胞内移行の速度は, 細胞内移行そのものとリサイクリングの速度の両方を反映した, 見かけ上の速度である。ゆえに, ET_BR 5KR の ET-1 刺激後のゆっくりとした細胞内移行は, 細胞内移行の速度そのものの低下, あるいは, リサイクリング速度の上昇によるものであるという 2 つの可能性が考えられる。これらの可能性を区別するために, ET_AR, ET_BR と ET_BR 5KR の細胞内トラフィックの経路を共焦点顕微鏡により解析した。すなわち, 細胞内トラフィック経路の解析により, 受容体の運命がリサイクリングなのか分解なのか判定した。トラフィック経路の解析のために, ET-1 による

図3 ET-1 刺激誘発的な ET_BR の細胞内移行におけるユビキチン化の役割

HA-ET_AR または HA-ET_BR (A, B), あるいは HA-ET_BR WT または HA-ET_BR 5KR (C, D) を安定的に発現する HEK293T 細胞を 30 nM ET-1 で各時間刺激した。その後、細胞表面上のタンパク質をビオチンで修飾し、細胞の溶解後にビオチン化タンパク質をstreptavidinビーズを用いて回収し、SDS-PAGE およびウェスタンブロット法により、回収物中の HA-ETR を抗 HA 抗体を用いて検出した。グラフは 3 回の実験結果の平均値 ± S.E.M. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 (HA-ET_AR WT との比較 (B), あるいは HA-ET_BR WT との比較 (D))。 (文献 13 より改変転載)

図4 ET-1 刺激誘発的な ET_BR の分解におけるユビキチン化の役割

HA-ET_AR または HA-ET_BR (A, B), あるいは HA-ET_BR WT または HA-ET_BR 5KR (C, D) を安定的に発現する HEK293T 細胞を 50 μM シクロヘキシミド (CHX) 存在下で 30 nM ET-1 で各時間刺激した。細胞の溶解後に、SDS-PAGE およびウェスタンブロットにより HA-ETR を抗 HA 抗体を用いて検出した。グラフは 3 回の実験結果の平均値 ± S.E.M. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 (HA-ET_AR WT との比較 (B), あるいは HA-ET_BR WT との比較 (D))。 (文献 13 より改変転載)

刺激後に、ETR と Rab7 (後期エンドソームおよびリソソームのマーカー) あるいは Rab11 (リサイクリングエンドソームのマーカー) との局在が一致するかどうかについて検討した。そのために、HEK293T 細胞に、GFP と融合させた ETR のいずれかひとつ (ET_AR-GFP, ET_BR-GFP あるいは ET_BR 5KR-GFP) と tdTomato と融合させた Rab7 (Rab7-tdTomato) あるいは Rab11-tdTomato を発現させ、ET-1 刺激 30 分後に、GFP と tdTomato のシグナルを示す画像を取得して解析した。ET-1 刺激前では受容体はほぼ細胞膜上に存在したが、刺激後は

細胞内に移行して細胞内小胞に局在した。ET_AR は、主に Rab11 の局在する小胞 (リサイクリングエンドソーム) に局在し、ET_BR は、主に Rab7 の局在する小胞 (後期エンドソーム/リソソーム) に局在した。そして、ユビキチン化されない変異体である ET_BR 5KR は、主に、リサイクリングエンドソームに局在が認められた (図 5A, B)。これらのことから、ET-1 による刺激後に細胞内移行した ET_BR 5KR は、主に細胞膜にリサイクリングされると考えられた。

図5 ETRのリサイクリングと分解の選択におけるユビキチン化の役割

ET_AR-GFP, ET_BR-GFP, ET_BR 5KR-GFPのいずれかとRab7-tdTomato (A)あるいはRab11-tdTomato (B)をHEK293T細胞に発現させた。それらの細胞をET-1で刺激した後固定して、共焦点顕微鏡を用いてGFPのシグナルを指標にETR-GFPの局在する細胞内小胞を同定した。同様に、tdTomatoのシグナルを指標にRab-tdTomatoの局在する小胞を同定した。ETRの局在する小胞のうち、Rab7 (A)あるいはRab11 (B)と共局在する小胞の割合を示した。それぞれにつき30~40個の細胞を解析。棒グラフは解析結果の平均値±S.E.M. ***P*<0.01 (HA-ET_BR WTとの比較 (A, B)), n.s.: not significantly different (HA-ET_ARとの比較 (A)), #*P*<0.05 (HA-ET_ARとの比較 (B)). (文献13より改変転載)

6. ET_BRシグナル伝達におけるユビキチン化の役割

受容体のユビキチン化がET_BRのシグナル伝達系にどのような影響を与えるのか、extracellular signal-regulated kinase (ERK)のリン酸化レベルを指標にして検討した。ET-1によるET_BRの活性化によってERKのリン酸化が引き起こされることが知られている(図6A, B; 1st stimulation)。細胞をET-1で30分間刺激して受容体の細胞内移行を誘発した後、ET-1を含まない培地に交換して、さらに15分間培養した後に再びET-1で刺激した(2回目の刺激)。1回目の刺激によるERKのリン酸化レベルの上昇は、ET_BR WTとET_BR 5KRとでほぼ同様であった(図6A, B; 1st stimulation)。2回目の刺激では、1回目の刺激と比較するとどちらの受容体でもERKのリン酸化レベルは弱くなった。しかし、2回目刺激によるERKのリン酸化レベルは、ET_BR 5KRにおいてET_BR WTよりも2~3倍高かった(図6A, B; 2nd stimulation)。このことは、2回目の刺激の時点での細胞膜上の受容体量が、ET_BR 5KRのほうが野生型ET_BRより多いことを反映すると考えられた(図3C, D)。次に、ET-1刺激によるカルシウム反応に関しても同様に検討した。ET_BRはGqを活性化することにより、細胞内カルシウム濃度を上昇させる。細胞内カルシウム濃度を測定すると、ET-1の1回目の刺激に対してはET_BR WTとET_BR 5KRは同程度に細胞内カルシウム濃度の上昇を誘発し

図6 ET_BRシグナル制御におけるユビキチン化の役割

HA-ET_BR WTあるいはHA-ET_BR 5KRを発現するHEK293T細胞をET-1で各時間刺激(1st stimulation),あるいは、ET-1で30分間刺激した後、ET-1を含まない培地に交換して15分間インキュベーションしたのちに各時間刺激(2nd stimulation)した。細胞の溶解後、リン酸化ERKを抗リン酸化ERK抗体を用いて検出した。グラフは3回の実験結果の平均値±S.E.M. **P*<0.05 (HA-ET_BR WTに対する比較)。 (文献13より改変転載)

た。2回目の刺激に対してもカルシウム濃度の上昇を誘発したが、どちらも1回目の反応より弱くなった。しかし、2回目の刺激に対しては、約60%ほど、ET_BR 5KRのほうがET_BR WTよりも大きいカルシウム反応を誘発した。

7. おわりに

ET_BRはユビキチン化されるがET_ARされず、ET_BRはET-1の刺激によりユビキチン化されると後期エンドソーム/リソソームの分解経路を辿り、ユビキチン化されない変異型ET_BR (ET_BR 5KR)は、ET_ARと同様に、リサイクリングの経路を辿った。以上のことから、ユビキチン化の有無がETRの異なる受容体運命の選択に重要な役割を果たすことが示された。また、ET_BRはET-1による刺激の後に細胞膜の受容体量が急激に減少したが、ET_BR 5KRでは減少は軽度であった。それが原因となり、ET-1による繰り返しの刺激に対しては、ET_BR 5KRは野生型ET_BRよりも大きな反応(ERKのリン酸化レベルの上昇および細胞内Ca²⁺濃度の上昇)を示したと考えられる。

血管平滑筋細胞におけるET_BRの発現レベルは低いとされている。一方、動脈硬化症や肺高血圧症などの病巣の血管平滑筋細胞においてET_BRが高発現してい

ることが報告されており，それら病態の発症や進展に ET_BR の発現レベルの上昇が関与する可能性が考えられている (19, 20)．どのようなメカニズムにより血管平滑筋細胞で ET_BR の発現レベルが上昇するのかは明らかにされていないが，ユビキチン化酵素の高発現や脱ユビキチン化酵素の発現の低下などが可能性として考えられる．今後，ET_BR のユビキチン化の制御機構を解析することにより，上述したような病態の発症および進展のメカニズムに，これまでとは異なる角度から迫ることができるかもしれない．

This research was originally published in Journal of Biological Chemistry. Terada et al., Agonist-promoted ubiquitination differentially regulates receptor trafficking of endothelin type A and type B receptors. J. Biol. Chem. published November 7, 2014 as doi:10.1074/jbc.M113.544171. ©the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない．

文 献

- 1) Yanagisawa M, et al. Nature. 1988;332:411-415.
- 2) Arai H, et al. Nature. 1990;348:730-732.
- 3) Sakurai T, et al. Nature. 1990;348:732-735.
- 4) Takagi Y, et al. J Biol Chem. 1995;270:10072-10078.
- 5) Kawanabe Y, et al. Mol Pharmacol. 2002;61:277-284.
- 6) Fukuroda T, et al. Biochem Biophys Res Commun. 1994;199:1461-1465.
- 7) Oksche A, et al. Mol Pharmacol. 2000;57:1104-1113.
- 8) Bremnes T, et al. J Biol Chem. 2000;275:17596-17604.
- 9) Whistler JL, et al. Science. 2002;297:615-620.
- 10) Trejo J, et al. J Biol Chem. 1999;274:2216-2224.
- 11) Abe Y, et al. J Biol Chem. 2000;275:8664-8671.
- 12) Paasche JD, et al. J Biol Chem. 2001;276:34041-34050.
- 13) Terada K, et al. J Biol Chem. In press.
- 14) Cottrell GS, et al. J Biol Chem. 2006;281:27773-27783.
- 15) Marchese A, et al. J Biol Chem. 2001;276:45509-45512.
- 16) Li JG, et al. Mol Pharmacol. 2008;73:1319-1330.
- 17) Chen B, et al. J Biol Chem. 2011;286:40760-40770.
- 18) Okamoto Y, et al. J Biol Chem. 1997;272:21589-21596.
- 19) Iwasa S, et al. Atherosclerosis. 1999;146:93-100.
- 20) Schneider MP, et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007;47:731-759.