

## ミニ・レビュー

## オーファン受容体は宝のヤマ?

水上洋一

山口大学医学部器官病態系・生理学第一講座 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)

Key words : 心臓, 虚血, オーファン受容体 GTP結合型受容体 (GPCR)

## はじめに

DNAシーケンスなどの遺伝子解析の分野では、めざましい勢いで技術革新が進んでいる。今年にはヒトゲノムのドラフトシーケンスが発表され、様々な情報が私たちの前に姿を現した。これらの情報の中でも細胞外からの刺激を細胞内に伝えるGTP結合型受容体 (G-protein coupled receptor ; GPCR) の遺伝子数が意外に多く、数千個の遺伝子が存在していることが明らかになった。

ヒトの記憶、感情、味覚や臭覚、心血管機能といった高次機能にはまだ不明な点が多いが、こうした高次機能の解明にGPCRが大きな注目を集めている。

とりわけ、オーファン受容体と呼ばれるリガンドや機能が未解明のGPCRは、今後、生理的に重要な発見につながる可能性を秘めていることから、世界中の研究者が大きな関心を寄せている。

そこで、このミニレビューでは最近のGPCRおよびオーファン受容体の研究を概説するとともに筆者らのオーファン受容体に関連した研究をご紹介させていただきたい。

## GTP結合型受容体 (GPCR) とは

GPCRはその名前からもわかるようにguanine nucleotide-binding regulatory proteinの活性化を介して機能を果たしている受容体である<sup>1)</sup> (表1)。

---

クラスA : rhodopsin-like receptor  
 ファミリーI olfactory receptors, adenosine receptors  
 ファミリーII biogenic amine receptors  
 ファミリーIII neuropeptide receptors  
 ファミリーIV invertebrate opsins  
 ファミリーV chemokine receptors  
 ファミリーVI melatonin receptors

クラスB: calcitonin and related receptors  
 ファミリーI calcitonin receptors  
 ファミリーII PTH receptors  
 ファミリーIII glucagon receptors  
 ファミリーIV latroxin receptors

クラスC: metabolic glutamate receptors  
 ファミリーI metabolic glutamate receptors  
 ファミリーII calcium receptors  
 ファミリーIII GABA-B receptors  
 ファミリーIV putative pheromone receptors

クラスD : STE2 pheromone receptors  
 クラスE : STE3 pheromone receptors  
 クラスF : cAMP receptors

---

表1 遺伝子配列に基づいたGタンパク質結合型受容体 (GPCR) の分類<sup>1)</sup>

GPCRに結合しているGタンパク質は、休止状態ではG $\alpha$ サブユニットがGDPと結合し、G $\beta$ 、G $\gamma$ サブユニットとともに3量体を形成している。リガンドがGPCRに結合し、活性化すると、3量体型Gタンパク質はGDP-GTP交換反応によってGTP結合型に変換され、 $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットから解離する。

この反応によってアデニル酸シクラーゼ、グアニル酸シクラーゼ、ホスホリパーゼA<sub>2</sub>、Cなどの分子を活性化し、cAMP、cGMP、ジアシルグリセロール、イノシトール3ホスフェートなどのセカンドメッセンジャーが産生され、一連の細胞内シグナル経

平成13年7月23日受理

## Biogenic amines

Adrenaline, Dopamine, Histamine, Acetylcholine, Noradrenaline

## Peptide and proteins

Angiotensin, Bradykinine, Bombesin, C5a, Calcitonin, Chemokines, Interleukin 8, Diuretic hormone, Growth hormone, fMLP, Vasopressin, Enkephalins, Neuropeptide Y, Neurotensin, Opioids, Endothelin.

## Lipids

Anandamide, Cannabinoids, Leukotrienes, Lysophosphatidic acid, Platelet-activating factor

## Eicosanoids

Prostacyclins, Prostaglandins, Thromboxanes

## Purines and nucleotides

Adenosine, cAMP, ATP, UTP, ADP, UDP

## Excitatory amino acid and ions

Glutamate, Calcium, GABA

表2 Gタンパク質結合型受容体 (GPCR) に対する内因性リガンドの分類<sup>1)</sup>

路が活性化される。

また、あるときにはCa<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>チャンネルの活性化を介してアラキドン酸やホスファチジン酸のような別のセカンドメッセンジャーを産生する。

多くのGPCRは、Mitogen-activated protein kinase (MAPK) を活性化することができるが、このプロセスはGPCRのエンドサイトーシスやアダプタータンパクのチロシンリン酸化が関与していると考えられている。

このような細胞内シグナル伝達システムだけではなく、GPCRのシグナル伝達には明らかに複雑なシステムが存在していると考えられている。なぜならば、細胞によって異なる代謝応答を誘導したり、様々な遺伝子発現が活性化されることが知られており、この遺伝子発現の違いが、細胞の増殖や分化あるいは筋肉収縮や視覚、臭覚、記憶、感情といった高次機能の発現において生理的に重要な役割をはたしていると思われているからである。

### GPCRを活性化する内因性リガンド

GPCRは幅広い分子をリガンドとして結合することができる<sup>1)</sup> (表2)。

たとえば糖蛋白質からペプチド、あるいは薬物や脂質といった低分子の物質まで結合することができ

薬品名	標的となるGタンパク質結合型受容体
Antenolol	$\beta_2$ antagonist
Buspirone	5-HT <sub>1A</sub> agonist
Cetizine	Antihistamine H <sub>1</sub> antagonist
Cimetidine	H <sub>2</sub> antagonist
Cisapride	5-HT <sub>4</sub> ligand
Doxazosin	$\alpha_1$ antagonist
Famotidine	H <sub>2</sub> antagonist
Leuprorelin	LH-RH agonist
Losartan	AT <sub>1</sub> antagonist
Leuprolide	LH-RH agonist
Nizatidine	H <sub>2</sub> antagonist
Metoprolol	$\beta_1$ antagonist
Olanzapine	Mixed D <sub>2</sub> /D <sub>1</sub> /5-HT <sub>2</sub> antagonist
Ranitidine	H <sub>2</sub> antagonist
Risperidone	Mixed D <sub>2</sub> /5-HT <sub>2</sub> antagonist
Salmeterol	$\beta_2$ antagonist
Terazosine	$\alpha_1$ antagonist

表3 Gタンパク質結合型受容体 (GPCR) を標的にした医薬品<sup>1)</sup>

るが、結合部位や結合様式は様々である。

タンパク質や高分子のペプチドは、多くの場合、細胞外に出ているスカフォールドループに結合する。薬物を含めた低分子の物質は、受容体の膜貫通領域に結合すると考えられている。また、ペプチドの中には、細胞外のループに結合した後、取り込まれ、膜貫通領域に結合し、受容体を活性化するものも報告されている。

いずれにしても重要なことはリガンド結合部位を同定することによって薬剤として有用なアゴニストやアンタゴニストを開発することであり、多くの製薬企業では受容体の立体構造を予測し、新薬開発を加速させている。

### GPCRを標的とする医薬品

GPCRを介した薬物治療はこの30年間でめざましい成功を遂げてきた。

現在、使われている薬剤の50%以上がGPCRを標的にしたものであり、その薬剤の世界中の売り上げは、上位25%以上を占めており、売上高は1997年で2兆ドルに達しようとしている<sup>1)</sup> (表3)。

このため、各製薬企業はGPCRの研究にかなりのエネルギーを注いでおり、ハイスループットなスクリーニング方法が次々に開発されている<sup>2)</sup>。

疾患名	受容体	遺伝子様式	変異の種類
Color blindness	Red and green opsins	X-linked	X chromosome rearrangements
Stationary night blindness	Rhodopsin	AR	Missense mutations
Retinitis pigmentosa	Rhodopsin	AD	Apoptosis of rod cells
Nephrogenic DI	V <sub>2</sub> receptor	X-linked	Loss of function
Isolated glucocorticoid deficiency	ACTH receptor	AR	Loss of function
Hyperfunctioning thyroid adenomas	TSH receptor	Somatic mutation	Missense
Familial precocious puberty	LH receptor	AD male limited	Missense
Familial hypocalciuric hypercalcaemia	Ca <sup>2+</sup> -sensing receptor	AD	Missense

表4 遺伝性疾患に関連したGタンパク質結合型受容体 (GPCR) <sup>1)</sup>

オーファン受容体	活性測定法	精製に用いた臓器	リガンド名	主な機能	発表年
ORL-1	cAMP測定	脳	Nociceptin	不安、記憶	1995
HFGAN72	細胞内Ca <sup>2+</sup> 測定	脳	Orexins	食欲、睡眠	1998
GPR10	アラキドン酸測定	脳	Prolactin-releasing peptide	プロラクチン分泌	1998
GHS-R	細胞内Ca <sup>2+</sup> 測定	胃	Ghrelin	肥満症	1999
SLC-1	細胞内Ca <sup>2+</sup> 測定	脳	Melanin-concentrating hormone	摂食行動	1999
GPR14	細胞内Ca <sup>2+</sup> 測定	脳	Urotensin II	血管収縮	1999
FM-3/4	細胞内Ca <sup>2+</sup> 測定	小腸	Neuromedin U	子宮収縮	2000

表5 オーファン受容体ストラトジーを用いて同定された内因性リガンド<sup>2)</sup>

### GPCRと遺伝性疾患

GPCRの重要性は薬物開発ばかりではなく遺伝性疾患の多くとも関連していることにある<sup>1)</sup> (表4)。

現在のところ、視覚において、色盲や夜盲症、網膜性色素変性症といった疾患でGPCRの変異が検出されている。また、味覚や臭覚に関連するGPCRは2000以上存在すると言われており、味覚、臭覚異常の解明が急速に進展する可能性がある。GPCRは細胞外の刺激を受け取る受容体であることからこうした五感に密接に関連していることも十分理解することができる。

また、ホルモン分泌においてGPCRの変異がかなり報告されており、生理的役割における重要性が示唆されている。

### オーファン受容体の解明

これまでに見つかったGPCRのホモロジーサーチや保存された配列からのPCRによって未だにリガンドが不明なGPCRが少なくとも140は存在していることが明らかになった。

これらのリガンド未知のGPCRをみなしごの受容体という意味からオーファン受容体と呼んでいる

(オーファン受容体のなかには一般的に核内受容体も含まれることが多い)。

これらのオーファン受容体からリガンドをスクリーニング方法はオーファン受容体ストラトジーと呼ばれ、すでにかんりのリガンドがこの方法で成功を収めている<sup>3)</sup> (表5)。

この方法は、具体的には古典的なタンパク精製技術と遺伝子発現細胞のバイオアッセイを組み合わせたものである。アッセイ方法として簡便に大量のサンプル処理が可能な細胞内Ca<sup>2+</sup>測定やアラキドン酸の測定を組み合わせている。

この方法の成功の中でも最も先駆的な役割を果たしたのはオレキシンの発見ではないだろうか。

オーソドックスなオーファン受容体ストラトジーによってオレキシンの発見されたのだが、オレキシンのラットに投与した結果や脳内の発現部位から、当初は食欲を司るニューロトランスミッターだと考えられていた<sup>4)</sup>。

しかし、その後ノックアウトマウスの実験などからオレキシン受容体がナルコレプシー原因遺伝子であることが明らかになった<sup>5)</sup>。

同時にナルコレプシーの患者からもオレキシン受容体の変異が見つかり、ナルコレプシーの原因が初めて遺伝子レベルで解明された<sup>6)</sup>。

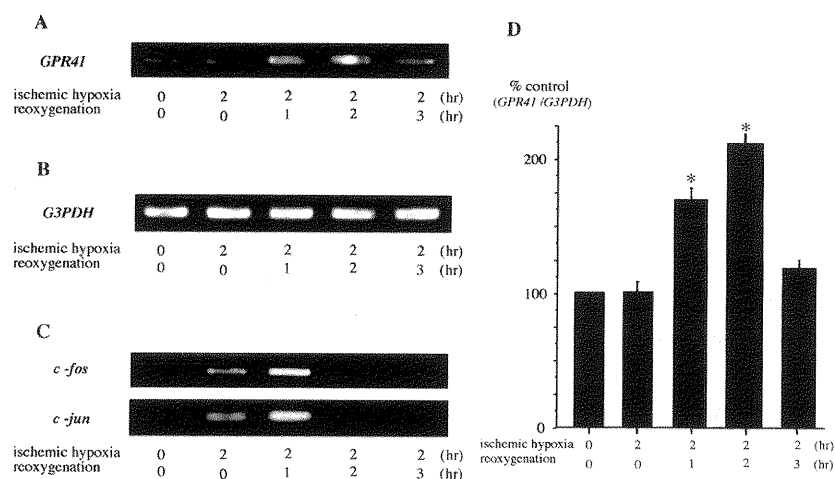


図1 細胞レベルでの虚血再灌流刺激におけるGPR41の遺伝子発現  
H9c2細胞を虚血再灌流刺激後、mRNAを抽出し、GPR41 (A), G3PDH (B), c-fos (C), c-jun (C) に対するプライマーを用いてRT-PCRを行った。GPR41に対するRT-PCRの結果をデンストメトリーで測定し、グラフに表示した(D)。

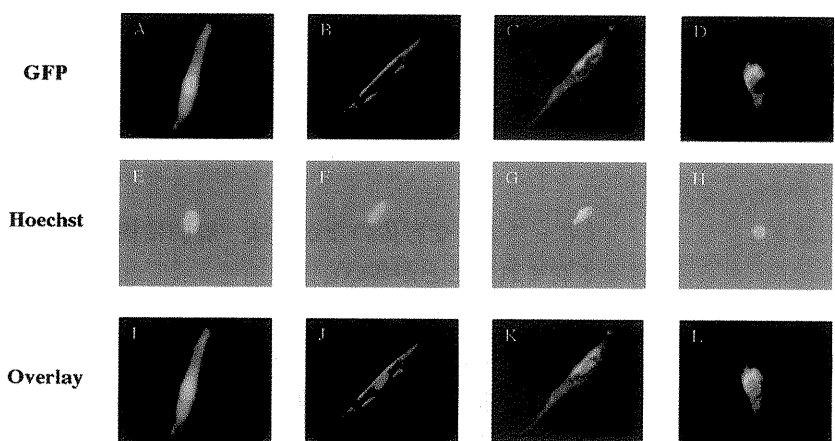


図2 GPR41の細胞内局在の変化  
GFP単独(A)およびGFP-GPR41(B, C, D)を発現し、GPR41の細胞内局在を発現後、12時間 (B and F), 24時間 (C and G), 36時間 (D and H)で観察した。また、細胞はヘキスト(E-H)で2重染色を行い、これらの像を重ね合わせた(I-L)。

この研究の成果は、オーファン受容体の中にはまだまだ、重要な遺伝子が数多く眠っていることを強く示唆している。

この研究を境にオーファン受容体に関する研究は一気に加速され、グレリン<sup>7)</sup>やウロテンシン<sup>8)</sup>といった新たなニューロトランスマITTERやホルモンが発見されていった。

#### 心筋虚血とオーファン受容体

心臓は全身に血液を送るポンプの役割を果たしている。私は心臓が単に血液を送っているだけでなく全身の機能をシンクロさせるためのシグナルをおくっているのではないかと考えた。

つまり、心筋梗塞など心臓になんらかの疾患が生

じた場合、それを他の臓器に知らせる役割、逆に、他の臓器 (あるいは心臓自身) で異常が発生した場合、それを感知する機能が心臓に存在しているのではないかと予想した。

そこで、まず、大量の心筋細胞を虚血にさらし、その培養上清を集め、解析を行った。その結果、心臓からは10kDa程度の低分子の物質から70kDa近い高分子のタンパク質まで100種類近いペプチド分子が細胞外に放出されていることが明らかになった。さらに、これらのなかには、リン酸化反応などの細胞内シグナル経路を活性化する分子が多数検出された。

この研究と平行して、これらの細胞外シグナル伝達因子の受け手側である受容体についても検討した。つまり、細胞外シグナル伝達因子が多数存在している条件下では、受け手側である受容体の転写が

Luciferase activity /  $\beta$ -gal  
activity (control %)

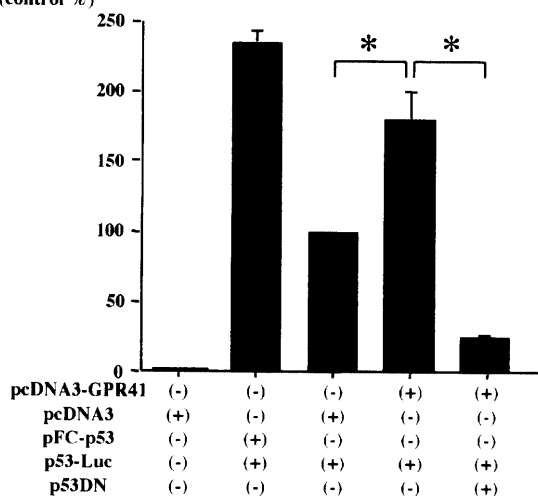


図3 GPR41によるp53転写活性の測定

それぞれのベクターを細胞内に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定することでp53の転写活性化能を測定した。また、ルシフェラーゼ活性は $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性で補正を行った。

亢進しているのではないかと考えたからである。

受容体の中でもリガンド未知のオーファン受容体にターゲットを絞って虚血における発現を観察した。様々なオーファン受容体の転写活性を検討した結果、GPR41が虚血再灌流後に転写活性の有意な上昇を示していることが明らかになった<sup>2)</sup> (図1)。

心臓は、GPR41をほとんど発現していないことから、この細胞にGPR41を過剰発現させ、生理機能を観察した。その結果、過剰発現した細胞のほとんどがアポトーシスを起こし丸くなって死滅してしまった (図2)。そこで、私たちはこの遺伝子を低酸素誘導アポトーシス受容体 (Hypoxia-induced apoptosis receptor; HIA-R) と呼ぶことにした。

興味あることにすでにHIA-Rの発現が観察されるCHO細胞では細胞死を誘導できないが、正常な状態では発現していない心筋細胞や肝細胞ではHIA-Rの過剰発現によって細胞死誘導することができた。

神経細胞にはHIA-Rはすでにかなり高発現しているが、このような細胞にはHIA-Rによる細胞死を抑制するメカニズムが存在しているのかもしれない。また、細胞死以外にも何らかの生理的役割が存在しているのかもしれない。

## HIA-Rによる心筋細胞死のメカニズム

HIA-Rによる細胞死のメカニズムにはガン抑制遺伝子であるp53が関与しているようである。これまでの結果では、HIA-Rを過剰発現した細胞では、p53のmRNAレベルは変化しないが、タンパク質レベルの顕著な亢進が認められた。これまでの報告では、正常な状態ではp53は常に分解されており、アポトーシスを抑制していると考えられている。HIA-Rはこのp53分解経路を抑制しているようである。蓄積したp53は核に移行し、アポトーシス誘導に関与しているbaxの転写を活性化しており、これが心筋細胞をアポトーシスに導いているようである<sup>3)</sup> (図3)。

多くのGPCRがMAPKを活性化できることから、MAPK superfamilyの酵素活性も検討したが、私たちの実験系では顕著な変化を観察することができなかった。

これらの結果からHIA-Rはp53を活性化することができる全く新しい種類の受容体であり、虚血後に心筋細胞にアポトーシスを誘導する受容体であることが示唆された。

HIA-Rの生理的役割を解明し、心筋梗塞の治療に応用するためには、リガンドの同定を行うとともにノックアウトマウスの作製が重要になってくることは疑いのないところである。

## 今後の研究について

私は、この6年間、心疾患と細胞内シグナル伝達因子との関係に焦点を絞り、研究を行ってきたが、今後はシグナル伝達の研究から離れ、オーファン受容体に研究の中心を移す予定である。この分野は世界中の製薬企業が参入しており、激しい競争があることは予想されるが、近い将来、様々な疾患に苦しむ患者さんを救い、社会に多くの福音をもたらすことができると考えている。

山口大学医学会中村賞の受賞内容は、すでに、「山口医学」(50, 563-568, 2001)に紹介しております。このため、最近の研究内容を一部ご紹介させていただきます。

## 文 献

- 1) Flower D R. Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* 1999 ; **1422** : 207-234.
- 2) Hertzberg R P, Pope A J. High-throughput screening: new technology for the 21st century. *Current Opinion in Chem. Biol* 2000 ; **4** : 445-451.
- 3) Civelli O, Nothacker H-P, Saito Y, Wang Z, Lin S H S, Reinscheid R K. Novel neurotransmitters as natural ligands of orphan G-protein-coupled receptors. *Trends in Neuroscience* 2001 ; **24** : 230-237.
- 4) Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*. 1998 ; **92** : 573-585.
- 5) Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999 ; **98** : 437-451.
- 6) Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 1999 ; **98** : 365-376.
- 7) Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999 ; **402** : 656-60.
- 8) Nothacker HP, Wang Z, McNeill AM, Saito Y, Merten S, O'Dowd B, Duckles SP, Civelli O. Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nature Cell Biol* 1999 ; **1** : 383-385.
- 9) Kimura M, Mizukami Y, Miura T, Fujimoto K, Kobayashi S, Matsuzaki M. G-protein-coupled receptor, GPR41, induces apoptosis via a p53/Bax pathway during ischemic hypoxia and reoxygenation. *J Biol Chem* 2001 ; **276** : 26453-26460.

# Orphan G-protein Coupled Receptors are Fruitful Sources for Drug Discovery

Yoichi MIZUKAMI

*Dept of Physiology I and Organ Pathophysiology,  
Yamaguchi University School of Medicine,  
1-1-1, Minami-kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

## SUMMARY

Functional genomics can be defined as the search for the physiological role of a gene for which its primary sequence is known. Most of the gene encoding proteins containing seven hydrophobic regions code for G protein-coupled receptors (GPCRs). GPCRs from a large and multi-gene superfamily with many important physiological functions, and have become to important targets in pharmaceutical research. Although many of GPCRs have been identified the natural ligands, the ligands for the other GPCRs are presently unknown. These GPCRs are called orphan receptors. Here, we examine the expression of various orphan receptors in H9c2 cells during ischemic hypoxia and reoxygenation. Among orphan receptors examined, the level of *G protein-coupled receptor 41 (GPR41)* mRNA increases significantly with a peak at 2 hrs after reoxygenation, and recovers to the control level by 3 hrs after reoxygenation. The transfection of GPR41 into H9c2 cells results in a significant decrease in cell number, with DNA fragmentation observed by *in vitro* and *in situ* assay. The amount of p53 protein increases significantly in the nuclei of cells expressing GPR41, accompanying an increase in the transcriptional activity of p53. Consistent with the activation of p53, the level of *bax* mRNA is significantly increased, which leads to an increase in Bax protein. Furthermore, the expression of a deletion mutant of a GPR41, which lacks the G protein binding site and shows an attenuation of intracellular phosphorylation signals to H9c2 cells, inhibits cell death and the increase in p53 protein within 24 hrs after reoxygenation. These observations demonstrate that GPR41 is a novel receptor that activates p53, leading to apoptosis during reoxygenation after ischemic hypoxia in H9c2 cells. We have designated GPR41 as hypoxia-induced apoptosis receptor, HIA-R.