

- J.*, 7, 1208–1218.
- 2) Kagan, H.M. & Li, W. (2003) *J. Cell. Biochem.*, 88, 660–672.
  - 3) Hornstra, I.K., Birge, S., Starcher, B., Bailey, A.J., Mecham, R.P., & Shapiro, S.D. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 14387–14393.
  - 4) Maki, J.M., Rasanen, J., Tikkanen, H., Sormunen, R., Makikallio, K., Kivirikko, K.I., & Soininen, R. (2002) *Circulation*, 106, 2503–2509.
  - 5) Ramirez, F., Sakai, L.Y., Dietz, H.C., & Rifkin, D.B. (2004) *Physiol. Genomics*, 19, 151–154.
  - 6) Carta, L., Pereira, L., Arteaga-Solis, E., Lee-Arteaga, S.Y., Lenart, B., Starcher, B., Merkel, C.A., Sukoyan, M., Kerkis, A., Hazeki, N., Keene, D.R., Sakai, L.Y., & Ramirez, F. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 8016–8023.
  - 7) Nakamura, T., Ruiz-Lozano, P., Lindner, V., Yabe, D., Taniguchi, M., Furukawa, Y., Kobuke, K., Tashiro, K., Lu, Z., Andon, N.L., Schaub, R., Matsumori, A., Sasayama, S., Chien, K.R., & Honjo, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 22476–22483.
  - 8) Nakamura, T., Lozano, P.R., Ikeda, Y., Iwanaga, Y., Hinek, A., Minamisawa, S., Cheng, C.F., Kobuke, K., Dalton, N., Takeda, Y., Tashiro, K., Ross Jr., J., Honjo, T., & Chien, K.R. (2002) *Nature*, 415, 171–175.
  - 9) Yanagisawa, H., Davis, E.C., Starcher, B.C., Ouchi, T., Yanagisawa, M., Richardson, J.A., & Olson, E.N. (2002) *Nature*, 415, 168–171.
  - 10) Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Okawa, K., Hagiwara, A., Chien, K.R., Kita, T., & Nakamura, T. (2007) *J. Cell Biol.*, 176, 1061–1071.
  - 11) McLaughlin, P.J., Chen, Q., Horiguchi, M., Starcher, B.C., Stanton, J.B., Broekelmann, T.J., Marmorstein, A.D., McKay, B., Mecham, R., Nakamura, T., & Marmorstein, L.Y. (2006) *Mol. Cell Biol.*, 26, 1700–1709.
  - 12) McLaughlin, P.J., Bakall, B., Choi, J., Liu, Z., Sasaki, T., Davis, E.C., Marmorstein, A.D., & Marmorstein, L.Y. (2007) *Hum. Mol. Genet.*, 16, 3059–3070.
  - 13) Kostka, G., Giltay, R., Bloch, W., Addicks, K., Timpl, R., Fassler, R., & Chu, M.L. (2001) *Mol. Cell Biol.*, 21, 7025–7034.
  - 14) Sicot, F.X., Tsuda, T., Markova, D., Klement, J.F., Arita, M., Zhang, R.Z., Pan, T.C., Mecham, R.P., Birk, D.E., & Chu, M.L. (2008) *Mol. Cell Biol.*, 28, 1061–1067.
  - 15) Hirai, M., Horiguchi, M., Ohbayashi, T., Kita, T., Chien, K.R., & Nakamura, T. (2007) *EMBO J.*, 26, 3283–3295.
  - 16) Sterner-Kock, A., Thorey, I.S., Koli, K., Wempe, F., Otte, J., Bangsow, T., Kuhlmeier, K., Kirchner, T., Jin, S., Keski-Oja, J., & Melchner, H. (2002) *Genes Dev.*, 16, 2264–2273.

中邨 智之  
(関西医科大学薬理学講座)

The roles of fibulin family proteins in elastic fiber assembly  
Tomoyuki Nakamura (Department of Pharmacology, Kansai  
Medical University, 10–15 Fumizonochō, Moriguchi, Osaka  
570–8506, Japan)

## NOによるタンパク質修飾を介した受容体の制御

### 1. はじめに (NOの歴史とS-ニトロソ化)

血管内皮細胞より血管平滑筋を弛緩させる内皮細胞由来平滑筋弛緩因子 (EDRF) が分泌されていることが見いだされ、その正体が一酸化窒素 (NO) であることが証明され、NOが生体内の情報伝達に関わっていることが明らかとなった。その後、L-アルギニンをNOに変換する酵素であるNO合成酵素 (NOS) の発見により、生体内における情報伝達物質としてのNOの地位が確立された。ノーベル財団は1998年、NOの機能解明の業績をたたえてファーチゴット、イグナロとムラドの3人にノーベル生理学・医学賞を授与した。

このEDRFとしてのNOの機能は、主にグアニル酸シクラーゼ (GC) のヘム鉄にNOが結合することによりGCを活性化することであるというのが定説である。しかし、その後の研究でNOは非常に多くの生理的、病理的作用があることが示され、GCの阻害剤を使った研究などによりGCを介する経路以外にもNOの作用メカニズムがあることが示された。その後、NOによるタンパク質のシステインチオール基の修飾 (S-ニトロソ化) がNOの生理的活性のメカニズムであることが提唱され、現在ではこのS-ニトロソ化は実際に、様々なタンパク質でそのタンパク質の機能を制御していると考えられている<sup>1,2)</sup>。

### 2. GPCRの制御

7回膜貫通型受容体 (GPCR) は、その名の通り7回細胞膜を貫通する構造を持った受容体のグループであり、受容体はGタンパク質と呼ばれるタンパク質と結合して、このGタンパク質を通して細胞内に情報を伝達する。ただ、GPCRの機能はGタンパク質以外にも多くのタンパク質が関与する非常に複雑な機構により制御されている。その代表的な機構が、アゴニストが受容体に結合して受容体が活性化し、Gタンパク質が受容体から解離した後、Gタンパク質による情報伝達が脱感作され、また受容体が細胞膜上から細胞内に移行する現象である。この現象は非常に複雑に制御されているが、今回は簡単な説明にとどめるので、興味があれば文献を参照していただきたい<sup>3,4)</sup>。Gタンパク質が解離した受容体は、G protein-coupled receptor

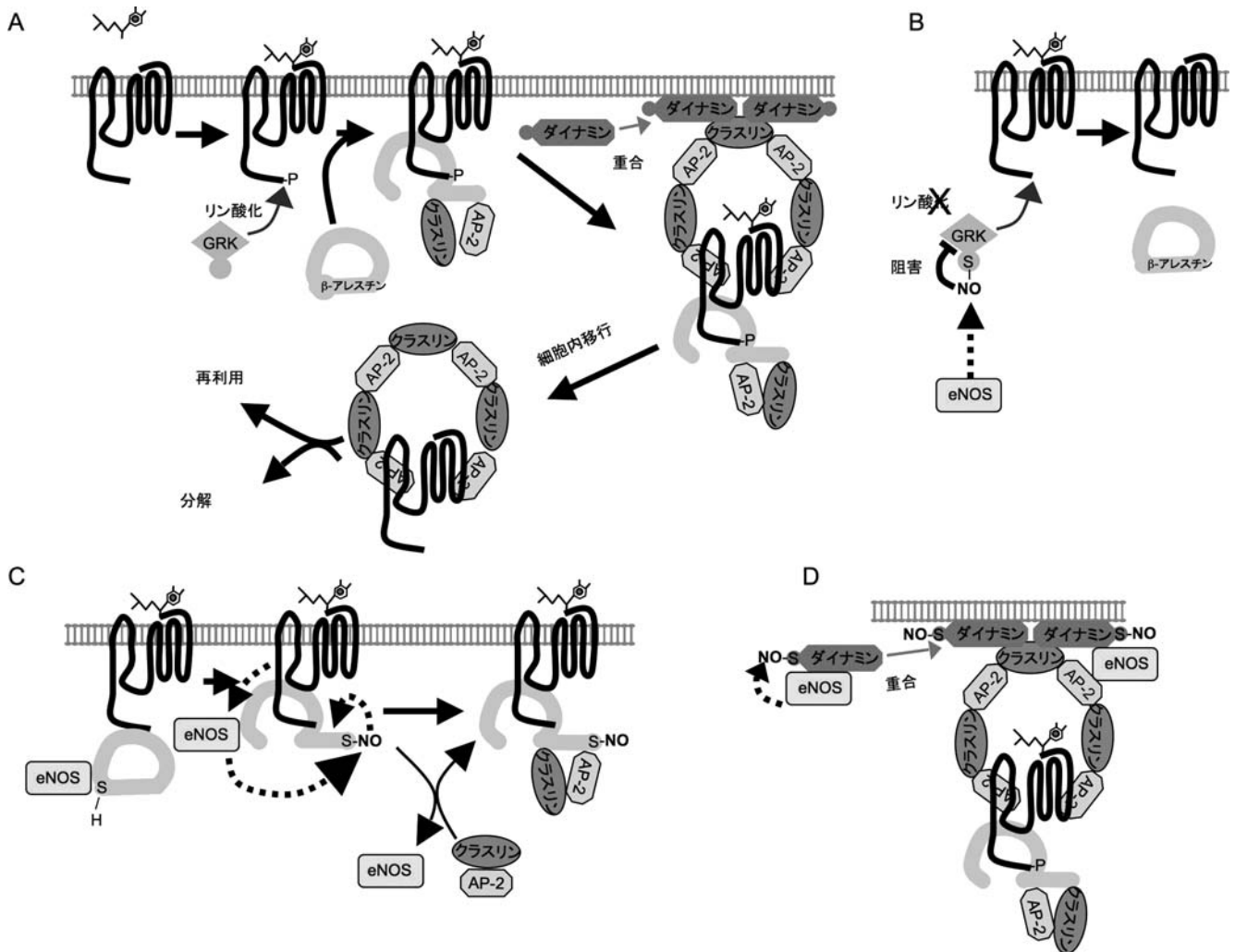


図 1

A 活性化後の GPCR の細胞内への移行の機構

7 回膜貫通型受容体 (GPCR) は、活性化後 G protein-coupled receptor kinase (GRK) によりリン酸化され、その後  $\beta$ -アレスチンが結合し、クラスリン小胞を形成した後、ダイナミンにより細胞膜から遊離して、一部は再度細胞膜上へ移動、その他はユビキチン-プロテアソーム系により分解される。

B GRK2 の S-ニトロソ化による制御

NO 合成酵素により GRK2 は S-ニトロソ化修飾され、活性が減弱する。そのため GPCR のリン酸化および  $\beta$ -アレスチンとの結合も低下する。

C  $\beta$ -アレスチンの S-ニトロソ化による制御

$\beta$ -アレスチンは eNOS と結合し、GPCR の活性化により eNOS も活性化され、 $\beta$ -アレスチンは S-ニトロソ化される。S-ニトロソ化により  $\beta$ -アレスチンの立体構造は変化し、eNOS は解離し、クラスリンと AP-2 が結合し、最終的に細胞内移行を促進する。

D ダイナミンの S-ニトロソ化による制御

ダイナミンと eNOS は結合し、S-ニトロソ化されたダイナミンは細胞膜に移行し、重合する。この結果、GPCR を含むクラスリン小胞は細胞膜より遊離する。

kinase (GRK) と呼ばれるリン酸化酵素によりリン酸化を受ける。このリン酸化された受容体に  $\beta$ -アレステチンとよばれるタンパク質が結合する。 $\beta$ -アレステチンは様々なタンパク質と結合する典型的な足場タンパク質 (scaffold protein) であり、その結合するタンパク質の中には、PDE4 ホスホジエステラーゼや DG キナーゼなど脱感作に関与するものや、クラスリンや AP-2 など小胞形成に関与するタンパク質が含まれている。この  $\beta$ -アレステチンの結合により受容体を中に含むクラスリン小胞が形成される。そしてダイナミンと呼ばれるタンパク質によりこのクラスリン小胞は細胞膜から遊離して、細胞質へ移動し、一部は再び細胞膜へもどり、その他はユビキチン-プロテアソーム系により分解される (図 1A)。

NO が GPCR からの細胞内情報伝達を制御しているという報告は様々な研究者からされてきたが、その分子メカニズムに関してはほとんどわかっていなかった。そこで我々はこの NO による GPCR の制御が、GPCR を制御するタンパク質の *S*-ニトロソ化による修飾により生じているのではないかと仮定し、以下に示すように一連の研究を行った。

### 3. GRK

まず GPCR が活性化した後、一連の機構の引き金を引く GRK による GPCR のリン酸化が *S*-ニトロソ化により制御されているかどうかを、GPCR の中で代表的な  $\beta$ 2 アドレナリン受容体 ( $\beta$ 2-AR) を用いて検討した<sup>5)</sup>。まず外部より *S*-ニトロソ化されたシステインまたはグルタチオンを加え、GRK による  $\beta$ 2-AR のリン酸化が NO により制御されているかどうかを、精製した  $\beta$ 2-AR と GRK2 を用いた *in vitro* の実験系と、培養細胞を用いた *in vivo* の実験系の両方で検討し、NO が GRK2 による  $\beta$ 2-AR のリン酸化を負に制御していることを示した。そこで、GRK2 が *S*-ニトロソ化修飾を受けているかどうかを、*S*-ニトロソ化されたタンパク質を特異的に精製する Biotin-switch 法<sup>6)</sup>により検討したところ、GRK2 が *S*-ニトロソ化されていることが示された。そこで GRK2 の中の修飾を受けているシステインを、質量分析計を用いて検討したところ、C340 が *S*-ニトロソ化を受けたシステインとして同定された。そこで野生型の GRK2 と C340 をセリンに置換したミュータント、C340S を細胞に強制発現させ、 $\beta$ 2-AR のリン酸化と受容体活性化後の細胞内への移行を評価したところ、C340S を強制発現させた細胞では NO による制御が消失しており、C340 の *S*-ニトロソ化による修飾が、NO による GPCR の機能の制御の分子メカニズムの一つであることが

示された (図 1B)。

### 4. $\beta$ -アレステチン

次に  $\beta$ -アレステチンが *S*-ニトロソ化により制御されているかどうかを検討した<sup>7)</sup>。すると血管内皮型 NOS (eNOS) 依存性に  $\beta$ -アレステチン 2 も *S*-ニトロソ化により制御されており、また eNOS による *S*-ニトロソ化は受容体がアゴニストに結合することにより一過性に生じ、時間経過と共に修飾が消失 (脱ニトロソ化) することがわかった。一方、 $\beta$ -アレステチン 1 は修飾を受けなかった。また eNOS と  $\beta$ -アレステチン 2 は、精製したタンパク質を使った *in vitro* の実験系、培養細胞を使った *in vivo* の実験系において結合しているという結果が得られ、その結合は受容体の活性により負に制御されていた。次に *S*-ニトロソ化により修飾を受けるシステインを同定するため、修飾を受けない  $\beta$ -アレステチン 1 と  $\beta$ -アレステチン 2 のアミノ酸を比較したところ、七つのシステインの位置はほぼ同じであるが、違いは  $\beta$ -アレステチン 2 の N 末端と C 末端に  $\beta$ -アレステチン 1 には存在しない三つのシステインがあることであった。そこでこれらのシステインをアラニンに置換したミュータントを作成して解析すると C410A のみが *S*-ニトロソ化による修飾を受けなかった。 $\beta$ -アレステチン 1 の C 末端には MAP キナーゼの一つである ERK により修飾を受けるセリンが存在しており、このリン酸化が  $\beta$ -アレステチン 1 とクラスリン、AP-2 との結合を制御しているという報告があるが、 $\beta$ -アレステチン 2 にはそのセリンが存在していない。しかし今回、 $\beta$ -アレステチン 2 にはそのセリンとほぼ同じ場所に  $\beta$ -アレステチン 1 には存在していない *S*-ニトロソ化により修飾されるシステインが存在することがわかり、この *S*-ニトロソ化が同様にクラスリン、AP-2 との結合を制御しているのではないかと考えた。そこで野生型の  $\beta$ -アレステチン 2 と C410S を用いて、 $\beta$ -アレステチン 2 とクラスリン、AP-2 との結合を評価したところ、*S*-ニトロソ化がクラスリン、AP-2 との結合を正に制御していることが示された。また同時に同じ *S*-ニトロソ化が  $\beta$ -アレステチン 2 と eNOS の結合を負に制御しているという結果も得られた。そこで最終的にこの修飾が  $\beta$ 2-AR の活性化後の細胞内移行を制御しているかどうかを検討したところ、予想通り eNOS による  $\beta$ -アレステチン 2 の *S*-ニトロソ化は細胞内への移行を正に制御していることが示され、 $\beta$ -アレステチン 2 の *S*-ニトロソ化も NO による GPCR の機能の制御に関与していると考えられた (図 1C)。

## 5. ダイナミン

GPCRが細胞膜より遊離する際に必須と考えられているダイナミンがeNOSと結合することは既に報告されているが、その生理的意義についての報告はなかった。我々はeNOSがダイナミンの機能を制御しているのではないかと考え、S-ニトロソ化システインを特異的に認識する抗体とBiotin-switch法によりダイナミンのS-ニトロソ化による修飾を検討したところ、ダイナミンがS-ニトロソ化により修飾されていることが示された<sup>8)</sup>。そこでダイナミンのシステインをアラニンに置換したミュータントを6種類作成し、野生型、ドミナントネガティブのダイナミンとシステインミュータントをそれぞれ強制発現させ、 $\beta$ 2-ARの活性化後の細胞内移行を評価したところ、システインミュータントのC607Aを強制発現させた細胞において、NO存在下の細胞内移行が阻害されているという結果が得られた。またダイナミンの重合やGTPの加水分解もNOにより正に制御されていたが、C607AではこれらのNOによる正の制御が阻害されていた。Biotin-switch法によりC607AはS-ニトロソ化による修飾をうけないことが示され、以上の結果よりダイナミンのC607がS-ニトロソ化による修飾を受け、この修飾によりダイナミンの機能が正に制御されていると考えられた(図1D)。

## 6. おわりに

以上、GPCRの活性化後の細胞内移行を制御している3種類のキープレーヤーが、いずれもS-ニトロソ化によりその機能を制御されていることが示された。しかもおもしろいことに、GRK2は負に制御されており、 $\beta$ -アレスタチン2とダイナミンは正に制御されている。このことは一見矛盾しているように思えるが、S-ニトロソ化によるNOの機能が、リン酸化やユビキチン化と同じように複雑な細胞内情報伝達を司るタンパク質の翻訳後修飾であることを示していると考えている。例えばこのGPCRの細胞内移行はリン酸化によっても制御されているが、GRKによるGPCRのリン酸化は正に、ERKによる $\beta$ -アレスタチン1のリン酸化は負に制御しており、基質が違えば同じリン酸化でもまったく逆の効果を示している。S-ニトロソ化も細胞種や種々の条件により、GPCRを様々な形で制御していると考えている。

GRKのサブタイプに関しては、GRK1から6まではいずれもGPCRをリン酸化すると考えられているが、S-ニトロソ化により修飾されるGRK2のシステイン残基はす

べてのGRKにおいて保存されていない。細胞の種類によってどのGRKのサブタイプが発現、機能しているかが異なっていると考えられており、例えば今回使ったU2-OS細胞はGRK2の発現が高いが、HEK293細胞は逆に低くNOによるGRK2阻害の影響はU2-OS細胞に比べ小さかった。以上より、GRK2の発現が低い条件では、NOの負の制御は働かず、 $\beta$ -アレスタチン2とダイナミンによる正の制御の影響が大きいと考えられる。

次にS-ニトロソ化の機構であるが、 $\beta$ -アレスタチン2とダイナミンは両者ともeNOSとの結合が確認されたが、GRK2に関してはeNOSによりS-ニトロソ化されているにも関わらずeNOSとの結合は確認できず、おそらくeNOSだけでなくNOS以外のタンパク質が関与する未知の機構により修飾されていると推測している。このような機構の違いが、生体内において役割の違いを生じている可能性は否定できない。

NOはEDRFとして働いていることが発見され、その後生体内で非常に多岐にわたった働きがあることが示されているが、その分子メカニズムはまだまだわからないことが多い。今回紹介したS-ニトロソ化は、NOが直接タンパク質を修飾することによりその機能を制御するというものであり、現在わかっていないNOの作用機序のいくつかを説明できる可能性があると考えている。そしてNOが従来考えられていたような病的なものではなく、むしろ生理的な条件で非常に精緻な細胞内情報伝達に関与していると考えており、今回の一連の研究はその好例であると考えている。

## 謝辞

この一連の研究はDuke大学のStamler教授の研究室で行ったものであり、同時にGRK2と $\beta$ -アレスタチンは同じくDuke大学のLefkowitz教授との、またダイナミンの研究に関してはGeorgia医科大学のDaaka教授との共同研究で行われた。

- 1) Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E., & Stamler, J.S. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 150-166.
- 2) 松本昭郎, 谷口直之, 鈴木敬一郎 (2006) 細胞工学, 25, 128-131.
- 3) Rockman, H.A., Koch, W.J., & Lefkowitz, R.J. (2002) *Nature*, 415, 206-212.
- 4) Lefkowitz, R.J., & Shenoy, S.K. (2005) *Science*, 308, 512-517.
- 5) Whalen, E.J., Foster, M.W., Matsumoto, A., Ozawa, K., Violin, J.D., Que, L.G., Nelson, C.D., Benhar, M., Keys, J.R., Rock-

- man, H.A., Koch, W.J., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J., & Stamler, J.S. (2007) *Cell*, **129**, 511–522
- 6) Jaffrey, S.R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C.D., Tempst, P., & Snyder, S.H. (2001) *Nat. Cell Biol.*, **3**, 193–197.
- 7) Ozawa, K., Whalen, E.J., Nelson, C.D., Mu, Y., Hess, D.T., Lefkowitz, R.J., & Stamler, J.S. (2008) *Mol. Cell*, **31**, 395–405.
- 8) Wang, G., Moniri, N.H., Ozawa, K., Stamler, J.S., & Daaka, Y. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 1295–1300.

小澤 健太郎

(金沢大学医薬保健研究域医学類分子情報薬理学)

---

Regulation of GPCR by S-nitrosylation  
Kentaro Ozawa (Department of Pharmacology, Kanazawa University Medical School, 13-1 Takaramachi, Kanazawa, Ishikawa 920-8640, Japan)