



TITLE:

The molecular associations in clathrin-coated pit regulate β -arrestin-mediated MAPK signaling downstream of μ -opioid receptor(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sato, Atsuko

CITATION:

Sato, Atsuko. The molecular associations in clathrin-coated pit regulate β -arrestin-mediated MAPK signaling downstream of μ -opioid receptor. 京都大学, 2023, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2023-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k24525>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏名	佐藤 敦子
論文題目	The molecular associations in clathrin-coated pit regulate β -arrestin-mediated MAPK signaling downstream of μ -opioid receptor (クラスリン被覆小孔の構成分子との会合が μ オピオイド受容体下流の β アレスチンを介したMAPK経路のシグナル伝達を制御する)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>μオピオイド受容体 (MOP) は G タンパク質共役型受容体 (GPCR) である。これまで、MOP は、Gi/o を起点として鎮痛効果を発現する細胞内シグナル経路と、Gi/o 経路とは独立してβアレスチン2を起点とする、副作用の発現に関与する細胞内シグナル経路を活性化すると考えられてきた。そのため、βアレスチン2をMOPに動員しにくく、同経路を活性化しにくい薬剤は、副作用の少ない理想的なオピオイドになると期待されてきた。しかし近年、Gi/o 経路をより選択的に活性化するオピオイドでも、呼吸抑制などの副作用を誘発することが報告された。さらに、βアレスチン2欠損マウスや、βアレスチン2を動員しないはずのリン酸化欠損MOP変異体発現マウスでも、オピオイドの副作用が誘発されると報告された。すなわち、MOPにβアレスチン2が動員されることがオピオイドの副作用に関与するのか疑問が提起された。そこで本研究では、MOPの下流でβアレスチンを介したシグナル伝達経路が活性化する分子機構の解明に取り組んだ。</p> <p>まず、CRISPR/Cas9を利用して、βアレスチン1、2、及び両者を欠損したSH-SY5Y細胞（ヒト神経芽細胞腫）を作出し、βアレスチンが起点となるMAPK経路の活性化を評価した。βアレスチン1、2両者を欠損すると、MOPの内在化は消失し、MAPK経路の活性化は著減した。βアレスチン1、2のいずれか一方を欠損した株では、MAPK経路の活性化に株間で差は認めず、βアレスチン1、2のいずれもがMAPK活性化に関与することが示唆された。次にSH-SY5Y細胞を、βアレスチンをMOPへ動員する強度の異なる2種のオピオイド、[D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]-Enkephalin (DAMGO)とモルヒネ塩酸塩で刺激した。DAMGOはMOPを強く内在化したが、MAPK経路の活性化にはリガンド間で差を認めなかった。そこで、MOPへのβアレスチンの動員に重要であるMOPのC末端領域のリン酸化が、MAPK経路活性化に与える影響を解析した。MOPのリン酸化欠損変異体(11S/T-A)やC末端領域欠損変異体は、野生型と同程度にMAPK経路を活性化した。つまり、MOPのC末端領域のリン酸化を介したβアレスチンの動員は、MAPK経路の活性化には必要がないことがわかった。次に、この変異体発現株をGi阻害剤で処理すると、MAPK経路は活性化しなくなった。すなわち、これまでβアレスチンを起点とすると想定されていたMAPK経路は、Gi/oが上流で制御しており、Gi/oはβアレスチンと協同してMAPK経路を活性化していることを明らかにした。さらに、βアレスチンがMOPのリン酸化によらず活性化状態を維持してMAPK経路を活性化するには、MOPを内在化する過程でAP-2複合体のβ2アダプチンサブユニットやクラスリン重鎖と形成するクラスリン被覆小孔においてそれらの分子と会合することが重要であることを明らかにした。</p> <p>本研究は、MOPを起点とするシグナル活性化機構の解析を通して、受容体の内在化に関与するクラスリン被覆小孔を形成するために分子が会合することが、細胞内シグナルの活性化においても重要な役割を果たすことを明らかにした点において意義があると考えられる。(1,388字)</p>			

(論文審査の結果の要旨)

μ オピオイド受容体 (MOP) は、Gi/o を起点として鎮痛効果を発現するシグナル経路と、Gi/o 経路とは独立して β アレスチン2を起点とする、副作用の発現に関与するシグナル経路を活性化すると考えられてきた。本研究では、MOPの下流で β アレスチンを介したシグナル伝達経路が活性化する分子機構の解明に取り組んだ。

SH-SY5Y細胞において、 β アレスチン1、2の両者および各欠損株の比較により、 β アレスチン1、2の両者がMAPK経路活性化に関与することを示した。次に、MOPのC末端領域がリン酸化修飾を受けないよう変異を加えた変異体の解析により、 β アレスチンの動員に重要と考えられてきたMOPのC末端領域のリン酸化修飾が、 β アレスチンを介したMAPK経路の活性化に必須でないことを明らかにした。加えて、変異体にGi阻害剤を用いてGi/oが β アレスチンと協同してMOP下流のMAPK経路を活性化することを示した。さらに、 β アレスチンがMOPのC末端領域のリン酸化状態によらず活性化状態を維持し、MAPK経路を活性化するには、MOPを内在化する過程で形成するクラスリン被覆小孔においてAP-2複合体やクラスリン重鎖と会合することが重要であることを明らかにした。

以上の研究はMOP下流の β アレスチンを介した細胞内シグナル経路の活性化機構の一端の解明に貢献し、分子生物学および麻酔科学の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和5年2月16日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日 以降