

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14921

研究課題名(和文) P2Y6受容体タンパク質のプリン非依存的シグナル伝達機構と慢性炎症治療への応用

研究課題名(英文) Atypical GPCR signaling regulated by cysteine-based post-translational modification and its physiological significance

研究代表者

西山 和宏 (Nishiyama, Kazuhiro)

九州大学・薬学研究院・特任助教

研究者番号：60810116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食品中に含まれる代表的なイソチオシアネート(ITC)であるイベリンおよびスルフォラファンがP2Y6Rを阻害することが明らかとなった。さらに、ITCによりP2Y6Rの内在化およびプロテアソーム系を介した分解が認められた。ITCによるP2Y6Rの分解は、P2Y6Rの220番目のシステインをセリンに置換した変異体では認められなかった。また、P2Y6R K0はWTに比較して、大腸炎の進行が抑制された。以上よりイベリンやスルフォラファンなどのITCがP2Y6Rの220番目のシステインを標的として、細胞内への内在化を引き起こし、プロテアソーム系を介してP2Y6Rを分解することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローン病や潰瘍性大腸炎に代表される炎症性腸疾患(以下IBD)は寛解と再燃を繰り返す腸管の慢性炎症を特徴とする難治性の疾患である。一方で、P2Y6Rは細胞外UDPをリガンドとするプリン作動性受容体であり、心臓や神経、免疫系細胞に発現している。本研究では過剰なP2Y6受容体の発現によるシグナルの増加が病態を進行させる可能性が示された。さらに、IBDの環境要因のうち食事に着目し、P2Y6受容体シグナリングを抑制する食事成分を見出した。本研究の成果により、大腸炎の発症メカニズムにおけるP2Y6Rの役割が明らかとなり、P2Y6Rを標的とした革新的な医療基盤技術の創出に発展させることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We found that Iberine and sulforaphane, which are isothiocyanates (ITCs) contained in foods, inhibit P2Y6R signaling. Furthermore, ITCs induced internalization of P2Y6R and degradation via the proteasome system. ITCs-induced internalization and degradation of P2Y6R are caused by the 220th cysteine modification. In addition, in the DSS colitis model, which is an ulcerative colitis model, we found that deficient of P2Y6R attenuates body weight loss, disease activity index and the amount of inflammatory cytokine.

研究分野：薬理学

キーワード：プリン作動性受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性炎症は免疫応答が収束できずに、長期間に渡り炎症が持続する。大腸性潰瘍炎や慢性腎不全などは慢性炎症を根幹としており、さらに高血圧などの生活習慣病にも慢性炎症は関与する。しかしながら、炎症が慢性化する過程における炎症リガンド・受容シグナルの時空間制御機構は未だ解明されておらず、慢性炎症に起因する疾患に共通する創薬標的分子も見つかっていない。一方で、ATP や UDP などのヌクレオチド類は細胞の傷害に伴い放出され、炎症を引き起こすことが知られている。

2. 研究の目的

申請者らのグループは細胞外ヌクレオチド作動性の G 蛋白質共役型受容体 (GPCRs) について研究を進めており、これまで P2Y6R が加齢依存的に発現増加し、リガンド (UDP) 非依存性にアンジオテンシン受容体とヘテロダイマーを形成し、高血圧リスクを増加させることを報告している (Nishimura A. et al., Science Signal. 2016)。さらに、P2Y6R が親電子性の高い機能性食品成分と反応する「細胞膜環境センサー受容体」として働く可能性も見出ししている。そこで本研究では、親電子物質が選択的に P2Y6R に影響を与える分子機構解析を軸に、慢性炎症におけるプリン非依存的な P2Y6R シグナリングの役割を明らかにする。さらに、慢性炎症疾患に対する機能性食品成分 (親電子物質) の有効性および P2Y6R 依存性を検証することで、P2Y6R を標的とする新しい慢性炎症治療のストラテジー構築を目指す。

3. 研究の方法

・ P2Y6R 阻害作用を持つ親電子物質の探索

細胞外 UDP はマクロファージ細胞株 RAW264.7 において P2Y6R を介して、MEK-ERK 経路を活性化し炎症性サイトカインである CCL2 を産生する。この現象を用いて UDP 刺激における CCL2 産生を指標にスクリーニングを行った。スクリーニング用のライブラリーには P2Y6R 阻害薬である MRS2578 の親電子性 (2 つのイソチオシアネート基) に着目して、構造活性相関により、イソチオシアネート基 (ITC) をもつ化合物ライブラリーを用いた。

・ 親電子物質による P2Y6R 阻害機構の解明

親電子物質であるヒット化合物がどのようにして P2Y6R シグナルを阻害するかを検討する。具体的には、P2Y6R の分子挙動に着目し、ウエスタンブロッティング法およびライブセルイメージング、bioluminescence resonance energy transfer (BRET) により検討した。さらに、P2Y6R に親電子物質が結合するか Proximity Ligation Assay (PLA) を用いて検討した。

・ 潰瘍性大腸炎モデルにおける P2Y6R の役割

大腸炎モデルとしてデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘発大腸炎モデルを用いて、炎症性腸疾患における P2Y6R の役割を明らかにする。具体的には野生型マウス (WT) および P2Y6R 欠損マウス (P2Y6R KO) に 2% DSS を 7 日間飲水させ、7 日間通常の飲水に戻し、腸炎モデルを作製、比較する。体重増減、および血便、下痢を評価した。さらに腸管の長さ、組織学的評価およびリアルタイム PCR 法を用いたサイトカイン発現量の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 食品成分中の ITC であるイベリンおよびスルフォラファンは P2Y6R シグナルを阻害する。

RAW264.7 細胞を用いて行ったスクリーニングにより食品中に含まれる代表的な ITC であるイベリンおよびスルフォラファンが濃度依存的に P2Y6R シグナルを阻害することが明らかとなった (図 1)。

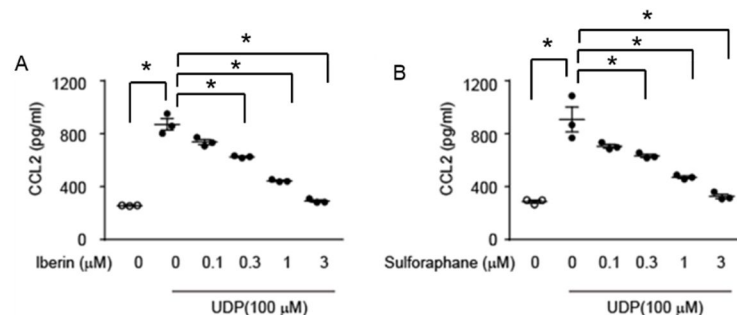


図1 IberinとSulfaphaneはUDP刺激によるCCL2の放出を抑制する。

A, Iberin処置 B, Sulfaphane処置

(2) ITC は P2Y6R を細胞内に内在化させ、プロテアソーム系を介して P2Y6R を分解する。

次に ITC がどのように P2Y6R シグナルを阻害しているか検討した。HEK293 細胞に FLAG タグをつけた P2Y6R を発現させ、スルフォラファンを投与したところ、スルフォラファンの濃度依存的に P2Y6R の発現量が減少した (図 2)。スルフォラファンによる P2Y6R の減少はプロテアソーム

阻害剤である MG132 の前処置により抑制された。さらに、HEK293 細胞に YFP タグをつけた P2Y6R を発現させた後、ライブセルイメージングにより P2Y6R の局在を確認したところ、スルフォラファン投与により P2Y6R が細胞内に内在化することが明らかとなった。BRET 反応を利用した方法でも同様にスルフォラファンによる P2Y6R の内在化が認められた。以上の結果から ITC は P2Y6R を細胞内に内在化させ、プロテアソーム系を介して P2Y6R を分解することが明らかとなった。

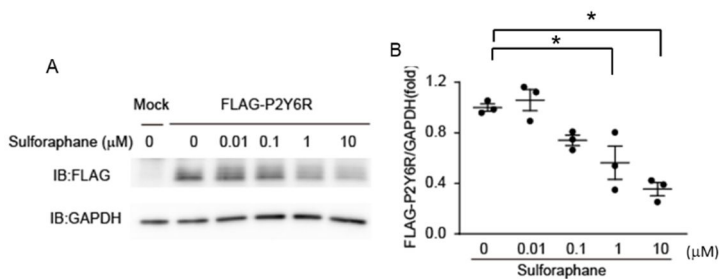


図2 SulforaphaneはP2Y6Rの発現を減少させる。
A, ウェスタンブロットング図 B, 定量化グラフ

(3) ITC は P2Y6R の 220 番目のシステインを標的としている。

親電子性の高い ITC はアミノ酸残基のうち求核性の高いシステイン残基を修飾することが知られている。そこで P2Y6R に含まれる 13 個のシステイン残基をそれぞれセリンに置換した変異体を用いて、ITC がどのシステイン残基を標的としているかを検討した。スルフォラファンによる P2Y6R の分解は、P2Y6R の 220 番目のシステインをセリンに置換した変異体 (C220S) では認められなかった(図 3)。さらに、C220S ではスルフォラファンによる内在化も認められなかった。加えて、PLA により P2Y6R に ITC が結合することが明らかになった。以上の結果より、ITC は P2Y6R の 220 番目のシステイン残基を直接的に修飾し、内在化および分解を引き起こすことが明らかとなった。

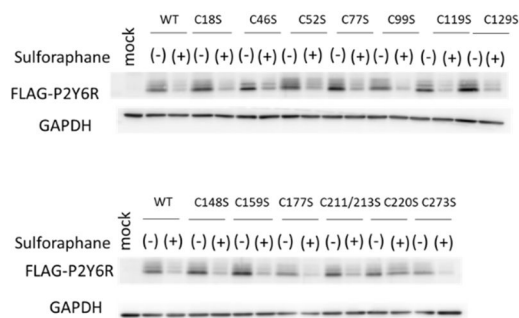


図3 P2Y6Rの220番目のシステインをセリンに置換した変異体ではSulforaphaneによる分解が起きない。

(4) ITC による P2Y6R の分解は 137 番目のリジン残基が必要である。

プロテアソーム系を介した分解にはタンパク中のリジン残基のユビキチン化が必要である。そこで、P2Y6R のリジン残基をアルギニンに置換した変異体を作成し、どここのリジン残基が標的となっているかを検討した。スルフォラファンによる P2Y6R の分解は、P2Y6R の 137 番目のリジン残基をアルギニンに置換した変異体 (K137R) では認められなかった。以上の結果から、ITC による P2Y6R の分解には 137 番目のリジン残基および 220 番目のシステイン残基が必要であることが明らかとなった。さらに、興味深いことに P2Y6R の 137 番目のリジン残基および 220 番目のシステイン残基は魚類以外の脊椎動物でよく保存されていた。

(5) 潰瘍性大腸炎モデルにおける P2Y6R の役割

野生型マウスおよび P2Y6R 欠損マウスに 2%DSS を 7 日間飲水させ、7 日間通常の飲水に戻し、腸炎モデルを作製、比較した。体重増減、および血便、下痢を評価した。さらに腸管の長さおよびリアルタイム PCR 法を用いたサイトカイン発現量を比較した。P2Y6 KO は WT と比較して、体重の減少、血便、下痢が有意に軽度であった(図 4)。さらに、腸管の長さや炎症性サイトカインの産生量も野生型マウスと比較して有意に軽度であった。したがって P2Y6R は大腸炎の進行に関与することが明らかとなった。

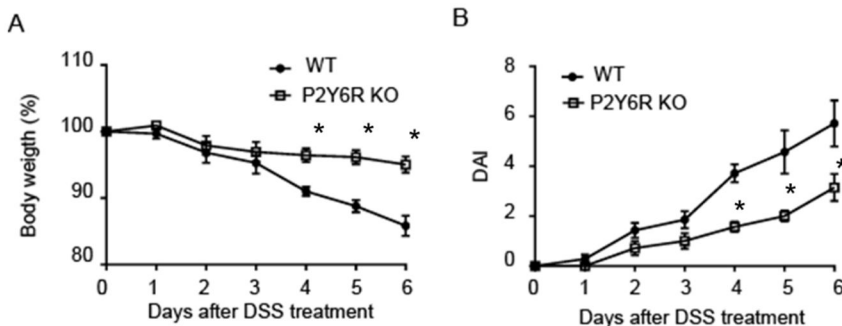


図4 P2Y6R KOではWTと比べてDSS誘発性大腸炎が軽度である。

A, 体重変化 B, 体重減少, 血便, 下痢をスコアリングしたDisease activity index(DAI)

(6)内因性親電子物質である一酸化窒素(NO)も P2Y6R の分子挙動を制御する。

システイン残基は食品成分などの外的環境由来の親電子性物質以外にも、生体内中の内因性の親電子性物質でも翻訳後修飾を受けることが知られている。そこで、内因性の親電子性物質で

ある NO の
供与体であ
る S-ニトロ
ソグルタチ
オン(GSNO)
を用いて
P2Y6R の分
子挙動を検
討した。

GSNO でも
ITC と同様
に、P2Y6R の

内在化および分解が認められた(図 5)。

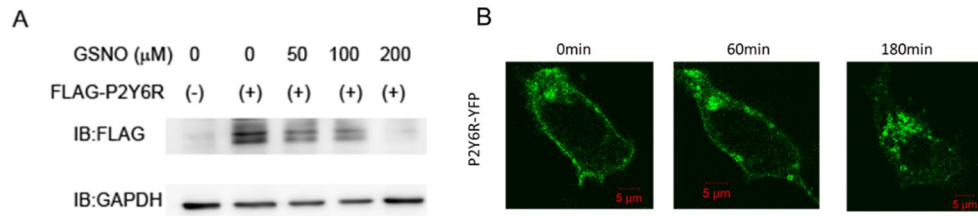


図5 GSNOの処置によりP2Y6Rは内在化し分解される。

A, P2Y6Rのタンパク発現量 B, P2Y6Rの局在変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nishiyama Kazuhiro, Numaga Tomita Takuro, Fujimoto Yasuyuki, Tanaka Tomohiro, Toyama Chiemi, Nishimura Akiyuki, Yamashita Tomohiro, Matsunaga Naoya, Koyanagi Satoru, Azuma Yasu Taka, Ibuki Yuko, Uchida Koji, Ohdo Shigehiro, Nishida Motohiro	4. 巻 176
2. 論文標題 Ibutilast attenuates doxorubicin induced cytotoxicity by suppressing formation of TRPC3 channel and NADPH oxidase 2 protein complexes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 3723 ~ 3738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/bph.14777	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sudi Suhaini Binti, Tanaka Tomohiro, Oda Sayaka, Nishiyama Kazuhiro, Nishimura Akiyuki, Sunggip Caroline, Mangmool Supachoke, Numaga-Tomita Takuro, Nishida Motohiro	4. 巻 9
2. 論文標題 TRPC3-Nox2 axis mediates nutritional deficiency-induced cardiomyocyte atrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41598-019-46252-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura Akiyuki, Shimoda Kakeru, Tanaka Tomohiro, Toyama Takashi, Nishiyama Kazuhiro, Shinkai Yasuhiro, Numaga-Tomita Takuro, Yamazaki Daiju, Kanda Yasunari, Akaike Takaaki, Kumagai Yoshito, Nishida Motohiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Depolsulfidation of Drp1 induced by low-dose methylmercury exposure increases cardiac vulnerability to hemodynamic overload	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaaw1920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1126/scisignal.aaw1920	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Numaga Tomita Takuro, Shimauchi Tsukasa, Oda Sayaka, Tanaka Tomohiro, Nishiyama Kazuhiro, Nishimura Akiyuki, Birnbaumer Lutz, Mori Yasuo, Nishida Motohiro	4. 巻 33
2. 論文標題 TRPC6 regulates phenotypic switching of vascular smooth muscle cells through plasma membrane potential dependent coupling with PTEN	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 9785 ~ 9796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1096/fj.201802811R	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishida Motohiro, Tanaka Tomohiro, Mangmool Supachoke, Nishiyama Kazuhiro, Nishimura Akiyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Canonical Transient Receptor Potential Channels and Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Lipid and Atherosclerosis	6. 最初と最後の頁 124 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.12997/jla.2020.9.1.124	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sunggip C, Shimoda K, Oda S, Tanaka T, Nishiyama K, Mangmool S, Nishimura A, Numaga-Tomita T and Nishida M	4. 巻 9
2. 論文標題 TRPC5-eNOS Axis Negatively Regulates ATP-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2018.00523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka T, Nishimura A, Nishiyama K, Goto T, Numaga-Tomita T, Nishida M.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Mitochondrial dynamics in exercise physiology.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/s00424-019-02258-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Numaga-Tomita T, Oda S, Nishiyama K, Tanaka T, Nishimura A, Nishida M.	4. 巻 471
2. 論文標題 TRPC channels in exercise-mimetic therapy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 507-517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/s00424-018-2211-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishiyama K, Aono K, Fujimoto Y, Kuwamura M, Okada T, Tokumoto H, et al.	4. 巻 234
2. 論文標題 Chronic kidney disease after 5/6 nephrectomy disturbs the intestinal microbiota and alters intestinal motility.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology.	6. 最初と最後の頁 6667-6678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1002/jcp.27408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Nishiyama K
2. 発表標題 Atypical GPCR signaling regulated by cysteine-based post-translational modification and its physiological significance.
3. 学会等名 The 50th NIPS International Symposium. 'MIRACLES' in Cardiovascular Physiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishiyama K, Tanaka T, Toyama C, Nishimura A, Nishida M.
2. 発表標題 Identification of a novel TRPC3-Nox2 complex inhibitor that attenuates anthracycline-induced cytotoxicity.
3. 学会等名 The 50th NIPS International Symposium. 'MIRACLES' in Cardiovascular Physiology. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山和宏
2. 発表標題 抗がん剤の副作用を軽減する新規 TRPC3-Nox2 複合体阻害剤の探索および効果の検証
3. 学会等名 第19回日本NO学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西山和宏
2. 発表標題 多因子に着目した消化管運動機能に関わる新規調節機構の解明
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishiyama K, Azuma YT, Nakajima H, Takeuchi T.
2. 発表標題 Microbiota and uremic toxin contribute to intestinal motility dysregulation induced by renal impairment
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山 和宏、赤司 壮一郎、富田 拓郎、藤本 泰之、田中 智弘、西村 明幸、東泰孝、西田 基宏。
2. 発表標題 新規TRPC3-Nox2複合体阻害剤の探索および効果の検証。
3. 学会等名 第71回日本薬理学会西南部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山 和宏、赤司 壮一郎、富田 拓郎、藤本 泰之、田中 智弘、西村 明幸、東泰孝、西田 基宏。
2. 発表標題 抗がん剤の副作用を軽減する新規TRPC3-Nox2複合体阻害薬の探索
3. 学会等名 第35回日本薬学会九州支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山 和宏、富田 拓郎、藤本 泰之、田中 智弘、遠山 千恵実、西村 明幸、東 泰孝、西田 基宏
2. 発表標題 抗がん剤の副作用を軽減する新規TRPC3-Nox2複合体阻害薬の同定
3. 学会等名 第92回薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhiro Nishiyama, Yasu-Taka Azuma, Hidemitsu Nakajima and Tadayoshi Takeuchi
2. 発表標題 Renal impairment following 5/6 nephrectomy disturbs the intestinal microbiota and alters intestinal motility
3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会 (The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----