

令和 3 年 5 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22443

研究課題名（和文）GPCRによる細胞興奮性獲得の分子制御機構とその生理学的意義の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism underlying induction of spontaneous excitation by GPCR and its physiological significance

研究代表者

西田 基宏（Nishida, Motohiro）

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：90342641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：Gタンパク質共役型受容体（GPCR）は細胞外の物理化学的情報を細胞内情報に変換し伝達する膜タンパク質である。多くのGPCRは特有の化学物質をリガンドとし、リガンドがGPCRに結合することでシグナルがONになる。我々は、250種類のGPCRのうち、少なくとも7種類のGPCR（GPR-X）がリガンド非依存的に活性化する性質（自発活性）を持つことを新たに見出した。遺伝子改変マウスを用いた解析の結果、7種のGPR-Xの1つであるP2Y6Rが心筋のストレス抵抗性を制御することが明らかとなり、新たな治療標的としてのGPR-Xsの可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Gタンパク質共役型受容体（GPCR）は、細胞外ホルモン情報を細胞内に伝達する重要なセンサーであり、創薬標的としても非常に注目される膜タンパク質である。教科書的には、GPCRはホルモンや神経伝達物質などのリガンドによってのみ活性化されると信じられてきたが、我々はGPCRが存在する場の環境変化によって自発的に活性化することを明らかにした。この知見は、リガンド-GPCR結合様式でのみ考えられてきたGPCR創薬研究を見直すきっかけとなり、新たな疾患治療のストラテジー構築につながる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：G protein-coupled receptors (GPCRs) are membrane proteins that convert extracellular physicochemical stimuli into intracellular signal transduction. Every GPCR uses their characteristic chemical substance as a selective ligand, and the signal is turned on when the ligand binds to the GPCR. We newly found that out of 250 types of GPCRs, at least 7 types of GPCRs (GPR-Xs) have a ligand-independent activation property (i.e., spontaneous activity). We revealed using genetically modified mice that P2Y6R, one of the GPR-Xs, regulates cardiac stress resistance, and suggested a potentiality of these GPCRs as new therapeutic targets.

研究分野：薬理学、生理学

キーワード：GPCR 自発活性 炎症

1. 研究開始当初の背景

これまで、後天的な環境要因が心臓の形態構造を変化させ、心機能不全を誘導するメカニズムを細胞内シグナル伝達の視点から明らかにしてきた。三量体や低分子量・ダイナミン様 G タンパク質が活性酸素の標的分子となることを世界に先駆けて明らかにし、各 G タンパク質の酸化修飾の病態生理学的意義を明らかにした (Nature, 2000; Nature Chem Biol, 2012. Nature Commun, 2017; Science Signal., 2019)。また、圧負荷で誘発される心筋の線維化に三量体 G_{12/13} タンパク質 - Rho シグナリングが関与すること、そのトリガー GPCR が心筋細胞のプリン作動性 P2Y6 受容体であることを見出した (Nishida M et al, EMBO J, 2008)。P2Y6 受容体は加齢依存的にアンジオテンシン受容体とヘテロ二量体を形成し、加齢高血圧リスクを高めることも明らかにした (Science Signal, 2016)。P2Y6 受容体を心筋特異的に過剰発現させたマウスは、血行力学的負荷に対して脆弱性を示すことが明らかとなり、その分子制御機構を調べていく過程で本提案の自発活性の発見に至った。

遺伝子導入・発現させただけで、リガンド非依存的に細胞内シグナルを活性化する GPCR 群 (GPR-X) の存在を初めて明らかにした。GPR-X は、培養ディッシュやコーティングの種類など外環境に大きく依存することから、既存の GPCR 活性化経路とは異なる機構で興奮性を誘導していると考えられる。GPR-X は病態時の心臓でも発現が増加しており、左心室の期外収縮 (不整脈) の誘発にも関与している可能性が考えられる。一方で、GPR-X の一つである P2Y6R を欠損 (P2Y6R-KO) させたマウスの表現型が野生型のそれとほとんど変わらないことも確認している。これらの知見は、GPR-X の自発活性が、心臓のペースメイキングや概日リズムとは全く異なる「後天的な興奮性獲得」に関与することを強く示唆している。P2Y6R-KO マウスに炎症性腸疾患モデルを掛け合わせたところ、腸組織の炎症や突然死が顕著に抑制されることがわかった。腸組織における P2Y6R の役割に注目し始めたところ、結腸における蠕動運動リズムと P2Y6R 発現細胞の興奮リズムが似たパターンを示すことがわかってきた。

2. 研究の目的

本研究では、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のリガンドに依存しない新たな機能 (Moonlighting function) の動作原理とその生理的意義の解明を目指した。我々は、たった 1 つの GPR-X 遺伝子を非興奮性の細胞株に発現させるだけで律動的な細胞内 Ca²⁺濃度上昇 (Ca²⁺オシレーション) を惹起することを偶然発見した (3 種類の細胞株で再現性を確認)。GPR-X 群の一つである P2Y6R を発現させることで誘導される筋芽細胞の興奮性獲得は、リガンド結合欠損 P2Y6R 変異体を発現させても観察され、アレスチン欠損細胞株に P2Y6R 変異体を発現させても観察された。P2Y6R は組織普遍的に発現しており、P2Y6R-KO マウスは成長がやや遅いものの、成熟後の表現型には異常がないことも確認できている。こうした知見から、GPR-X の自発能は後天的に獲得される可能性が示されている。そこで本研究では、GPR-X が興奮性を獲得する分子機構を細胞レベルで解析するとともに、P2Y6R 変異マウスを例に、GPR-X 興奮性獲得の (病態) 生理的意義を調べた。

3. 研究の方法

1. GPCR による細胞興奮性獲得の分子機構解析

東北大薬・青木淳賢教授 (現・東京大薬教授) が保有する約 300 種類の GPCR を用いて、GPR-X と同様に自発活性を持ちうる GPCR を同定し、in silico 相同性検索により興奮性獲得に必要な部位の探索を行った。同時に、いくつかのアミノ酸変異体を作成し、恒常的に興奮性を獲得できる変異体を探索した。また、FLAG 標識を付加した GPR-X を アレスチン欠損線維芽細胞に安定発現させ、自発活動を惹起できる培養ディッシュと惹起できない培養ディッシュそれぞれに細胞を播種した。標識タグ抗体を用いて免疫沈降を行い、興奮性獲得依存的に相互作用が増加するタンパク質 (細胞外基質) を質量分析で探索した。

2. P2Y6R-KO マウスを用いた心臓のストレス抵抗力の評価

P2Y6R-KO マウスは、littermate の野生型マウスと比べて表現型 (行動・心血管機能・代謝能など) に目立った違いはない。そこで、P2Y6R-KO マウスに大動脈狭窄を外科的に施し、心臓の圧負荷ストレスに対する抵抗力を評価した。

4. 研究成果

1. GPCR による細胞興奮性獲得の分子機構解析

約 300 種類ある GPCR を 5 種類ずつに分け、HeLa 細胞株に発現させた後、細胞内 Ca²⁺濃度を計測した。通常のガラスボトムディッシュに播種した GPCR 一過的発現 HeLa 細胞では何ら変化認められなかったのに対し、シリコンチャンパーディッシュに播種した HeLa 細胞では、P2Y6R 以外に 6 種類の GPCR (GPR-X 群と呼ぶ) が自発的な Ca²⁺ 振動 (オシレーション) を示すことがわかった。これら 7 種の GPR-X 群のうち、2 種類について、リガンド及び阻害薬が報告されているものの、リガンドを処置しても自発活性に類似した Ca²⁺ オシレーションは再現されず、阻害薬

を処置しても自発活性は阻害されなかった。以上の結果から、GPR-X による細胞興奮性獲得はリガンドに依存しない可能性が示された。

次に、P2Y6R をベースに自発活性に関わるアミノ酸部位の探索を行った。リガンドとの結合に関わる細胞外ドメインを置換した P2Y6R 変異体でも Ca^{2+} オシレーションは観察されたが、細胞外のインテグリン結合ドメイン (RGD 配列) を RGE に置換した変異体では Ca^{2+} オシレーションが発生しなくなった。P2Y6R と Gタンパク質との共役に関わるアミノ酸を置換した変異体 P2Y6R (AAY) でも同様に、自発的な Ca^{2+} オシレーションが消失した。他 6 種の GPR-X には RGD 配列がないことを考慮すると、RGD 配列の変異は G_q タンパク質と P2Y6R との共役を阻害することで、見かけ上、自発活性を消失させたと考えられる。そこで、すでに 3 次元構造が解かれている 2 アドレナリン受容体を構造基盤として、7 種の GPR-X を対象に *in silico* 解析を行い、相同性の高いアミノ酸配列部位の予測を行った。残念ながら、想定されるアミノ酸配列の中に既知のドメイン配列は認められなかった。現在、相同性の高かったアミノ酸配列部位を対象に、一か所ずつアミノ酸を置換した変異体を作成している。

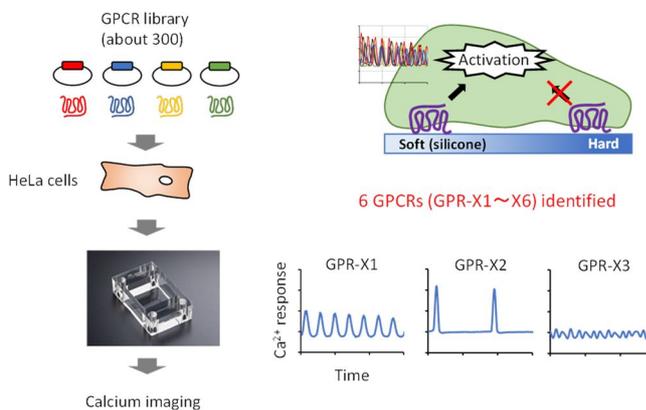


図 1 自発活性をもつ GPCR (GPR-Xs) のスクリーニング概要

2 . P2Y6R-KO マウスを用いた心臓のストレス抵抗性の評価

P2Y6R 欠損マウスでは TAC 処置後の生存率が顕著に低下し、生存マウスを比較しても、野生型のそれと比べて、著しい心肥大と線維化、心機能低下の亢進が認められた。一方、心筋特異的に P2Y6R を過剰発現させたマウスに TAC 処置したところ、やはり心機能が著しく低下し、特に間質の線維化が強く亢進されていた。この結果は、我々が以前 P2Y6R 阻害薬を用いて報告した知見と一致していた。P2Y6R をノックダウンさせたラット新生児心筋細胞において、低浸透圧ストレスに対する細胞肥大および細胞障害は有意

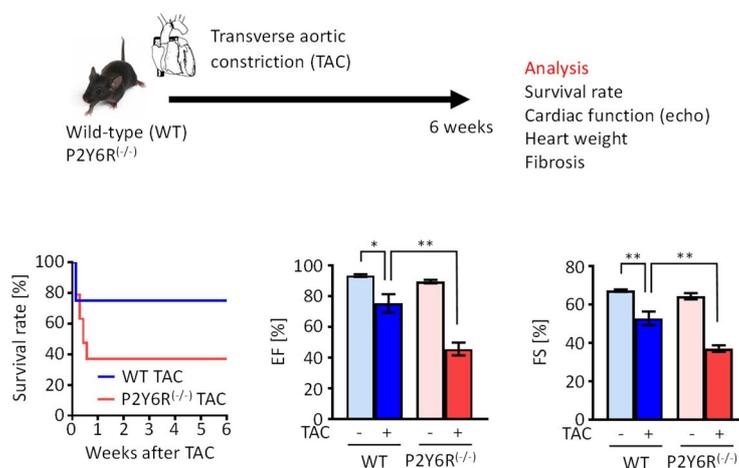


図 2 P2Y6R 欠損による心筋の圧負荷抵抗性の減弱

に抑制されていた。以上の結果より、心筋細胞の P2Y6R は物理的ストレスに対する心筋リモデリングや障害を仲介する役割を担うことが明らかとなった (Scientific Reports, 2020)。一方で、全身 P2Y6R 欠損マウスでも TAC による心不全が悪化したことから、マクロファージや線維芽細胞などの非心筋細胞 P2Y6R は心筋保護的に働く可能性も示された。さらに栄養飢餓によって誘発される心筋萎縮に対する P2Y6R の関与も検討した結果、栄養飢餓や低酸素ストレスでは心筋細胞から遊離される ATP が P2Y2 受容体を介して心筋萎縮を惹起することも明らかとなり、この系に P2Y6R は関与しないことも示された (Scientific Reports, 2019)。

以上より、心筋細胞の P2Y6R が線維化を誘導する引き金 GPCR として働くこと、P2Y6R の活性化にはリガンドに依存しない経路が存在することも明らかとなった。自発活性化型 P2Y6R の心筋細胞における役割 (線維化の引き金) は、非心筋細胞における役割 (心筋保護) と相反するものであることも示唆され、P2Y6R の多彩な生理機能が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Shimoda K, Nishimura A, Sunggip C, Ito T, Nishiyama K, Kato Y, Tanaka T, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Nishida M.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Modulation of P2Y6R expression exacerbates pressure overload-induced cardiac remodeling in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70956-5.	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 Shiratori-Hayashi M, Yamaguchi C, Eguchi K, Shiraishi Y, Kohno K, Mikoshiba K, Inoue K, Nishida M, Tsuda M.	4. 巻 S0091-6749(20)
2. 論文標題 Astrocytic STAT3 activation and chronic itch require IP3R1/TRPC-dependent Ca ²⁺ signals in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Allergy Clin Immunol.	6. 最初と最後の頁 31105-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2020.06.039.	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, Toyama C, Kato Y, Tanaka T, Nishimura A, Nagata R, Mori Y, Nishida M.	4. 巻 44(3)
2. 論文標題 Deletion of TRPC3 or TRPC6 fails to attenuate the formation of inflammation and fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 431-436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00903.	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 Sudi SB, Tanaka T, Oda S, Nishiyama K, Nishimura A, Sunggip C, Mangmool S, Numaga-Tomita T, Nishida M	4. 巻 9(1)
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) 10.1038/s41598-019-46252-2.	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 Nishiyama K, Numaga-Tomita T, Fujimoto Y, Tanaka T, Toyama C, Nishimura A, Yamashita T, Matsunaga N, Koyanagi S, Azuma YT, Ibuki Y, Uchida K, Ohdo S, Nishida M.	4. 巻 176(18)
2. 論文標題 Ibudilast attenuates doxorubicin-induced cytotoxicity by suppressing formation of TRPC3-Nox2 protein complex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br J Pharmacol.	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) 10.1111/bph.14777.	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 Nishimura A, Shimoda K, Tanaka T, Toyama T, Nishiyama K, Shinkai Y, Numaga-Tomita T, Yamazaki D, Kanda Y, Akaike T, Kumagai Y, Nishida M	4. 巻 12(587)
2. 論文標題 Depolysulfidation 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 pii: eaaw1920.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aaw1920.	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, Shimauchi T, Oda S, Tanaka T, Nishiyama K, Nishimura A, Birnbaumer L, Mori Y, Nishida M.	4. 巻 33(9)
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 FASEB J.	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) 10.1096/fj.201802811R.	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 Ihara H, Kakihana Y, Yamakage A, Kai K, Shibata T, Nishida M, Yamada KI, Uchida K.	4. 巻 294(4)
2. 論文標題 2-Oxo-histidine-containing dipeptides are functional oxidation products.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 1279-1289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.006111.	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 Kazuhiro, Tanaka Tomohiro, Nishimura Akiyuki, Nishida Motohiro	4. 巻 14
2. 論文標題 TRPC3-Based Protein Signaling Complex as a Therapeutic Target of Myocardial Atrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 123 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1874467213666200407090121	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 Nishida M, Tanaka T, Mangmool S, Nishiyama K, Nishimura A.	4. 巻 9(1)
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 J Lipid Atheroscler.	6. 最初と最後の頁 124-139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12997/jla.2020.9.1.124.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

心循環シグナル研究部門 http://www.nips.ac.jp/circulation/
--

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
研究協力者	西村 明幸 (Nishimura Akiyuki)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	西山 和宏 (Nishiyama Kazuhiro)		
研究協力者	田中 智弘 (Tanaka Tomohiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
マレーシア	Sabah大学			
タイ	Mahidol大学			