

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 7 月 31 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460061

研究課題名(和文)細胞表面の局在量調節をコンセプトとするGPCR制御剤開発のための基盤研究

研究課題名(英文)fundamental Study on the mechanism of GPCR trafficking to cell surface

研究代表者

中村 元直 (Nakamura, Motonao)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：40431762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、LTB4受容体(BLT1)のリン酸化がLTB4濃度の上昇で亢進し、これが引金となりBLT1を介する細胞応答が変化することを見つけた。BLT1は、周辺のLTB4が低濃度から高濃度へ変化することを感じてシグナル変換すると考える。炎症時、局所産生されたLTB4は血中放出され、好中球はこの際の濃度勾配を頼りに局所へ向かう。この濃度勾配は遊走の方向決定に重要とされてきたが、我々はこれに新たな意義を加えたい。本研究では、BLT1には高親和性と低親和性の少なくとも2つのリガンド認識構造が存在し、それぞれが初期応答(低濃度下での遊走)と終末応答(局所高濃度下での脱顆粒)に関わることを提唱する。

研究成果の概要(英文)：BLT1 is expressed in phagocytic and immune cells and plays crucial roles in various inflammatory diseases. Although BLT1 is phosphorylated upon stimulation with LTB4, precise functions of this modification remain elusive. We determined all phosphorylated sites, basal and ligand-induced modification residues of BLT1. The ligand-induced phosphorylations occurred at different concentration of LTB4, and each modification facilitated basal phosphorylations. Because the concentration of LTB4 exposed to BLT1 on leukocytes is raised gradually during migration toward inflammatory sites, the degree of phosphorylations could be enhanced in parallel with increase in LTB4. At high LTB4, deficiencies in the phosphorylations impaired chemotaxis and degranulation in BLT1 expressing cells. These results suggest that the phosphorylations of BLT1 recognize a rise in LTB4, resulting in the precise migration toward inflammatory regions and initiation of local responses, e.g., degranulation.

研究分野：生化学、分子生物学

キーワード：G蛋白質共役型受容体蛋白質共役型受容体 ロイコトリエンB4 リン酸化 BLT1

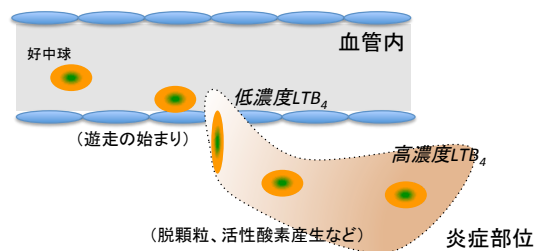
## 1. 研究開始当初の背景

生理活性脂質の1つであるLTB<sub>4</sub>は、好中球やマクロファージに対して強力な遊走活性を示す生体内物質である。一般に、こうした生理活性脂質は細胞表面に局在する特異的なGPCRに結合することで細胞に遊走の開始を伝える。LTB<sub>4</sub>の場合、好中球やマクロファージが持つGPCRタイプのLTB<sub>4</sub>特異的受容体 (BLT1) に結合することで生理活性を發揮することが知られており、LTB<sub>4</sub>のBLT1への結合は、炎症、アレルギーや関節リウマチなどの発症に深く関与することがBLT1遺伝子破壊マウスの解析などから示唆されている。こうした背景からBLT1は長年、創薬標的として注目されてきたが、未だにこれら疾患に対してBLT1特異的拮抗剤が臨床応用されるに至っていない。加えて、GPCR型受容体の阻害薬開発に関しては、その重要性から (臨床薬の40%以上を占める) 新しい観点のGPCR機能抑制の戦略も求められている。そこで本研究が目指すものは、BLT1を介するシグナル伝達に新たな調節機構を見出し、この発見から斬新なBLT1創薬のプラットフォームを提供することである。古典的なGPCR活性化調節の解釈は、特異的なアゴニストの結合がトリガーとなり、活性が単純に「OFF」から「ON」に切り替わるというものであった。しかし、最近のインバースアゴニストやバイアス型リガンドの発見から、同一GPCRであっても結合するリガンドの違いで伝わるシグナルの経路が異なるものが存在することが明らかになった。我々が本課題で提唱する新たなシグナル伝達機構は、これらとは全く異なるものである。同一GPCRに対し、1つのリガンドが濃度の変化によって伝えるシグナルの経路を切り替える例であり、BLT1の場合、C末端領域のリン酸化修飾亢進がその引金になるという発見である。

## 2. 研究の目的

我々は、LTB<sub>4</sub>刺激濃度の上昇でBLT1のリン酸化修飾が亢進する現象を発見した。また、BLT1のリン酸化修飾に呼応して細胞応答も変化することを見出した。本研究では、LTB<sub>4</sub>濃度依存的なBLT1のリン酸化修飾と細胞応答変化が連関することを確認し、その詳細な機構解明に加え、この調節の生理学的意義を明らかにすることを期間内の目標とした。炎症時、局所で産生されたLTB<sub>4</sub>は血中に放出され、好中球はこの際のリガンド濃度勾配を頼りに局所へ向かう。これまでこの濃度勾配は遊走の方向決定のみに重要とされてきたが、我々はこれに新たな意義を加えたい。我々は

好中球がもつLTB<sub>4</sub>/BLT1経路に関し、濃度勾配下で以下のような仮説を立てている。(1) 低濃度LTB<sub>4</sub>によるBLT1活性化 (遊走開始) → (2)BLT1の構造変化によるLTB<sub>4</sub>親和性の低下 → (3)高濃度LTB<sub>4</sub>による活性化 (C末端領域のリン酸化亢進) → (4)シグナル経路の変換 → (5)新たな細胞応答の始まり (炎症局所での脱顆粒など) (下図参照)。



**上図説明:** 炎症時、局所で産生されたLTB<sub>4</sub>は血中に放出され、濃度勾配が形成される。好中球はこの濃度勾配を頼りに局所へ向かう。同時に、高濃度LTB<sub>4</sub>領域に到達するとBLT1を介するシグナル経路の切り替えが起こり、脱顆粒などの細胞応答が始まると我々は考える。

即ち、このリガンド濃度勾配を利用したシグナル変換を立証し、機構を解明することが本研究の目標であった。達成できれば、好中球の脱顆粒や活性酸素の産生が初期の遊走段階では起こらず、炎症局所に限定した応答である理由が明らかになる (新しいGPCRシグナル伝達の調節機構の提唱)。また、この炎症局所に限定したシグナル伝達の切り替え機構が解明できれば、これを作用ポイントとした新たな抗炎症薬開発にも繋がる。現在、GPCR創薬の風景が変わりつつある。本課題で新しいGPCR創薬の情報基盤の充実に貢献することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

上述の作業仮説を立証するために期間中に以下の実験を進めた。

(1) **高濃度LTB<sub>4</sub>刺激によるBLT1リン酸化亢進の確証:** HeLa細胞をホストとし、BLT1のリン酸化度合の変化をPhos-tag SDS-PAGE法で評価する。

(2) **BLT1の表在確認:** 作業仮説が正しいならば、BLT1は低濃度LTB<sub>4</sub>で初期活性化 (例えば遊走惹起) されても細胞内に取込まれることはなく、細胞表面に留まるはずである。これを東京大学大学院工学研究科

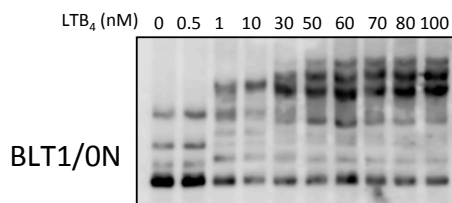
の長棟輝行教授が開発した表在 GPCR 特異的な蛍光標識法を活用し、共焦点蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス解析で解析する。

**(3) BLT1 リン酸化亢進とシグナル変換の意義**: BLT1 の全リン酸化部位 (7箇所) は既に決定し、その部位変異体も作製した。BLT1 のリン酸化は、恒常的な部位が5箇所、リガンド刺激依存的な部位が2箇所であった。そこで変異体は、恒常的な部位のみ ( $\Delta b\text{-phos}$ )、誘導的な部位のみ ( $\Delta i\text{-phos}$ )、全部位 ( $\Delta\text{phos}$ ) の3種類を作製した。このリン酸化欠損 BLT1 を HeLa 細胞、CHO-K1 細胞、RBL-2H3 細胞などで発現させ、低濃度、高濃度 LTB<sub>4</sub> で刺激した際の細胞応答 (遊走能、脱顆粒、活性酸素産生など) を正常型 BLT1 発現細胞と比較し、差異を見出す。

**(4) リン酸化欠損型の応答異常の原因解明**: 受容体活性化後の cAMP 産生、ERK 活性、Akt 活性などを調べ、リン酸化修飾の欠損で異常となるシグナル伝達経路を見出す。また、責任キナーゼの同定も進める。最近、GPCR の恒常的リン酸化修飾に GRK5/6 が関与するとの報告がある (Lingyong et al, *JBC*, 2015)。こうした情報も参考にし、阻害剤や siRNA 法などを駆使して解析を進める。

#### 4. 研究成果

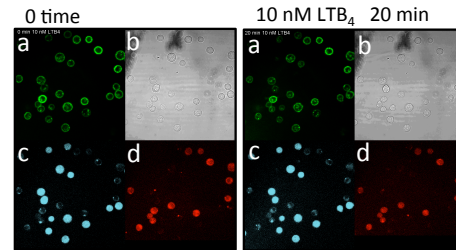
**(1) 高濃度 LTB<sub>4</sub> 刺激による BLT1 リン酸化亢進の確証**: リガンドの低濃度と高濃度の2点比較のみならず、細胞周辺を低濃度から高濃度へ勾配的に変化させ、リン酸化が亢進する濃度域を決定した。



**上図説明**: BLT1/ON (N型糖鎖欠失型) のリン酸化は 1nM 付近と 30~50nM 付近の2段階のリガンド濃度変化で亢進した。また、HeLa 細胞での強制発現系のみならず、ヒト血球系細胞株 (HL60 細胞など) やヒト白血球を用いて内在性 BLT1 の解析も行い、生体内を模倣した実験も行い、結果を得た。

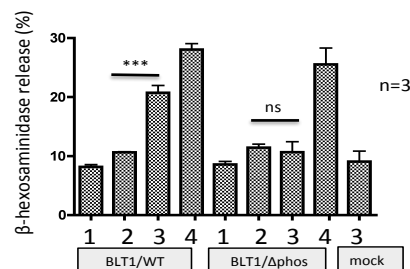
**(2) BLT1 の表在確認**: BLT1 は低濃度 LTB<sub>4</sub> で初期活性化 (例えば遊走惹起) されても

細胞内に取込まれることはなく、細胞表面に留まると考えた。これを東京大学大学院工学研究科の長棟輝行教授が開発した表在 GPCR 特異的な蛍光標識法を活用し、共焦点蛍光顕微鏡を用いたタイムラプス解析で確認できた (下図)。



**上図説明**: 表在 GPCR 特異的な蛍光標識法で、Ba/F3 細胞の表面に発現させた BLT1 を特異的に蛍光標識した。リン酸化欠失型 BLT1 (BLT1/ON  $\Delta\text{phos}$ ) を青色染色、正常 BLT1 (BLT1/ON) を赤色染色後、コラーゲン基盤上で共存接着培養させて観察している。[a]: 蛍光標識細胞を 10nM LTB<sub>4</sub> で 20 分間刺激し、刺激前 (0time) との標識受容体の局在を比較した。[c]: [a]のうち、リン酸化欠失型 BLT1 発現細胞を青色発色で同定した。[d]: [a]のうち、正常 BLT1 を赤色発色で同定した。

**(3) BLT1 リン酸化亢進とシグナル変換の意義**: BLT1 の全リン酸化部位 (7箇所) は既に決定し、その部位変異体も作製した。BLT1 のリン酸化は、恒常的な部位が5箇所、リガンド刺激依存的な部位が2箇所であった。そこで変異体は、恒常的な部位のみ ( $\Delta b\text{-phos}$ )、誘導的な部位のみ ( $\Delta i\text{-phos}$ )、全部位 ( $\Delta\text{phos}$ ) の3種類を作製した。このリン酸化欠損 BLT1 を HeLa 細胞、CHO-K1 細胞、RBL-2H3 細胞などで発現させ、低濃度、高濃度 LTB<sub>4</sub> で刺激した際の細胞応答を正常型 BLT1 発現細胞と比較し、高濃度リガンド刺激時における遊走能と脱顆粒能に関して正常 BLT1 を介する応答と有意な差異を見出した (下図)。



**上図説明**: RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒実験。1; 無刺激、2; 10nM LTB<sub>4</sub> (20分)後に vehicle (20分)追加、3; 10nM LTB<sub>4</sub> (20分)後に 100nM

LTB<sub>4</sub>(20分)追加、4; イオノフォア (A23187, 5 μM)。リン酸化欠損型 (BLT1/Δphos) では高濃度刺激後 (カラム 3) の脱顆粒応答が正常 BLT1 と比較して低下した。

(4) **リン酸化欠損型の応答異常の原因解明**: リガンド刺激後に細胞内で惹起される cAMP 産生、ERK 活性、Akt 活性などを調べ、リン酸化修飾の欠損でこれらいずれの応答も正常型と比較して異常であることを見出した。

上記の全ての解析結果をまとめ、現在、論文投稿準備中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

(1) Modong Tan, Satoshi Yamaguchi, Shinya Yamahira, Motonao Nakamura, Teruyuki Nagamune: Quantitative image cytometry for analyzing intracellular trafficking of G protein-coupled receptors on a chemically-trapping single cell array. *Lab on a Chip (Communications)* in press

(2) 安田大恭, 中村元直: 薬理的シャペロン-小胞体蓄積 GPCR を形質膜へ発現させる特異的リガンド: 特集「GPCR 研究の最前線 2016」, 医学のあゆみ, 第 256 巻 (2016) 385-392.

<http://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=286490&AC=15947>

(3) Daisuke Yasuda, Yuki Imura, Satoshi Ishii, Takao Shimizu, Motonao Nakamura: Atypical N-glycosylation motif of human GPR109A required for surface expression and intracellular signaling. *The FASEB J.*, Vol. 29 (2015) 2412-2422.

DOI: 10.1096/fj.14-267096

(4) Tetsuya Hori, Motonao Nakamura, Takehiko Yokomizo, Takao Shimizu, Masashi Miyano: The leukotriene B4 receptor BLT1 is stabilized by transmembrane helical capping mutations. *Biochemistry and Biophysics Reports*, Vol. 4 (2015) 243-249.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405580815000874>

(5) Miho Asahara, Nobuko Ito, Takehiko Yokomizo, Motonao Nakamura, Takao

Shimizu, Yoshitsugu Yamada: The absence of the leukotriene B4 receptor BLT1 attenuates peripheral inflammation and spinal nociceptive processing following intraplantar formalin injury. *The Molecular Pain*, Dec:11(1) (2015)  
DOI:10.1186/s12990-015-0010-9.

(6) 栗原裕基, 中村元直: Gタンパク質共役型受容体 (GPCR): 生体の科学, 第 66 (5) 巻 (2015) 2-3.

<http://www.igaku-shoin.co.jp/journalDetail.do?journal=36280>

(7) Wanjun Lan, Satoshi Yamaguchi, Teruyasu Yamamoto, Shinya Yamahira, Modong Tan, Naoka Murakami, Jingyan Zhang, Motonao Nakamura, Teruyuki Nagamune: Visualization of the pH-dependent dynamic distribution of G2A in living cells. *The FASEB J.*, Vol. 28 (2014) 3965-3974.

DOI: 10.1096/fj.14-252999

(8) Hayakazu Sumida, Keisuke Yanagida, Yoshihiro Kita, Jun Abe, Kouji Matsushima, Motonao Nakamura, Satoshi Ishii, Shinichi Sato, Takao Shimizu: Interplay between CXCR2 and BLT1 Facilitates Neutrophil Infiltration and Resultant Keratinocyte Activation in a Murine Model of Imiquimod-Induced Psoriasis. *J. Immunol.*, Vol. 192 (9) (2014)

4361-4369.  
DOI: 10.4049/jimmunol.1302959

[学会発表] (計 9 件)

(1) 前川直斗、山本千晶、藤原友幹、中村元直; ヒト苦味受容体の味細胞以外の組織での発現について~株化口内細胞における発現解析、日本組織培養学会、2017年6月30~7月1日、岡山理科大学 (岡山)

(2) 山本千晶、前川直斗、藤原友幹、中村元直; ヒト血球系細胞株における 25 種類の苦味受容体の発現解析、日本組織培養学会、2017年6月30~7月1日、岡山理科大学 (岡山)

(3) 中村元直; Phosphorylations of BLT1 receptor: necessary for sufficient cell responses at high concentration of LTB<sub>4</sub>、日本組織培養学会、2017年6月30~7月1日、岡山理科大学 (岡山)

(4) 前川直斗、山本千晶、藤原友幹、中村元直; ヒトの株化口内細胞における苦味受容体の発現解析、日本生化学会年会、2016年9月

25～27日、東北大学（仙台）

(5) 山本千晶、前川直斗、藤原友幹、中村元直；25種類の苦味受容体のヒト血球系細胞株での発現解析、日本生化学会年会、2016年9月25～27日、東北大学（仙台）

(6) 談莫東、山口哲志、山平真也、中村元直、長棟輝行；一細胞アレイを用いた pH 応答性 GPCR の細胞内動態解析、第 67 回（2015 年度）日本生物工学会大会、2015 年 10 月 26～28 日（発表 10/26）、城山観光ホテル、（鹿児島）

(7) Modong Tan, Shinya Yamahira, Satoshi Yamaguchi, Motonao Nakamura, Teruyuki Nagamune; Development of the image cytometry method to analyze g-protein coupled receptor kinetics in the cell. The international chemical congress of Pacific Basin Societies 2015, Dec. 15-20, Honolulu, Hawaii (USA)

(8) 談莫東、山平真也、山本晃康、山口哲志、山平真也、中村元直、長棟輝行；シンポジウム「細胞アッセイ技術の現状と将来」；GPCR 動態解析のためのイメージサイトメトリー技術の開発、細胞アッセイ研究会、2015 年 1 月 13 日、東京大学生産技術コンベンションホール（東京）

(9) Miho Asahara, Nobuko Ito, Yoshitsugu Yamada, Takehiko Yokomizo, Motonao Nakamura, Takao Shimizu; Reduced local inflammation affected the attenuation of pain behavior following formalin injection in BLT1 deficiency mice, The International Association for the Study of Pain (国際疼痛学会), 2014, Oct. 6-11, Buenos Aires (Argentina)

〔図書〕（計 1 件）

村上誠、原俊太郎、中村元直 訳、東京化学同人、エリオット 生化学・分子生物学 第 5 版、2016 年、全 583 ページ（324-506 ページ担当）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://www.dls.ous.ac.jp/staff2/nakamura.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村元直 (Nakamura Motonao)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：40431762

### (2) 研究分担者

なし ( )

### (3) 連携研究者

なし ( )

### (4) 研究協力者

なし ( )