

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 5日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659042

研究課題名（和文） アミノ酸作動性チャネルによる細胞外マトリックス制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of extracellular matrix homeostasis via amino acid-operated cation channels

研究代表者

西田 基宏 (NISHIDA MOTOHIRO)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：90342641

研究成果の概要（和文）：

生体内のアミノ酸は蛋白質の構成成分としてだけでなく、細胞内シグナル伝達経路を活性化する細胞外の栄養リガンドとしても働いている。生体内のアミノ酸バランスの破綻と様々な疾患との関連が示唆されているものの、両者を直接結びつけるアミノ酸の標的センサー分子は見つかっていなかった。我々は、プロリン、ヒドロキシプロリンなどの細胞外基質の構成アミノ酸によって直接活性化されるカチオンチャネル（Proline-activated Channel: PRAC）を同定した。心筋細胞・心線維芽細胞においては、ジアシルグリセロール活性型の TRPC カチオンチャネル（TRPC3 と TRPC6）が PRAC の構成サブユニットとして関与することが明らかとなり、TRPC3 または TRPC6 を欠損させることでアミノ酸刺激によるカチオン流入とそれに付随して起こる細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇が完全に抑制された。また、TRPC3 または TRPC6 を欠損させたマウスの心臓においてオートファジーの強い誘導が観察された。初代培養ラット新生児心筋細胞や心線維芽細胞の TRPC3/6 を阻害した際にもオートファジーの誘導が観察されたことから、これらのシグナルは蛋白質のリサイクリングと密接に関わる可能性が示された。逆に、プロリン感受性を示さない細胞に TRPC3 と TRPC6 を共発現させることでプロリン感受性が確認できたことから、TRPC3/6ヘテロ4量体チャネルが PRAC の分子実体あるいは構成サブユニットとして機能する可能性が初めて示された。

研究成果の概要（英文）：

Amino acids *in vivo* work not only as components of proteins, but also specific ligands activating intracellular nutrition signalings. Although collapse of amino acid balance *in vivo* has been implicated in the development of several diseases, molecular target(s) connecting amino acid imbalance directly to diseases have not been identified. We identified proline-activated cation channel (PRAC), which is directly activated by extracellular matrix-composing amino acids, such as proline, hydroxyproline, alanine, and glycine. We demonstrated that diacylglycerol-activated transient receptor potential canonical (TRPC) channels (TRPC3 and TRPC6) participated as major components of PRAC in primary-cultured cardiomyocytes and cardiac fibroblasts. Deletion of TRPC3 or TRPC6 abolished amino acid-induced cation influx and subsequent increase in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration. We also found that autophagy was significantly induced in TRPC3- and TRPC6-deficient mouse hearts, and in cardiomyocytes treated with TRPC3/6 inhibitor. These findings strongly suggest that PRAC plays a critical role in protein recycling in the heart. On the other hand, overexpression of TRPC3 and TRPC6 conferred susceptibility to amino acid-induced  $Ca^{2+}$  signaling in PRAC-nonexpressing cells. These results strongly suggest that TRPC3/6 heteromultimer channels function as PRAC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：シグナル伝達、イオンチャネル、アミノ酸

### 1. 研究開始当初の背景

蛋白質の構成成分であるアミノ酸は、細胞内情報伝達系を活性化する細胞外アゴニストとしても機能している。アミノ酸シグナルの生理的役割については、L-グルタミン酸・グリシン・D-セリンに代表されるように、シナプス可塑性や記憶学習への関与がよく知られている。L-ロイシンは栄養シグナルを活性化し、タンパク合成を促進することが知られている。いずれの場合も、アミノ酸は細胞膜上の受容体・イオンチャネル・トランスポーターを介してシグナル伝達経路を活性化している。最近では、アミノ酸バランスの破綻と疾患との関係を示唆する知見もいくつか報告され、アミノ酸の標的分子および標的分子の生理機能に対する関心が高まってきている。

我々は世界に先駆けて、L-プロリンで直接活性化されるCa<sup>2+</sup>透過型チャネル (PRAC) を同定した。PRACは組織普遍的に発現しているものの、その役割については全くわかっていない。一方、L-プロリンの代謝機能欠損マウスが、組織中のL-プロリン濃度の上昇に伴って、慢性炎症や精神分裂症を引き起こすことが報告されている (Nat. Genet., 1999; Nat. Neurosci., 2005)。

### 2. 研究の目的

本研究では、①細胞外基質タンパクを構成する主要アミノ酸によってのみ PRAC が活性化される、②不全心筋やてんかん脳組織においてプロリン代謝酵素遺伝子の発現が低下する、③細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇がコラーゲン分解能を抑制する、という3つの予備知見をもとに、PRACを介するCa<sup>2+</sup>流入 (プロリンシグナリング) が細胞外マトリックス形成 (線維化) に対する負のフィードバック制御機構として働くことを明らかにする。また、プロリン代謝異常マウスや心不全モデルマウスを用いて、PRACがアミノ酸バランス異常による病態形成の仲介因子となることを示す。

### 3. 研究の方法

・細胞外基質代謝におけるPRACの役割解析  
 (1)PRAC誘発性のCa<sup>2+</sup>シグナリングがMMPs酵素活性に及ぼす効果を検討する。  
 (2)Myocardin-related transcription factor (MRTF)の核移行や転写活性を指標に、

PRAC誘発性のCa<sup>2+</sup>シグナリングがMRTFに及ぼす効果を検討する。

(3)PRAC阻害剤がMRTFを介してコラーゲン産生 (線維化) を促進するかどうか検討する。

#### ・PRACの電気生理学的特性解析

(1)全アミノ酸に対するCa<sup>2+</sup>応答性を調べる。  
 (2)flagタグを付加したPRACサブユニット遺伝子をHEK293細胞に発現させ、局在観察と同時にTRPチャネルと複合体を形成するかどうか免疫沈降法を用いて確認する。  
 (3)PRAC陽性細胞におけるL-プロリン誘発性の電流とPRAC過剰発現HEK293細胞株におけるそれを比較し、電流量の振幅あるいは持続時間の観点から複合体形成の意義を明らかにする。

#### ・心臓リモデリングにおけるPRACおよびプロリン代謝酵素の発現変化の解析

PRACサブユニット遺伝子を欠損させたマウスを作成し、心臓における表現型を観察する。

### 4. 研究成果

#### ・PRACのチャネル特性解析

ラット新生児の初代培養心筋細胞および心線維芽細胞を用いて、アミノ酸に対するCa<sup>2+</sup>応答を調べた結果、全アミノ酸のうち、L-proline, L-hydroxy-proline, L-alanine, glycineといった細胞外基質の構成アミノ酸によってのみ細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が誘発されることがわかった。EC<sub>50</sub>はいずれも50~100 μMと低く、段階的に細胞外アミノ酸濃度を上げた場合でもCa<sup>2+</sup>応答を引き起こすことから、生理的条件下で十分活性化されうるチャネルである可能性が示された。興味深いことに、PRAC活性はTRPC3/6チャネルを阻害することで完全に抑制された。逆に、PRAC活性をもたないHEK293細胞にTRPC3およびTRPC6を共発現させることでPRAC活性を獲得させることに成功した。以上の結果は、TRPC3/6チャネルがPRACの重要なサブユニットであることを示している。

#### ・細胞外基質代謝におけるPRACの役割解析

心線維芽細胞にprolineやhydroxy-prolineなどを処置すると顕著な細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が確認できるものの、アミノ酸刺激自体はコラーゲン産生そのものに

影響を与えなかった。TRPC3/6 チャンネルを阻害することでPRAC活性を抑制すると、TGF- $\beta$  や Ang II 刺激で誘発されるコラーゲン産生が有意に抑制された。TGF- $\beta$  や Ang II 刺激で誘発されるアクチン重合とそれに付随して起こる MRTF-A の核移行も PRAC 阻害によって抑制された。以上の結果から、PRAC は生理的条件下でのコラーゲン合成・代謝には影響を与えないものの、Ang II や TGF- $\beta$  刺激で誘発される過剰なコラーゲン合成に対して促進的に働く可能性が示された。

・心臓リモデリングにおける PRAC およびプロリン代謝酵素の発現変化の解析

心筋症モデル (MLP 欠損) マウスおよび心筋梗塞マウスの心臓 mRNA からプロリン合成酵素およびプロリンラセミ化酵素の発現量を調べたところ、心不全の心臓でプロリンラセミ化酵素の発現量が低下していることがわかった。これと相関して、心不全モデルマウスの尿中 D-proline 量は顕著に低下しており、L-proline 量の増加が観察された。しかし、PRAC の構成サブユニットである TRPC3/6 それぞれを欠損させたマウスで尿中アミノ酸量を測定したところ、尿中 L/D-proline 量は野生型のそれと変わらなかったことから、正常時の proline ラセミ化に PRAC は関与しないことが示された。

一方、TRPC3 欠損および TRPC6 欠損マウスの心臓を摘出し、アミノ酸シグナルの下流にある autophagy を調べたところ、野生型で抑制されていた autophagy が TRPC3/6 欠損により著しく促進されることがわかった。以上の結果から、PRAC が心臓 autophagy のネガティブレギュレーターとして働く可能性が示された。

## 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 11 件)

- ① Nakaya M, Tajima M, Kosako H, Nakaya T, Hashimoto A, Watari K, Nishihara H, Ohba M, Komiya S, Tani N, Nishida M, Taniguchi H, Sato Y, Matsumoto M, Tsuda M, Kuroda M, Inoue K, Kurose H. GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance. *Nature Commun.* 2013, 4, 1532. 査読有  
DOI: 10.1038/ncomms2540.
- ② Nishida M, Ishikawa T, Saiki S, Sunggip C, Aritomi S, Harada E, Kuwahara K, Hirano K, Mori Y, Kim-Mitsuyama S. Voltage-dependent N-type  $Ca^{2+}$  channels in endothelial cells contribute to oxidative stress-related endothelial dysfunction induced by angiotensin II in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* (in press) 査読有  
DOI:pii: S0006-291X(13)00456-7.
- ③ Nakaya M, Chikura S, Watari K, Mizuno N, Mochinaga K, Mangmool S, Koyanagi S, Ohdo S, Sato Y, Ide T, Nishida M, Kurose H. Induction of cardiac fibrosis by  $\beta$ -blocker in G protein-independent and GRK5/ $\beta$ -arrestin2-dependent signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 287(42), 35669-35677 (2012). 査読有
- ④ Kan-o M, Takeya R, Abe T, Kitajima N, Nishida M, Tominaga R, Kurose H and Sumimoto H. Mammalian formin Fhod3 plays an essential role in cardiogenesis by organizing myofibrillogenesis. *Biol. Open.* 1(9), 889-896 (2012). 査読有
- ⑤ Fujino T, Ide T, Yoshida M, Onitsuka K, Tanaka A, Hata Y, Nishida M, Takehara T, Kanemaru T, Kitajima N, Takazaki S, Kurose H, Kang D and Sunagawa K. Recombinant mitochondrial transcription factor A protein inhibits nuclear factor of activated T cells signaling and attenuates pathological hypertrophy of cardiac myocytes. *Mitochondrion.* 12: 449-458 (2012). 査読有
- ⑥ Nishida M, Sawa T, Kitajima N, Ono K, Inoue H, Ihara H, Motohashi H, Yamamoto M, Suematsu M, Kurose H, van der Vliet A, Freeman BA, Shibata T, Uchida K, Kumagai Y and Akaike T. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulphydration. *Nature Chem. Biol.* 8: 714-724 (2012). 査読有
- ⑦ Nishioka K, Nishida M, Ariyoshi M, Saiki S, Jian Z, Hirano M, Nakaya M, Sato Y, Kita S, Iwamoto T, Hirano K, Inoue R and Kurose H. Protein kinase A-mediated phosphorylation of TRPC6 channels underlies suppression of angiotensin II-induced vasoconstriction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 2278-2286 (2011). 査読有
- ⑧ Kitajima N, Watanabe K, Morimoto S, Sato Y, Kiyonaka S, Hoshijima M, Ikeda Y, Nakaya M, Ide T, Mori Y, Kurose H and Nishida M. TRPC3-mediated  $Ca^{2+}$  influx contributes to Rac1-mediated production of reactive oxygen species in MLP-deficient mouse hearts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409: 108-113

(2011). 査読有

⑨ Nishida M, Ogushi M, Suda R, Toyotaka M, Saiki S, Kitajima N, Nakaya M, Kim K-M, Ide T, Sato Y, Inoue K and Kurose H Heterologous down-regulation of angiotensin type1 receptors by purinergic P2Y2 receptor stimulation through S-nitrosylation of NF- $\kappa$ B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108: 6662-6627 (2011). 査読有

⑩ Tomonari M, To H, Nishida M, Mishima T, Sasaki H, and Kurose H Mechanism of the cardioprotective effects of docetaxel pre-administration against adriamycin-induced cardiotoxicity. J. Pharmacol. Sci. 115: 336-345 (2011). 査読有

⑪ Sugihara M, Morita H, Matsuda M, Umebayashi H, Kajioka S, Ito S, Nishida M, Inoue R, Futatsuki T, Yamazaki J, Mori Y, Inoue R, Ito Y, Abe K and Hirata M Dual signaling pathways of arterial constriction by extracellular urine 5' -triphosphate in the rat. J. Pharmacol. Sci. 115: 293-308 (2011). 査読有

[学会発表] (計 2 件)

① 西田基宏 Hydrogen sulfide suppresses H-Ras-mediated cardiac senescence after myocardial infarction via electrophile sulfhydration. 第33回内藤コンファレンス Oxygen Biology, Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases (June26-29, 2012, Sapporo). 優秀ポスター発表賞受賞

② 西田基宏 Sulfhydration of Electrophiles Underlies Protection against Reactive Oxygen Species-mediated Cardiac Senescence by Hydrogen Sulfide. New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011 (第10回 JBS バイオフロンティア国際シンポジウム 2011, Nov. 14-16th, Fukuoka). 招待講演

[図書] (計 1 件)

① Nishida M\*, Sunggip C, Kitajima N & Kurose H Redox regulation of angiotensin receptor signaling in the heart. Angiotensin: New Research, NOVA Publishers (New York), Edited by Harada S and Moi I. 165-179 (2012).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

研究室ホームページ:

<http://soyaku.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田基宏 (NISHIDA MOTOHIRO)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号: 90342641

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし