

令和 2 年 4 月 25 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08294

研究課題名(和文) リガンド濃度勾配で起こるシグナル経路の切換え機構とその生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Phosphorylations of BLT1 receptor are necessary for sufficient cell responses at high concentration of leukotriene B4

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はBLT1の希有な活性制御機構を発見した。この情報伝達機構にはBLT1のリン酸化が重要な意味を持つ。我々はBLT1の全リン酸化部位を決定し、同時に、以下の知見も見出した。BLT1は活性化後も細胞内移行せずに細胞表面に留まる、低濃度LTB4で高親和性BLT1を活性化するとリン酸化が始まり、その後周辺LTB4濃度を徐々に高めると、このリン酸化度合は段階的に亢進する、BLT1はリン酸化度合の亢進に伴い、リガンド親和性が低下する。本研究では、こうしたLTB4濃度に依存した段階的リン酸化亢進と親和性低下がBLT1機能にどう寄与し、生理的に如何なる意義があるのか、その一旦を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症時、局所で産生されたLTB4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指示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る。BLT1を介して好中球に局所応答の開始時期を伝える意義である。低親和性化したBLT1が濃度勾配の中で再活性化されうる高いLTB4濃度に到達することで、この低親和性型を介して高親和性型とは異なる情報伝達が作動し、局所応答が開始されるという考え方である。この仕組みは全く新奇なシグナル伝達調節の発見である。

研究成果の概要(英文)：LTB4 receptor type 1 (BLT1) is abundantly expressed in immune cells and plays crucial roles in various inflammatory diseases. We determined two types of BLT1 phosphorylation, basal and ligand-induced, in the C-terminus of human BLT1 using the Phos-tag SDS-PAGE. Ligand-induced phosphorylation occurred at different LTB4 concentrations, and this modification facilitated basal phosphorylation. Because neutrophils migrate through the LTB4 gradient toward inflammatory sites, the degree of phosphorylation could be enhanced in parallel with an increase in LTB4. At high concentrations of LTB4, deficiencies in these two types of phosphorylation impaired chemotaxis and α -hexosaminidase release in CHO-K1 and RBL-2H3 cells, respectively. These results suggest that an LTB4 gradient around inflammatory regions boosts BLT1 phosphorylation in a stepwise manner to facilitate the precise migration of phagocytic and immune cells, and the initiation of local responses, including degranulation.

研究分野：脂質生化学

キーワード：ロイコトリエンB4 BLT1 リン酸化 ユビキチン修飾 アレスチン G蛋白質共役型受容体 GPCR

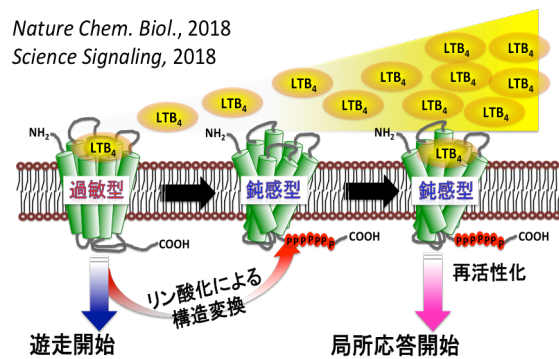
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

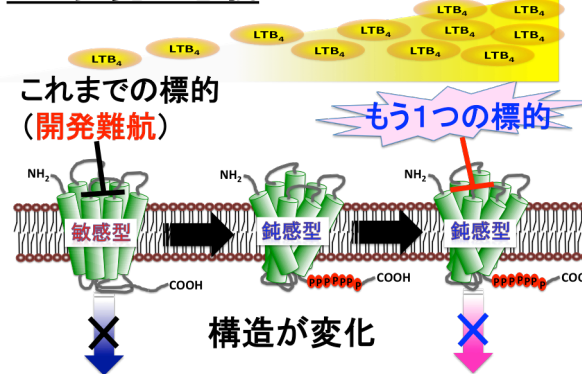
ロイコトリエン B₄ (LTB₄) は好中球に対して強力な遊走活性を示す生理活性脂質であり、特異的受容体である BLT1 への結合で生理機能を発揮する。LTB₄/BLT1 経路の情報伝達は、炎症、アレルギーや関節リウマチ等の発症に深く関わることが BLT1 欠損マウスや受容体拮抗剤を用いた実験結果から示唆されているが、未だ臨床使用可能な BLT1 拮抗剤はない。本研究の核心は、新奇な BLT1 活性制御機構の発見とこの発見の BLT1 拮抗剤開発への応用である。我々は、BLT1 拮抗剤創製への取り組みの中、最近、BLT1 の結晶構造解析に成功し、構造的観点からの創薬ヒントを社会に発信した。また、BLT1 の C 末端領域のリン酸化が刺激 LTB₄ 濃度に依存して段階的に亢進することも発見し、このリン酸化亢進が受容体のリガンド親和性に変化をもたらすと同時に、好中球の炎症応答にも非常に重要であることを示唆した。36 年前、好中球は遊走開始に関わる高親和性 LTB₄ 受容体と脱顆粒などの惹起に関わる低親和性 LTB₄ 受容体の 2 種類を持つことをカリフォルニア大学の D.W.Goldman 博士と E.J.Goetzl 博士が提唱した (*J.Exp.Med.*, 159, 1027-1041, 1984)。その後、この説を支持する報告は幾つも出たが、今日現在、好中球に発現する LTB₄ 受容体は BLT1 が唯一無二のものとされている。この矛盾は長い間謎とされてきたが、その謎解きの中に、BLT1 拮抗剤開発へのヒントがあると考えたことが本研究の切掛けである。

2. 研究の目的

この度発見したリガンド濃度に依存する段階的リン酸化は、BLT1 を LTB₄ 高親和性から低親和性へと構造変化させると我々は推察している (図 1、右図モデル)。好中球が遊走で局所到達後、この低親和化した BLT1 は周辺の高濃度 LTB₄ で再活性化され、好中球に局所応答 (脱顆粒や活性酸素産生など) の開始を促すと考える。即ち、36 年前に提唱された 2 種類の LTB₄ 受容体はどちらも BLT1 で説明できることになる。この考えを立証し、斬新な BLT1 拮抗剤開発を提唱することが本研究の目標である。



この発見の意義



炎症時、局所で産生された LTB₄ は血中に放出され、好中球はこの際に形成される LTB₄ 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、我々はこれに独創的な意義を加える。BLT1 を介した情報伝達で好中球に局所応答の開始を伝える意義である。即ち、好中球が LTB₄ の高濃度域に遊走で到達すると、低親和化した BLT1 は再活性化され、高親和型とは異なる情報伝達を惹起し、局所応答が開始されるという考えである (図 2、左図モデル)。1 つの GPCR が低濃度リガンドを敏感に感受し、シグナル発信後も細胞膜上に留まり、

徐々に低親和性へと構造変化し、やがて高濃度下で再び活性化すると別のシグナル伝達が作動する仕組みはこれまで報告例のない希有な GPCR 情報伝達機構の発見である。本研究の目的の1つはこの発見の確度を高め、新奇 GPCR 制御機構を提唱することにある。創薬の観点からは、従来の拮抗剤は高親和性 BLT1 のみを標的としたが、例えばリン酸化部位を酸性アミノ酸に置換することでリン酸化をミミックし、これが低親和性 BLT1 を模倣するものであれば、これを標的とした化合物を探索することで新たな BLT1 拮抗剤の開発が期待できる。本研究の2つ目の目的は、このリン酸化ミミック型 BLT1 の阻害剤探索用ツールとしての提案である。

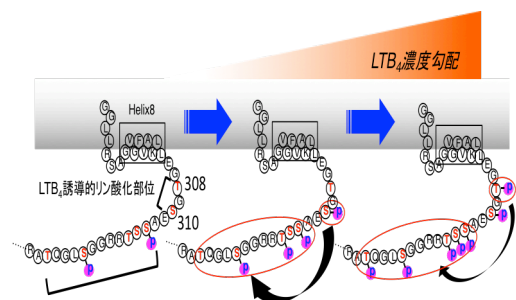
3. 研究の方法

- ① BLT1 の C 末端領域内リン酸化候補部位の点変異体を PCR 法で作製し、phos-tag SDS-PAGE 法にてリン酸化の欠失を評価しながら、リン酸化修飾部位を全て決定した。
- ② 決定したリン酸化修飾部位のリン酸化とそれを誘発するリガンド刺激濃度（刺激有無に加え、刺激濃度も検討）との関係を調べた。
- ③ 全リン酸化欠損 BLT1 を発現させた CHO-K1 細胞を作製し、LTB₄ 濃度依存的な細胞遊走性を正常型 BLT1 発現細胞とボイデンチャンバー法で比較した。
- ④ 全リン酸化欠損 BLT1 を発現させた RBL-2H3 細胞を作製し、LTB₄ 刺激後の β-hexosaminidase 放出（脱顆粒能）を正常型 BLT1 発現細胞と比較した。
- ⑤ GPCR シグナル応答性レポーター法や TGFα-shedding 法を活用し、全リン酸化部位を酸性アミノ酸に置換したリン酸化ミミック BLT1 や全リン酸化欠損 BLT1 の LTB₄ に対する応答性（活性化度合い）を評価した。
- ⑥ 全リン酸化欠損 BLT1 発現細胞での LTB₄ 刺激時の ERK1/2 活性化や PI3K/Akt 経路活性化を正常型 BLT1 発現細胞と比較した。

4. 研究成果

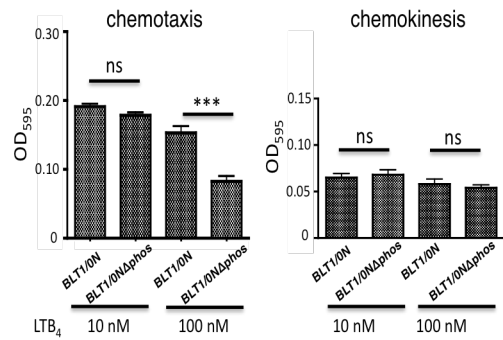
- ① BLT1 の C 末端領域に存在する 7 箇所のリン酸化部位（T308, S310, S313, S314, T315, S320, T324）を全て決定した（図 3）。

図 3 説明： BLT1 の C 末端領域の段階的リン酸化を示す。2 箇所の誘導的リン酸化部位のうち、310 番目の Ser (S) 残基が低濃度 LTB₄ で先に修飾を受け、これに付随して下流の 5 箇所のリン酸化が始まる。さらに高濃度 LTB₄ 環境下に移行すると 308 番目の Thr (T) 残基のリン酸化が起こり、下流 5 残基の修飾はさらに充進する。



- ② 7 箇所の内、2 箇所は LTB₄ 刺激依存的、残りの 5 箇所は先の 2 箇所のリン酸化がトリガーとなって修飾が充進することを明らかにした(図3)。
- ③ 2 箇所の LTB₄ 刺激依存的リン酸化は、それぞれが異なる LTB₄ 濃度(一方が数 pM、他方が 20 ~30 nM 以上)で誘導されることを明らかにした。即ち、BLT1 の全リン酸化度合いは、周辺 LTB₄ 濃度の上昇に伴い段階的に充進することを発見した(図3)。
- ④ 全リン酸化欠損 BLT1 発現細胞(CHO-K1 細胞)は、低濃度 LTB₄ に対する遊走性は正常型 BLT1 発現細胞と差異が無いが(遊走開始応答)、高濃度 LTB₄ に対しては低下することを明らかにした(図4)。

図4説明： 正常型 BLT1(BLT1/ON)、又は、リン酸化欠損 BLT1(BLT1/ON Δ phos)を発現させた CHO-K1 細胞の遊走実験（ポイデンチャンパー法）。Chemokinesis には違いが認められないが、リン酸化欠損（Δ phos）によって高濃度（100 nM）LTB₄域での Chemotaxis は有意に低下した。



⑤ RBL-2H3細胞をホストとし、刺激後の

β-hexosaminidase放出を評価した。BLT1/ONΔphos発現細胞は、高濃度LTB₄で惹起される脱顆粒応答が減弱することが示唆された(図5)。

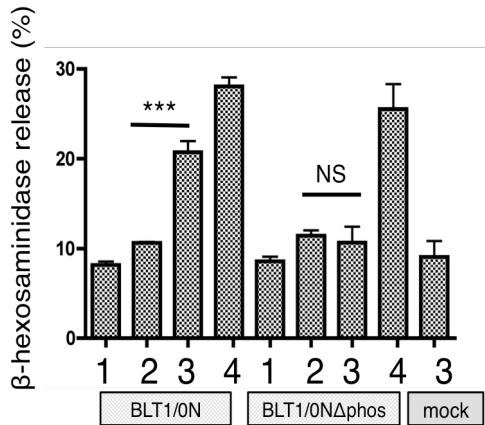
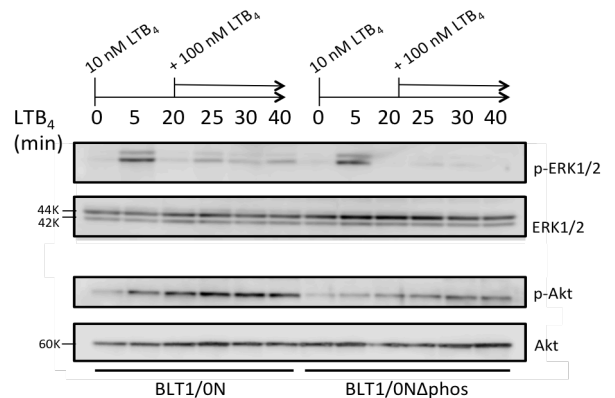


図5説明： RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒実験。BLT1/ ONΔphos を発現させた同細胞は高濃度（100 nM）LTB₄ 刺激時の脱顆粒が低下した。図中カラム1は vehicle、カラム2は 10 nM の LTB₄ 刺激、カラム3は 100 nM の LTB₄ 刺激、カラム4はイオノフォア刺激の結果を示す。

⑥ 全リン酸化部位を酸性アミノ酸に置換したリン酸化ミミック BLT1 は、低濃度 LTB₄ に対する応答性が減弱していることを見出した(GPCR シグナル応答性レポーター実験)。

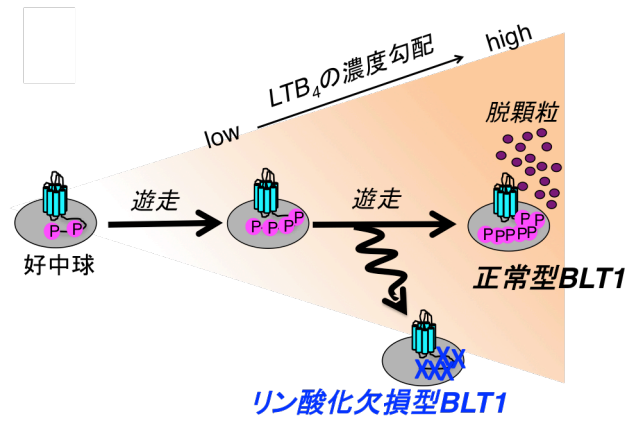
⑥ BLT1/ONΔphos発現細胞では、高濃度LTB₄刺激時のPI3K/Akt経路の情報伝達に明らかな異常が認められた(図6)。

図6説明： HEK293T 細胞での情報伝達解析。BLT1/ON 発現細胞では低濃度（10 nM）LTB₄ 刺激直後の ERK1/2 の一過的な活性化（リン酸化）と 100 nM 追加刺激以降の Akt の持続的な活性化が認められた。一方、BLT1/ONΔphos 発現細胞では、ERK1/2 の活性化に差異はないが、100 nM 追加刺激後の Akt の活性化は低下した。



以上の結果、我々は、低濃度 LTB₄ で始まる BLT1 のリン酸化亢進は高 LTB₄ 濃度環境下での細胞応答に不可欠な修飾と推察した(図7)。これは好中球が局所に到達し、防御活動の開始時期を察知する“スイッチ機能”と解釈することもできる。こうした知見の確度をより高めて新奇な BLT1 活性制御機構を明らかにし、且つ、新規拮抗剤開発に活かすことが本研究の今後の課題である。

図7説明: 全リン酸化欠損 BLT1 を発現させた細胞で認められた応答異常をまとめた図。全リン酸化の欠損により、高濃度 LTB₄ 環境下では遊走能に異常が認められ、また、脱顆粒応答も減弱していた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura.M. and Yokomizo.T.	4. 巻 11 March
2. 論文標題 Leukotrienes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Nakanishi,Y., Tan,M., Ichiki,T., Inoue,A. Yoshihara,J., Maekawa,N., Takenoshita.I., Yanagida,K., Yamahira,S., Yamaguchi,S., Aoki,J. Nagamune,T., Yokomizo,T., Shimizu,T., and Nakamura,M	4. 巻 11 (544)
2. 論文標題 Stepwise phosphorylation of leukotriene B4 receptor 1 defines cellular responses to leukotriene B4.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaa05390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.aao5390.	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 -
1. 著者名 Yokomizo,T., Nakamura,M., and Shimizu,T	4. 巻 128
2. 論文標題 Leukotriene receptors and experience as potential therapeutic targets.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J.Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 2691-2701
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI97946.	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 -
1. 著者名 Tan,M., Yamaguchi,S., Nakamura,M. and Nagamune,T.	4. 巻 S1389-1723
2. 論文標題 Real-time monitoring of pH-dependent intracellular trafficking of ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 in living leukocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 30031-30066
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2018.03.012.	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 -

1. 著者名 Hori,T., Okuno,T., Hirata,K., Yamashita,K., Kawano,Y., Yamamoto,M., Hato,M., Nakamura,M., Shimizu,T., Yokomizo,T., Miyano,M. and Yokoyama,S.	4. 巻 14
2. 論文標題 Na ⁺ -mimicking ligands stabilize the inactive state of leukotriene B4 receptor BLT1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 262-269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/nchembio.2547.	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 -

1. 著者名 Tan,M., Yamaguchi,S., Yamahira,S., Nakamura,M. and Nagamune,T.	4. 巻 17 (11)
2. 論文標題 Quantitative image cytometry for analyzing intracellular trafficking of G protein-coupled receptors on a chemically-trapping single cell array.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Lab on a Chip	6. 最初と最後の頁 1933-1938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c7lc00198c.	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 -

1. 著者名 Izuta,S., Yamaguchi,S., Misawa,R., Yamahira,S., Tan,M., Kawahara,M., Suzuki,T., Takagi,T., Sato,K., Nakamura,M., Nagamune,T. and Okamoto,A.	4. 巻 7:14962
2. 論文標題 Microfluidic preparation of anchored cell membrane sheets for in vitro analyses and manipulation of the cytoplasmic face	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	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) 10.1038/s41598-017-14737-7.	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24件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩田久瑠実、河北麻衣、山崎慎太郎、中村元直
2. 発表標題 HL60細胞に発現する2つの短鎖脂肪酸受容体 (GPR41、GPR43) の機能的差異に関する研究
3. 学会等名 第92回日本生化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田佳純、熊谷早織、中村元直
2. 発表標題 N型糖鎖に非依存的な小胞体内品質管理について ~ 糖鎖修飾の無いIGPCRを材料とした解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森脇 瑞貴、谷口 梨奈、竹之下 逸樹、相原 咲希、中村 元直
2. 発表標題 ロイコトリエンB4受容体のリン酸化修飾とコピキチン修飾の連関について
3. 学会等名 第92回日本生化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真田 恵、真鍋 光、菊池 彩花、瀬川 美奈、宮本 拓実、中村 元直
2. 発表標題 細胞内に局在する苦味受容体の機能解析について
3. 学会等名 第92回日本生化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真鍋光、真田恵、菊池彩花、瀬川美奈、中村元直
2. 発表標題 ヒト表皮角化細胞であるHaCaT株に内在的に発現する苦味受容体の機能について
3. 学会等名 第92回日本生化学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村元直
2. 発表標題 シャペロン薬を含めたGPCRを標的とした創薬研究について
3. 学会等名 日経バイオテクプロフェッショナルセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森脇 瑞貴、谷口 梨奈、竹之下 逸樹、相原 咲希、中村 元直
2. 発表標題 ロイコトリエンB4受容体の翻訳後修飾とその意義について
3. 学会等名 日本生化学会中国四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 真田 恵、瀬川 美奈、菊池 彩花、眞鍋 光、中村 元直
2. 発表標題 苦味受容体は異物排出のためのセンサーとして働くのか？
3. 学会等名 日本生化学会中国四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田久瑠美、河北麻衣、中野花菜、佐伯美樹、中村元直
2. 発表標題 短鎖脂肪酸受容体であるGPR41とGPR43のHL60細胞における発現
3. 学会等名 第91回日本生化学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊池彩花、瀬川美奈、真田恵、真鍋光、前川直斗、中村元直
2. 発表標題 苦味受容体TAS2R38の配列多様性が機能に与える影響について
3. 学会等名 第91回日本生化学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田佳純、中村元直
2. 発表標題 N型糖鎖修飾を持たないGPCRの小胞体内での品質管理について
3. 学会等名 第91回日本生化学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森脇瑞貴、谷口梨奈、小田未那美、中村元直
2. 発表標題 ロイコトリエンB4受容体のユビキチン化修飾に関する解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真田恵、瀬川美奈、菊池彩花、前川直斗、中村元直
2. 発表標題 25種類のヒト苦味受容体のホモ/ヘテロ2量体形成に関する研究
3. 学会等名 第91回日本生化学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 瀬川美奈、菊池彩花、真田恵、真鍋光、前川直斗、中村元直
2. 発表標題 25種類のヒト苦味受容体の中でTAS2R4が持つ特異な特徴について
3. 学会等名 第91回日本生化学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹之下逸樹、相原咲希、井上飛鳥、青木淳賢、中村元直
2. 発表標題 ロイコトリエンB4受容体のリン酸化修飾に関する解析～昨年からの続報
3. 学会等名 第91回日本生化学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真鍋光、瀬川美奈、菊池彩花、山本千晶、中村元直
2. 発表標題 皮膚系細胞株に発現する苦味受容体の機能について
3. 学会等名 第91回日本生化学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前川直斗、山本千晶、藤原友幹、中村元直
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本組織培養学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本千晶、前川直斗、藤原友幹、中村元直
2. 発表標題 ヒト由来の血球系細胞株における苦味受容体の発現
3. 学会等名 日本組織培養学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村元直
2. 発表標題 Phosphorylations of BLT1 receptor: necessary for sufficient cell responses at high concentration of LTB4
3. 学会等名 日本組織培養学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本千晶、前川直斗、藤原友幹、中尾榛花、中村元直
2. 発表標題 ヒト皮膚由来細胞株に発現する苦味受容体の解析
3. 学会等名 Combio 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前川直斗、山本千晶、藤原友幹、中村元直
2. 発表標題 味細胞以外の細胞におけるヒト苦味受容体の発現とその局在について
3. 学会等名 Combio 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 瀬川美奈、井上飛鳥、青木淳賢、中村元直
2. 発表標題 TGF 切断アッセイ系を活用したロイコトリエンB4受容体のシグナル伝達解析について
3. 学会等名 Combio 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菊池彩花、西田愛、金城夢乃、井上知邑、中村元直
2. 発表標題 ヒト苦味受容体遺伝子配列の多型解析
3. 学会等名 Combio 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹之下逸樹、伊藤千尋、前川直斗、中村元直
2. 発表標題 LTB4/BLT1 を介した情報伝達におけるBLT1 リン酸化の意義
3. 学会等名 Combio 2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清水孝雄、中村元直	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 306 (うち、9頁)
3. 書名 脂質解析ハンドブック；生理活性脂質（脂質メディエーター）	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----