プリン受容体ヘテロ多量体形成が血小板機能に与える影響の解析

鈴木 登紀子[†]**Hetero-oligomerization and Functional Interaction between Purinergic Receptors Expressed in Platelets to Regulate Platelet Shape Change**Tokiko Suzuki[†]*Department of Cellular Signaling, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku University; 6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan.*

(Received May 26, 2015)

Adenosine and its precursors, ATP and ADP, exert various physiological effects *via* binding to purinergic receptors. We previously used co-immunoprecipitation, bioluminescence resonance energy transfer (BRET) and immunoelectron microscopy to demonstrate the hetero-oligomerization of purinergic receptor subtypes. Furthermore, pharmacological studies found significant changes in receptor-mediated signaling in human embryonic kidney (HEK) 293T cells co-transfected with these receptors. These findings suggest that heterodimers of purinergic receptors may have distinct pharmacological profiles, possibly due to dimerization-induced conformational changes, further suggesting that hetero-dimerization may be employed to “fine-tune” purinergic receptor signaling. Adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}R), P2Y₁ receptor (P2Y₁R) and P2Y₁₂ receptor (P2Y₁₂R) are predominantly expressed on human platelets. ADP activates human platelets by stimulating both P2Y₁R and P2Y₁₂R, which act sequentially and in concert to achieve complete platelet aggregation. In contrast, adenosine stimulates Gs-coupled A_{2A}R, followed by activation of adenylate cyclase, leading to an increase in intracellular cAMP levels, which potently inhibits platelet activation. We examined the hetero-oligomerization and functional interactions of A_{2A}R, P2Y₁R, and P2Y₁₂R. In HEK293T cells triply expressing all three receptors, hetero-oligomerization was observed among the three receptors. Additionally, P2Y₁R agonist-evoked Ca²⁺ signaling was significantly inhibited by co-treatment with an A_{2A}R antagonist in HEK293T cells. In human platelets, we identified endogenous A_{2A}R/P2Y₁R and A_{2A}R/P2Y₁₂R heterodimers. We also observed functional Ca²⁺-signaling-related cross-talk similar to those found in HEK293T cells, and found that they appeared to affect platelet shape. These results collectively suggest that intermolecular signal transduction and specific conformational changes occur among components of the hetero-oligomers formed by these three receptors.

Key words—purinergic receptor; heterooligomer; ADP; adenosine; platelet shape change**1. はじめに**

Gタンパク質共役型受容体 (G protein coupled receptor; GPCR) は既に多くの治療薬のターゲットとなっているが、単独の受容体としての機能だけでなく他の GPCR とのヘテロ多量体形成の例が近年活発に報告されている。¹⁾ GPCR ヘテロ多量体形成の研究に関してはほとんどの場合培養細胞強制発現系を用いて行われているのが現状であるが、*in*

vivo での多量体形成と生理機能の関係を示す興味深い研究も報告され始めている。例えば、マウスのアンギオテンシン AT₁ 受容体 (AT₁R) とセクレチン受容体 (SecR) のヘテロ多量体形成を妨げるペプチドを利用した *in vivo* 実験により、それらの多量体形成が飲水行動を制御しているという見解が報告された。²⁾ また以下のような他のアプローチも報告されている。^{3,4)} すなわち、 μ オピオイド受容体 (μ opioid receptor; MOR) と δ オピオイド受容体 (δ opioid receptor; DOR), MOR と代謝型グルタミン酸受容体 5 (metabotropic glutamate receptor 5; mGluR5) はそれぞれヘテロ多量体を形成するが、MOR アゴニストの Oxymorphone と DOR アンタゴニストの Naltrindole, Oxymorphone と mGluR5

東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

現所属: [†] 富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) 分子医科薬理学講座 (〒930-0194 富山市杉谷 2630 番地)
e-mail: tokikosu@med.u-toyama.ac.jp

本総説は、平成 26 年度日本薬学会東北支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

アンタゴニストの M-MPEP2 を連結した二価リガンドが合成された。^{3,4)} Oxymorphone-Naltrindole, Oxymorphone-M-MPEP2 とともに、多量体を形成している 2 つの受容体分子に同時に結合することを考慮して、リンカーの長さが調節されている。^{3,4)} マウスを用いた実験により、Oxymorphone-Naltrindole, Oxymorphone-M-MPEP2 とともに低濃度でモルヒネ様の効果を示し、副作用も軽減されるという興味深い結果が発表されている。^{3,4)} GPCR ヘテロ多量体は培養細胞強制発現系での研究が先行していたため、生理的意義を疑問視する声もあったが、少なくとも AT₁R/SecR, MOR/DOR, MOR/mGluR5 のヘテロ多量体形成には生理的役割があることが明らかになった。²⁻⁴⁾ 前述のように GPCR は多くの治療薬のターゲットとなっているが、これまでのように単独としての GPCR を創薬ターゲットとする戦略には限界がある。シーズが枯渇しつつある現代において、GPCR ヘテロ多量体は新たな創薬ターゲットとして期待を集めている。

2. プリン受容体間ヘテロ多量体形成 (A₁ 受容体/P2Y₁ 受容体, A₁ 受容体/P2Y₂ 受容体)

細胞内の主要なエネルギー源である ATP は、細胞外ではシグナル伝達物質として機能することが知られている。ATP は細胞外で種々の加水分解酵素により、ATP → ADP (アデノシン二リン酸) → AMP (アデノシン一リン酸) → アデノシンへと速やかに代謝され、また再生酵素によって生成され、その局所濃度が厳密に調節されている。⁵⁾ ATP, ADP, uridine 5'-triphosphate (UTP) 等のヌクレオチドは、P2 受容体 (GPCR である P2Y 受容体とイオンチャネルである P2X 受容体に分類) に結合し、神経細胞保護や痛みの伝達などに深く関わっている。⁶⁾ 一方でアデノシンは、GPCR であるアデノシン受容体に結合し、交感神経・副交感神経作用の減弱、睡眠の調節、虚血による脳障害の防止など、多くの重要な生理作用を持つ。⁷⁾ これらのアデノシン受容体と P2 受容体はプリン受容体と総称され、中枢神経系から末梢組織にまで広範囲に発現、機能している。リガンド同士に上記のような密接な関連性があるため、筆者らはプリン受容体間にも直接的な相互作用があり、相互作用により機能が調節される可能性を考え、本研究に着手した。

アデノシン受容体には、A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃ の 4 種

類のサブタイプがあり、P2Y 受容体には、P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14} のサブタイプがある。これらのうち、筆者らはまず中枢神経系等での共発現が知られる A₁ 受容体・P2Y₁ 受容体 (A₁R/P2Y₁R), 及び A₁ 受容体・P2Y₂ 受容体 (A₁R/P2Y₂R) のヘテロ多量体形成の解析を行った。A₁R/P2Y₁R あるいは A₁R/P2Y₂R の組み合わせでヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞に共発現させると、免疫共沈降法によりどちらの組み合わせによっても共沈降がみられた。^{8,9)} さらにそれぞれの受容体にドナー (レニラルシフェラーゼ) とアクセプター (変異型 GFP) を融合させた形で共発現させ、共鳴エネルギー転移によって目的タンパク質の近接から多量体形成を評価する bioluminescence resonance energy transfer (BRET) 解析も行い、2 種の受容体間での多量体形成を明らかにすることができた。^{10,11)} A₁R/P2Y₂R については免疫電子顕微鏡法によっても多量体形成を証明した。¹²⁾

次に多量体形成によって受容体のシグナル伝達に変化が及ぼされるかどうかを検討した。A₁R には主に Gi が、P2Y₁R, P2Y₂R には主に Gq が共役しているが、A₁R/P2Y₁R 共発現細胞では P2Y₁R の選択的アゴニストである adenosine 5'-O- (2-thiotriphosphate) (ADPβS) の添加により、Gi 経路のアデニル酸シクラーゼ阻害がみられ、百日咳毒素による Gi 阻害及び A₁R の選択的アンタゴニスト 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) によりブロックされた。⁸⁾ つまり、A₁R は P2Y₁R とヘテロ多量体を形成することで構造が変化し、P2Y₁R のアゴニストを結合して Gi 経路の反応が起こるようになったと考えることができる (Fig. 1)。また、Gq 経路の反応は P2Y₁R 単独発現細胞と同様にみられたことから、P2Y₁R には構造変化は起こらないことが示唆された。一方で、A₁R/P2Y₂R 共発現細胞では、P2Y₂R にアゴニストとして ATP と同程度のアフィニティーで作用する UTP を作用させることで、A₁R 選択的アゴニスト N6-cyclopentyladenosine (CPA) 刺激による Gi 経路の反応が阻害された。⁹⁾ そして、UTP とアデノシン受容体非選択的アゴニストである 5'-N-ethylcarboxamido-adenosine (NECA) を同時に添加すると Gq 経路の反応は相乗的に促進され、相乗的促進は DPCPX ではブロックされなかった。つまり、A₁R は P2Y₂

Fig. 1. Presumed Signaling Pathways Induced by Heterodimers of A₁R/P2Y₁R (left) and A₁R/P2Y₂R (right) in Co-transfected HEK293T Cells

Following the heteromeric oligomerization of A₁R and P2Y₁R, a potent P2Y₁R agonist binds to an A₁R binding pocket and inhibits adenylyl cyclase activity *via* the Gi/o protein-linked effector system. On the other hand, after heteromeric oligomerization of A₁R and P2Y₂R, increase in the intracellular Ca²⁺ levels induced by activated P2Y₂R was synergistically enhanced upon simultaneous addition of an A₁R receptor agonist. The A₁R-coupled inhibitory activity of adenylate cyclase was attenuated upon simultaneous addition of A₁R and P2Y₂R agonists. AC, adenylyl cyclase; DAG, diacylglycerol; IP₃, inositol trisphosphate; PLC, phospholipase C.

R とヘテロ多量体を形成することで、P2Y₁R のときとは違った構造変化を生じ、両方のアゴニスト刺激で Gi 経路の反応は阻害され、Gq 経路の反応は相乗的に促進されるようになったと考えられる (Fig. 1). P2Y₁R と P2Y₂R はアミノ酸配列については 50% 以上の相同性がみられ、ともに中枢神経系に発現し、Gq に共役するなど類似点が多くみられるが、A₁R とのヘテロ多量体形成に関しては異なる性質を示すことが以上の研究によって示唆された。

以上に述べた A₁R/P2Y₁R あるいは A₁R/P2Y₂R の共発現による特異的シグナル変化は、すべて培養細胞に強制発現させた場合の結果であるが、A₁R/P2Y₁R に関しては、ラット脳でも免疫染色法及び免疫共沈降法で受容体共局在とヘテロ多量体形成が明らかにされている。¹³⁾ A₁R/P2Y₂R においても、免疫染色法、免疫共沈降法、免疫電子顕微鏡法によって、ラット脳での共局在と多量体形成を立証した。¹²⁾ したがって、実際の組織内でも上記のシグナル伝達の変化が起こっている可能性があり、A₁R/P2Y₁R あるいは A₁R/P2Y₂R のヘテロ多量体の生理

的役割についての解析が必要である。

3. プリン受容体間ヘテロ多量体形成 (A_{2A} 受容体/P2Y₁ 受容体/P2Y₁₂ 受容体)

血小板は直径約 2-4 μm の扁平円盤状の形態を有し、止血に欠かすことのできない血球成分である。様々な外部刺激により活性化し、血小板内顆粒の放出、形態変化に引き続き、活性化された接着膜タンパク質のインテグリンを介して細胞外基質や血小板同士と接着し、凝集塊を形成する。¹⁴⁾ 古くより、ADP は強力な血小板凝集誘発物質として知られており、その受容体である GPCR 型プリン受容体が血小板に高発現することが報告されてきた。¹⁵⁾ ADP 受容体である P2Y₁ 受容体 (P2Y₁R) は主に Gq と共役しており、ADP による血小板の活性化や形態変化に重要な役割を持つ一方、P2Y₁₂ 受容体 (P2Y₁₂R) は Gi と共役し、接着タンパク質の活性化を通じて ADP による血小板凝集の中心的役割を担う。また、アデノシン受容体である A_{2A} 受容体 (A_{2A}R) は Gs と共役しており、血小板の活性化を抑制することが知られている。¹⁶⁾ 筆者らは、血小板に高発現し、その機能に重要な役割を果たしている

Fig. 2. Heterooligomerization of $A_{2A}R$, $P2Y_1R$ and $P2Y_{12}R$ Examined Using Immuno-column and Co-immunoprecipitation Methods in Transfected HEK293T Cells

HEK293T cell lysates co-transfected with 3HA- $A_{2A}R$, Myc- $P2Y_1R$ and FLAG- $P2Y_{12}R$ were applied to anti-FLAG immuno-column (left panel). Eluate including FLAG- $P2Y_{12}R$ were immunoprecipitated with anti-Myc (middle panel) or anti-HA (right panel), and precipitates were analyzed by Western blotting with anti-HA (middle panel) and anti-Myc (right panel) antibodies. Anti-Myc antibody precipitated 3HA- $A_{2A}R$ coimmunoprecipitated with Myc- $P2Y_1R$ (middle panel). Anti-HA antibody precipitated Myc- $P2Y_1R$ coimmunoprecipitated with 3HA- $A_{2A}R$ (right panel). This figure is kindly provided from Dr. K Oyanagi (Aoyama Gakuin University). Extract, solubilized membrane extract; IP, immunoprecipitate; WB, immunoblotting with each antibody indicated. Approximate molecular masses are shown in kDa.

これらの受容体間にもヘテロ多量体形成や機能におけるクロストークがあるのではないかと考え、検討を始めた。まず HEK293T 細胞に 3 種類のタグを付加した受容体 (3HA- $A_{2A}R$, Myc- $P2Y_1R$, Flag- $P2Y_{12}R$) をすべて同時に共発現させ、細胞膜を可溶化したのち、抗 Flag イムノカラムに結合させた (Fig. 2)。結合した成分が Flag- $P2Y_{12}R$ を含んでいることを観察した (Fig. 2, Left) 上で、抗 HA 抗体あるいは抗 Myc 抗体で免疫沈降を行い、各々抗 Myc 抗体あるいは抗 HA 抗体でイムノプロットを行うことで、 $A_{2A}R$ / $P2Y_1R$ / $P2Y_{12}R$ の三成分からなるヘテロ多量体を検出することができた (Fig. 2)。¹⁷⁾ また、健康ヒトボランティアから採血した血液から調製した血小板においては、免疫沈降によって少なくとも $A_{2A}R$ / $P2Y_1R$, $A_{2A}R$ / $P2Y_{12}R$ の間の共沈降がみられ、強制発現系のみならず血小板での内在発現受容体においてもヘテロ多量体が形成されていることが示唆された。¹⁷⁾

次にシグナル伝達に関してクロストークがみられるかどうかを解析するため、 G_q に共役している $P2Y_1R$ のシグナル伝達を、細胞内 Ca^{2+} アッセイによって評価した。HEK293T 細胞に 3 種類の受容体を共発現させ、 $P2Y_1R$, $P2Y_{12}R$ アゴニストである 2-methylthio-ADP (2MeSADP) を作用させたところ

明確な細胞内 Ca^{2+} 上昇がみられ、 $P2Y_1R$ 選択的アンタゴニスト *N*6-methyl-2'-deoxyadenosine-3', 5'-bisphosphate (MRS2179) によって完全に遮断されたため、 $P2Y_1R$ 経由のシグナル伝達が正常に起こっていることを同定した。¹⁸⁾ 興味深いことにこの反応は $A_{2A}R$ 選択的アンタゴニスト 4-(2-[7-amino-2-(2-furyl) [1,2,4]-triazolo [2,3- α] [1,3,5] triazin-5-yl amino]ethyl) phenol (ZM241385) 及び $P2Y_{12}R$ 選択的アンタゴニスト *N*6-(2-methyl-thioethyl)-2-(3,3,3-trifluoropropylthio)- β,γ -dichloromethylene-ATP (ARC69931MX) によって有意に抑制され、 $A_{2A}R$ / $P2Y_1R$, $P2Y_{12}R$ / $P2Y_1R$ 間でのシグナルのクロストークが示唆された。本反応の生理的役割について考察するため、より生体内に近い環境でアッセイを行うことを考え、HEK293T 細胞に内在的に発現しているこれらの受容体に対しても同様の実験を行った。すると ZM241385 による抑制は同様に観察されたが、ARC69931MX については抑制傾向がみられるものの有意な差は観察できなかった。強制発現系と内在発現系における各々の受容体の発現量の差や、受容体の発現、多量体形成や細胞内での機能を助ける他の因子の発現量によるものと考えられることができる。

続いてこの反応が血小板内在性のプリン受容体に

Fig. 3. Effect of Antagonists on 0.1 μ M 2MeSADP-induced Platelet Shape Change Using Human Platelet-rich Plasma

Representative traces of platelet shape change in the presence of 10 mM EGTA induced by 0.1 μ M 2MeSADP and the effect of vehicle (A), 10 μ M MRS2179 (B), 10 μ M ZM241385 (C) or 10 μ M ARC69931MX (D) are shown. (E) Differences between platelet shape change before stimulation and 1 min after stimulation. Results show the mean of four independent experiments. ** $p < 0.05$ vs. vehicle by Dunnett's test.

においても観察されるかどうかを検討するため、健康ヒト血液から単離した洗浄血小板を用いて同様のアッセイを行った。その結果、2MeSADPによって明確な Ca^{2+} 上昇がみられ、MRS2179によって完全にブロックされたので、血小板での $\text{P2Y}_1\text{R}$ の正常なシグナル伝達を観察できた。加えて、ZM241385による2MeSADP誘発性細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の減弱作用とがあり、ARC69931MXによって有意な作用がみられなかったので、HEK293Tの内在発現受容体刺激時と同等の結果を得ることができた。

血小板における $\text{P2Y}_1\text{R}$ -Gq シグナルは形態変化に大きく関与している。¹⁴⁾ そこで次に ZM241385 による 2MeSADP 誘発性細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の減弱作用が血小板機能に与える影響を検討するため、ヒト多血小板血漿を用いて形態変化を解析することにした。方法としては、形態変化による体積の増大に伴う光透過率をアグリゴメーターによって測定する比濁法を用いた。その結果興味深いことに、2MeSADP 刺激によってみられる形態変化は ZM241385 によっては有意な影響を受けず、ARC69931MX によって有意な抑制がみられるという、 Ca^{2+} 濃度変化とは異なる結果が得られた (Fig. 3)。血小板における ADP 誘発性形態変化には、Gq を介する経路と並んで G12/13 を介する経路の存在が報告されている。¹⁹⁾ 今回の結果から、血小板における $\text{A}_2\text{A}\text{R}$ は $\text{P2Y}_1\text{R}$ の Gq 経路に変化を

与えるものの、形態変化に影響を及ぼすほどではなく、対して $\text{P2Y}_{12}\text{R}$ は $\text{P2Y}_1\text{R}$ の G12/13 経路に作用を及ぼすことで形態変化の制御に係わっているのではないかと考えることができる。詳細なメカニズムについては更なる研究を必要とするが、いずれにしても血小板において高発現しているプリン受容体がクロストークによって ATP とその代謝産物の微妙な濃度変化に対応して血小板機能を制御している可能性が示唆される。

謝辞 本総説に関する研究は東京都神経科学総合研究所（現 東京都医学総合研究所）中田裕康副参事研究員及び東北大学大学院薬学研究科 故・中畑則道教授の指導の下によって実施されたものであり、この場を借りて心から感謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Birdsall N. J., *Trends Pharmacol. Sci.*, **31**, 499–508 (2010).
- 2) Lee L. T., Ng S. Y., Chu. J. Y., Sekar R., Harikumar K. G., Miller. L. J., Chow B. K., *FASEB J.*, **28**, 2632–2644 (2014).
- 3) Daniels D. J., Lenard N. R., Etienne C. L., Law P. Y., Roerig S. C., Portoghesi P. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 19208–19213 (2005).

- 4) Akgün E., Javed M., Lunzer M. M., Smeester B. A., Beitz A. J., Portoghese P. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 11595–11599 (2013).
- 5) Yegutkin G. G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 673–694 (2008).
- 6) Abbracchio M. P., Burnstock G., Boeynaems J. M., Barnard E. A., Boyer J. L., Kennedy C., Knight G. E., Fumagalli M., Gachet C., Jacobson K. A., Weisman G. A., *Pharmacol. Rev.*, **58**, 281–341 (2006).
- 7) Fredholm B. B., IJzerman A. P., Jacobson K. A., Linden J., Müller C. E., *Pharmacol. Rev.*, **63**, 1–34 (2011).
- 8) Yoshioka K., Saitoh O., Nakata H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7617–7622 (2001).
- 9) Suzuki T., Namba K., Tsuga H., Nakata H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **351**, 559–565 (2006).
- 10) Yoshioka K., Saitoh O., Nakata H., *FEBS Lett.*, **523**, 147–151 (2002).
- 11) Suzuki T., Namba K., Mizuno N., Nakata H., *Methods Enzymol.*, **521**, 239–257 (2013).
- 12) Namba K., Suzuki T., Nakata H., *BMC Res. Notes*, **3**, 323 (2010).
- 13) Yoshioka K., Hosoda R., Kuroda Y., Nakata H., *FEBS Lett.*, **531**, 299–303 (2002).
- 14) Goggs R., Williams C. M., Mellor H., Poole A. W., *Biochem. J.*, **466**, 431–442 (2015).
- 15) Cattaneo M., Gachet C., *Haematologica*, **86**, 346–348 (2001).
- 16) Ledent C., Vaugeois J. M., Schiffmann S. N., Pedrazzini T., El Yacoubi M., Vanderhaeghen J. J., Costentin J., Heath J. K., Vassart G., Parmentier M., *Nature*, **388**, 674–678 (1997).
- 17) Nakata H., Suzuki T., Namba K., Oyanagi K., *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **30**, 337–346 (2010).
- 18) Suzuki T., Obara Y., Moriya T., Nakata H., Nakahata N., *FEBS Lett.*, **585**, 3978–3984 (2011).
- 19) Paul B. Z., Daniel J. L., Kunapuli S. P., *J. Biol. Chem.*, **274**, 28293–28300 (1999).