

研究課題別評価

1 研究課題名: 医薬品創製標的としての G 蛋白質共役受容体の膜移行の分子機構

2 研究者氏名: 横溝 岳彦

研究員: 戸田 晶子 (研究期間 H15.2 ~ H.17.3)

3 研究の狙い:

G-タンパク質共役型受容体(GPCR)は生体内では様々な細胞の形質膜に発現し、特異的なリガンドに結合して細胞内に情報を伝達することで、細胞の分化、増殖、形態形成、運動、細胞極性の形成に重要な役割を果たしている。ヒトゲノムに約 800-1000 種類存在すると考えられている GPCR の多くは未だにリガンドが不明であり(孤児受容体)、主として受容体過剰発現細胞を用いてリガンドの探索がなされている。ところが、孤児受容体の多くは過剰発現の系において細胞膜に発現させることが困難であり、効率の良いリガンド探索のためにはその細胞内移行のメカニズムの解明が必要であると考えた。本研究では以下の 3 点を主要な研究テーマとして設定した。

細胞膜に容易に移行する高親和性ロイコトリエン B4 受容体(BLT1)、細胞膜に移行しにくいケモカイン受容体(CXCR4, CCR7)をモデルに、細胞膜移行に関わる受容体ドメインの同定や結合因子の探索を行う。

細胞膜に移行できた孤児受容体については、安定発現細胞株を構築し、リガンドのスクリーニングを行う。

高親和性ロイコトリエン B4 受容体(BLT1)の欠損マウスを作成し、炎症・免疫反応における役割を *in vivo* で解明する。

4 研究成果:

(1) GPCR の細胞内移行に関する研究

細胞膜に移行しうる BLT1 の C 末端が細胞膜移行に必要なドメインであると考え、変異体受容体を作成したところ、C 末端を欠損した BLT1 受容体は正常に細胞膜に移行したため、C 末端は BLT1 の細胞膜移行に必須ではないことがわかった。しかし C 末端欠損 BLT1 では、リガンド刺激後の受容体の不活性化が生じず、リガンドに対する高親和性結合能と長時間にわたる細胞内シグナル伝達能を有していることが明らかとなった。以上より、BLT1 の C 末端は第 8 ヘリックスともいえる新規の構造を有しており、このドメインがリガンド刺激後の受容体の構造変化の支点として機能していることを明らかにした(Okuno, J. Biol. Chem. 2003)。また BLT1 に関しては詳細な細胞内伝達機構を明らかにし、脱顆粒反応における細胞外からのカルシウム上昇と PI3 キナーゼの活性化の必要性を証明した(Ito, J. Biol. Chem. 2002)。CXCR4, CCR7 はリンパ球系の培養細胞(Jurkat, TART-1)に遺伝子導入すると細胞膜に移行するが、GPCR のリガンドスクリーニングに用いられる培養細胞では細胞膜に移行せず、ゴルジ体に貯留する。そこで、TART-1 細胞から cDNA ライブラリを作成し、Yeast two-hybrid 法を用いてこれらの受容体を細胞膜に移行させる因子の単離を試みた。複数の受容体結合因子を同定したが、そのいずれも直接受容体の細胞膜移行には関わってはいなかった。より直接的に細胞膜移行に関わる因子を単離するため、レトロウイルスベクターとセルソータを用いた発現クローニング法を試みたが、CXCR4, CCR7 を細胞膜移行させる因子を単離することはできなかった。

(2) 孤児受容体のリガンド探索

約 20 個の孤児受容体 cDNA を単離し、過剰発現細胞を作成してリガンドの探索を行った。細胞膜上に受容体を発現できた受容体は 6 種類であったが、そのうち 2 種類のリガンドの同定に成功した。ペプチドロイコトリエン第二受容体 CysLT2 は、LTC4, LTD4 の両者に同様の結合能を示し、

細胞内カルシウム上昇反応、アデニル酸シクラーゼの抑制を引き起こした(Ogasawara, J. Biol. Chem. 2002)。また、他のグループによってリゾリン脂質 LPC の受容体として報告された G2A が、LPC に反応しないことを見だし、リガンドの探索を行ったところ、G2A は細胞外の pH の低下を感知し、G13 を介して低分子量 G タンパク質 RhoA の活性化を引き起こすプロトンセンサーであることを見いだした。さらに LPC が G2A に対して拮抗的に働くことを明らかにした(Murakami, J. Biol. Chem. 2004)。

(3) BLT1 の生体内での機能の解明

強力な炎症起炎物質であるロイコトリエン B₄(LTB₄)の高親和性受容体 BLT1 を欠損するマウスを作成し、表現型の解析を行った。BLT1 欠損マウスの好中球は LTB₄ 依存性のカルシウム上昇、脱顆粒反応を消失していたため、好中球における主要な LTB₄ 受容体であることがわかった。卵白アルブミン感作・惹起による気管支喘息モデルにおいて、BLT1 欠損マウスは気道過敏性の上昇を起こさず、気道への好酸球浸潤、血中 IgE 上昇がほぼ完全に消失しており、Th2 型免疫反応の低下が推定された。感作後の傍気道リンパ節細胞を *in vitro* で抗原刺激した際の Th2 サイトカイン産生が BLT1 欠損マウスで大きく減弱していたことから、BLT1 は Th2 型免疫反応に重要な役割を演じていることが明らかとなった(Terawaki, 投稿中)。また、免疫反応における主要な抗原提示細胞である樹状細胞に BLT1 が発現していることを見いだした。BLT1 欠損マウス由来の樹状細胞では LTB₄ 依存性のカルシウム上昇と細胞走化性が完全に消失していた。アロジェニックなリンパ球混合試験において、BLT1 欠損マウス由来の樹状細胞は極めて減弱した Th1 反応を示した。この原因は、BLT1 欠損樹状細胞からの IL-12 産生が減弱しているためであった。*In vivo* においても、BLT1 欠損マウスでは Th1 型遅延反応が大きく減弱しており、BLT1 は樹状細胞を介して Th1 型免疫反応を引き起こすための重要な因子であることを見いだした(Toda, 投稿中)。以上より、BLT1 は、Th1/Th2 型免疫反応の両者に必要なユニークな分子であることを明らかにした。

5 自己評価:

リガンド不明の GPCR のリガンドの同定を効率よく行うために、受容体の細胞膜移行の分子メカニズムを明らかにすることが重要であるとの認識は現在でも変わっていない。しかしながら、複数の GPCR を用い、複数の手法を用いて実験を行ったにもかかわらず、受容体膜移行に関わる分子の同定は困難であり、当初の目的を果たすことはできなかった。世界的にも同様の問題意識をもつ GPCR 研究者が多いにもかかわらず、これまでに明確にその経路を示した研究が存在しないことから本研究の困難さが推定できる。今後は、新たなストラテジーを用いた研究方針の確立が必要であると考えている。一方、並行して進めた孤児受容体のリガンド探索では、二つの受容体のリガンドの同定に成功した。特に G2A 受容体が細胞外プロトン認識することを見いだした論文(Murakami, JBC, 2004)のインパクトは大きく、G2A がリゾリン脂質 LPC の受容体であるとした過去の論文(Science, 293, p702-705, 2001)は、つい最近リトラクションされるに至った(Science, 307, 2005)。申請者が単離した生理活性脂質 LTB₄ の受容体 BLT1 の欠損マウスの解析では予想外の表現型を見いだすことができた。これまで局所の炎症反応を引き起こすとされた LTB₄ が実は、Th1/Th2 型の免疫反応の制御を行っていること、特に Th1 型免疫反応においては、樹状細胞における BLT1 の発現が重要であることを見いだした今回の発見は、サイトカイン・ケモカインに偏重した免疫反応の解釈に大きく影響を与えるものだと自負している。BLT1 欠損マウスでは Th1/Th2 の両方の免疫反応が減弱したことから、Th1/Th2 バランス(Th1 反応が減弱すれば Th2 反応が増強する)の考え方が、必ずしも当てはまらないことを示すことができたと思う。今後は、脂質メディエーターとその受容体を中心に、*in vitro* と *in vivo* の両方の視点から、免疫反応・炎症反応を解析し、将来の創薬につなげていきたいと考えている。免疫学的な実験に長けたポストドクの採用は有効で、遺伝子改変マウスの解析に当たって実験手法の広がり、予想以上の表現型の解析が得られたものと評価している。

6 研究総括の見解:

GPCRは対象とする受容体分子の数が多いだけに、研究開始の初期段階では、研究焦点の分散化が懸念された。それが見事に克服され、注目すべき成果が現在着実に上げられつつある。医学部出身者としての本領を活かして、医療分野への波及効果にも見るべきものがある。今後の着実な成長とブレークスルーを期待できる逸材である。

7 主な論文等:

論文

1. Ito N, Yokomizo T, Sasaki T, Kurosu H, Penninger J, Kanaho Y, Katada T, Hanaoka K, Shimizu T:
Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B4-induced enzyme release.
J. Biol. Chem. 277, 44898-44904, 2002
2. Ogasawara H, Ishii S, Yokomizo T, Kakinuma T, Komine M, Tamaki K, Shimizu T, Izumi T:
Characterization of mouse cysteinyl leukotriene receptors mCysLT1 and mCysLT2: differential pharmacological properties and tissue distribution.
J. Biol. Chem. 277, 18763-18768, 2002
3. Obinata H, Yokomizo T, Shimizu T, Izumi T:
Glucocorticoids up-regulate leukotriene B4 receptor-1 expression during neutrophilic differentiation of HL-60 cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 309, 114-119, 2003
4. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T:
Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.
Nature 423, 762-769, 2003
5. Masuda K, Itoh H, Sakihama T, Akiyama C, Takahashi K, Fukuda R, Yokomizo T, Shimizu T, Kodama T, Hamakubo T:
A combinatorial G protein-coupled receptor reconstitution system on budded baculovirus. Evidence for G α and G α coupling to a human leukotriene B4 receptor.
J. Biol. Chem. 278, 24552-24562, 2003
6. Okuno T, Ago H, Terawaki K, Miyano M, Shimizu T, Yokomizo T:
Helix 8 of the leukotriene B4 receptor is required for the conformational change to the low-affinity state after G-protein activation.
J. Biol. Chem. 278, 41500-41509, 2003
7. Hori T, Yokomizo T, Ago H, Sugahara M, Ueno G, Yamamoto M, Kumasaka T, Shimizu T and Miyano M:
Structural basis of leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase/15-oxo-prostaglandin 13-reductase catalytic mechanism and a possible SH3 binding loop.
J. Biol. Chem. 279, 22615-22623, 2004
8. Murakami N, Yokomizo T, Okuno T, Shimizu T:
G2A is a proton-sensing G-protein coupled receptor antagonized by lysophosphatidylcholine.
J. Biol. Chem. 279, 42484-42491, 2004

総説

1. Toda A, Yokomizo T, Shimizu T:

- Leukotriene B4 receptors.
Prostaglandins Other Lipid Mediat. 68-69, 575-585, 2002
2. Yokomizo T, Noiri E, Izumi T, Shimizu T:
 In vivo chemotaxis using CHO cells expressing human leukotriene B4 receptor.
Adv. Exp. Med. Biol. 507, 357-361, 2002
 3. Brink C, Dahlen SE, Drazen J, Evans JF, Hay DWP, Nicosia S, Serhan CN, Shimizu T, Yokomizo T:
 International Union of Pharmacology-Classification of Leukotriene and Lipoxin Receptors: Distribution, Function and Molecular Aspects.
Pharmacol. Rev. 55, 195-227, 2003
 4. Brink C, Dahlen SE, Drazen J, Evans JF, Hay DWP, Nicosia S, Serhan CN, Shimizu T, Yokomizo T
 International Union of Pharmacology XLIV. Nomenclature for the Oxoeicosanoid Receptor.
Pharmacol. Rev. 56, 149-157, 2004
 5. 横溝岳彦
 ロイコトリエン B4.
炎症と免疫 10, 712-715, 2002
 6. 横溝岳彦
 ロイコトリエン B4 の代謝と受容体.
生化学 74, 1139-1147, 2002
 7. 伊藤伸子、横溝岳彦
 アラキドン酸カスケードに関する最新の知見.
ペインクリニック 25, 1050-1058, 2004
 8. 横溝岳彦
 脂質メディエーターと炎症・免疫
脂質生物学がわかる (清水孝雄編:羊土社, 東京) 90-97, 2004
 9. 横溝岳彦
 ロイコトリエンと肺線維症
分子呼吸器病 8, 511-513, 2004
 10. 横溝岳彦
 ロイコトリエン受容体
 医学の歩み別冊 7 回膜貫通型受容体研究の新展開, 212, 89-94, 2005
 11. 寺脇 幹、横溝岳彦
 ロイコトリエンと免疫・炎症の基盤
アレルギーと炎症 印刷中
 12. 戸田晶子、横溝岳彦
 ロイコトリエン
Annual Review 内分泌, 印刷中
 13. 横溝岳彦
 オープン受容体の脂質リガンド探索戦略
脂質研究の最前線(実験医学増刊号) 印刷中
 14. 横溝岳彦
 免疫疾患・アレルギー病態におけるロイコトリエン
臨床免疫学(山本一彦編:日本臨床社、大阪) 印刷中

招待講演

1. Yokomizo T, Terawaki K, Shimizu T
Leukotriene B4 receptors: Cloning, Pharmacology, and Functions in vivo,
6th World Congress on Inflammation, Vancouver, 2003
2. Yokomizo T. and Shimizu T
In vitro and *in vivo* roles of leukotriene B4 receptors
Keystone Symposia, Taos, 2004
3. Yokomizo T., Terawaki K., Toda A., Nagase T. and Shimizu T.
Attenuated immunological and inflammatory responses in leukotriene B4 receptor 1
(BLT1)-deficient mice
2nd international conference on phospholipase A2 and 8th international congress on
platelet-activating factor and related lipid mediators, Berlin, 2004
4. 横溝岳彦
ロイコトリエン B4 受容体 BLT1 の生体内での機能
第 24 回日本炎症・再生医学会ワークショップ, 京都, 2003
5. Yokomizo, T., Shimizu, T.
Reduced airway hyperreactivity, eosinophil acculation, and IgE production in leukotriene B4
receptor 1-null mice
第 33 回日本免疫学会シンポジウム, 福岡, 2003
6. 横溝岳彦
ロイコトリエン B4 受容体 BLT1 の気道過敏性における役割
日本薬学会 第 124 年会, 大阪, 2004
7. 横溝岳彦
ロイコトリエン B4 受容体を介した細胞走化性
第 25 回日本炎症・再生医学会ワークショップ, 東京, 2004
8. 横溝岳彦, 清水孝雄
生理活性脂質受容体の orphaning,
第 111 回日本薬理学会関東部会, つくば, 2004
9. 戸田晶子, 横溝岳彦, 寺脇 幹, 清水孝雄
免疫反応におけるロイコトリエン B4 受容体 BLT1 の役割
第 78 回日本薬理学会年会, 横浜, 2005