

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

オーファン受容体の脂質天然リガンドの探索

### 2. 氏名

石井 聡

### 3. 研究のねらい

7回の膜貫通部位を持つ G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は哺乳動物では数百種類存在し、タンパク質の中で最大のスーパーファミリーを形成している。細胞膜上に存在して多彩な細胞内シグナルを惹起する GPCR は、匂いやフェロモン、味、光など外来刺激に反応するものと、脂質やペプチド、アミン、核酸など生体の代謝産物 (天然リガンド) に反応するものに大別される。後者の GPCR はヒトの生理現象や病態に重要な役割を果たしていると考えられている。事実、現在販売されている薬の多くは天然リガンドに反応する GPCR をターゲットとしており、その割合は 30%とも 50%とも言われている。ヒトゲノム解析の結果から 100 を超えるリガンド不明の GPCR、いわゆるオーファン GPCR の存在が明らかになったが、一部の脂質はこのオーファン GPCR を介して病態生理学的に強い影響を生体へ及ぼしている可能性が高い。そこで本研究では、オーファン GPCR の脂質天然リガンドを見つけること (脱オーファン化) を目的とする。さらにその GPCR の生物学的な機能を解析することにより、関連疾患を解明することに加え、新規薬剤の開発を介して疾患治療に貢献する可能性を模索する。

### 4. 研究成果

#### A. p2y5 受容体の脱オーファン化 (Manuscript under revision.)

脂質をリガンドとすることが既に明らかになっているヒト GPCR (図 1) のアミノ酸配列を元に、本研究の対象となる「脂質をリガンドとすることが予想される」オーファン GPCR 候補 (約 20 種類) を選んだ。これら GPCR の DNA クローニングを行ったが、その際に各 GPCR の N 末に 9 アミノ酸から成る「エピープタグ」が付加されるように DNA 塩基配列を改変した。次にこれらオーファン GPCR の安定発現動物細胞を樹立した。細胞は CHO-K1 細胞、CHO-S 細胞 (チャイニーズハムスターの卵巢由来という点では CHO-K1 と同じであるが、まったく別系統の細胞)、RH7777 細胞 (ラット肝臓由来の細胞) 及び B103 細胞 (ラット神経由来の細胞) を用いた。各 GPCR の N 末 (空間配置的には細胞外に向いている) に付加したエピープタグの細胞表面における発現量を指標に、セル

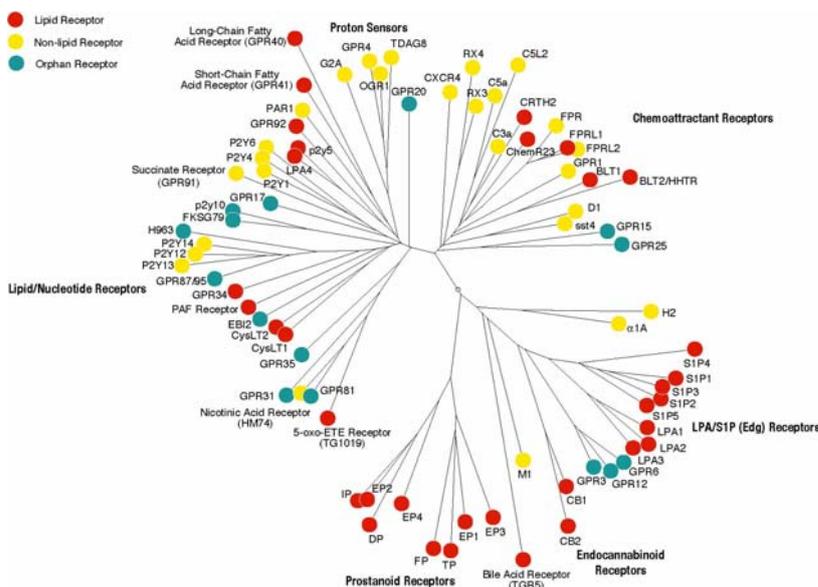


図 1 種々のヒト GPCR のアミノ酸配列をもとに構築した系統樹。任意の 2 つの受容体を結ぶ線の長さの総和が小さい程、お互いは近縁でアミノ酸相同性が高い。リガンドが同じまたは類似の化学構造をもつ GPCR どうし、また機能が類似する GPCR どうしはこの系統樹上で集まる傾向がある。

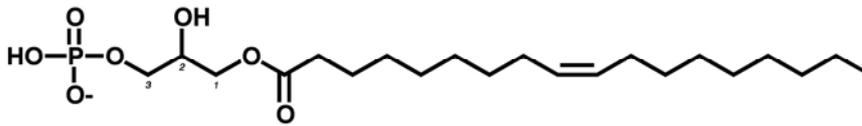


図2 LPAの化学構造。LPAは3価のアルコールであるグリセロールに脂肪酸が *sn*-1位または *sn*-2位に、そしてリン酸が *sn*-3位に結合したリン脂質の総称である。この図では *sn*-1位にオレイン酸が結合した1-オレオイル LPAを示したが、断りのない限り以降の実験ではこのLPAを用いた。

ソーターを用いて受容体発現レベルの高い細胞集団を選別して回収して実験に用いた。GPCRの発現レベルは、発現させる細胞によってもまたGPCRの種類

によっても異なっていた(データ略)。

樹立したオーファンGPCRの安定発現細胞のそれぞれに対して約200種類の脂質分子を作用させ、細胞に及ぶ変化を観察した。具体的には、細胞内カルシウムや細胞内サイクリックAMPというGPCRの活性化に伴って濃度が増加するセカンドメッセンジャーに加え、細胞形態も変化の指標とした。その結果、オーファンGPCRの1つであるp2y5を安定発現したB103細胞とRH7777細胞において、リゾホスファチジン酸(LPA: 図2)が神経突起退縮と小胞形成をそれぞれの細胞に引き起こすことが明らかとなった(図3)。LPAがp2y5を介して引き起こす細胞形態変化は、Rhoキナーゼ阻害剤であるY27632の前処理によってほぼ抑制できたことから(図3)、低分子量Gタンパク質の一種であるRhoが関与する現象であると考えられた。なお、LPAはどの細胞に対しても細胞内カルシウムやサイクリックAMP濃度に影響を及ぼさなかった。

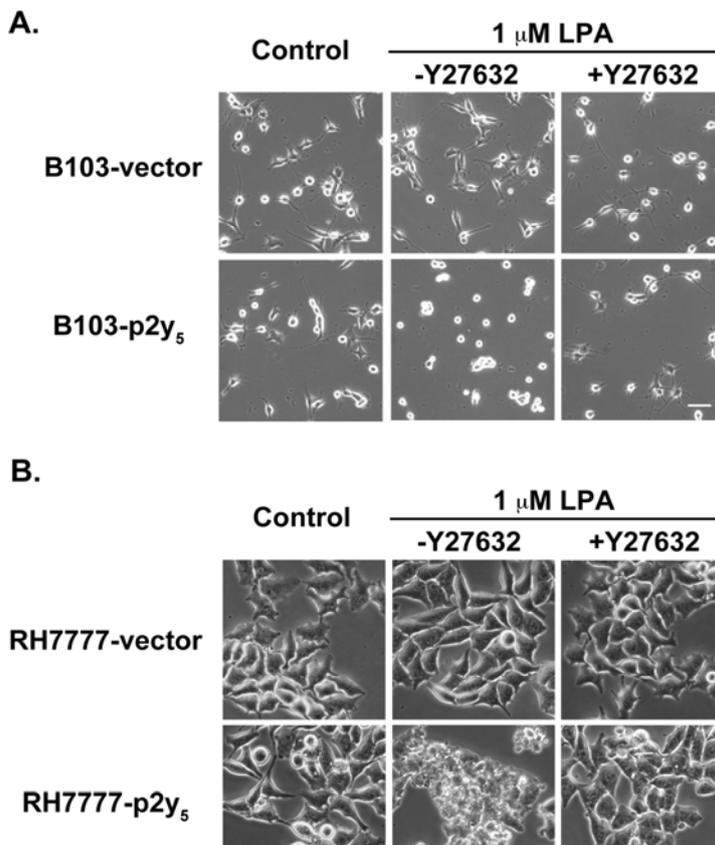


図3 LPAによるB103細胞の神経突起退縮とRH7777細胞の小胞形成。A. p2y5安定発現B103細胞を血清飢餓条件で12時間培養した後に、1  $\mu$ M LPAで15分間刺激した。2%パラホルムアルデヒドで固定した細胞を写真撮影した。Rhoキナーゼを阻害した実験では、5  $\mu$ M Y27632で予め10分間処理した。横向きバーは50  $\mu$ mを表す。B. p2y5安定発現RH7777細胞をAと同じ実験条件で処理した。横向きバーは50  $\mu$ mを表す。

RH7777細胞から膜画分を調製し、これをトリチウムで放射ラベル化したLPAと反応させた。その結果、ネガティブコントロール細胞から調製した膜画分では認められないLPAの特異的結合が、p2y5を発現する細胞の膜画分で観察することができた(図4)。この結果はp2y5がLPAの受容体であることを強く支持する。さらに、p2y5を一過的にまたは安定的に発現させたRH7777細胞の膜画分において、LPAによるGDP/GTP交換反応の促進も観察された(データ略)。この結果もまたp2y5がLPAの受容体であることを支持し、しかもGタンパク質と共役するタイプのGPCRであることを示す。Gタンパク質にはいくつか種類があり、GPCRによって共役するGタンパク質は異なることが知られている。p2y5の場合、低分子量Gタンパク質Rhoの活性化に伴う形態変化を細胞に惹起したが、過去の報告を考慮するとp2y5はG13タンパク質と共役することが予想された。そこで、p2y5を発現するB103細胞にさらにGsとG13タンパク

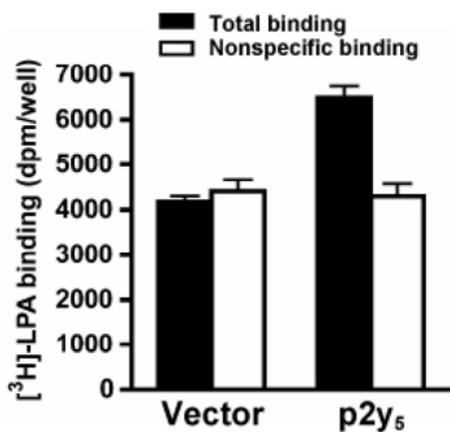


図4 p2y5 安定発現RH7777 細胞由来の膜画分へのトリチウムラベルした 1-オレオイルLPAの結合。30 nMの<sup>3</sup>H]-1-オレオイルLPAを膜画分と 4°Cで70分間インキュベートした。反応液をガラスフィルターでろ過し、洗浄した後、フィルターに吸着している放射能を計測した(総結合)。非特異的結合を検出するために10 μMのトリチウムラベルしていない1-オレオイルLPAを共存させた実験も平行して行った。「特異的結合」とは「総結合」から「非特異的結合」を差し引いた値を指す。データは平均値+標準誤差 (n=3)。

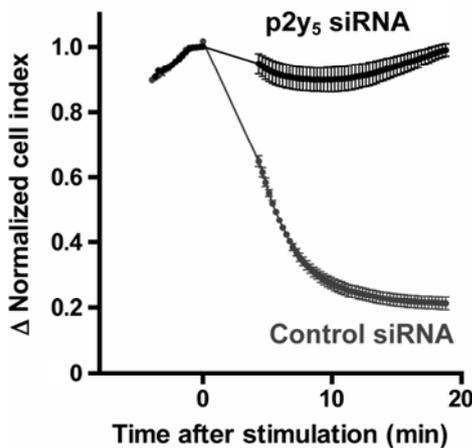


図5 HUVECの形態変化に対するp2y5の役割。siRNAを導入したHUVECを血清飢餓状態で4時間培養後、5 μM LPAで刺激した。その後の細胞形態変化を示す指標としての細胞-ディッシュ間の抵抗値(Δ Normalized cell indexと示す)の時間変化を示す。データは平均値±標準誤差 (n=6)。

質のキメラタンパク質を発現させてLPAで刺激した。このキメラタンパク質の存在下でG13タンパク質と共役するGPCRが活性化すると、アデニル酸シクラーゼが活性化されるためにサイクリックAMP産生量が増加する。やはり予想通り、LPA濃度依存的なサイクリックAMP産生の亢進がこのキメラタンパク質発現細胞で観察された(データ略)。

最近、遺伝学的アプローチによりp2y5がヒトの毛髪成長異常原因遺伝子であることが報告され、p2y5がLPAの受容体であることも併せて示唆された(Pasternack *et al.* (2008) *Nat Genet* 40, 329-334)。グリセロール骨格のsn-2位に脂肪酸を結合した2-アシルLPAの産生酵素であるmPA-PLA1の変異もp2y5の変異と同様の毛髪異常につながることから、p2y5の天然リガンドとして2-アシル型LPAは1-アシルLPAよりも強力である可能性が高い。そこで、上述したGsとG13のキメラタンパク質を発現させてサイクリックAMP産生を観察するアッセイ系を利用してこの点についての検討を行った。その結果、実際に2-オレオイルLPAが1-オレオイルLPAに比べてp2y5のより強いリガンドとして機能することが明らかになった(データ略)。さらに、オレイン酸以外の脂肪酸が結合したLPAについてもいくつか調べたが、やはりどの2-アシルLPAでも1-アシルLPAより強力であった(データ略)。

ここまでの実験では培養細胞に外来性のp2y5を発現した条件で行い、このGPCRの機能を解析してきた。そこで次に、細胞に内在的に発現するp2y5の機能を解析することとした。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)はLPA刺激によりRhoの活性化を起こすことが論文報告されている。これに加え、トランスクリプトームデータベース(東京大学システム生物医学データベースシステム)にはHUVECにおけるp2y5 mRNAの高い発現が示されている。このことから私は、p2y5を内在的に発現する細胞としてHUVECを解析対象に選び、この細胞の形態に対するp2y5の機能を調べた。もともと扁平型のHUVECはLPAに反応して球形に細胞形態を変化させた(データ略)。この変化は先に述べたp2y5を発現するB103細胞で観察されたものと似ており(図3A)、p2y5が関わる可能性が考えられた。そこで、RNA干渉法によってHUVEC内のp2y5 mRNAレベルを低下させたときのLPAへの反応を観察した。この際、細胞の形態変化を客観的に評価するためにRoche社のxCELLigenceというシステムで細胞とディッシュの間の抵抗値を計った。ネガティブコントロールのsiRNAを導入されたHUVECでは、LPAによって細胞が球形になることに起因すると思われる抵抗値の急激な低下が起きた(図5)。一方でp2y5のsiRNAを導入されたHUVECではLPAによる抵抗値の低下は大きく抑制された。この結果は内因性のp2y5もまた細胞の形態を調節する

機能をもつことを示唆する。

本研究では、オーファン GPCR の p2y5 が新規 LPA 受容体であることを明らかにした。さらに p2y5 は G13 タンパク質と共役して細胞形態を調節する機能を持つことが示唆された。HUVEC を解析した結果より、p2y5 は血管内皮細胞における形態変化を通して血管透過性の調節因子として働く可能性が示された。p2y5 のリガンド指向性に関しては 2-アシル LPA の方が 1-アシル LPA よりも高く、この結果はともに毛包の内根鞘に発現する p2y5 または mPA-PLA1 の欠損が毛髪成長異常に至ることと矛盾しないと思われた。LPA は多彩な生理機能を発揮する脂質メディエーターであるが、現在までに 5 種類の GPCR (LPA1-LPA5) が明らかになっている。本研究の結果は p2y5 の生物学的機能の一端を明らかにしたと同時に、p2y5 が第 6 番目の LPA 受容体 LPA6 と命名できる分子であることを示した。今後の更なる LPA6 の解析によって毛髪の成長や血管透過性に関する詳細なメカニズムはもとより、この GPCR の別の生物学的機能を解明することを目指したい。

**B. LPA4 受容体の機能解析** (Yanagida, K., Ishii, S., Hamano, F., Noguchi, K., and Shimizu, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 5814-5824)

2003 年に私どもは、p2y9 または GPR23 と呼ばれていたオーファン GPCR が、第 4 番目の LPA 受容体 (LPA4) であることを突きとめ報告した (Noguchi, K., Ishii, S., and Shimizu, T. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 25600-25606)。脳に豊富な LPA は神経細胞の形態や生存に影響を及ぼすことが数多く報告されている。LPA4 mRNA はラットの胎児海馬由来神経細胞や不死化した海馬神経前駆細胞で発現するとの報告がある。またマウス胎児の脳においても高いレベルで発現していることを私は観察している (データ略)。そこで、神経細胞における LPA4 の機能を評価するために、LPA4 を安定発現した B103 細胞における細胞内シグナル伝達経路の解析を行った。比較対象として、やはり神経細胞で機能することが明らかにされている LPA1 受容体を安定発現した B103 細胞を用いた。安定発現細胞の樹立は、上記 A.と同様の方法に依った。

LPA4-B103 細胞において  $G_q$  依存性 Ca 反応が LPA によって惹起されたが、アデニル酸シクラーゼ活性への影響は認められなかった。故にこの細胞において LPA4 は  $G_s$  にも  $G_i/o$  にも共役して

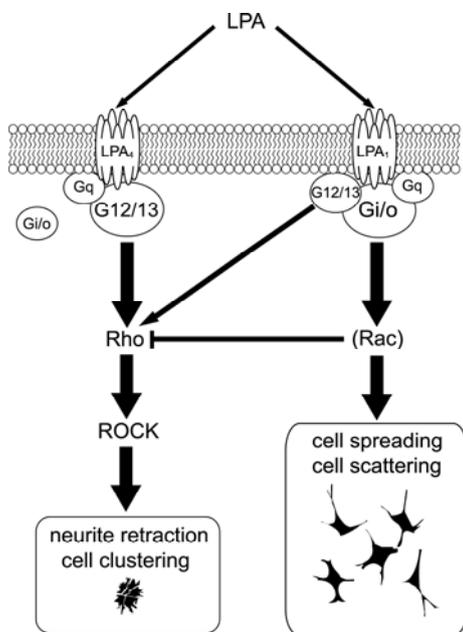


図 6 B103 細胞に異なる形態をもたらす LPA1 と LPA4 の独特な細胞内シグナル経路。LPA4 は LPA1 と同様に  $G_q$  と  $G_{12/13}$  と共役する一方で、LPA1 と違って  $G_{i/o}$  とは共役していない。この性質の違いが、細胞形態変化の違いをもたらす。詳細は本文参照。

いないと考えられた。さらに図 7 に示すように、この細胞は LPA に反応して顕著な細胞形態変化、すなわち神経突起の退縮および細胞凝集を示した。これらの形態変化には p2y5 と同様に  $G_{12/13}$  と Rho を介した細胞内シグナルが関わっていることが明らかになった。これとは対照的に、LPA1-B103 細胞は LPA 刺激時に LPA4-B103 細胞とは異なる形態変化、すなわち扁平化および分散化に至った (図 7)。しかし、百日咳毒素処理で  $G_{i/o}$  の活性を阻害した LPA1-B103 細胞では、LPA4-B103 細胞のように凝集化するようになった。この結果は、LPA1-B103 細胞では  $G_{i/o}$  によって活性化された Rac が Rho の活性を抑制するため、普段は  $G_{12/13}$  からの細胞内シグナルがマスクされていることを示唆する。以上の結果から、LPA4 は LPA1 とは異なった細胞内シグナルを介して、発生期の神経細胞移動、さらには神経回路のリモデリングやシナプスの可塑性などに対して独特の機能を発揮している可能性が伺えた。

## 5. 自己評価

本研究期間中に二つのオーファン GPCR の脱オーファン化をすることができた点については、当初の目標を概ね達成することができたと考えている。しかしながら、リガンドとして同定された脂質分子はすべて購入した精製品であった。生体試料から抽出した脂質の中から精製することにより、未知の生理活性脂質リガンドを同定する試みは、結局のところ成功に至らなかったことには力量不足を感じている。LPA4 受容体に関しては、少なくとも 6 種類の LPA 受容体が存在する中で、この受容体が担う独特な機能を培養細胞やノックアウトマウスを用いてある程度明らかにすることができた。この点についてもある程度満足できる成果と考えている。これら脱オーファン化および LPA4 解析の結果について、総じて論文発表が研究終了までに間に合わないものが多々あったことは反省すべき点である。

## 6. 研究総括の見解

オーファン受容体の機能の解析を出発点とし、リガンド結合実験ではうまく解析できなかった受容体を、細胞の形態変化を指標に突き止める方法、レポーターを組み込んだキメラタンパク質を使った系を開発して、同定した。LPA の受容体が P2Y5 であることを証明できた点は高く評価できる。今後さらに、新規生理活性脂質およびその受容体の同定が望まれる。新規因子の探索は非常に困難であることは理解できるが、新たな探索法の確立など、次のステップに繋がるチャレンジングな方向に進めて欲しい。

## 7. 主な論文等

### (A) さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

#### (1) 論文(原著論文)発表 \* Corresponding author

1. Yanagida, K., **Ishii, S.\***, Hamano, F., Noguchi, K., and Shimizu, T. (2007) LPA<sub>4</sub>/p2y<sub>9</sub>/GPR23 mediates Rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line. **J. Biol. Chem.** 282, 5814–5824.

#### (2) 特許

なし

#### (3) 総説 \* Corresponding author

1. Hikiji H., Takato T., Shimizu T., and **Ishii S.\*** (2008) The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Prog. Lipid Res.** 47, 107–126.

#### (4) 招待講演

1. 石井聡 G タンパク質共役型受容体の機能解明と呼吸器学への応用  
第 47 回日本呼吸器学会学術講演会 2007 年 5 月 12 日
2. 石井聡 システイニルロイコトリエンの生体機能 -CysLT2 とアレルギー性炎症-  
第 28 回日本炎症・再生医学会ワークショップ 2007 年 8 月 2 日
3. 石井聡 リゾホスファチジン酸受容体 LPA4 と LPA5 の生体機能  
BMB2007(第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会)  
2007 年 12 月 13 日
4. 石井聡 脂質メディエーター受容体の病態機能 -ベンチサイドからの呼吸器研究-  
第 5 回東京レスピレーションフロンティア 2008 年 11 月 7 日
5. 石井聡 非 EDG 型リゾホスファチジン酸受容体の生体機能  
BMB2008(第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会)  
2008 年 12 月 9 日

(B) その他の主な成果

(1) 論文(原著論文)発表

1. Shindou, H., Hishikawa, D., Nakanishi, H., Harayama, T., **Ishii, S.**, Taguchi, R., and Shimizu, T. (2007) A single enzyme catalyzes both PAF production and membrane biogenesis of inflammatory cells: cloning and characterization of acetyl-CoA:lyso-PAF acetyltransferase. **J. Biol. Chem.** 282, 6532–6539.
2. Tsuda, M., **Ishii, S.**, Masuda, T., Hasegawa, S., Nakamura, K., Nagata, K., Yamashita, T., Furue, H., Tozaki-Saito, H., Yoshimura, M., Koizumi, S., Shimizu, T., and Inoue, K. (2007) Reduced pain behaviors and ERK activation in primary sensory neurons by peripheral tissue injury in mice lacking platelet-activating factor receptor. **J. Neurochem.** 102, 1658–1668.
3. Kihara, Y., Yanagida, K., Masago, K., Kita, Y., Hishikawa, D., Shindou, H., **Ishii, S.**, and Shimizu, T. (2008) Platelet-activating factor production in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis mice via the group IVA cytosolic PLA2-LysoPAFAT axis. **J. Immunol.** 181, 5008–5014.