

# 研究報告書

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

(研究領域:「代謝と機能制御」)

研究者氏名：石井 聡

(研究期間：2005年10月1日～2009年3月31日)

# 研究報告書

## 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 amino 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「エピトプタグ」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巣由来という点では 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)に付加したエピトプタグの細胞表面における発現量を指標に、セル

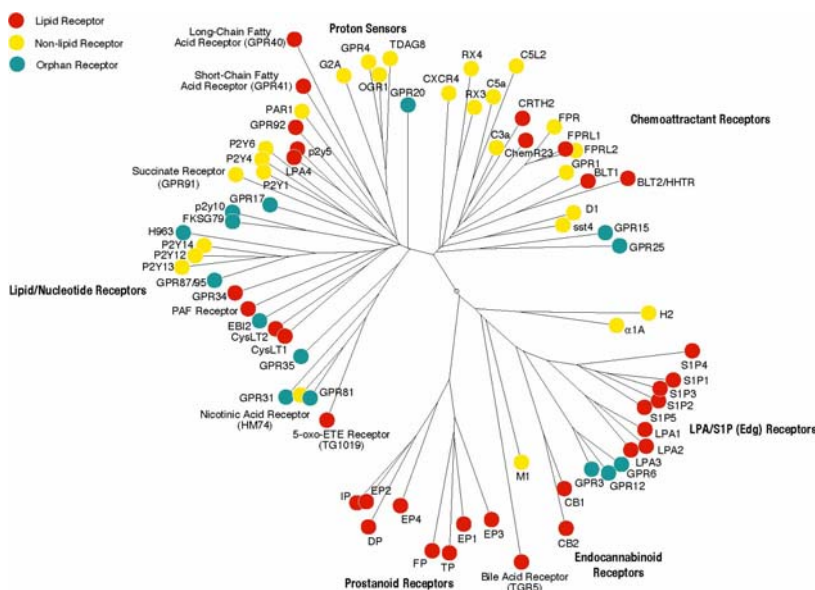


図 1 種々のヒト GPCR の amino 酸配列をもとに構築した系統樹。任意の 2 つの受容体を結ぶ線の長さの総和が小さい程、お互いは近縁で amino 酸相同性が高い。リガンドが同じまたは類似の化学構造をもつ GPCR どうし、また機能が類似する GPCR どうしはこの系統樹上で集まる傾向がある。

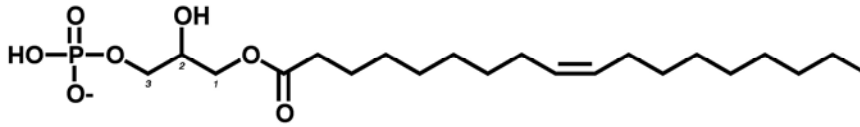


図2 LPAの化学構造。LPAは3価のアルコールであるグリセロールに脂肪酸が *sn*-1位または *sn*-2位に、そしてリン酸が *sn*-3位に結合したリン脂質の総称である。この図では *sn*-1位にオレイン酸が結合した1-オレオイル LPAを示したが、断りのない限り以降の実験ではこの LPA を用いた。

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。

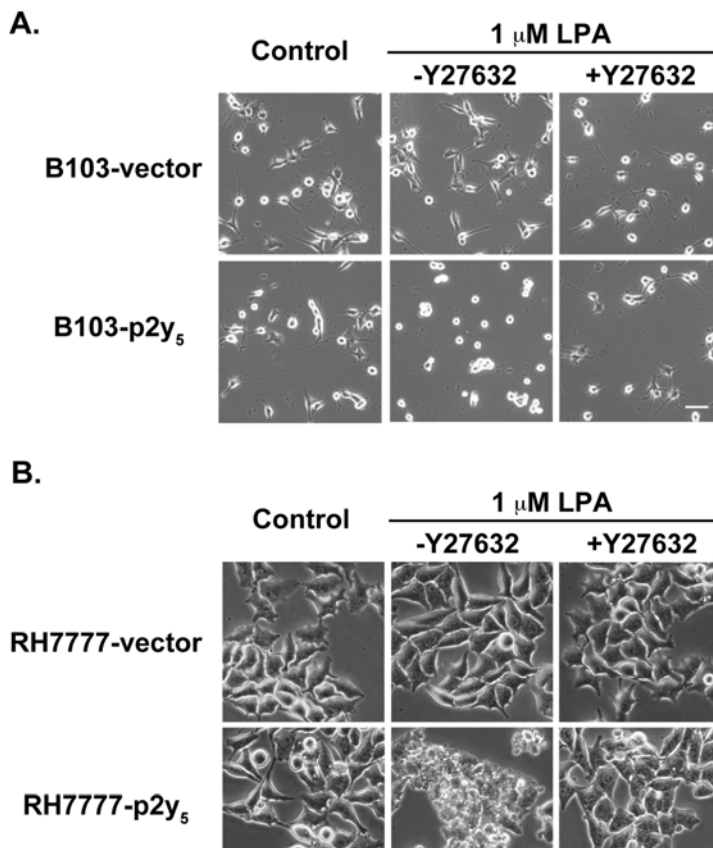


図3 LPAによる B103 細胞の神経突起退縮と RH7777 細胞の小胞形成。A. p2y5 安定発現 B103 細胞を血清飢餓条件で 12 時間培養した後に、1  $\mu$ M LPA で 15 分間刺激した。2%パラホルムアルデヒドで固定した細胞を写真撮影した。Rho キナーゼを阻害した実験では、5  $\mu$ M Y27632 で予め 10 分間処理した。横向きバーは 50  $\mu$ m を表す。B. p2y5 安定発現 RH7777 細胞を A と同じ実験条件で処理した。横向きバーは 50  $\mu$ m を表す。

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

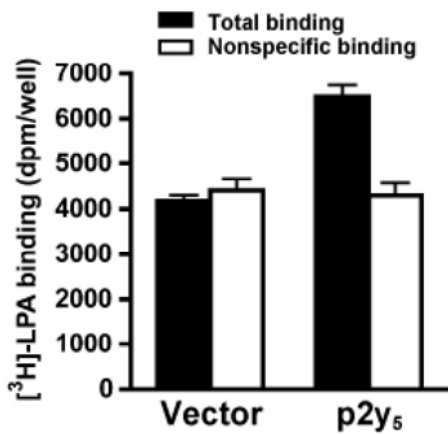


図4 p2y5 安定発現RH7777 細胞由来の膜画分へのトリチウムラベルした 1-オレオイル LPA の結合。30 nM の  $[^3\text{H}]$ -1-オレオイル LPA を膜画分と 4°C で 70 分間インキュベートした。反応液をガラスフィルターでろ過し、洗浄した後、フィルターに吸着している放射能を計測した (総結合)。非特異的結合を検出するために 10  $\mu\text{M}$  のトリチウムラベルしていない 1-オレオイル LPA を共存させた実験も平行して行った。「特異的結合」とは「総結合」から「非特異的結合」を差し引いた値を指す。データは平均値 + 標準誤差 ( $n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

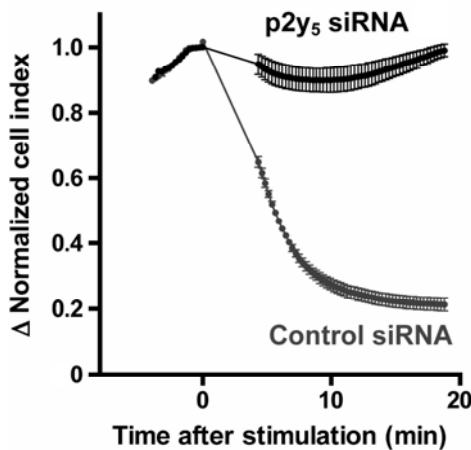


図5 HUVEC の形態変化に対する p2y5 の役割。siRNA を導入した HUVEC を血清飢餓状態で 4 時間培養後、5  $\mu\text{M}$  LPA で刺激した。その後の細胞形態変化を示す指標としての細胞-ディッシュ間の抵抗値 ( $\Delta$  Normalized cell index と示す) の時間変化を示す。データは平均値  $\pm$  標準誤差 ( $n = 6$ )。

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

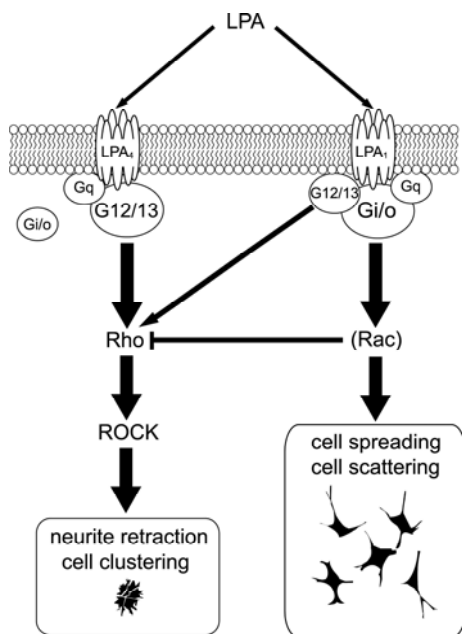


図 6 B103 細胞に異なる形態をもたらす LPA1 と LPA4 の独特な細胞内シグナル経路。LPA4 は LPA1 と同様に  $G_q$  と  $G_{12/13}$  と共役する一方で、LPA1 と違って  $G_{i/o}$  とは共役していない。この性質の違いが、細胞形態変化の違いをもたらす。詳細は本文参照。

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. 今後の展開

脂質リガンドに着目したオーファン GPCR の脱オーファン化への取り組みは、今後も地道に行っていくつもりである。一方、さきがけ研究で既に得られた成果を発展させていくためには、現在までに脱オーファン化した GPCR と疾患との関連を見極めて臨床応用に向けた知見を集め続けることが重要と考えている。当面はノックアウトマウスの表現型解析や培養細胞を用いた細胞内シグナル伝達解析が研究の中心となるであろうが、もしその過程で臨床応用の可能性が見いだせたときには専門家との積極的な共同研究を図っていきたい。

## 6. 研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Zhang Q, Mousdicas N, Yi Q, Al-Hassani M, Billings SD, Perkins SM, Howard KM, Ishii S, Shimizu T, Travers JB, Staphylococcal lipoteichoic acid inhibits delayed-type hypersensitivity reactions via the platelet-activating factor receptor, *J. Clin. Invest.*, vol. 115, 2855-2861 (2005)
2. Toyo-Oka K, Sasaki S, Yano Y, Mori D, Kobayashi T, Toyoshima YY, Tokuoka SM, Ishii S, Shimizu T, Muramatsu M, Hiraiwa N, Yoshiki A, Wynshaw-Boris A, Hirotsune S., Recruitment of katanin p60 by phosphorylated NDEL1, an LIS1 interacting protein, is essential for mitotic cell division and neuronal migration, *Hum. Mol. Genet.*, vol. 14, 3113-3128 (2005)
3. van der Sluijs KF, van Elden LJ, Nijhuis M, Schuurman R, Florquin S, Shimizu T, Ishii S, Jansen HM, Lutter R, van der Poll T, Involvement of the platelet-activating factor receptor in host defense against *Streptococcus pneumoniae* during postinfluenza pneumonia, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 290, L194-L199 (2006)
4. Doi, K., Okamoto, K., Negishi, K., Suzuki, Y., Nakao, A., Fujita, T., Toda, A., Yokomizo, T., Kita, Y., Kihara, Y., Ishii, S., Shimizu, T., Noiri, E., Attenuation of folic acid-induced renal inflammatory injury in platelet-activating factor receptor-deficient mice, *Am. J. Pathol.*, vol. 168, 1413-1424 (2006)
5. Schaefer, M.B., Ott, J., Mohr, A., Bi, M.H., Grosz, A., Weissmann, N., Ishii, S., Grimminger, F., Seeger, W., Mayer, K., Immunomodulation by n-3- vs. n-6-rich lipid emulsions in murine acute lung injury ? role of platelet-activating factor receptor, *Crit. Care Med.*, vol. 35, 544-554 (2007)
6. Yanagida, K., Ishii, S., Hamano, F., Noguchi, K., Shimizu, T., LPA4/p2y9/GPR23 mediates Rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line, *J. Biol. Chem.*, vol. 282, 5814-5824 (2007)
7. Shindou, H., Hishikawa, D., Nakanishi, H., Harayama, T., Ishii, S., Taguchi, R., Shimizu, T., 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.*, vol. 282, 6532-6539 (2007)
8. Witzernath, M., Gutbier, B., Owen, J.S., Schmeck, B., Mitchell, T.J., Mayer, K., Thomas, M.J., Ishii, S., Rosseau, S., Suttorp, N., Schutte, H., Role of platelet-activating factor in pneumolysin-induced acute lung injury, *Crit. Care Med.*, vol. 35, 1756-1762 (2007)
9. 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., Inoue, K., Reduced pain behaviors and ERK activation in primary sensory neurons by peripheral tissue injury in mice lacking platelet-activating factor receptor, *J. Neurochem.*, vol. 102, 1658-1668 (2007)
10. Jiang, W., Hall, S.R., Moos, M.P.W., Cao, R.Y., Ishii, S., Ogunyankin, K.O., Melo, L.G., Funk, C.D., Endothelial cysteinyl leukotriene 2 receptor (CysLT2R) expression mediates myocardial

- ischemia-reperfusion injury, Am. J. Pathol., vol. 172, 592-602 (2008)
11. Kihara, Y., Yanagida, K., Masago, K., Kita, Y., Hishikawa, D., Shindou, H., Ishii, S., Shimizu, T., Platelet-activating factor production in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis mice via the group IVA cytosolic PLA2-LysoPAFAT axis, J. Immunol., vol. 181, 5008-5014 (2008)
  12. Moos, M.P.W., Mewburn, J.D., Kan, F.W.K., Ishii, S., Abe, M., Sakimura, K., Noguchi, K., Shimizu, T., Funk, C.D., Cysteinyl leukotriene 2 receptor-mediated vascular permeability via transendothelial vesicle transport, FASEB J., vol. 22, 4352-4362 (2008)
  13. Welch, E.J., Naikawadi, R.P., Li, Z., Lin, P., Ishii, S., Shimizu, T., Tirupathi, C., Du, X., Subbaiah, P.V., Ye, R.D., Opposing effects of platelet-activating factor and lyso-platelet activating factor on neutrophil and platelet activation, Mol. Pharmacol., vol. 75, 227-234 (2009)
  14. Mogi, C., Tobo, M., Tomura, H., Murata, N., He, X.-d., Sato, K., Kimura, T., Ishizuka, T., Sasaki, T., Sato, T., Kihara, Y., Ishii, S., Harada, A., Okajima, F., Involvement of proton-sensing TDAG8 in extracellular acidification-induced inhibition of pro-inflammatory cytokine production in peritoneal macrophages, J. Immunol., in press

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果

(A)学会発表

1. 石井聡、野口響子、神谷寿美子、阿部学、崎村健司、清水孝雄、システニルロイコトリエン第二受容体の生体制御機能の解析、第 78 回日本生化学会(神戸)(2005 年 10 月 22 日)
2. 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教育講演(東京)(2007 年 5 月 12 日)
3. 石井聡、システ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(東京)(2007 年 8 月 2 日)
4. 石井聡、柳田圭介、井原裕一郎、住田隼一、木原泰行、野口響子、清水孝雄、阿部学、崎村建司、リゾホスファチジン酸受容体 LPA4 と LPA5 の生体機能、BMB2007(横浜)(2007 年 8 月 2 日)
5. 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(東京)(2008 年 11 月 7 日)
6. 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(神戸)(2008 年 12 月 9 日)
7. 石井聡、井原裕一郎、木原泰行、国田朱子、北芳博、浜野文三江、柳田圭介、油谷浩幸、深山正久、清水孝雄、細胞外 pH 感知性 G 蛋白質共役型受容体 TDAG8 の癌の進展における役割、第 3 回炎症・脂質代謝・メタボリサーチフォーラム(東京)(2009 年 1 月 31 日)

(B)受賞

なし

(C)著作物

1. Hikiji H., Takato T., Shimizu T., Ishii S., The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease, Prog. Lipid Res., vol. 47, 107-126 (2008)
2. 石井聡, 遺伝子改変マウスの問題点, 呼吸と循環, vol. 56, 913-918 (2008)
3. 石井聡, 気管支喘息とGタンパク質共役型受容体, Annual Review 呼吸器 2009, pp1-6