

# 生理活性脂質受容体の機能解析：In vivo と in vitro

## —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—



横溝 岳彦

東京大学大学院医学系研究科 助教授

### 1. 私が知りたかったこと

G タンパク質共役型受容体(GPCR)は、ヒトゲノム中に 1000 以上の遺伝子が存在するとされ、最大の遺伝子ファミリーを形成している。また、現在使用されている医薬品の半数以上がいずれかの受容体を標的としており、新規医薬品創製の標的としても重要な分子群である。本研究では、いくつかの GPCR の結合分子の解析を通して、GPCR の細胞膜移行の分子メカニズムの解明を目指した。残念ながら GPCR の細胞膜輸送を担う分子の単離はできなかったが、様々な GPCR の解析を通して、リガンド不明の孤儿受容体 G2A が新規プロトンセンサーであること、ロイコトリエン B4 受容体 BLT1 の細胞内 C 末端が、受容体構造変化に重要な役割を果たしていることを見いだすことができた。BLT1 欠損マウスを作成し、表現型を解析したところ、BLT1 が Th1/Th2 型の免疫反応の惹起に重要な役割を演じていることが明らかとなった。

### 2. 研究の狙い

ヒトゲノム上に 1000 種類以上あると考えられる G 蛋白質共役型受容体(GPCR)は、新たな創薬の対象として注目されているが、そのリガンドが同定されているものはわずか 2 割程度にすぎない。リガンドが不明の GPCR の多くは、過剰発現系ではうまく細胞膜に発現せず、リガンドの同定や拮抗薬の開発を困難にしている。本研究では、GPCR の細胞膜移行のメカニズムを明らかにし、新規医薬品創薬の基礎的基盤を築くことを目指す。現在所有している約 40 種類の GPCR から、細胞膜に移行できる受容体としてロイコトリエン B4 第一受容体 (BLT1)を、細胞膜に移行できない受容体としてロイコトリエン D4 第一受容体(CysLT1)、CCR7,CXCR4 を用いる。GPCR の細胞膜移行に関しては、第 7 回膜貫通部位から細胞内 C テイルにかけての配列が重要であることが示唆されているので、BLT1 の細胞内 C テイルの変異体を作成し、細胞膜での発現の変化を観察する。また、BLT1 の C 末端に結合する因子の同

定を行う。CysLT1、CCR7、CXCR4 に関しては、いくつかの細胞株で細胞膜上での発現を観察し、細胞膜に受容体を発現しうる細胞株より、cDNA ライブラリを作成し、発現クローニングによって、これらの GPCR を細胞膜に移行させることのできる分子の単離を試みる。これらの基礎的検討をふまえて、GPCR を細胞膜に移行しうる細胞系の構築と、これを用いた受容体のリガンド検索を行う。また、生体内での BLT1 の役割を解明する目的で、BLT1 を欠損するマウスを作成し、いくつかの病態モデルにおける BLT1 欠損の影響を観察する。

### 3. 結果

#### ロイコトリエン B4 第一受容体 (BLT1) の細胞内 C 末端の役割の解明

BLT1 は培養細胞に過剰発現した場合、容易に細胞膜に移行する。一方、CysLT1 は細胞膜に移行しない分子である。これらの受容体の C 末端を bait に用いた yeast two-hybrid 法にて、複数の受容体結合タンパク質を同定した。免疫沈降実験によって、それらの分子がそれぞれの受容体と結合することがわかったが、それらを遺伝子導入しても、受容体の細胞膜上での発現に変化は見られなかった (data not shown)。解析のために作成した BLT1 の C 末端欠損受容体は、野生型の受容体に比べて、約 10-20 倍のリガンド結合能を示した(図 1)。GTP $\gamma$ S 結合

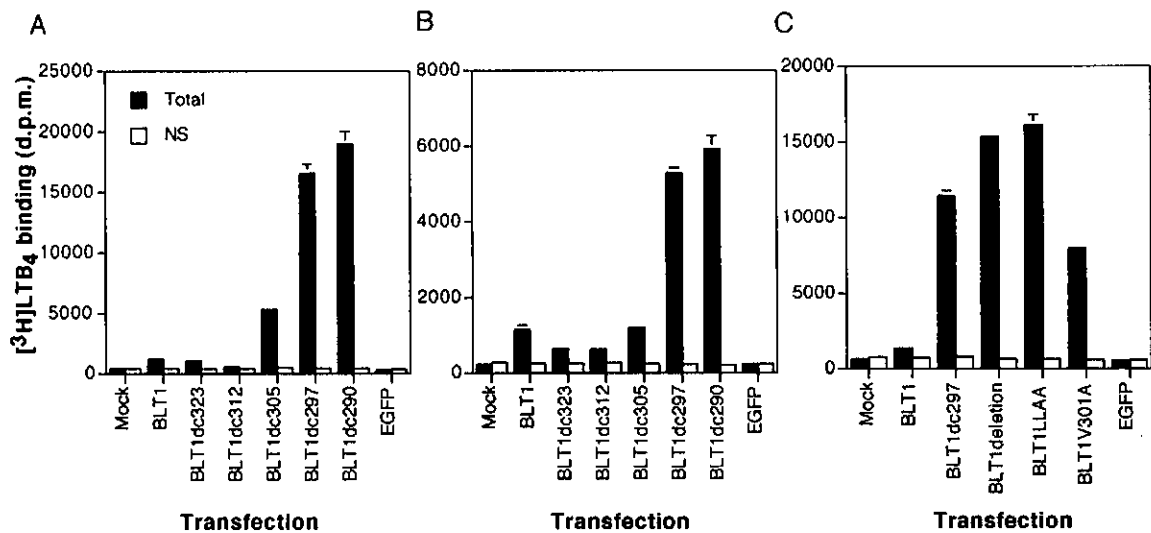


図 1. 野生型 BLT1 受容体と C 末端変異 BLT1 受容体の  $[^3\text{H}]\text{LTB}_4$  に対する結合

A、C は HEK293 細胞への一過性発現、B は CHO 細胞への安定的発現後の結合活性を示す。dc312 は、C 末端から 312 番目までのアミノ酸を欠失させた変異体を示す。297-312 番目の間に、結合を大きく左右するドメインが存在することが示唆される。(図 2 参照)

を指標にした3量体Gタンパク質の活性化能は正常であったが、細胞内カルシウム上昇反応、細胞内pH変化により経時的に観察した場合、C末端を欠く変異体ではシグナル伝達が遷延していた。

GTP $\gamma$ SでGタンパク質を強制的に活性化させた状態での結合実験において、野生型受容体が低親和性に変化していたのに対し、C末端を欠く変異体では、低親和性への変化が観察されなかった。部位特異的変異導入実験により、BLT1のC末端に存在する二つの連続したLeu残基が、受容体活性化後の低親和性受容体への構造変化に必要な支点となっていることが示唆された(図2)。(Okunoら、J. Biol. Chem. 278, 41500-41509, 2003)

### 孤児受容体 G2A のリガンド探索

リガンド不明の受容体を孤児受容体と称し、活発にリガンドの探索がなされている。我々は、かつてリゾフォスファチジルコリン(LPC)の受容体として報告されていたG2AがLPCに反応しないことを見だし、G2Aリガンドの探索を開始した。G2Aは細胞外プロトン濃度を上昇させることによって、細胞内にシグナルを伝達し、小分子量Gタンパク質Rhoを介して細胞内アクチン繊維の重合化、フォスホリパーゼCの活性化を介した細胞内IP3濃度の上昇を引き起こすことを見いだした(図3)。

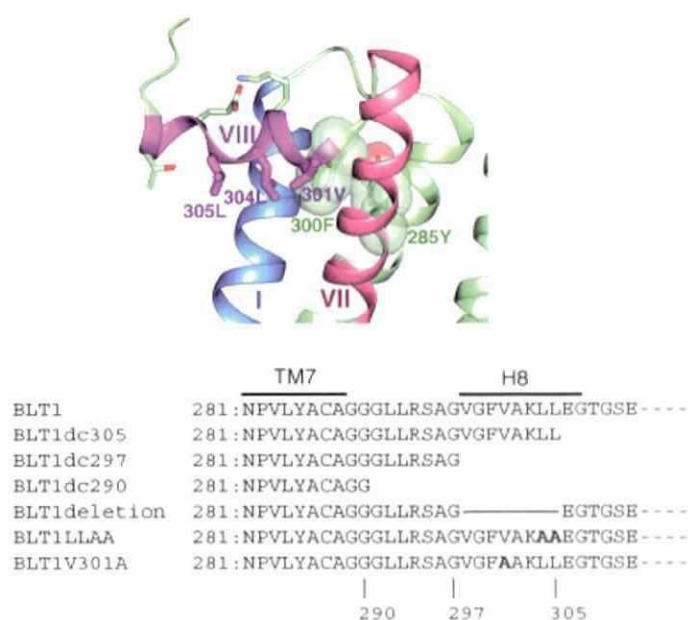


図2. 想定されるBLT1の細胞内C末端の新しい機能

BLT1の細胞内テイルは、第8ヘリックスと呼ぶべきヘリックス構造をとっており、細胞膜(図では上方向)に向かって疎水性のアミノ酸の側鎖を伸ばしており、細胞膜にアンカリングしていることが推定された。このアミノ酸(304L、305L)の変異によって、受容体はリガンド結合後の低親和性への変化を起こせなくなったことから、GPCRの第8ヘリックスと細胞膜との相互作用が、受容体の構造変化の支点として機能していると考えられた。

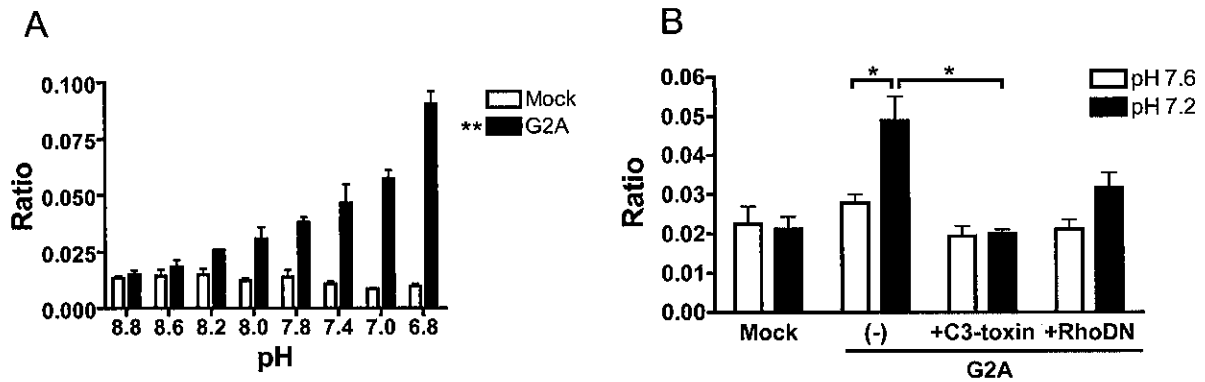


図 3. G2A はプロトン感知性 GPCR である

G2A を発現した PC12 細胞は、細胞外 pH の低下に伴って zif-268 プロモーターを活性化した(A)。この活性化は、C3 毒素導入やドミナントネガティブ Rho(RhoDN)で抑制されたことから、小分子量 G タンパク質 Rho を介していることがわかった。

さらに、LPC は濃度依存的に G2A を抑制したことから、G2A のアゴニストではなく、アンタゴニストとして機能していることが明かとなった(図 4)。さらに LPC は G2A を拮抗するのみならず、G2A を介して、細胞骨格の再構成に対して抑制的なシグナルを伝達することも明かとなった。(Murakami ら、J. Biol. Chem. 279, 42484-42491, 2004)

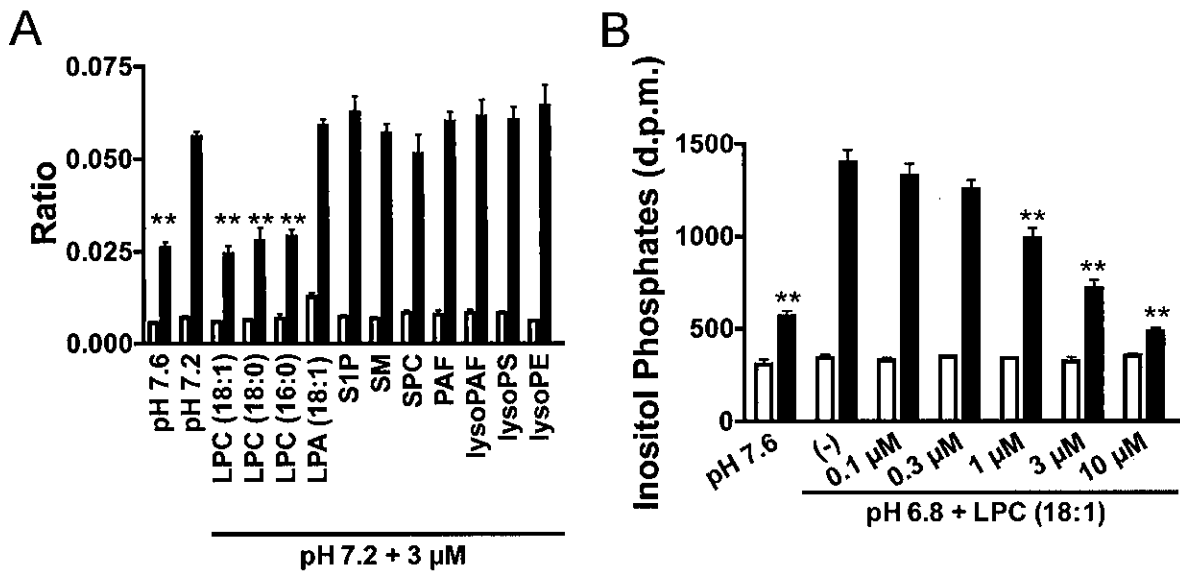


図 4. リゾリン脂質 LPC はプロトンによる G2A の活性化を抑制する

かつて G2A のリガンドとして報告された LPC は、プロトンによる G2A の活性化を抑制した。(A)G2A を遺伝子導入した PC12h 細胞を pH7.2 で刺激した際に様々な生理活性脂質を添加して zif-268 プロモーターの抑制効果を観察した。Sn-1 に結合した脂肪酸の分子種にかかわらず、LPC が G2A の抑制作用を有することがわかる。(B)Cos-7 細胞に一過性に G2A を遺伝子導入し、pH6.8 で刺激した際に、様々な濃度の LPC を加え、細胞内イノシトールリン酸の蓄積に対する抑制効果を観察した

## BLT1 欠損マウスの作成と表現型の解析

BLT1 は、強力な炎症起炎物質であるロイコトリエン B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>)の高親和性受容体である。BLT1 の生体内での役割を解明する目的で、BLT1 欠損マウスを作成し表現型の解析を行った。オブアルブミン惹起・感作による気道過敏性モデルを作成し、野性型マウスと表現型を比較した。BLT1 欠損マウスでは、野性型マウスで観察された気道過敏性の上昇が観察されなかった。肺胞洗浄液中の炎症細胞を解析したところ、野性型マウスで観察された著名な好酸球の浸潤が、BLT1 欠損マウスでは全く観察されなかった。肺の組織学的検討を行ったところ、野性型マウスで見られた気道周囲での著名な炎症や、気管支上皮の杯細胞のムチン様物質の過剰産生(goblet cell hyperplasia)が BLT1 欠損マウスでは有意に減少していた。BLT1 欠損マウスの肺胞洗浄液中の IL-5、IL-13 濃度や、血清中の IgE のタイターが減少していたことから、BLT1 欠損マウスで Th2 型免疫反応が減弱していることが推定された。マウスの傍気管支リンパ節から調製した細胞を、*in vitro* でオブアルブミンで再感作したところ、T 細胞の増殖と Th2 サイトカイン産生が著名に減弱していた。以上より BLT1 は、抗原感作による Th2 型免疫反応に対して促進的に機能していることが明らかとなった。(Yokomizo ら、論文投稿中)

さらに減弱した免疫反応の責任細胞を同定する目的で主要な抗原提示細胞である樹状細胞の機能における BLT1 の役割の解明を目指した。マウス骨髄より GM-CSF 存在下に分化させた骨髄由来樹状細胞(BMDC)は、機能的 BLT1 を発現しており、LTB<sub>4</sub> 刺激により、細胞内カルシウム上昇と走化性を示した。この反応は、BLT1 欠損マウス由来の BMDC で完全に欠失していた。アロジェニックなリンパ球混合試験において、BLT1 欠損 BMDC は、野性型 BMDC と比較して、減弱した T 細胞活性化能しか示さなかった。BMDC の刺激分子・共刺激分子の発現は BLT1 欠損の影響を受けなかったことから、液性因子の検索を行ったところ、BLT1 欠損 BMDC は野性型 BMDC と比べて減弱した IL-12 産生を示したことから、BLT1 は樹状細胞からの IL-12 産生を介して CD4 陽性 T 細胞を活性化していることが明らかとなった。(Toda ら、論文準備中)

## 4. 考 察

研究開始時の目標であった GPCR の細胞膜移行のメカニズムの解明に関しては、残念ながら明確な結果を出すことはできなかった。単離した GPCR の C 末端結合因子の機能に関しては、今後も検討を加えていきたいと考えている。しかしながら、研究の過程で予期せず見い

ただし、BLT1 の細胞内テイルの受容体構造変化における新しい機能の同定や、孤児受容体 G2A のプロトン感知能の発見は、GPCR 研究において高い評価を得ることができた。BLT1 欠損マウスの解析に関しては、これまで予想もされていなかった免疫反応における BLT1 の役割を明確に示すことができたものと考えている。

## 参考文献

1. Yokomizo T, Kato K, Hagiya H, Izumi T, Shimizu T: Hydroxyeicosanoids bind to and activate the low affinity leukotriene B4 receptor, BLT2. *J. Biol. Chem.* 276, 12454-12459, 2001
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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