

# オーファン受容体の脂質天然リガンドの探索

石井 聡

東京大学大学院医学系研究科

## 1. 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。この研究は脂質が関与する生理機能や疾患を理解することに加え、新規薬剤の開発を介して疾患治療にも役立つ可能性を持っている。

## 2. 研究成果

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「エピトープタグ」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)に付加したエピトープタグの細胞表面における発現量を指標に、セル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)。

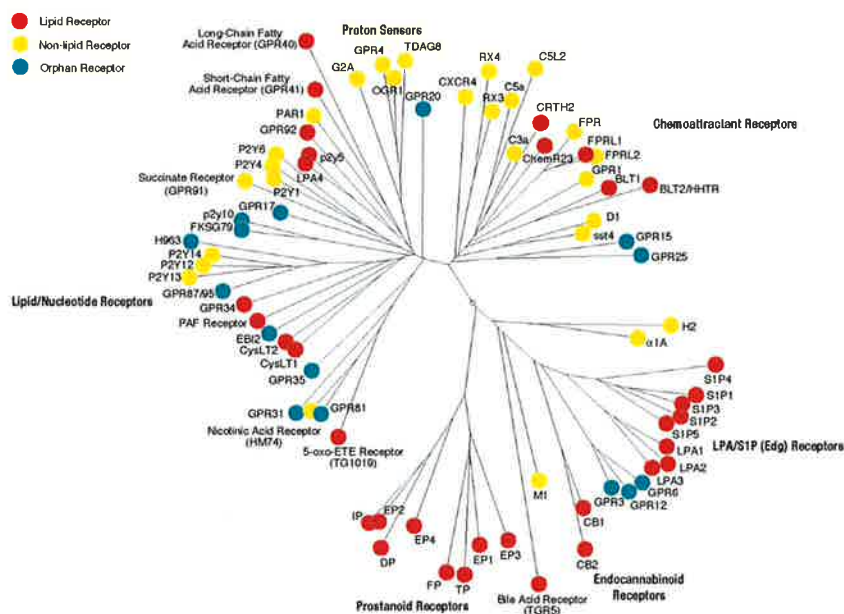


図1 種々のヒトGPCRのアミノ酸配列をもとに構築した系統樹。任意の2つの受容体を結ぶ線の長さの総和が小さい程、お互いは近縁でアミノ酸相溶性が高い。リガンドが同じまたは類似の化学構造をもつGPCRどうし、また機能が類似するGPCRどうしはこの系統樹上で集まる傾向がある。

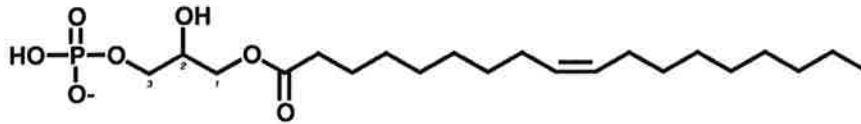


図2 LPAの化学構造。LPAは3価のアルコールであるグリセロールに脂肪酸が *sn*-1 位または *sn*-2 位に、そしてリン酸が *sn*-3 位に結合したリン脂質の総称である。この図では *sn*-1 位にオレイン酸が結合した1-オレオイルLPAを示したが、断りのない限り以降の実験ではこのLPAを用いた。

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変化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。

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

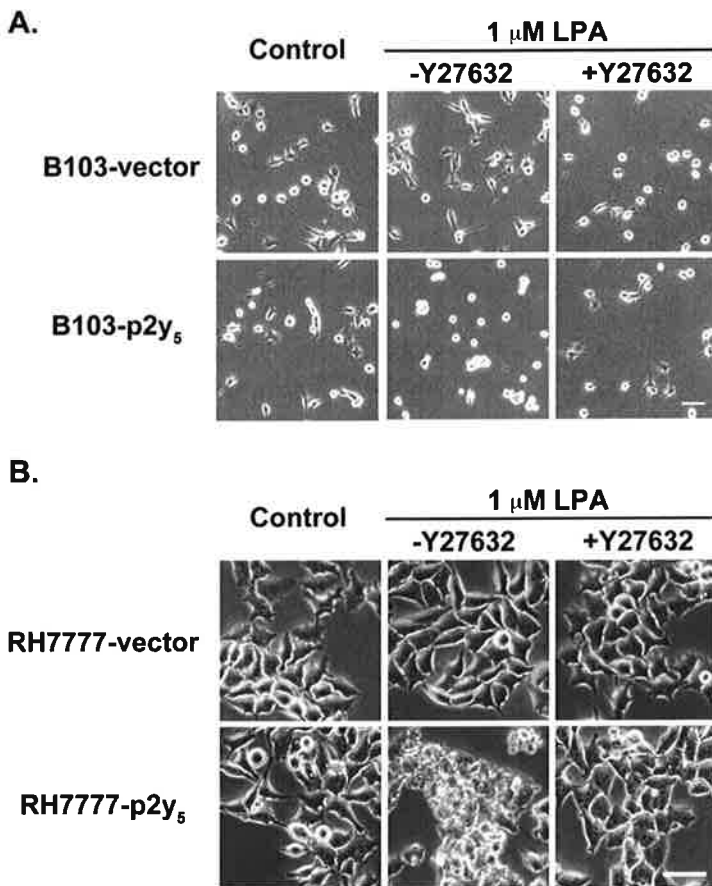


図3 LPAによるB103細胞の神経突起退縮とRH7777細胞の小胞形成。A. p2y5安定発現B103細胞を血清飢餓条件で12時間培養した後、1μM LPAで15分間刺激した。2%パラホルムアルデヒドで固定した細胞を写真撮影した。Rhoキナーゼを阻害した実験では、5μM Y27632で予め10分間処理した。横向きバーは50μmを表す。B. p2y5安定発現RH7777細胞をAと同じ実験条件で処理した。横向きバーは50μmを表す。

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

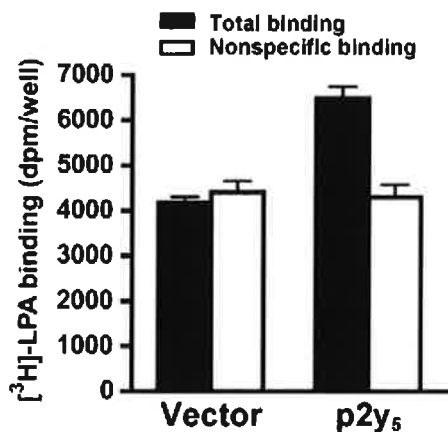


図4 p2y5 安定発現 RH7777 細胞由来の膜画分へのトリチウムラベルした 1-オレオイル LPA の結合。30 nM の  $[^3\text{H}]$ -1-オレオイル LPA を膜画分と 4°C で 70 分間インキュベートした。反応液をガラスフィルターでろ過し、洗浄した後、フィルターに吸着している放射能を計測した(総結合)。非特異的結合を検出するために 10  $\mu\text{M}$  のトリチウムラベルしていない 1-オレオイル LPA を共存させた実験も平行して行った。「特異的結合」とは「総結合」から「非特異的結合」を差し引いた値を指す。データは平均値  $\pm$  標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

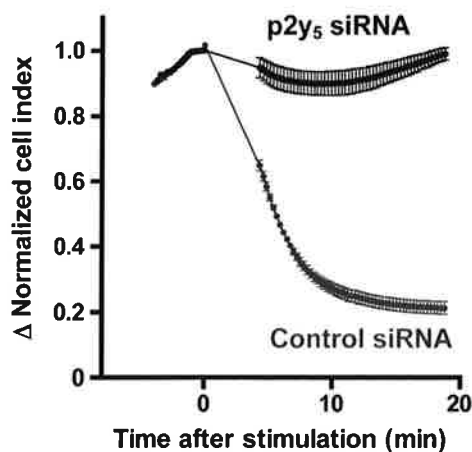


図5 HUVEC の形態変化に対する p2y5 の役割。siRNA を導入した HUVEC を血清飢餓状態で 4 時間培養後、5  $\mu\text{M}$  LPA で刺激した。その後の細胞形態変化を示す指標としての細胞-ディッシュ間の抵抗値 ( $\Delta$  Normalized cell index と示す) の時間変化を示す。データは平均値  $\pm$  標準誤差 ( $n=6$ )。

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受容体 p2y5 が LPA の新規 GPCR 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できることが期待される。

### 3. 主な発表

#### 論文

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Jiang, W., Hall, S.R., Moos, M.P.W., Cao, R.Y., Ishii, S., Ogunyankin, K.O., Melo, L.G., and Funk, C.D. (2008) Endothelial cysteinyl leukotriene 2 receptor (CysLT2R) expression mediates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Pathol.* 172, 592-602.
- 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.

#### 招待講演

- 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
- 石井聡 リゾホスファチジン酸受容体 LPA<sub>4</sub> と LPA<sub>5</sub> 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