

審査の結果の要旨

氏名 川澤百可

本研究は、ほ乳類の脳神経系に特異的な新規のGタンパク質共役型受容体（GPCR；G-protein-coupled receptor）を単離し、その生理機能の解析を試みたものである。研究の対象とした新規GPCRは、元々PSP24としてアフリカツメガエル卵母細胞 *Xenopus oocyte* からクローニングされたものであった。その報告では、PSP24の過剰発現が*Xenopus oocyte* のリゾホスファチジン酸（LPA；lysophosphatidic acid）に対する反応を増強し、逆にアンチセンスcRNAの導入が内在性LPA受容体の活性を抑えることから、PSP24がLPA受容体であることを示していた。LPAは単純な構造のリン脂質であるが、近年様々な生理作用を持つ脂質性メディエーターとして注目を集めている。そこで我々は、ほ乳類のPSP24相同遺伝子を単離して、その臓器分布やLPA受容体としての機能を検討した。本研究で得られた結果について以下に列記する。

1. *Xenopus* PSP24のORF配列を用いてマウスのゲノムライブラリをスクリーニングし、マウスのPSP24相同遺伝子を単離した。これは*Xenopus* PSP24と約70%のアミノ酸相同性を有していた。次に、このマウスの配列を元にdegenerative PCRを行い、ヒトの相同遺伝子を得たが、これはマウス、*Xenopus*の遺伝子と50%程度の相同性しか有さず、異なるタイプのPSP24遺伝子であると考えられ、これらを区別するために、マウス、*Xenopus*の遺伝子を α タイプ、ヒトの遺伝子を β タイプとしてグループ分けした。また、マウスの β タイプ存在も想定され、ゲノムライブラリを再度スクリーニングすることによって、目的の遺伝子の単離に成功した。また、1999年になって、Marcheseらによってヒトの α タイプも単離され、マウス、ヒトとも両タイプのPSP24を有していることが明らかとなった。 β タイプはN末端に α タイプより約40アミノ酸長い配列を持っているが、 α タイプ、 β タイプとも、それぞれの種差による違いは少なく、マウス、ヒト間でのアミノ酸の相同性は90%前後にも及んでいた。BLASTサーチによりPSP24の相同性を比較したところ、既知のGPCRとは有意な相同性を有さず、独立した遺伝子ファミリーを形成しているものと考えられた。最も類似したGPCRとしては、ドーパミンD1受容体やニューロペプチドY受容体タイプ1などが挙げられるが、相同性はいずれも30%以下であった。

2. マウスのPSP24 α 、 β について、マウス各組織での遺伝子発現量を調べた。いずれのタイプも脳に特異的な発現を認め、その他の臓器にはほとんど発現していなかった。ただ、 β タイプについては、卵巣や子宮にわずかな発現を認めた。

同様に、PSP24の遺伝子発現量を種々の培養細胞において検討した。約40種類の細胞株について検討したところ、神経、もしくは生殖系由来の細胞株で発現が認められ、臓器分布の結果

と良く相応するものであった。

さらに、脳における発現についてより詳細に検討した。まず、発達段階における遺伝子発現量の変化を、胎児もしくは生後のマウスの脳を用いて解析した。その結果、 α 、 β いずれのタイプも胎児期の脳にも発現を認め、 α は胎生期13日頃から発現し、その後成体になるまで一定のレベルを保っていた。一方、 β は胎生期9日頃から発現するようになり、その後成長に応じて徐々に発現量が増加する傾向にあった。

また、*in situ* hybridization によって、マウス脳におけるPSP24 α の局在を調べたところ、脳全般に遺伝子発現を認め、特に嗅球のmitral neuronや海馬のpyramidal neuron、小脳のPurkinje cellなどの神経細胞に強い発現を認めた。以上の結果から、PSP24が、ほ乳類の脳神経系の発達、神経ネットワークの構築や神経可塑性などに関与している可能性が示唆された。

3. PSP24がLPA受容体として機能するかどうか検討した。

LPAに対する内在性の反応を欠く細胞株として、ラット肝臓癌由来RH7777細胞、及びラット神経芽細胞腫由来 B103細胞を用い、 $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ の結合 (Gタンパク質の活性化) を検討した。まず、RH7777細胞にベクター、PSP24 α 、PSP24 β そしてポジティブコントロールとしてEdg2、Edg4を過剰発現させた。さらにPSP24がヘテロ二量体で機能している可能性を考慮して両者を同時に一過的に過剰発現させた。また、B103細胞にはPSP24を恒常的に発現させ、二つずつクローンを選んで実験に供与した。この際、Edg2、またその逆向き配列を恒常的に発現させた細胞株をアッセイのコントロールとした。その結果、Edg2、Edg4はLPAの添加によって $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ の結合量が増加したのに対して、PSP24はいずれの場合においても、結合量の上昇は認められなかった。

4. また、PC12細胞にZif268プロモーターに結合させたルシフェラーゼ遺伝子を発現させ、リガンドで刺激することによって、効率よくGPCRからのシグナルを検出する方法を樹立した。しかしこの方法ではGi signalを検出する効率が悪いことから、我々は外来性にG16およびGqiキメラタンパク質を過剰発現させ、Gi signalをGq signalに転換し検出感度を上げる工夫を施した。このアッセイ系を用い、PSP24、Edg2、Edg4のLPAに対する反応性を検討した。Edg2、Edg4では濃度依存的にルシフェラーゼの発現が上昇したが、PSP24ではその効果は認められなかった。同様に、その他のリン脂質としてPA (phosphatidic acid)、S1P、PAF (platelet-activating factor)、LPC (lysophosphatidylcholine)、LPE

(lysophosphatidylethanolamine)、LPS (lysophosphatidylserine)などを添加したが、いずれもPSP24を活性化しなかった。

この他にも $[^3\text{H}]\text{LPA}$ の結合実験、細胞内 Ca^{2+} の上昇、MAPKの活性化、DNA合成、*Xenopus* oocyteでのクロライド電流の発生といった、様々な方法を検討したが、いずれの場合もPSP24のLPA受容体としての作用を見出すことはできなかった。

以上、本論文では、神経細胞に特異的に発現するGPCRとしてマウス、ヒトのPSP24を単離した。PSP24は、いずれの種においても α タイプ、 β タイプの合計2種類のサブタイプが存在した。また他のGPCRと有意な相同性を有さず、独立した遺伝子ファミリーを形成していると考えられた。また、元来*Xenopus* PSP24はLPA受容体として報告されていたが、我々が単離した

ほ乳類PSP24はいずれの実験系においてもLPA受容体としての作用を見い出すことはできなかった。現在のところPSP24のリガンドは不明であるが、Zif268ルシフェラーゼアッセイを利用したリガンド探索システムを構築し、生体試料や化学物質ライブラリーから新規のリガンド分子を探索中である。近年のゲノム解析の爆発的な発展によって、多数のリガンド未知のGPCR（孤児受容体、orphan GPCR）が存在することが明らかになって来ているが、本研究は、新規のorphan GPCRの単離、解析だけでなく、そのリガンド同定に有効なアッセイ系を樹立した上でも、今後のGPCR研究に重要な貢献を果たすものと考えられる。以上のことから、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。