

審査の結果の要旨

氏名 岡本 宏之

本研究は、これまでリガンド不明であった G タンパク共役型受容体 EDG1、EDG3、EDG5/AGR16 を CHO(Chinese hamster ovary)細胞に強制発現させ、その安定形質発現株を用いてリガンドの同定と機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. S1P に対する細胞応答の非常に弱い CHO 細胞に EDG1 を一過性に発現させると、親細胞には認められない S1P による細胞内カルシウム上昇と MAPK の活性化が観察された。また S1P のみならず類縁脂質の LPA にも反応を示さない HEL(human erythroleukemia)細胞で樹立した EDG1 の安定発現株(HEL-EDG1)においても、S1P は濃度依存的にカルシウム上昇反応を引き起こし、EC50 は 10^{-9} M であった。S1P の他には SPC が EC50= 10^{-7} M の弱いアゴニストであることがわかった。その他の類縁脂質は 10^{-6} M までの濃度でカルシウム上昇を引き起こさなかった。 32 P で標識した S1P を使って EDG1 に対する結合を調べると、HEL 親細胞では特異的結合はほとんどみられないのに対し、HEL-EDG1 細胞では有意な特異的結合が観察された。HEL-EDG1 細胞への 32 P]S1P 結合は非標識の S1P により濃度依存的に抑制された。その IC50 は 5×10^{-8} M であった。また他の類縁脂質の中では SPC のみが 32 P]S1P の結合に競合した。また EDG3、EDG5 も S1P の受容体として機能し、いずれも S1P の他には SPC のみが弱いアゴニストとして作用することを確認した。各受容体を発現させた CHO 細胞

(EDG1 細胞、EDG3 細胞、EDG5 細胞)を用いて各々の情報伝達能を検討した。EDG1、EDG3、EDG5 はいずれもホスホリパーゼ C/カルシウム動員に共役するが、EDG1 は百日咳毒素 (PTX) 感受性の Gi を介して、EDG3 と EDG5 は主として PTX 非感受性 G タンパク質おそらくは Gq/11 を介して共役した。また 3 種の受容体とも PTX 感受性の Gi を介して MAPK を活性化した。しかしその共役の効率は受容体ごとに異なっており、EDG1 と EDG3 の MAPK 活性化に対する EC50 値は EDG5 のそれより 10 倍低値であった。また EDG1 と EDG3 は cAMP 産生を PTX 感受性 Gi を介して抑制した。これとは対照的に、EDG5 は cAMP 産生を促進した。

2. 各 S1P 受容体の細胞遊走に及ぼす作用を検討したところ、EDG1 細胞、EDG3 細胞では、S1P は化学遊走を誘導し、膜ラッフリングの形成、Rac の活性化を引

き起こした。これらの反応は、別の化学遊走因子であるインシュリン様増殖因子-I (IGF I)によっても同様に引き起こされた。S1P、IGF Iによるこれらの反応は Rac の dominant negative 変異体の発現や PI 3-キナーゼ阻害剤によって強く抑制された。一方、EDG5 細胞では S1P は化学遊走を誘導せず、逆に IGF I による化学遊走、膜ラッフリングの形成、Rac の活性化を完全に抑制した。S1P は EDG5 細胞において他の EDG 細胞と同様に PI 3-キナーゼ活性とその下流に存在する Rac-GEF 活性を増加させた。しかし Rac-GAP 活性は、EDG1 細胞では S1P によって抑制される傾向にあったが、EDG5 細胞では逆に増強した。これらの結果は、EDG5 細胞における S1P の化学遊走抑制作用には Rac-GEF 活性の抑制ではなく Rac-GAP 活性の増強による Rac の抑制が関与していることを意味している。また S1P は EDG3 細胞と EDG5 細胞において Rho を活性化したが、EDG1 細胞では活性化しなかった。Cdc42 は無刺激の状態である程度活性化されており、S1P 刺激による変化はみられなかった。

以上、本論文はこれまでリガンド不明であった G タンパク共役型受容体 EDG1、EDG3、EDG5/AGR16 がスフィンゴシン 1-リン酸受容体であることを示した。またこれらの受容体が異なる情報伝達能を有し、EDG1、EDG3 は Gi タンパクを介して Rac の活性化を引き起こし S1P に対する細胞遊走を誘導するのに対し、EDG5 は Rac-GAP 活性を増強し Rac 活性を抑制することによって細胞遊走を抑制することを明らかにした。本研究はスフィンゴシン 1-リン酸の生理活性の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。