

論文の内容の要旨

論文題目	Identification and Analysis of a Novel G Protein-coupled Receptor for Lysophosphatidic Acid, LPA ₄
和訳	Gタンパク質共役型の新規リゾホスファチジン酸受容体LPA ₄ の同定と解析
指導教員	清水 孝雄 教授
東京大学大学院 医学系研究科	
平成15年4月入学	
医学博士課程 分子細胞生物学専攻	
野口 韶子	

要旨

Gタンパク質共役型受容体の総数はおよそ700といわれているが、そのうち約140個がリガンドの分かっていない、いわゆるオーファン受容体である。私は2003年にGタンパク質供役型オーファン受容体の一つであるヒトGPR23（別名p2y₉）が新規リゾホスファチジン酸（Lysophosphatidic Acid、LPA、1-アシルグリセロール-3-リン酸）受容体であることを同定した。

私は幾つかのGタンパク質供役型オーファン受容体の安定高発現CHO細胞株を樹立し、その細胞株に約200種類の脂質分子と17種類の核酸を作用させたときの細胞内シグナルを調べることにより受容体特異的なリガンドをスクリーニングした。その結果、ヒトGPR23安定発現細胞がLPAに反応して細胞内カルシウム濃度を上昇させることを発見した。さらに、GPR23を一過性発現させたRH7777細胞の膜にトリチウムラベルしたLPAが特異的に結合することを確認した。この特異的結合はスキヤッチャード解析により解離定数（K_d値）44.8 nMを示した。LPAに構造の類似した他の脂質についてトリチウムラベルしたLPAに対する競合的結合を調べたが、GPR23はLPA以外とは結合しなかった。LPAには脂肪酸の鎖長や不飽和結合数、結合の種類により多くの分子種が存在する。GPR23は血清中に豊富に存在する1-オレオイル-LPAに最も高い親和性を持つことが、競合的膜結合実験とレポーター遺伝子実験により明らかになった。ヒトGPR23安定発現CHO細胞ではLPAを作用させると細胞内カルシウムの上昇が見られることはリガンドスクリーニングの結果から分かっていたが、さらに、LPA濃度依存的な細胞内サイクリックAMPの蓄積も見られた。16種類のヒト組織由来のcDNAを鑄型にした定量的PCRからはGPR23が卵巣で比較的高発現していることが分かった。さらにヒトの腎臓、骨格筋、および巨核球系細胞から抽出

したp o l y (A)⁺RNAを用いたノザンハイブリダイゼーションでは4.4 kbの長さのmRNAが検出された。以上の結果より、GPR23がLPAの新規受容体、LPA₄であることを結論づけた。

GPR23/LPA₄の生体内での機能を解明するにはマウスを用いた解析が不可欠である。そこで、ヒトGPR23/LPA₄と相同的なマウスGPR23もまたLPA受容体LPA₄であることを、前述と同様に膜結合実験により確認した。なおK_d値は31.3 nMと、ヒトLPA₄と同程度の値であった。マウス各組織のp o l y (A)⁺RNAを用いたノザンハイブリダイゼーションから、マウスGPR23/LPA₄ mRNAは広汎に発現しているが、卵巣・子宮・胎盤などの雌性生殖器官に特に高く発現していることが分かった。そこで性周期や妊娠による雌性生殖器官でのGPR23/LPA₄ mRNA発現量の変動を定量的PCRで調べた。ホルモン誘導性過排卵時に卵巣、卵管、子宮で有意な発現量の変動は得られなかつたが、妊娠3.5日の卵管と子宮、妊娠5.5日（着床1日後）の子宮の着床部分（胚を含む）でGPR23/LPA₄ mRNA発現量が上がつた。また、胎生12.5日齢の胎児でも高い発現を示した。しかし、子宮の非着床部分や胎盤での発現上昇は見られなかつた。一般に、マウス卵子は卵管で受精後、卵管を下降して、受精後3日頃に子宮内腔に到達し、4.5日に子宮内膜に着床すると言われている。よつて、妊娠3.5日の卵管と子宮、妊娠5.5日（着床1日後）の子宮の着床部分でのGPR23/LPA₄ mRNAの発現上昇の由来は胚・胎児成分であり、GPR23/LPA₄は胚や胎児で高発現していることが推察された。そこで、胎児の発生過程を追つてGPR23/LPA₄ mRNAの発現量を調べた。その結果、胎児全体では胎生中～後期に安定して高い発現であるが、脳に限局すると胎生中期（E12）、つまり神経発生の初期段階で極めて高く発現しており、発生が進むにつれてその発現量が急激に減少することが分かつた。

GPR23/LPA₄の生体内での機能を解析するにあたり、詳細な発現分布を得ることは重要である。私はGPR23/LPA₄に対するポリクローナル抗体を作製した。この抗体を用いたウェスタンプロットでは、マウス胎児脳の内在性GPR23/LPA₄の検出に成功した。今後 *in situ* ハイブリダイゼーションやこの抗体を用いた免疫組織化学を行い、より詳細な発現を調べる予定である。さらに私はGPR23/LPA₄遺伝子欠損マウスを作製した。このマウスには現在のところ発生や外観、行動、生殖能力などに明らかな異常は観察されていない。

LPAは細胞膜リン脂質から合成されるグリセロリン脂質の一つで、血清中に豊富に存在する。LPAは細胞分裂を促進したり細胞形態を変化させる作用をもち、神経発生、血管形成、創傷治癒、癌の進行などに関与すると考えられている。LPA受容体として、互いに高い相同性（50～57%）を示す3種類のGタンパク質共役型受容体ファミリー、LPA₁/Edg2/Vzg-1、LPA₂/Edg4、LPA₃/Edg7、が既に同定されていた。しかし興味深いことに、GPR23/LPA₄はこれらEdgファミリーとは相同性が低い（20～24%）。さらに最近、やはりEdgファミリーと相同性が低くGPR23/LPA₄と相同性が高いGタンパク質共役型オーファン受容体GPR92が第五のLPA受容体LPA₅であり、GPR23

／LPA₄と同様、細胞内サイクリックAMP上昇作用を有することが報告された。

先に述べた通り、GPR23／LPA₄は胎生12日齢という神経発生の初期段階の脳で極めて高い発現を示し、発生が進むにつれその発現量が急激に減少していった。この結果から、GPR23／LPA₄が中枢神経系の発生や分化に重要な役割を果たしていることが期待される。LPA₁遺伝子単独欠損マウスやLPA₁／LPA₂遺伝子二重欠損マウスでは、母乳を吸う行為が出来ないことによる新生児の死亡率の増加、大脳皮質の菲薄化や脳溝の形成不全、神経因性疼痛の消失など、神経発生・分化での異常を窺わせる表現型がいくつも観察されている。これらの神経系におけるLPAの作用に、GPR23／LPA₄が関与している可能性がある。最近、GPR23／LPA₄を過剰発現させた神経系株化細胞で、LPAによって神経突起の退縮や細胞形態の変化が誘発されることが報告された。また、ラット海馬の神経前駆細胞ではLPA刺激により細胞内サイクリックAMPレベルの上昇が見られるという報告があるが、これまでに同定された5種類のLPA受容体のうちサイクリックAMPの上昇を起こすのはGPR23／LPA₄とGPR92／LPA₅のみであることから、海馬神経前駆細胞においてGPR23／LPA₄が何らかの機能をする可能性がある。神経系でのLPA産生については未知だが、LPA産生に関わる主要な酵素、オートタキシンやホスホリパーゼA₁・A₂は、発生途中の脳に発現している。本研究の結果と以上の報告から、GPR23／LPA₄と神経発生・神経分化との関与が強く示唆される。さらに、オートタキシン遺伝子欠損マウスの胎仔は胎生9.5～10.5日齢頃に死亡することが、2つの独立したグループから同時に報告されたが、LPA₁₋₃遺伝子単独欠損マウスやLPA₁／LPA₂遺伝子二重欠損マウスではこのような表現型は観察されないので、この胎生致死にはGPR23／LPA₄やGPR92／LPA₅あるいは未知のLPA受容体の関与が予想される。今後、GPR23／LPA₄遺伝子欠損マウスや、他のLPA受容体欠損と掛け合わせたマルチ欠損マウスを解析して、GPR23／LPA₄の生体内での機能を解明していくつもりである。