

論文の内容の要旨

論文題目

Identification of 9-Hydroxyoctadecadienoic Acid and Other Oxidized Free Fatty Acids as Ligands of a G Protein-coupled Receptor G2A

(和訳)

9-ヒドロキシオクタデカジエン酸をはじめとする遊離酸化脂肪酸は G タンパク質共役型受容体 G2A のリガンドである

大日方 英

[緒言]

G2A は様々な DNA 損傷刺激により誘導され、細胞周期を G2/M 期で停止させる G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) として同定された (1)。リンパ球やマクロファージなどで発現が高く、免疫系の制御や動脈硬化との関わりが示唆されている。2001 年に Kabarowski らによってリゾホスファチジルコリンとスフィンゴシルホスホリルコリンがリガンドであることが報告されたが (2)、結合実験の再現性が得られないことなどから、この報告は 2005 年に取り下げられた。一方、Murakami らは 2004 年に、G2A が酸性条件下でイノシトールリン酸の産生やストレスファイバーの形成を促し、この活性はリゾホスファチジルコリンにより抑制されることを報告した (3)。しかしながら、G2A のプロトン感受性はアミノ酸配列の相同性を有する他のプロトン感受性の GPCR に比べると低く、G2A が他の機能を有する可能性が考えられた。

私は、いくつかのオーファン GPCR のリガンドスクリーニングを行う過程で、9-ヒドロキシオクタデカジエン酸 (9-hydroxyoctadecadienoic acid; 9-HODE) をはじめとする遊離酸化脂肪酸が、G2A を活性化し、細胞内カルシウム濃度の上昇などを引き起こすことを見いだした。9-HODE はリノール酸由来の酸化代謝物であり、酸化された低密度リポタンパクに多量に含まれていることが知られている。生体内ではフリーラジカル反応やリポキシゲナーゼ、チトクロム P450 などの酵素反応により生じうる。

本研究で私は、9-HODE をはじめとする遊離酸化脂肪酸が G2A のリガンドとして働き、細胞内カルシウム濃度の上昇や cAMP の産生抑制、JNK の活性化など様々な細胞内シグナルを活性化することを明らかにした。G2A が動脈硬化巣で高発現しているという知見や、酸化ストレス

による遊離酸化脂肪酸の産生増加などを考えると、G2A が酸化ストレスによる様々な病態形成において、何らかの役割を果たしている可能性が示唆される。

[方法]

- G2A を安定的に高発現する CHO 細胞株の樹立 -

G2A 遺伝子コード領域のアミノ末端に FLAG タグを付与した後、哺乳細胞用発現ベクター pCXN2.1 に組み込み、リポフェクション法により CHO 細胞に遺伝子導入した。限界希釈法により選択薬剤耐性を有する細胞をクローン化した後、RT-PCR 法と抗 FLAG 抗体を用いたフローサイトメトリーにより G2A を高発現するクローンを選択し、以降の実験に用いた。

- 細胞内カルシウムおよび cAMP 濃度の測定-

リガンド刺激時の細胞内カルシウム濃度の上昇は、カルシウム感受性の蛍光試薬 Fura-2 を細胞内に取り込ませた後、FLEXstation (Molecular Device 社) を用いて測定した。細胞内 cAMP 濃度の測定は、cAMP-Screen キット (Applied Biosystems 社) を用いて競合的 ELISA 法により行った。アデニル酸シクラーゼの活性化剤であるフォルスコリン存在下で細胞をリガンド刺激し、フォルスコリンによる cAMP 産生への抑制効果を検討した。

- [³⁵S]GTP γ S 結合実験-

細胞を超音波処理により破碎した後、超遠心により細胞成分を分画し、100,000 x g の沈殿として膜画分を得た。膜画分を [³⁵S]GTP γ S の存在下でリガンド刺激し、膜画分への [³⁵S]GTP γ S の結合量をシンチレーションカウンターを用いて測定した。また、非特異的な [³⁵S]GTP γ S の結合は過剰量の未標識 GTP γ S 存在下で測定した。

- 9-HODE 産生機序の *in vitro* における解析-

ホスファチジルコリン (PC; 1-パルミトイル-2-リノレオイル) をラジカルイニシエーターである 2,2'-azobis (2,4-dimethylvaleronitrile) で処理した後、ホスホリパーゼ A₂ により 2 位の脂肪酸を切り出した。溶媒を窒素ガス存在下で留去した後、G2A 発現細胞における細胞内カルシウム上昇活性を検討した。

- プロトン感受性の測定 -

細胞に *myo*-[³H]inositol を取り込ませた後、様々な pH 条件下で 9-HODE 刺激を行った。遊離されたイノシトルリン酸を酸抽出し、レジンカラムを用いてホスファチジルイノシトールと分離した後、シンチレーションカウンターを用いて測定した。

[結果と考察]

G2A を安定的に高発現させた細胞において、9-HODE による濃度依存的な細胞内カルシウム濃度の上昇 (Fig. 1A)、cAMP 産生の抑制 (Fig. 1B)、および [³⁵S]GTP γ S の結合 (Fig. 1C) が観察された。G α_{qi} キメラタンパク質を G2A と共発現させると細胞内カルシウム濃度上昇反応が著明に増大した (Fig. 1A)。G α_{qi} キメラタンパク質は G α_q のカルボキシ末端 9 アミノ酸配列が G α_i の配列で置き換えられたものであり、細胞内カルシウム反応の感度を高めることが知られている。また、cAMP 産生の抑制は百日咳毒素前処理により完全に消失することから、G α_i タンパク質の関与が示唆された (Fig. 1B)。9-HODE によるこれらの反応は、G2A を細胞に一過性に発現させた系でも確認された。

リノール酸およびアラキドン酸由来の様々な酸化代謝物を用いて、G2A のリガンド特異性を

細胞内カルシウム濃度上昇反応により検討したところ、9-HODE および 11-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (11-hydroxyeicosatetraenoic acid; 11-HETE) が最も強い活性を示した (Fig. 2)。これら二つの脂肪酸はオメガ末端から水酸基までの構造が同一であり、この構造が G2A のリガンド認識において重要であると考えられた。過酸化物質である 9-HPODE も同様に高い活性を示したが、13位が酸化された 13-HODE やその他の HETE 類は高い活性は示さなかった (Fig. 2)。9-HODE のコレステロール結合体はわずかな活性しか示さず、G2A は遊離型の酸化脂肪酸をよりリガンドとすることが示唆された (Fig. 2)。また、G2A は酵素的に産生される 9(S)-HODE だけでなく、非特異的な酸化反応により産生される 9(R)-HODE にも高い反応性を示した。

PC を *in vitro* で酸化した後、ホスホリパーゼ A₂ により 2位の脂肪酸を切り出し、G2A 発現細胞における細胞内カルシウム濃度上昇反応を観察したところ、酸化処理とホスホリパーゼ A₂ 処理を両方行ったサンプルでのみ、活性が観察された (Fig. 3)。液体クロマトグラフィー-質量分析法により、このサンプル中では 9-HPODE の産生が確認された。酸化処理のみを行った PC はほとんど活性を示さず、遊離型の 9-HODE が活性を持つことが確認された (Fig. 3)。また、かつて G2A のリガンドであると報告されたリゾホスファチジルコリン (1-パルミトイル) は、酸化処理の有無に関わらず、活性を示さなかった (Fig. 3)。

G2A のプロトン感受性に対する 9-HODE の影響をイノシトールリン酸の産生により検討したところ、9-HODE は酸性条件下でのイノシトールリン酸産生量を相加的に上昇させたが、相乗的な効果は観察されなかった (Fig. 4)。このことから、9-HODE とプロトンはそれぞれ独立して G2A を活性化することが示唆された。

生体内における遊離の酸化脂肪酸含量は明らかではないが、生体は絶えず様々な酸化ストレスに曝されており、酸化された低密度リポタンパク中や動脈硬化巣では、9-HODE をはじめとする酸化脂肪酸が PC やコレステロールにエステル結合した状態で多量に存在していることが報告されている。酸化ストレス条件下ではホスホリパーゼ A₂ やエステラーゼなどの酵素も活性化されていることが想定され、局所的に G2A を活性化するのに十分な濃度の酸化脂肪酸が遊離され得ると考えられる。また、G2A は様々な DNA 損傷刺激により発現が誘導されることから、酸化ストレス条件下で受容体とリガンドがともに誘導・産生され、反応性を高めている可能性が示唆される。今後の研究で、生体内における遊離酸化脂肪酸の産生機序について検討を行い、G2A を介した細胞応答を解析することで、G2A の生体内における役割が明らかになっていくものと期待される。

[参考文献]

- (1) Weng, Z. *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 12334-12339
- (2) Kabarowski, JH. *et al.* (2001) Science 293, 702-705
- (3) Murakami, N. *et al.* (2004) J. Biol. Chem. 279, 42484-42491

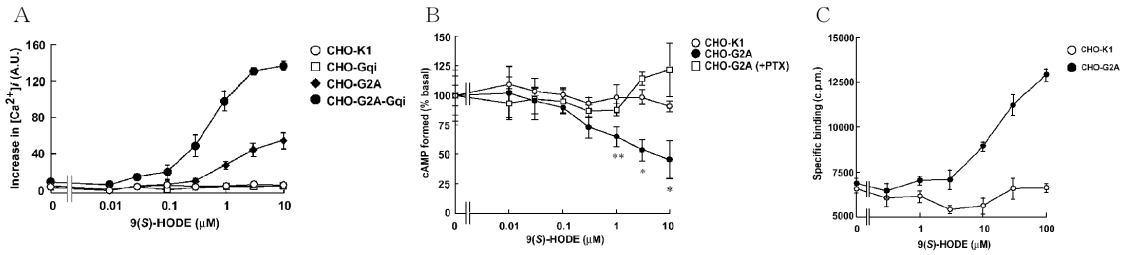


Fig. 1 G2A発現細胞において9(S)-HODEにより引き起こされる細胞内カルシウム濃度上昇反応 (A)、cAMP産生の抑制 (B)、および ^{35}S GTP γ S結合 (C)

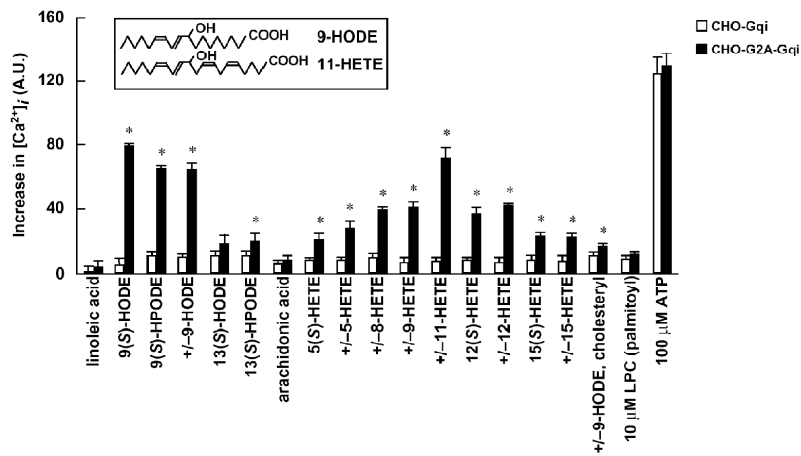


Fig. 2 G2Aのリガンド特異性

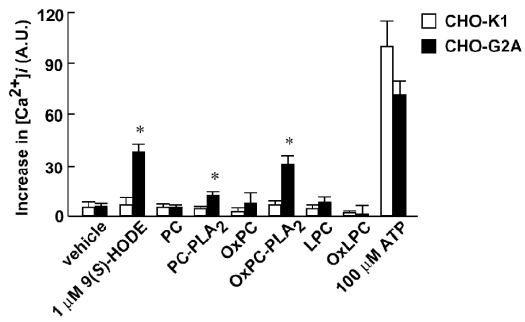


Fig. 3 PCの酸化とPLA₂処理により引き起こされるG2Aの活性化

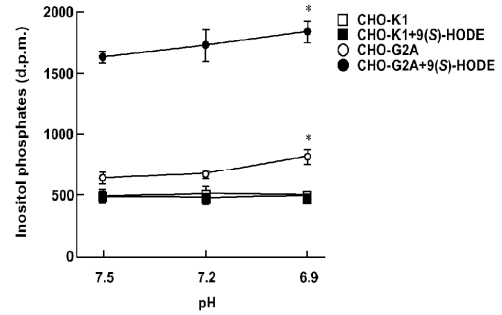


Fig. 4 G2Aのプロトン感受性に9(S)-HODEがおよぼす影響