

審査の結果の要旨

氏名 大日方 英

本研究は、G2A と呼ばれる G タンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) の新規のリガンドとして、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を同定したものである。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 GPCR として同定された。G2A のノックアウトマウスが遅発性に自己免疫疾患を発症するという報告や、動脈硬化巣で G2A が高発現しているという報告などから、免疫系の制御や動脈硬化との関わりが示唆されている。しかしながら、G2A のリガンドに関しては、リゾホスファチジルコリンがリガンドであるとした 2001 年の報告が、2005 年になって取り下げられ、明らかにはなっていなかった。また、G2A が弱いながらもプロトン感受性を有するという報告が 2004 年になされたが、他のリガンドが存在する可能性が残されていた。本研究は、下記の結果により、遊離酸化脂肪酸が G2A の新規のリガンドとして働くことを明らかにしたものである。

1. G2A を過剰発現させた CHO 細胞を 9(*S*)-HODE により刺激すると、9(*S*)-HODE の濃度依存的に細胞内カルシウム上昇反応が観察された。
2. 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。9-HODE と 11-HETE は ω 末端から水酸基までの構造が同一であり、この部分が G2A のリガンド認識に関与していることが示唆された。一方、9-HODE のコレステロール結合体や酸化処理したホスファチジルコリンはほとんど活性を示さず、G2A は遊離の酸化脂肪酸をよいリガンドとすることが示唆された。また、G2A はリポキシゲナーゼなどの酵素反応により生じる 9(*S*)-HODE ばかりでなく、非特異的な酸化反応により生じる 9(*R*)-HODE にも反応することが示された。
3. G2A を過剰発現させた細胞から調整された膜面分において、9(*S*)-HODE の濃度依存的に [³⁵S]GTP γ S 結合活性の上昇が観察された。
4. G2A を過剰発現させた CHO 細胞を百日咳毒素で前処理すると、9(*S*)-HODE による細胞内カル

シウム濃度上昇反応は部分的に阻害された。このことから、CHO 細胞においては G2A を介した細胞内カルシウム濃度上昇反応は、百日咳毒素感受性の $G\alpha_i$ または $G\alpha_o$ と、非感受性の $G\alpha_q$ または $G\alpha_z$ により伝えられていることが示唆された。また、G2A を過剰発現させた CHO 細胞では、フォルスコリン刺激による cAMP 産生が 9(S)-HODE の濃度依存的に抑制され、この活性は百日咳毒素の前処理により消失した。このことから、CHO 細胞においては G2A を介した cAMP 産生の抑制は、百日咳毒素感受性の $G\alpha_i$ または $G\alpha_o$ により伝えられていることが示唆された。

5. G2A を過剰発現させた CHO 細胞を 9(S)-HODE により刺激すると、MAP キナーゼの一つである JNK の活性化が観察された。一方、他の MAP キナーゼである ERK1/2 および p38 の 9(S)-HODE 刺激による活性化は観察されなかった。
6. ホスファチジルコリン (1-パルミトイル-2-リノレオイル) を *in vitro* でラジカルイニシエーター試薬で酸化し、さらにホスホリパーゼ A_2 で 2 位の脂肪酸を水解した産物では、G2A を介した細胞内カルシウム上昇反応が観察されたが、酸化処理のみでは活性が観察されなかった。このことから、リン脂質が酸化された後、酸化脂肪酸がホスホリパーゼ A_2 によって遊離することにより、G2A のリガンドとして働くことが示された。
7. G2A のプロトン感受性に対する 9(S)-HODE の影響を、イノシトールリン酸産生量の変化により検討したところ、9(S)-HODE は酸性 pH 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。

以上、本論文は 9-HODE をはじめとするいくつかの遊離酸化脂肪酸が G2A のリガンドとして機能することを示したものである。生体内においてリノール酸やアラキドン酸などの多価不飽和脂肪酸は、細胞膜や低密度リポタンパク質の構成成分として多量に含まれており、様々な酸化ストレスにより 9-HODE をはじめとする遊離酸化脂肪酸が産生されると考えられる。しかしながら、動脈硬化や虚血後再灌流による臓器障害など、酸化ストレスと密接に関連している様々な病態における、遊離酸化脂肪酸の役割はそれほど明らかにされてはいない。遊離酸化脂肪酸の受容体として G2A が同定されたことは、酸化ストレスによる病態形成において遊離酸化脂肪酸が果たす役割を解明する上で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。