

論文の内容の要旨

論文題目 Identification and characterization of a novel
human 5-oxo-eicosatetraenoic acid receptor
5-oxo-ETE 受容体の発見とその機能解析

氏名 細井 健史

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、三量体 G タンパク質と共役する 7 回膜貫通型の受容体であり、ペプチド、ホルモン、核酸、脂質、光、臭気物質などのリガンド刺激を細胞内に伝達し、様々な生理作用の発現に重要な分子である。ヒトゲノム解析により、約 720 種類の GPCR が存在することが明らかとなっている。そのうち約半分は臭覚や視覚などの感覚受容体である。残り 360 個の GPCR のうち 210 個についてリガンドが同定されているが、リガンドが未知である受容体、オーファン GPCR (oGPCR) がまだ 150 個残されている。

ヒトゲノム解析の進行と遺伝子工学技術の発展から、逆薬理学 (Reverse Pharmacology) の手法に基づいたリガンド探索が可能となり、oGPCR のリガンド同定に関する研究が加速されている。すなわち、ゲノム配列に対する相同検索による新規 GPCR 遺伝子の同定、PCR 法によるクローニング、遺伝子導入によるその受容体発現細胞の取得、発現細胞に対して応答を惹起する化合物の探索、という手順でリガンド探索が行われている。

TG1019 のクローニングとリガンド発見

【背景】 GPCR は生体機能における重要な分子であることが知られており、上に示したようなオーファン GPCR のリガンド探索およびその機能解析は、新たな情報伝達系や未知の生命現象の解明に大きく寄与すると思われる。また、現在上市されている薬剤のうち GPCR を標的とした薬剤が約半数を占めていることから、これら oGPCR は新たな創薬ターゲットとなる可能性が考えられる。そのため、我々は逆薬理学的手法を用いた oGPCR のリガンド探索研究を

行った。

【方法】 米国立バイオテクノロジー情報センター (NCBI) で公開しているヒトゲノム配列に対する既知 GPCR との相同性検索によって GPCR と推測される配列を見出し、PCR 法によって新規 GPCR 遺伝子 (TG1019) の cDNA をクローニングした。TG1019 の cDNA を鋳型として ^{32}P ラベルしたプローブを用い、ドットブロットおよびノザンブロット法によって、TG1019 のヒト組織における発現を網羅的に解析した。リガンド探索におけるシグナル活性測定法は、TG1019 の C 末端に各 G タンパク質 (Gai, Gaq, Gas) を結合した融合タンパク質を発現させた昆虫細胞の膜画分を用い、種々のリガンド刺激に対する GTP γ S 結合活性を測定した。また、融合タンパク質の発現の確認は、各 G タンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロット法によって行った。哺乳細胞を用いた TG1019 の機能解析は、TG1019 cDNA を発現ベクター pcDNA3.1 に組み込んだプラスミド (pcDNA3-TG1019) を CHO 細胞に導入し、TG1019 を一過性に発現させた細胞を用い、細胞内 cAMP 濃度を測定することによって行った。

【結果および考察】 上に示したような逆薬理学的手法によって、我々はいくつかのオーファン GPCR のリガンド同定に成功し、その 1 つが TG1019 である。TG1019 は、1272 bp、423 アミノ酸残基からなり、ファミリー 1 に属する 7 回膜貫通型の GPCR である。第 2 細胞内ループにファミリー 1 に属する GPCR に特異的なモチーフである DRY モチーフが存在し、また第 7 膜貫通領域に GPCR 内在化シグナルである N/DPxxY モチーフが存在する。アミノ酸一次配列において、HM74A (ニコチン酸受容体)、GPR81 (オーファン GPCR) と約 40% の相同性を有していた。

TG1019 の mRNA のヒト組織における網羅的な発現分布解析の結果、脳以外の広範な組織において発現が認められ、特に肝臓、肺、脾臓、末梢白血球において高発現していることが示された。肝臓、肺、脾臓、末梢白血球は免疫担当細胞が集積する部位であることから、TG1019 がそれらの生体機能に関わる GPCR である可能性が示唆された。

リガンド探索に用いるライブラリーとして、74 種類の核酸、56 種類のアミン・ペプチド、199 種類の脂質および 21 種類のウシまたはブタの組織抽出物を用いた。その結果、エイコサノイドである 5-oxo-ETE (5-oxo-eicosatetraenoic acid) あるいは 5 (S)-HPETE (5 (S)-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid) を添加した時に、TG1019-Gai を発現させた膜画分において強い GTP γ S 結合活性を示し、その EC50 値はそれぞれ 5.7、および 69 nM であった。また、プロスタグランジンやロイコトリエン B4 (LTB4) などの脂質メディエーターは反応しなかった。一方、TG1019-Gas、TG1019-Gaq を発現させた膜画分では反応しなかった。この結果から、TG1019 は 5-oxo-ETE などの脂肪酸を特異的にリガンドとして認識し、Gai と共役する新規 GPCR であることが示唆された。5-oxo-ETE による TG1019 活性化は、DHA (docosahexaenoic acid) や EPA (eicosapentaenoic acid) などの n3 不飽和脂肪酸によって阻害され、生体内においてこれらの脂肪酸によって活性が調節されていると考えられる。

次に、TG1019 が細胞においても 5-oxo-ETE をリガンドとして認識するかを調べるため、TG1019 遺伝子を導入した CHO 細胞を用いた機能性試験を行った。TG1019 を一過性に発現させた CHO 細胞においてリガンド刺激による cAMP 産生抑制を調べた。その結果、アデニル酸シクラーゼを活性化する forskolin 刺激による細胞内 cAMP 濃度上昇は、5-oxo-ETE 刺激に

よって抑制された (IC₅₀ 値=33 nM)。また、MOCK トランスフェクタントでは、これらの反応は見られなかった。このことから、TG1019 が 5-oxo-EETE をリガンドとし Gai と共役する GPCR であることが、細胞系においても示された。

5-oxo-EETE はアラキドン酸の 5-リポキシゲナーゼ (5-LO) による代謝物として知られ、好酸球、好中球、樹状細胞などの免疫担当細胞によって産生され、好酸球や好中球の遊走因子であることが報告されている。また、5-oxo-EETE は Gai と共役する GPCR を介してこれらのシグナルを伝達していることが示唆されていたが、その受容体については不明であった。本研究において 5-oxo-EETE 受容体 TG1019 を見出し、本 GPCR がこれまで報告されている 5-oxo-EETE の生物活性に関与している可能性が推察された。

TG1019 を介した 5-oxo-EETE による細胞遊走およびシグナル伝達解析

【背景】 5-oxo-EETE は好酸球や好中球の遊走因子として知られているエイコサノイドであり、特に好酸球に対しては、Eotaxin に次ぐ強力な遊走因子であることから、アレルギー疾患におけるメディエーターとして注目されている。5-oxo-EETE は好酸球や好中球において、細胞内 Ca²⁺濃度上昇、p42/p44 MAPK (ERK)、phosphatidil inositol 3 kinase (PI3K) 活性化、および単球から好酸球等の生存因子である GM-CSF の発現誘導が報告されており、炎症性疾患におけるこれらの細胞の組織浸潤、生存延長に関与している可能性が示唆されている。また、5-oxo-EETE 暴露によってラット肺およびヒト皮膚への好酸球浸潤が誘導され、5-oxo-EETE は *in vivo* においても炎症性疾患への関与が示唆されている。TG1019 の mRNA は好酸球において高発現しており、好中球やマクロファージにも発現していることが報告されている。しかしながら、その細胞遊走に対する機能に関しての報告はまだ無い。我々は 5-oxo-EETE 刺激による細胞遊走に対する TG1019 の機能を解析し、その遊走に関与するシグナル伝達経路を明らかにすることによって、5-oxo-EETE および TG1019 の詳細な機能を明らかにできるのではないかと考えて、TG1019 安定発現株を作製してそれらの解析を行った。

【方法】 哺乳細胞発現ベクター pcDNA3.1 に TG1019 の全長 cDNA を組み込んだプラスミド (pcDNA3-TG1019) を CHO 細胞に導入し、ハイグロマイシン耐性株をクローン化することによって、TG1019 安定発現細胞株 (CHO/TG1019) を作製した。細胞内カルシウム濃度測定は、カルシウム指示薬 Fura2-AM を用い、FDSS6000 を用いた蛍光測定法により測定した。細胞内シグナル伝達解析として ERK および Akt のリン酸化誘導は、それぞれのリン酸化タンパク質を認識する抗体を用いたウェスタンブロット法によって行った。細胞遊走試験は microchemotaxis chamber を用い、フィルター下面に遊走した細胞数を、Diff Quik 染色後 600 nm の吸光度を測定することにより定量した。

【結果および考察】 TG1019 安定発現細胞株 (CHO/TG1019) において、種々の 5-LO 代謝産物に対する細胞内 Ca²⁺濃度上昇反応を調べた。その結果、5-oxo-EETE、5(S)-HPETE が強い反応を示し、EC₅₀ 値はそれぞれ、5.1 nM および 98 nM であった。また、好中球の遊走因子として知られる LTB₄ は TG1019 に対して全く反応しなかった。これらの結果から、LTB₄ および 5-oxo-EETE はそれぞれ異なる受容体を介していることが示唆された。また、5-oxo-EETE のグルタチオン付加化合物である FOG9 が、5-HETE と同程度のアゴニスト活性を示すことを明らか

にした。エイコサノイドには、グルタチオン付加されることによって、新たな生物活性を持つものがあり、LTC₄ および FOG₇ の例が知られている。FOG₉ についての生物活性については未報告であるが、本研究の結果から 5-HETE と同程度のアゴニスト活性を持つ FOG₉ の生合成および生物活性に興味をもたれる。また、5-oxo-EETE による細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇反応は、百日咳毒素 (PTX) 処理および PLC 阻害剤 (U73122) 前処理により完全に抑制された。これらの結果から、TG1019 を介した細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇反応は、Gai から解離した Gβγ を介して PLC を活性化することが明らかとなった。

CHO/TG1019 細胞における 5-oxo-EETE 刺激に対する ERK および Akt の活性化を調べた。その結果、5-oxo-EETE 刺激後、5 分以内に、濃度依存的に ERK および Akt の活性化が誘導され、これらの活性化は MAPKK である MEK 阻害剤 PD98059、および AKT の上流で働く PI3K の阻害剤 LY294002 によってそれぞれ抑制された。これらのことから、TG1019 は 5-oxo-EETE 刺激による MEK-ERK、および PI3K-AKT のシグナル伝達経路の活性化を担う受容体であることが示された。

CHO/TG1019 細胞の 5-oxo-EETE に対するケモタキシス反応を調べた。その結果、CHO/TG1019 細胞は 5-oxo-EETE に対し 100~1000 nM で最大の遊走反応を示した。また、5(S)-HPETE に対してもケモタキシス反応を示し、その強さは細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇反応を指標としたアゴニスト活性と相関していた。CHO/TG1019 細胞で観察された各リガンドのケモタキシス誘導活性の強さは、ヒト好酸球の報告とほぼ一致しており、TG1019 が 5-oxo-EETE によるケモタキシス反応に関与していることが示された。この 5-oxo-EETE に対するケモタキシス反応は、PTX、PLC 阻害剤、PI3K 阻害剤前処理によって顕著に抑制された。一方、MEK 阻害剤ではその抑制は弱かった。また、ケモタキシスに関わる因子として知られる Rho キナーゼ阻害剤 Y27632 では、細胞遊走は抑制されなかった。これらの結果から、5-oxo-EETE 刺激による細胞遊走反応には Gai から解離した Gβγ による PLC の活性化と PI3K 活性化が 5-oxo-EETE 刺激によるケモタキシスに重要であることが示唆された。また、TG1019 を介したケモタキシスは、MEK 阻害剤および Rho キナーゼ阻害剤で抑制されなかったことから、好酸球の遊走因子として知られる Eotaxin とは異なるシグナル伝達経路でケモタキシスを誘導することが示唆された。

【結論】我々は、好酸球に対して強い遊走反応を示すアラキドン酸代謝産物である 5-oxo-EETE の受容体が TG1019 であることを見出し、その安定発現株が遊走反応を示すこと、およびそのシグナル伝達経路を明らかにした。これらの結果は、好中球や好酸球に対して報告されている 5-oxo-EETE の作用と一致しており、TG1019 が生体内において 5-oxo-EETE の受容体として機能していることを示唆しているとともに、CHO/TG1019 細胞は 5-oxo-EETE の機能解析を行うために有用なモデルとなると考えている。また、TG1019 は 5-HPETE から 5-oxo-EETE に至る代謝産物を特異的に認識することから、これら 5-LO 代謝産物と TG1019 を介した新たなリガンド-受容体システムが生体内に存在することが示唆される。好酸球は喘息等のアレルギー疾患の増悪に関与することが知られており、好酸球を強力に遊走する 5-oxo-EETE はそれらの疾患との関連が示唆されている。本研究における発見は、病態における好酸球遊走シグナルや未知の部分が多い 5-oxo-EETE の生物活性の解明、および 5-oxo-EETE が関与するアレルギー反応を制御する薬剤開発において大きく貢献できるものと考えている。