

[論文の内容の要旨]

論文題目 **Characterization of human G2A;
gene regulation and cellular function**

和訳 **G タンパク質共役型受容体 G2A :
遺伝子発現および細胞内機能解析**

指導教官 清水孝雄教授

東京大学大学院医学系研究科 分子細胞生物学専攻

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

村上尚加

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) は、神経系、免疫系、内分泌系など生体内のあらゆる組織において、生理学的・病理学的に重要な役割を担うことが知られている。現在市販されている薬物の約 30% が GPCR を標的とした薬物であることからその重要性が分かる。

構造学的には、GPCR は N 末端を細胞外、C 末端を細胞内に持つ I 型 7 回細胞膜貫通タンパク質であり、主に形質膜に発現してその機能を発揮する。古典的な GPCR 活性化のモデルにおいては、それぞれの GPCR はリガンドと呼ばれる特異的な分子によって構造変化を起こし、それにより、共役する三量体 G タンパク質を活性化することで細胞内シグナル伝達を惹起する。

GPCR をコードする遺伝子は、ヒトにおいて約 800 個と全遺伝子数の約 3% を占め、最大の遺伝子ファミリーを構成する。その一方で、リガンドが既知の GPCR は、嗅覚受容体をのぞく約 400 個の遺伝子のうち、約 250 個と、半数の GPCR はリガンドが未知の孤児 (オーファン) 受容体である。これら孤児受容体のリガンドを発見することは、受容体を介したシグナル伝達の研究はもとより、創薬の新たな可能性を開くものとして期待される。

本研究は 1) 当時孤児受容体であった G2A 受容体のリガンド同定およびシグナル伝達の解析、 2) ヒト G2A 遺伝子の遺伝子発現調節の解析、の 2 つに大別される。それぞれ、以下の新しい知見を得た。

1) G2A 受容体のリガンド同定およびシグナル伝達系の解析

当時ヒト G2A 受容体は、リン脂質の一種であるリゾホスファチジルコリン (Lysophosphatidylcholine, LPC) の受容体として報告されていた (Kabarowski *et al.*, *Science*, 2001) が、再現がとれなかったため、新規リガンドの探索を行った。折しも、G2A と相同性の高い受容体ファミリー (G2A ファミリー) のうち、OGR1 (GPR68)、GPR4 が細胞外プロトンを感じて活性化される受容体であることが報告された (Ludwig *et al.*, *Nature*, 2003) ため、G2A についても細胞外プロトン感受性受容体と推定し、解析を進めた。

その結果、ヒト G2A は pH 7.4 の生理的条件において構成的活性化を示すものの、更に細胞外酸性化により活性化され、低分子量 G タンパク質である Rho を介したシグナル伝達を引き起こすことを示した。さらに、G2A ファミリーに保存されている塩基性アミノ酸残基ヒスチジン 174 (H174) をフェニルアラニン (F) に置換した変異受容体 H174F を作製し、この変異体の pH 依存的活性化が低下していることを示し、細胞外プロトン感受の機序について、受容体の構造学的側面から説明した。

他方、これまでアゴニストと考えられていた LPC は、濃度依存的に G2A の活性化を抑制すること ($IC_{50} = 3 \mu M$) も明らかとした。そのうえ、LPC はリゾホスファチジン酸 (LPA) やプロスタグランジン E₂ (PGE₂)、トロンビン誘導性のアクチン重合をも、G2A 依存的に抑制したことから、LPC は G2A を介して未知の抑制性シグナル伝達を行っていることが示唆された。

細胞膜画分を用いた受容体と LPC の直接結合実験が技術的に困難であることから、LPC の作用点を定めるために、GTP-Rho プルダウン解析・G α サブユニットとの共発現の系を用いた。LPC は G2A 受容体レベルあるいは三量体 G タンパク質レベルで G2A の活性化を抑制していることが示唆された。同時に、R203A 変異体は細胞外 pH によって活性化されるが、LPC によって抑制されないことから、LPC の G2A に対する作用は受容体レベルにおいて起こっていると考えられた。

Murakami, N., Yokomizo, T., Okuno, T., Shimizu, T.,

G2A is a proton-sensing G-protein-coupled receptor, antagonized by lysophosphatidylcholine.

J. Biol. Chem. (2004) 279: 42484-

Murakami, N. et al.

投稿準備中

2) ヒト G2A 遺伝子の遺伝子発現調節の解析

ヒト G2A は pH 7.4 の生理的条件下でも構成的活性化を示すことから、細胞膜上の受容体発現量の調節が重要である。その調節には、i) 遺伝子転写調節、ii) 翻訳調節、iii) タンパク質の細胞膜への輸送調節の 3 段階が考えられる。本研究では転写調節に主眼をおいて解析を行った。

ヒト末梢白血球より調整した mRNA を鋳型とし、5'RACE 解析を行い、転写開始点(TSS)を同定した。これをもとに、TSS 付近の DNase I 高感受性領域(DHS)を同定した。TSS の上・下流 5 kb の範囲に、転写開始点を含む 4 箇所の DHS が検出された。これらの DHS はすべて、G2A を高発現しているヒト単球系細胞株 THP-1 細胞では観察されたが、ヒト胎児腎臓細胞株 HEK 293 細胞では観察されなかったことから、TSS 付近のクロマチン状態を反映していると考えられた。同時に、TSS 付近のヒストン H3 のアセチル化状態も、G2A の発現レベルと関連していた。

一方で、TSS 直上の約 300 bp がヒト G2A のコアプロモーター活性に重要であることをレポーター遺伝子解析により明らかにしたが、この領域は *cis* エlement として、c/EBP, Runx, Ets 因子のコンセンサス配列を含んでいた。これらの配列は *in vitro* においても、*in vivo* においても c/EBP α , Runx1, Pu.1 と結合し、ヒト G2A の発現調節に寄与していることを示した。

Murakami, N. et al

投稿準備中