

[課程-2]

審査結果の要旨

氏名 村上 尚加

本研究は当時リガンド未知の孤児受容体であったヒト G2A 受容体のリガンド同定と、ヒト単球系細胞株 THP-1 における G2A の遺伝子発現制御の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ヒト G2A 受容体が細胞外の酸性条件により活性化されることを以下の二つの実験により示した。まず、PC12h 細胞に、zif268 プロモーター駆動性ルシフェラーゼと G2A 受容体を共発現させ、酸性刺激による活性化を観察した。つぎに、COS-7 細胞に G2A 受容体を一過性に過剰発現させ、細胞外酸性刺激により細胞内イノシトールリン酸(IPs)産生が惹起されることを示した。
2. これまでアゴニストとして報告されていた lysophosphatidylcholine (LPC)により、zif268 プロモーターの活性化も、IPs 産生も濃度依存的に抑制されることを示した。
3. G2A が細胞外酸性環境を感知する機序として、G2A 受容体ファミリー (G2A, OGR1, GPR4, TDAG8)すべてに保存されている塩基性アミノ酸残基ヒスチジンに着目した。第四膜貫通領域に存在する 174 番目のヒスチジン(H174)残基をフェニルアラニンに置換した変異体では酸性環境による活性が有意に低下したことから、H174 が酸性環境の感知に重要な役割を果たしていることが示唆された。
4. G2A の発現レベルの制御を明らかにするために、転写レベルにおける制御に注目した。まず、ヒトおよびマウスにおいて G2A の発現臓器分布を Northern blot により確認し、ヒトにおいては末梢血白血球、リンパ節、脾臓などに多く発現する一方で、マウスにおいては胸腺や骨髄などの一次リンパ組織に強い発現のあることを示した。
5. ヒト末梢血白血球より調整した RNA を鋳型とし、5'RACE 解析を行い、転写開始点(transcriptional start site, TSS)を同定した。
6. その TSS 近傍 5 kb 上下流の DNaseI 高感受性領域(DHS) 4 箇所を THP-1

において同定し、その一つが TSS に一致することを示した。一方で HEK293 細胞では DHS が観察されず、細胞特異的な転写制御であることを裏付けた。同時に、アセチル化ヒストン H3 (AcH3)特異的抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)解析により、G2A のプロモーター領域のヒストンが、THP-1 において高度にアセチル化されていることを示した。

7. さらに、THP-1 を用いたレポーター解析により、G2A のコアプロモーター領域を同定し、その領域に *in vitro* で結合しうる因子を EMSA によって確認した。C/EBP $\alpha$ , Runx1, Pu.1 の結合が確認された。
8. 次に、THP-1 を用いた機能的レポーター遺伝子解析によって、予測された *cis* エlementが機能的に重要であるということ、また、転写因子の過剰発現によってプロモーター活性が増強されること (*trans-activation*)を示した。
9. 最後に、ChIP 解析により、THP-1 において c/EBP, Pu.1 が *in vivo* で G2A のプロモーター領域に結合していることを示した。

以上、本論文はヒト G2A 受容体が細胞外酸性条件によって活性化され、その活性化が LPC により抑制されることを示した。また、ヒト単球系細胞株 THP-1 において G2A の転写が c/EBP, Runx1, Pu.1 という因子によって維持されていることを示した。本研究は、これまで未知であったヒト G2A 受容体のリガンドを同定し、G2A を中心とした動脈硬化研究に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。