

審査の結果の要旨

氏名 柳田 圭介

本研究は多彩な生理機能を発揮する脂質メディエーターであるリゾホスファチジン酸(LPA)の受容体のうち、非 EDG 型 LPA 受容体群の機能を明らかにするため、LPA₄の細胞内シグナル伝達の解析と新規 LPA 受容体の同定を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. GPR23/p2y9/LPA₄を安定発現させたラット神経芽腫細胞株 B103 細胞(B103-LPA₄細胞)を樹立してその形態観察を行なったところ、血清存在下において細胞凝集が観察された。血清中に豊富に存在する LPA による LPA₄の活性化がこの形態的特徴をもたらしていることが推察された。

2. LPA₄の共役 G タンパク質を同定するために、Ca²⁺シグナルと cAMP シグナルについて検討したところ、LPA₄は Gq タンパク質には共役するが Gs、Gi タンパク質には共役しないことが明らかとなった。

3. 低密度で播種した B103-LPA₄細胞を血清飢餓処理後に LPA 刺激をしたところ、神経突起退縮が観察された。各種阻害剤の効果の検討により、この形態変化が G12/13-Rho 経路の活性化によることが示唆された。

4. 高密度で播種した B103-LPA₄細胞を血清飢餓処理後に LPA 刺激をしたところ、血清存在下で同細胞が呈していたような細胞凝集塊の形成が観察された。この形態変化についても G12/13-Rho 経路の活性化によることが、各種阻害剤の効果の検討により示唆された。

5. B103-LPA₄細胞で認められた細胞凝集における細胞間接着にカドヘリン、特に N-カドヘリンが関与することが、トリプシンを用いた細胞解離実験と免疫細胞化学実験により明らかとなった。

6. オーフアン受容体 p2y5 を安定発現させた B103 細胞株及びラット肝細胞腫細胞株 RH7777 細胞株において、LPA 依存的な細胞形態の変化を認めた。この形態変化は ROCK 阻害剤により阻害されたため、p2y5 が Rho 経路を活性化させる LPA 受容体である可能性が示された。

7. p2y5 を安定発現させた RH7777 細胞株の膜画分を用い、トリチウムラベルされた LPA の結合を認めた。また、p2y5 を介した G タンパク質、特に G13 タンパク質の GDP/GTP 交換反応が LPA 刺激により亢進することを GTPγS 結合実験と免疫沈降実験により明らかにした。

8. p2y5 の LPA による活性化をセカンドメッセンジャーの変化として検出することができた。すなわち、G13 タンパク質と Gs タンパク質とのキメラ G タンパク質を作製し、これを p2y5 を

安定発現させた B103 細胞に一過性に発現させたところ、LPA 濃度依存的な cAMP の上昇を検出することができた。

9. GTP γ S 結合実験と上記キメラ G タンパク質を用いた cAMP 上昇検出系を用いて、グリセロール骨格の *sn*-2 位に脂肪酸が結合した LPA つまり 2-アシル型 LPA の方が、1-アシル型 LPA よりも p2y5 のリガンドとして強いことを示した。

10. 内在性に p2y5 を発現するヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)は LPA 刺激により迅速な形態変化を引き起こした。この形態変化は p2y5 に対する siRNA 処理により著しく減弱したため、p2y5 依存的に起こることが示された。

以上、本論文は非 EDG 型 LPA 受容体である LPA₄ が G12/13-Rho 経路を活性化させる受容体であること、さらにオーファン受容体であった p2y5 が同じく G12/13-Rho 経路を活性化させる新規の非 EDG 型 LPA 受容体(LPA₆)であることを明らかにした。本研究は多彩な機能を発揮する LPA の作用メカニズム解明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。