

血管内皮細胞特異的受容体の制御による動脈硬化予防に関する研究

主任研究者 望月 直樹 国立国際医療センター研究所 室長

研究要旨:血管内皮細胞に発現する新規7回膜貫通型受容体 Edg(Endothelial Differentiation Gene) 受容体に着目して研究を行った。Edg 受容体サブタイプ特異的発現細胞株を樹立した。Edg 受容体は SPP (スフィンゴシン-1-リン酸) LPA (リゾフォスファチジン酸) をリガンドとする受容体であるがサブタイプに限らず三量体 GTP 結合蛋白質 Gi を介して Erk(MAP-キナーゼ)を活性化することを明らかにした。この Erk 活性化機構は EGF 受容体の transactivation 機構は関与していないことを明らかにした。今後 Edg 受容体関連薬剤開発のためのスクリーニング系を確立した。

A. 研究目的

本研究は動脈硬化症の発症・進行を制御する血管内皮細胞に特異的に発現する三量体 GTP 結合蛋白質共役型受容体①Edg 焦点を絞って研究を行ない、動脈硬化症・細動脈の閉塞を予防することにより老人性痴呆・脳血管障害による寝たきり老人の増加を阻止することを究極の目的とする。本年度は Edg 受容体からの細胞増殖機構の解明を目的とした。

B. 研究方法

(1)培養細胞系での Edg 受容体の情報伝達機構

Edg 受容体ど情報伝達系を解析するため Edg 受容体サブタイプ特異的発現細胞株の樹立を試みる。

(2)細胞増殖系の MAP キナーゼの調節機構を検討する。

内因性 EDG 受容体刺激による増殖刺激作用の検討はリン酸化 Erk を指標として調べた。NIH3T3 細胞、COS-1 細胞、Hela 細胞を 12 時間血清飢餓状態にした後、10mM SPP, 1mM LPA で刺激した。細胞溶解液で懸濁し 15,000rpm 10 分間の遠心後の上清を SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し 3%Ovalbumin (TBS-0.1% tween20) でブロッキングの後、抗リン酸化 Erk 抗体 (New England Biolab 社) を使用してイムノブロットを行った。

(3)細胞内 Ca の測定は NIH3T3 細胞を血清飢餓状態で培養後 Ca 蛍光指示薬 Fluo3-AM でラベル後 SPP あるいは LPA で刺激後の蛍光強度を測定することで Ca 濃度を計測した。

C. 研究結果

Edg-1,2,3,4,5cDNA の PCR 法による単離と EDG-1,2,3,4,-5 発現 Hela 細胞株の樹立

Edg 受容体のサブタイプ特異的発現 Hela 細胞株を樹立した。各細胞株での Edg 受容体の発現確認は野生型よりの刺激依存性 Erk の活性化が顕著であることと integrate された Edg 受容体を Southern ブロットで行った。

Edg 受容体を介した Erk 活性化と Erk 活性化機構の検討

Edg 受容体の Erk 活性化は三量体 GTP 結合蛋白質 Gi を介していることが判明した。また $\beta\gamma$ を介するが EGF 受容体の Transactivation 機構は Edg に関しては無いことが判明した。

Edg 受容体刺激による細胞内 Ca の増加

NIH3T3 細胞には内在性の Edg 受容体があることがわかり同細胞を用いて Ca 蛍光指示薬 Fluo3-AM により細胞内 Ca の濃度を測定した。本測定系が 96 穴培養皿でも測定できる感受性を持っていた。

D. 考察

今年度 Edg 受容体発現細胞株を得られたことから細胞内情報伝達系の解析が容易となった。Edg に関しては Erk 活性化機構 ($\beta\gamma$ を介するが EGF 受容体の Transactivation 機構ではない) が明らかとなった。この Erk 活性化は百日咳毒素で抑制されることから Gi 共役型受容体であることが証明された。また、Edg 受容体に関しては薬剤の開発のためのスクリーニング系を開発できたことから今将来的に創薬に有効利用できると思われる。

E. 結論

Edg受容体の情報伝達系を解析するべく同受容体を発現する細胞株を樹立した。創薬に向けてのスクリーニング系を開発した。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mochizuki N, Ohba Y, Kobayashi S, Otsuka N, Graybiel A. M. Tanaka S, and Matsuda M. Crk Activation of JNK via C3G and R-Ras. *J Biol Chem* 275:12667-12671, 2000.
2. Ohba Y, Mochizuki N, Yamashita S, Chan AM, Schrader JW, Hattori S, Nagashima K, and Matsuda M. Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem* 275:20020-20026, 2000.
3. Yanai, K., Saito, T., Kakinuma, Y., Kon, Y., Hirota, K., Taniguchi-Yanai, K., Nishijo, N., Shigematsu, Y., Horiguchi, H., Kasuya, Y., Sugiyama, F., Yagami, K., Murakami, K., and Fukamizu, A. 2000. Renin-dependent Cardiovascular and -independent Brain Functions Revealed by Renin-deficient Mice. *J. Biol. Chem.* 275, 5-8 (2000)
4. Miyagishi, M., Fujii, R., Hatta, M., Yoshida, E., Araya, N., Nagafuchi, A., Ishihara, S., Nakajima, T., and Fukamizu, A. 2000. Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating b-catenin with CBP/p300. *J. Biol. Chem.* 275, 35170-35175.

2. 学会発表

望月直樹、松田道行：三量体 GTP 結合蛋白質 Gαi による制御を受ける Rap1 水解促進因子を介したの Erk 活性化機構. 第 73 回日本生化学会総会 横浜 平成 12 年 10 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

血管内皮細胞特異的受容体の制御による動脈硬化予防に関する研究

主任研究者 望月 直樹 国立国際医療センター研究所室長

研究要旨:血管内皮細胞に発現する新規7回膜貫通型受容体 Edg (Endothelial Differentiation Gene) 受容体に着目して研究を行った。Edg 受容体サブタイプ特異的発現細胞株を樹立した。Edg 受容体は SPP (スフィンゴシン-1-リン酸) LPA (リゾフォスファチジン酸) をリガンドとする受容体であるがサブタイプに限らず三量体GTP結合蛋白質 Gi を介して Erk (MAP-キナーゼ)を活性化することを明らかにした。この Erk 活性化機構は EGF 受容体の transactivation 機構は関与していないことを明らかにした。今後 Edg 受容体関連薬剤開発のためのスクリーニング系を確立した。

A. 研究目的

本研究は動脈硬化症の発症・進行を制御する血管内皮細胞に特異的に発現する三量体 GTP 結合蛋白質共役型受容体①Edg 焦点を絞って研究を行ない、動脈硬化症・細動脈の閉塞を予防することにより老人性痴呆・脳血管障害による寝たきり老人の増加を阻止することを究極の目的とする。本年度は Edg 受容体からの細胞増殖機構の解明を目的とした。

B. 研究方法

(1)培養細胞系での Edg 受容体の情報伝達機構

Edg 受容体の情報伝達系を解析するため Edg 受容体サブタイプ特異的発現細胞株の樹立を試みる。

(2)細胞増殖系の MAP キナーゼの調節機構を検討する

内因性 EDG 受容体刺激による増殖刺激作用の検討はリン酸化 Erk を指標として調べた。NIH3T3 細胞、COS-1 細胞、Hela 細胞を 12 時間血清飢餓状態にした後、10mM SPP, 1mM LPA で刺激した。細胞溶解液 (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl PH 7.5, 1% NP-40, 10mM MgCl₂, 1mEMPMSF, 3mg/ml Leupeptin) で懸濁し 15,000rpm 10 分間の遠心後の上清を SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し 3% Ovalbumin (TBS-0.1% tween20) でブロッキングの後、抗リン酸化 Erk 抗体 (New England Biolab 社) を使用してイムノプロットを行った。

C. 研究結果

Edg-1,2,3,4,5cDNA の PCR 法による単離と EDG-1,2,3,4,5 発現 Hela 細胞株の樹立

Edg 受容体のサブタイプ特異的発現 Hela 細胞株を樹立した。各細胞株での Edg 受容体の発現確認は野生型よりの刺激依存性 Erk の活性化が顕著であることと integrate された Edg 受容体を Southern プロットで行った。

Edg 受容体を介した Erk 活性化と Erk 活性化機構の検討

Edg 受容体の Erk 活性化は三量体 GTP 結合蛋白質 Gi を介していることが判明した。また $\beta\gamma$ を介するが EGF 受容体の Transactivation 機構は Edg に関しては無いことが予想された。

D. 考察

今年度 Edg 受容体発現細胞株ならびに APV 受容体発現細胞株をそれぞれ得られたことから細胞内情報伝達系の解析が容易となった。Edg に関しては Erk 活性化機構が明らかとなり、また APV 受容体は cAMP 産生抑制作用があることが判明した。Edg 受容体 APV 受容体ともに Gi 共役型受容体である。また、Edg 受容体に関しては薬剤の開発のためのスクリーニング系を開発できたことから今将来的に創薬に有効利用できると思われる。APV の機能解析がノックアウトマウスを用いて可能となることが予想される。

E. 結論

Edg,APV 受容体の情報伝達系を解析するべく両受容体を発現する細胞株を樹立した。また APV 受容体の個体での機能解析のためにノックアウトマウスの準備としてヘテロ体を作製した。

F. 健康危険情報

特記なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mochizuki N, Ohba Y, Kobayashi S, Otsuka N, Graybiel A. M. Tanaka S, and Matsuda M. Crk Activation of JNK via C3G and R-Ras. *J Biol Chem* 275:12667-12671, 2000.
2. Ohba Y, Mochizuki N, Yamashita S, Chan AM, Schrader JW, Hattori S, Nagashima K, and Matsuda M. Regulatory proteins of R-Ras, TC21/R-Ras2, and M-Ras/R-Ras3. *J Biol Chem* 275:20020-20026, 2000.

2. 学会発表

望月直樹、松田道行：三量体 GTP 結合蛋白質 Gαi による制御を受ける Rap1 水解促進因子を介したの Erk 活性化機構. 第 73 回日本生化学会総会 横浜 平成 12 年 10 月

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当無し

血管内皮細胞特異的受容体の制御による動脈硬化予防に関する研究

分担研究者 深水 昭吉 筑波大学先端学際領域研究センター教授

研究要旨：動脈硬化の発症機構や脳血管機能の解明には、内皮細胞の制御機構を明らかにすることが必須である。マウス APV (AT1-related apelin/virus) 受容体は、内皮細胞、平滑筋細胞、脳、心臓、腎臓、肺や脂肪細胞に発現し、G タンパク質共役型 7 回膜貫通型受容体に分類される。しかし、APV 受容体を介した生理作用は不明である。そこで本研究は、APV 受容体の生理機能を解明し、G タンパク質共役型受容体を持つ病態発生メカニズムを理解する。本年度は、APV 受容体発現細胞を選択し、細胞株を樹立した。また、APV 受容体遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体の作製に成功した。

A. 研究目的

動脈硬化の発症機構や脳血管機能の解明には、内皮細胞の制御機構を明らかにすることは必須である。そこで、内皮細胞に発現する APV 受容体の遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体・ホモ接合体の内皮機能に着目して解析を行う。また、樹立細胞株を活用して、APV 受容体がどの G 蛋白質と共役しているのかを同定する。APV 受容体の拮抗薬が存在しない現在、受容体を介したシグナル伝達系を明らかにして、かつノックアウトマウスの表現型を解析することは、拮抗薬創生のヒントを得ることが出来る。

B. 研究方法

(1) APV 安定型発現細胞株の樹立

APV 受容体の N 末端、及び C 末端に Hemagglutinin (HA) タグや FLAG (FL) タグを組み込んだ APV 受容体と、タグを付加しない野生型 APV 受容体を作製後、ヒト胎児腎臓由来の 293-T 細胞に安定に発現させた。得られたクローンに関して、Western blot、フローサイトメトリーによる発現解析を行った。

(2) APV 遺伝子ノックアウトマウスの作製

APV 受容体の翻訳開始メチオニンに LacZ 遺伝子を挿入し、薬剤選択遺伝子・Neo と DT (ジフテリア毒素 A 断片) を付加して、5' 側と 3' 側の相同組み換え領域をそれぞれ 6.5 kb と 1.6 kb としてターゲティングベクターを作製した。TT2 細胞株にこのターゲティングベクターを導入し、G418 耐性選択を行い、APV 受容体遺伝子相同組み換え体変異

株を樹立した、キメラマウスを作製後ヘテロ接合体マウスを樹立した。

(倫理面への配慮) マウスの胚操作は、筑波大学・実験動物取扱指針に基づいて行われた。

C. 研究結果

APV 安定型発現細胞株の樹立

アペリンペプチド刺激により cAMP の合成が抑制されることが報告されていたため、各細胞株の RIA による細胞内 cAMP 濃度の測定を行った。この実験では細胞を二グループで用意し、1 グループ目はフォルスコリン刺激によりアデニル酸シクラーゼを活性化して最大限に cAMP を産生させておき、もう一方にはフォルスコリンと共にリガンドであるアペリンを終濃度 10⁻⁷M で加え、リガンド刺激によりどの程度の cAMP 産生が抑制されたかを検討した。その結果、APV-5'HA で 4 クローン、APV-5'FL で 3 クローン、APV-3'HA で 8 クローン、APV-3'FL で 5 クローン、APV-WT で 3 クローンの細胞株が 90%前後の高い cAMP 合成抑制効果を示した。

APV 遺伝子ノックアウトマウスの作製

APV 遺伝子欠損マウスの系統確立を目指し、ジーンターゲット法を用いて TT2 細胞で相同組み換えしマウスの 8 細胞期胚にインジェクションした後、胚盤胞期で偽妊娠マウスの仮親の輸卵管に移植した。ヘテロ欠損マウスを獲るために、キメラマウスを野生型の C57BL/6 マウスと交配した。ここに、APV 遺伝子欠損マウスのヘテロ接合体を確立した。

D. 考 察

APV 受容体はGiを介してcAMP産生を抑制していることが明らかとなった。取得したヘテロ欠損マウスは、ホモ欠損マウスを得るための交配実験に利用している。現段階では、ヘテロ欠損マウスの顕著な表現型は示していない。ホモ欠損マウスがメンデルの法則に従って出産してくるのか、胎生致死になるのかを注意深く観察する必要がある。

E. 結 論

APV 受容体の情報伝達系を解析するべく同受容体を発現する細胞株を樹立した。また APV 受容体の個体での機能解析のためにノックアウトマウスの準備としてヘテロ体を作製した。

F. 健康危険情報

特記なし。

G. 研究発表

1. Yanai, K., Saito, T., Kakinuma, Y., Kon, Y., Hirota, K., Taniguchi-Yanai, K., Nishijo, N., Shigematsu, Y., Horiguchi, H., Kasuya, Y., Sugiyama, F., Yagami, K., Murakami, K., and Fukamizu, A. 2000. Renin-dependent Cardiovascular and -independent Brain Functions Revealed by Renin-deficient Mice. *J. Biol. Chem.* 275, 5-8 (2000)
2. Miyagishi, M., Fujii, R., Hatta, M., Yoshida, E., Araya, N., Nagafuchi, A., Ishihara, S., Nakajima, T., and Fukamizu, A. 2000. Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating β -catenin with CBP/p300. *J. Biol. Chem.* 275, 35170-35175.

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当無し