

μl のバッファーA で常温において 15 分間処理した。その後、 $50 \mu\text{M}$ フォルスコリンの存在下で細胞を種々の濃度の 1-オレオイル (18:1) LPA (Avanti 社) で常温において 30 分間刺激し、反応を停止するために終濃度 1% Tween 20 を加えた。 4°C で一晩静置した後、上清に含まれる cAMP 濃度を PerkinElmer 社の AlphaScreen cAMP Functional Assay Kit と Fusion System で検出した。

LPA 受容体がアデニル酸シクラーゼを活性化することを検討する実験では、細胞を 0.1% BSA を含む HEPES-タイロッドバッファー (25 mM HEPES-NaOH [pH 7.4], 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 0.49 mM MgCl_2 , 12 mM NaHCO_3 , 0.37 mM NaH_2PO_4 , 5.6 mM D-グルコース) (HEPES-タイロッド-BSA バッファー) で二回洗い、 0.5 mM IBMX を含む HEPES-タイロッド-BSA バッファーで 37°C において 15 分間処理した。その後、細胞を種々の濃度の LPA で 37°C において 30 分間刺激した。細胞溶解液を加えて反応を停止し、溶解液中の cAMP 含量を GE Healthcare 社の cAMP Biotrack EIA Kit を用いて測定した。

細胞内 Ca 濃度の測定

コラーゲンコート 10 cm ディッシュに播種した細胞を無血清培地で 24 時間培養した。2 mM EDTA を含む PBS で細胞をディッシュからはがし、HEPES-タイロッド-BSA バッファーで洗った後、 $3 \mu\text{M}$ Fura2-AM (同仁社) を 37°C で 1 時間取り込ませた。

HEPES-タイロッド-BSA バッファーで二回洗い、 $1 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調整した。CAF-100 蛍光光度計 (日本分光社) に 0.5 ml の細胞懸濁液をセットし、LPA を作用させながら 340 nm 及び 380 nm の波長の光を当て、その際に発した蛍光の強度比から細胞内 Ca 濃度の変化を求めた。

細胞円形化アッセイ

ポリ-D-リジンでコートした 12 ウェルプレートに細胞 (1.0×10^4 個) を播種した。24 時間後に無血清培地に交換し、さらに 24 時間培養した。更なる培地交換の 3 時間後に細胞を $1 \mu\text{M}$ LPA で 15 分間刺激した。神経突起や糸状仮足を欠いた円形の形態を示す細胞の割合を、1 ウェル当たり 200 個以上の細胞を調べて算出した。

Rho 阻害アッセイ

ポリ-L-リジンでコートした 35 mm ディッシュに細胞 (1.0×10^4 個) を播種した。24 時間後に、ポツリヌス菌 C3 細胞外酵素の発現ベクター (pEF-C3) または空ベクター (pEF-BOS) を EGFP の発現ベクター (pEGFP-1) と 4:1 の重量比で混ぜた計 $3 \mu\text{g}$ の DNA を細胞へトランスフェクションした。24 時間後に細胞をポリ-D-リジンでコートした 12 ウェルプレートに移し、さらに 24 時間培養した。無血清培地で 12 時間培養の後、 $1 \mu\text{M}$ LPA で 15 分間刺激した。1% パラホルムアルデヒド固定の後、EGFP を発現する細胞を蛍光顕微鏡で検出した。そのうち、神経突起や糸状仮足を欠いた円形の形態を示す細胞の割合を、

20 視野以上で 100 個以上の細胞を調べて算出した。

細胞凝集の定量

ポリ-D-リジンでコートした 24 ウェルプレートに細胞 (1.5×10^5 個) を播種した。24 時間後に無血清培地に交換し、さらに 24 時間培養した。更なる培地交換の 3 時間後に細胞を $1 \mu\text{M}$ LPA で 3 時間刺激した。細胞を固定し、ディフクイックで染色した。凝集した細胞の分布の様子を写真撮影し、任意の $1710 \mu\text{m} \times 1290 \mu\text{m}$ の長方形部分を取り出した。ここに $30 \mu\text{m}$ グリッドを描いて 2451 個の正方形に分割した。1 つも細胞核含まない正方形の割合を算出して、細胞凝集の程度を示すパラメーターとした。

細胞凝集塊解離アッセイ

ポリ-D-リジンでコートした 35 mm ディッシュに細胞 (5×10^5 個) を播種した。一晚培養の後、無血清培地に交換し、さらに 24 時間培養した。細胞を $1 \mu\text{M}$ LPA で 2 時間刺激して、凝集塊を形成させた。2 mM CaCl_2 または EDTA を含む HBSS で細胞を洗浄し、0.01%トリプシンで 37°C において 30 分間処理した。穏やかに 10 回ピペティングして細胞塊を解離させ、生じた小さくなった塊の数を細胞カウンターで数えた。 CaCl_2 存在下における細胞塊の数 (TC) と EDTA 存在下における細胞塊の数 (TE) の比を計算して Ca 依存性の細胞間接着の程度を見積もった。

免疫蛍光染色

ポリ-L-リジンでコートしたガラスボトム 35 mm ディッシュに細胞 (3.5×10^5 個) を播種した。一晚培養の後、無血清培地に交換し、さらに 24 時間培養した。37°C において細胞を $1 \mu\text{M}$ LPA で 3 時間刺激して固定した。細胞膜の透過処理の後に N-カドヘリンに対するモノクローナル抗体と反応させた。Alexa-488 標識の二次抗体で一次抗体の結合を可視化し、Carl Zeiss 社の LSM510 共焦点顕微鏡で観察した。

統計解析

図中のすべての値は平均±標準誤差で示した。統計学的な有意さは、Turkey-Kramer テストをポストホックテストとした分散分析で値を比較することによって判定した。 $p < 0.05$ のときを「有意差有り」と判定した。

(倫理面への配慮)

すべて試験管内における研究であり、またヒトのサンプルは研究者本人のもの若しくは試薬として購入したもので、倫理的問題発生しないと判断し特別な措置は講じていない。

1-C. 研究結果

LPA_1 と LPA_4 の B103 細胞における安定発現

神経細胞における LPA_4 の機能を調べるために、B103 ラット神経芽細胞腫細胞に LPA_1 または LPA_4 を安定発現させた。この細胞を選択したのは、内在性の LPA への反応性を欠いているとの報告があったからである。予期したとおり、空ベクターをトランスフェクションしただけの細胞から得られた

細胞膜画分には、 ^3H ラベルされたLPA₄への結合活性は認められなかった。B103細胞における各種LPA受容体の発現プロファイル調べるために、この細胞から抽出されたRNAを鋳型にしてRT-PCRを行った。その結果、LPA₄のmRNAが僅かに検出されたが、LPA₁₋₃のmRNAはどれも検出されなかった。この細胞において、LPA₄の発現とLPAへの反応性を欠如していることは一見矛盾しているようであるが、LPAに反応することができない程度しかLPA₄分子がこの細胞には発現していないためではないかと解釈してい

る。また若しくは、転写後及び翻訳後調節がmRNA発現とタンパク質発現の間の不一致を招いているのかもしれない。いずれにせよ、B103細胞における低いLPA₄mRNAの発現は考慮の範囲外と見なし、この細胞のLPAへの不応性と神経細胞としての性質を利用して、神経細胞におけるLPA₄の機能を調べることにした。

LPA₁とLPA₄の安定発現株の樹立にあたり、細胞表面上の発現レベル容易にするためにN末端にHAエпитープを付加した。「研究方法」の項で記したように、蛍光標識したHAエピトープ

を指標に受容体発現量の高い薬剤耐性細胞をフローサイトメーターで分取した。こうして得られた多クローンの混合細胞を用いれば、単一クローンがたまたま示すかもしれない機能的な異常を観察するリスクを払拭することができる。このような分取を続けて2回行って得られた受容体安定発現細胞での発現レベルをフローサイトメーターで調べたところ、LPA₁の方がLPA₄よりも高いことが判った(図1-1A)。しかしながら、 ^3H

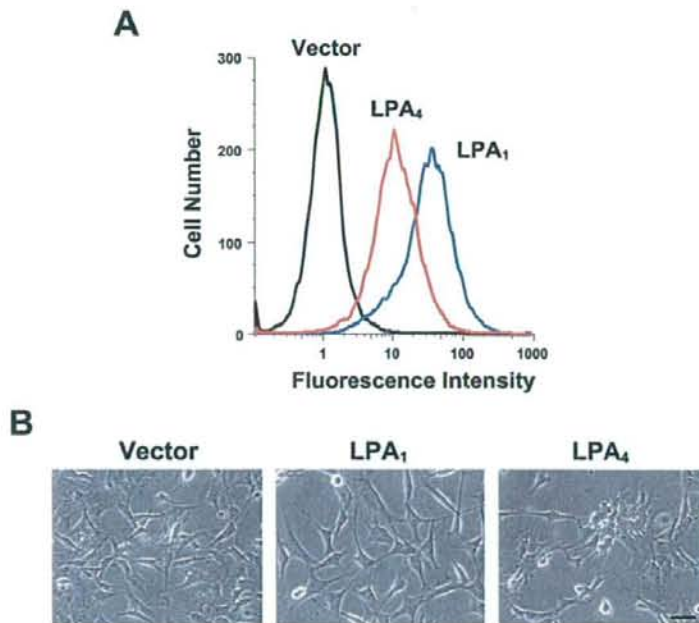


図1-1 LPA₁とLPA₄のB103細胞における安定発現。(A)フローサイトメーター解析。N末にHAエピトープを付加したLPA₁またはLPA₄の発現ベクターをB103細胞にトランスフェクションして受容体を安定発現させた。抗HA抗体とフィコエリスリンで標識した二次抗体を使って細胞を染色し、高いレベルで受容体を発現する細胞をセルソーターで分取した。この分取を二回繰り返して得られた細胞群における受容体発現レベルを示す。空ベクターをトランスフェクションした細胞を陰性対照サンプルとした。

(B)血清存在下におけるB103-vector、B103-LPA₁、B103-LPA₄各細胞の形態。細胞を播種して24時間後に撮影した。黒線は40μmを示す。

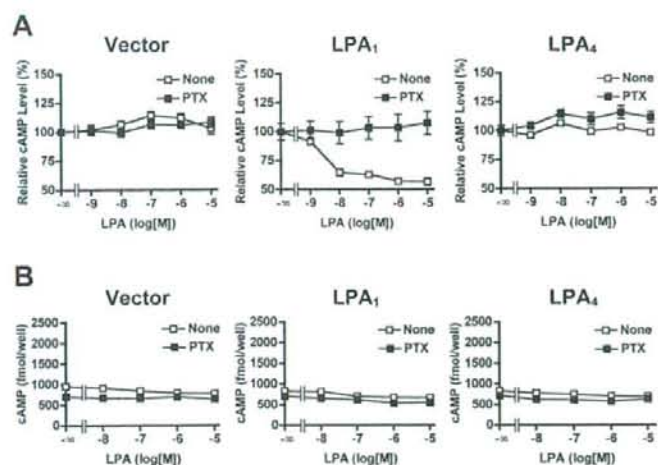


図1-2 LPAがB103-LPA₁とB103-LPA₄細胞のcAMP産生に及ぼす効果。(A) フォルスコリン存在下のcAMP産生レベル。無血清状態で培養した各細胞を0.5 mM IBMXと50 μM フォルスコリン存在下で種々の濃度のLPAで室温において30分間刺激した。細胞を溶解後、溶解液中のcAMP濃度を測定した。LPA非存在下でのcAMP濃度を100%として示した。PTX処理は100 ng/mlで24時間行った。3回行った実験のうち代表的なデータを示す($n=4$)。(B) フォルスコリン非存在下のcAMP産生レベル。無血清状態で培養した各細胞を0.5 mM IBMX存在下で種々の濃度のLPAで室温において30分間刺激した。細胞を溶解後、溶解液中のcAMP濃度を測定した。PTX処理は100 ng/mlで24時間行った。3回行った実験のうち代表的なデータを示す($n=2$)。

ラベルしたLPAをリガンドとした結合アッセイでは最大結合量(B_{max})がB103-LPA₁では0.8 pmol/mgタンパク質でありB103-LPA₄の B_{max} 値(6.0 pmol/mgタンパク質)よりも低かった。この一見した矛盾は、1) 結合アッセイでは形質膜以外に細胞内小器官の膜も含まれている、2) 二つの受容体でHAタグの抗原性に違いがあった、などで説明ができるかもしれない。LPA₁またはLPA₄の安定発現により二次的に他のLPA受容体の発現が促進されていないことは、各安定発現細胞由来のRNAを鋳型にしたRT-PCRで確認した(データ略)。

これら受容体安定発現細胞の増殖速度には変化はなかったが、血清存在下

での形態がそれぞれで独特のものになっていた(図1-1B)。B103-LPA₁細胞はB103-vector細胞よりも扁平で、なおかつ遊走性の形態を示していた。興味深いことに、B103-LPA₄細胞は上皮細胞様の形態を示し、B103-vector細胞よりも細胞どうしでお互いに密着していた。以上のことから、LPA₁とLPA₄はB103細胞に異なった細胞

形態をもたらす独特の細胞内シグナル経路を持つことが示唆された。

LPA₁とLPA₄のアデニル酸シクラーゼ活性への影響

LPA₄の細胞内シグナル経路を明らかにするためにまず、LPA₄が他のLPA受容体(LPA₁₋₃)と同様にアデニル酸シクラーゼ活性を抑制するかについて検討を行った(図1-2A)。アデニル酸シクラーゼをGPCR非依存的に活性化するフォルスコリンで処理したB103-LPA₁細胞では、LPAは濃度依存的にアデニル酸シクラーゼ活性を抑制した(IC_{50} は10 nM以下)。この抑制効果は百日咳毒素(PTX)処理で完全にブロックされたので、 $G_{i/o}$ 型のGタンパク質の関与が示された。しかし

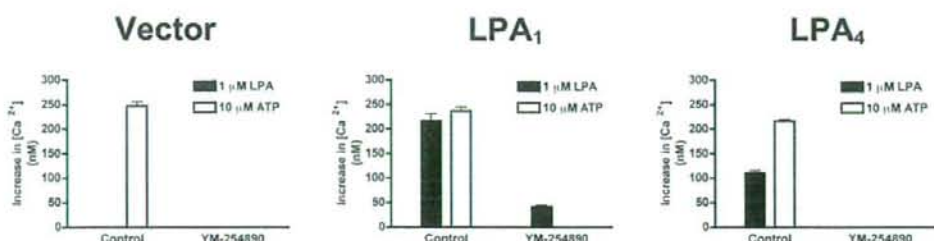


図 1-3 LPA₁ と LPA₄ を介した Ca 反応。(A) 無血清状態で培養した各細胞に 3 μM Fura-2 AM をロードした後、LPA または ATP で刺激した。YM-254890 処理は 5 μM で 10 分間行った。3 回行った実験のうち代表的なデータを示す (n=3)

ながら、B103-vector と B103-LPA₄ 細胞では 10 μM の LPA に対しても cAMP レベルの変化は認められなかった。このことは LPA₄ が G_{1/o} に共役していないことを示唆する。

以前、我々は LPA₄ を発現させた CHO 細胞が、LPA に反応して cAMP レベルを上昇させることを報告した。ところが、B103-LPA₄ 細胞は B103-vector や B103-LPA₁ 細胞と同様に cAMP レベルを上昇させることはなく (図 1-2B)、B103 細胞では LPA₄ と LPA₁ は G_s タンパク質に共役していないことが示唆された。

LPA₁ と LPA₄ の Ca 反応への影響

多くの細胞で LPA は細胞内 Ca 濃度を上昇させることが示されている。実際、LPA₁₋₃ はどれも B103 細胞に発現させたときに Ca 反応を引き起こすことが報告されている。そこで、LPA₄ が B103 細胞で Ca 反応を引き起こすかについて検討した。B103-vector 細胞は 1 μM LPA に応答することはなかったが、B103-LPA₁ と B103-LPA₄ 細胞では細胞内 Ca 濃度の上昇が認められた。LPA はホスホリパーゼ C を介した Ca 反応を誘導するが、これには PTX 感受性 G_{1/o} タンパク質と PTX 非

感受性 G_{q/11} タンパク質を介した経路がある。B103-LPA₁ と B103-LPA₄ 細胞で Ca 反応に至るシグナル経路を調べるために、まず G_{q/11} 特異的阻害剤である YM-254890 で細胞を処理した (図 1-3)。なお、G_{q/11} と共役する P2Y 受容体を介して Ca 反応を引き起こす ATP を陽性対照リガンドとした。B103-LPA₄ 細胞における LPA による Ca 反応と、B103-LPA₁ と B103-LPA₄ 両細胞における ATP による Ca 反応は 5 μM YM-254890 で完全にブロックされた (図 1-3)。一方、B103-LPA₁ 細胞では YM-254890 は部分的にしか Ca 反応をブロックしなかったが (図 1-3)、PTX を同時に作用させると完全にブロックされた (データ略)。YM-254890 の濃度を 20 μM まで上げて B103-LPA₁ 細胞の Ca 反応に対する阻害効果は変わらなかったことから、5 μM の YM-254890 は G_{q/11} を阻害するのに十分な濃度と考えられた。以上の結果から、B103-LPA₁ 細胞では Ca 反応に G_{1/o} と G_{q/11} の両方が関与する一方で、B103-LPA₄ 細胞では G_{q/11} が主に関与することが示唆された。

LPA₁ と LPA₄ の細胞円形化への影響

LPA は成長円錐崩壊、神経突起退縮、細胞円形化などの形態変化を幾つかの神経細胞で引き起こすことが報告されている。特に B103 細胞の円形化においては、マウス LPA₁ と LPA₂ そしてヒト LPA₁ で報告がある。そこで、ヒト LPA₄ の細胞円形化への寄与について検討を行った (図 1-4A と B)。B103 細胞は、LPA₁ または LPA₄ を安定発現させたことにより、LPA 投与前の段階で円形を呈するものの割合が僅かに上昇していた。LPA 刺激 15 分以内に約 80% の B103-LPA₄ 細胞が円形化し、神経突起を退縮させていた。過去の報告と同様に B103-LPA₁ 細胞でも細胞

の円形化が観察されたが、その割合は B103-LPA₄ 細胞のものよりも低かった。B103-vector 細胞では LPA による細胞円形化は認められなかった。

LPA による細胞の円形化には低分子 G タンパク質の一つである Rho の関与があると言われている。そして、G_{12/13} 型の三量体 G タンパク質が Rho を活性化することも知られている。さらに、G_{q/11} が Rho 依存のもしくは非依存の経路で細胞の円形化を引き起こすことも知られている。そこで、どの三量体 G タンパク質とシグナル経路が LPA による細胞円形化に関わるのかを調べるために、細胞を PTX や

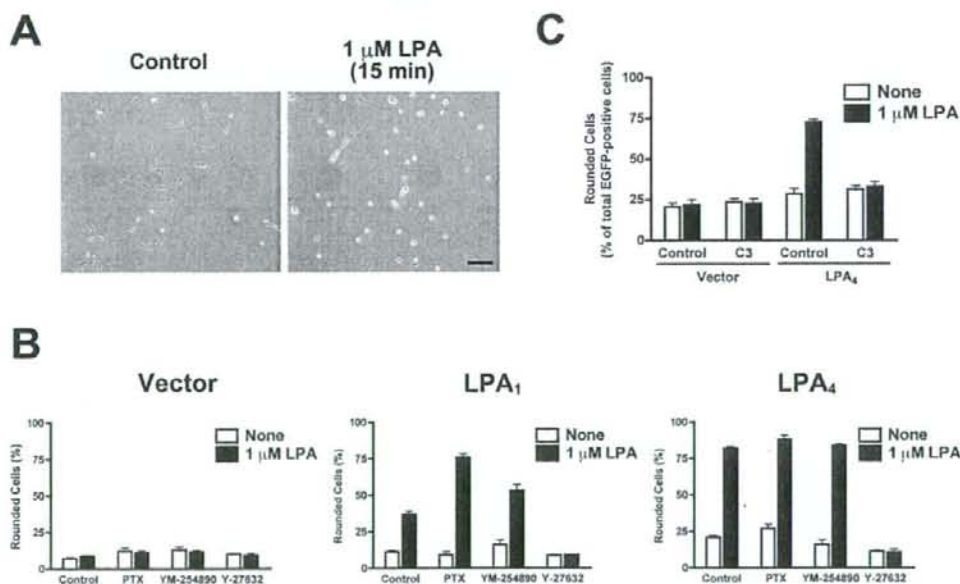
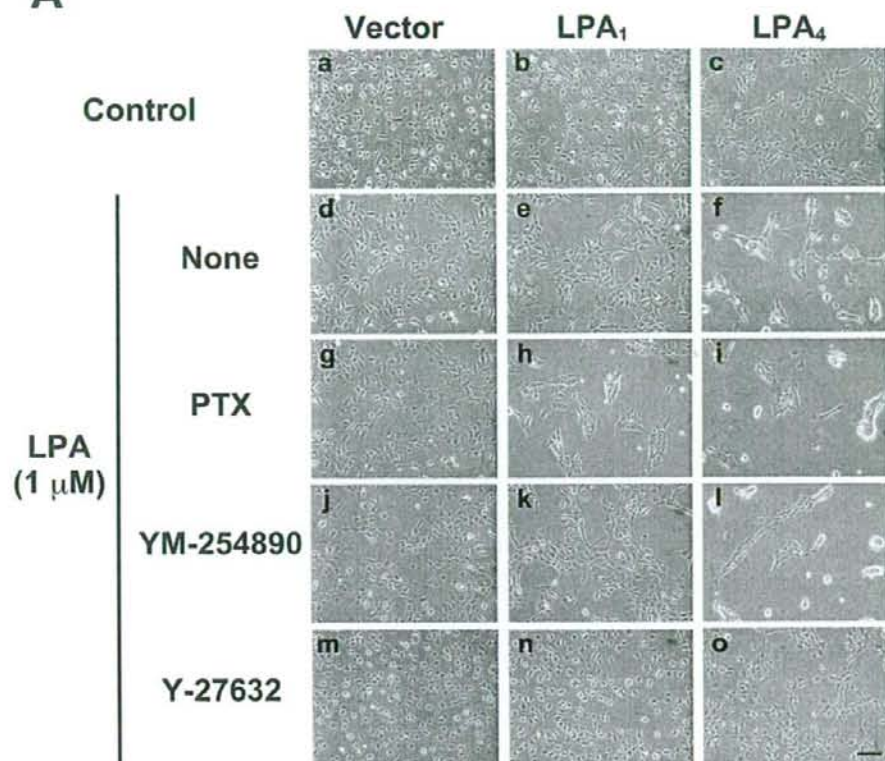


図 1-4 G_{12/13}-Rho-ROCK 経路を介した LPA による B103-LPA₁ と B103-LPA₄ 細胞の円形化。(A) B103-LPA₄ 細胞の円形化の様子。無血清状態で培養した細胞を LPA で刺激した。黒線は 100 μm を示す。(B) PTX、YM-254890、Y-27632 が細胞円形化に及ぼす影響。無血清状態で培養した細胞を 100 ng/ml PTX で 24 時間、または 5 μM YM-254890 で 10 分間、または 5 μM Y-27632 で 10 分間、前処理した。200 個以上の細胞について調べたうちの円形化した細胞の割合を示す (n = 3)。3 回行った実験のうち代表的なデータを示す。(C) C3 細胞外酵素が B103-LPA₄ 細胞の円形化に及ぼす効果。C3 細胞外酵素の発現ベクターまたは空ベクターを EGFP 発現ベクターとともにトランスフェクションした。無血清状態で培養した細胞を 1 μM LPA で 15 分間処理し、固定後に蛍光顕微鏡観察によって EGFP 陽性細胞を同定し、これを C3 細胞外酵素がトランスフェクションされた細胞とした。100 個以上の細胞について調べたうちの円形化した細胞の割合を示す (n = 3)。2 回行った実験のうち代表的なデータを示す。

A



B

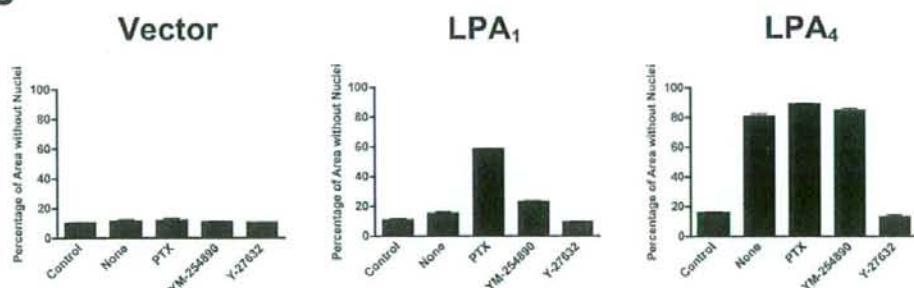


図 1-5 ROCK を介した B103-LPA₄ 細胞の凝集反応。(A) 無血清状態で培養した細胞を LPA で 3 時間刺激する前に、100 ng/ml PTX で 24 時間、または 5 μM YM-254890 で 10 分間、または 5 μM Y-27632 で 10 分間、各細胞を前処理した。黒線は 100 μm を示す。(B) 細胞凝集の定量化。(A) の細胞を固定化後に、核の染色を施した。細胞凝集の程度を示すパラメーターは「研究方法」に記した手順に従って計算し、グラフの縦軸として表した。データは、異なるウェルで観察した 3 視野の値の平均である。2 回行った実験のうち代表的なデータを示す。

YM-254890、そして Rho のエフェクターである ROCK の阻害剤 (Y-27632) で処理した。B103-LPA₄

細胞において、PTX や YM-254890 は LPA による細胞の円形化に影響を及ぼさなかったが、Y-27632 はこの形態

変化を完全に抑制した。Y-27632 は B103-LPA₄ 細胞の円形化反応に対しても同様に抑制効果を示し、また YM-254890 の効果はやはり B103-LPA₄ 細胞と同様に全く認められなかった。興味深いことに、PTX 処理は B103-LPA₄ 細胞の LPA による円形化反応を促進した。この円形化反応における Rho の関与を確認するために、B103-LPA₄ 細胞にボツリヌス菌の C3 細胞外酵素をコードする DNA をトランスフェクションした。C3 細胞外酵素は ADP リボシル化によって Rho を不活性化する作用がある。C3 細胞外酵素 DNA に混ぜておいた EGFP の DNA をマーカーにして、トランスフェクションされた細胞を蛍光顕微鏡で同定した。EGFP 陽性の細胞、すなわち C3 陽性の B103-LPA₄ 細胞は LPA による細胞円形化が起きなくなっていた (図 1-4C)。

LPA の ROCK 依存的細胞凝集作用

上述したように、血清存在下で B103-LPA₄ 細胞は B103-vector 細胞と比べてより凝集して増殖していた (図 1-1B)。LPA₄ が LPA に反応することが B103 細胞の細胞間接着を促すのかを検討するために、無血清状態で 24 時間培養した B103-LPA₄ 細胞を 1 μ M LPA で刺激をした。この実験では、播種した細胞の密度を細胞円形化実験のときよりも高くしたため、個々の細胞の円形化は観察できない代わりに細胞の凝集化が観察できるようになっている (図 1-5A-f)。B103-LPA₄ 細胞は一過性に凝集した。その程度は LPA 刺激後 2-3 時間で最大に達し、24 時間

後には細胞形態は元に戻るという過程を辿った (データ略)。

細胞凝集に関わる LPA₄ 受容体のシグナル経路を明らかにするために、B103-LPA₄ 細胞を幾つかの阻害剤で処理した。LPA による B103-LPA₄ 細胞の形態変化は Y-27632 で完全に抑制された (図 1-5A-o)。これとは対照的に、PTX や YM-254890 では細胞凝集は抑えることができなかった (図 1-5A-i と-l)。この細胞凝集の結果を「研究方法」の項に示した手順で定量化し、図 1-5B に示した。以上の結果、B103-LPA₄ 細胞において Rho は、G_{i/o} と G_{q/11} 非依存的に LPA による細胞凝集に関わることが示唆された。Rho は、アクチン骨格の再構成を介して細胞間接着を調節することが知られている。上記の LPA による細胞凝集現象にアクチン骨格の再構成が関わるかを検討するために、B103-LPA₄ 細胞をアクチン重合化阻害剤であるサイトカラシン D で処理をした。その結果、LPA による細胞の形態変化は起こらなくなった (データ略)。したがって、LPA による細胞凝集反応にはアクチンの再構成が必要であることが示された。B103-LPA₄ 細胞と同様に、PTX で処理をした B103-LPA₄ 細胞も LPA 処理後に凝集した (図 1-5A-h)。

LPA₄ を介した N-カドヘリン依存性細胞間接着

LPA で B103-LPA₄ 細胞を刺激して形成された細胞凝集物は、ピペッティングをしてもほとんどほぐれなかった (データ略)。細胞間接着は Ca 依存性のものと非依存性のものがあるが、カ

ドヘリンは前者の主要な責任分子である。カドヘリン依存性接着は元来、Ca存在下でトリプシン耐性であり、かつCa非存在下でトリプシン感受性であると定義されている。そこで、カドヘリン活性を測るための細胞間接着アッセイの一つである「細胞分散アッセイ」を行うことによって、LPAによる細胞間接着がカドヘリン依存性なのかについて検討を行うこととした。そのために、「研究方法」で記した手順に従って、Ca存在下でトリプシン処理したときの細胞塊の数(TC)とEDTA存在下でトリプシン処理したときの細胞塊の数(TE)を求め、両者の比(TC/TE)を算出した。どちらの処理でもまず大きな細胞凝集塊が生じ、これをピペティングでほぐすと細胞塊の数自体は増える。カドヘリン依存性細胞間接着はCa/トリプシン処理後も維持されるが、EDTA/トリプシン処理によって細胞間接着はほぼ完全に崩壊することから、TC/TE比はカドヘリン依存性細胞間接着の程度に逆比例するパラメーターとして捉えることができる。LPA刺激後にB103-LPA₄細胞のカドヘリン依存性細胞間接着の程度は上昇した(図1-6A)。B103-vectorとB103-LPA₁細胞ではLPA刺激による変化は認められなかった。なお、LPA刺激する前の段階から、B103-LPA₄細胞の凝集の程度は他の細胞に比べ亢進していた。

カドヘリンにはクラシックカドヘリン、デスモソーマルカドヘリン、プロトカドヘリン、種々のカドヘリン様タンパク質などがあり、大きなスーパーファミリーを構成している。神経系

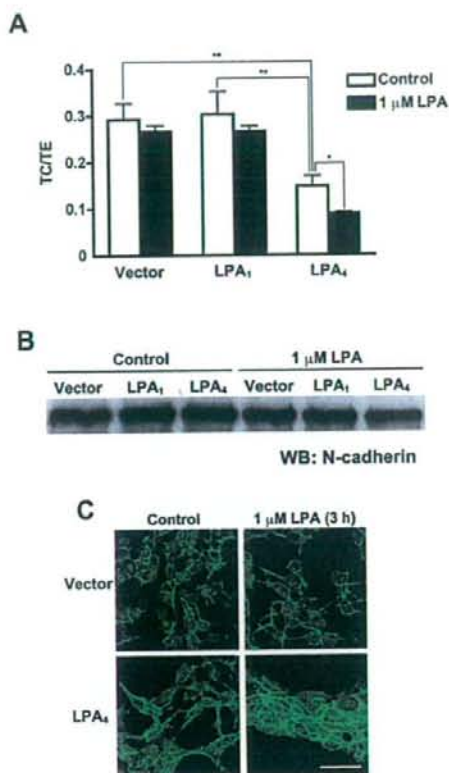


図1-6 B103-LPA₄細胞で顕著なN-カドヘリン依存性細胞接着。(A)細胞間接着のCa依存性。無血清状態で培養した細胞をLPAで2時間刺激し、2 mM CaCl₂(TC処理)またはEDTA(TE処理)を含むHBSSで細胞を洗浄した。引き続き、0.01%トリプシンを加えて37°Cにおいて30分間処理した。穏やかに10回ピペティングして細胞塊を解離させ、小さくなった細胞塊の数を細胞カウンターで数えた。細胞間接着程度はTC/TE比で表した(このパラメーターはカドヘリン活性と逆相関していることに注意)。5回の実験の平均値を示す。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$ 。(B) B103細胞におけるN-カドヘリンの発現。無血清状態で培養した細胞をLPAで3時間刺激し、溶解した。同じ量のタンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開し、ウェスタンブロットングでN-カドヘリンを検出した。(C) B103-vectorとB103-LPA₄細胞におけるN-カドヘリンの免疫染色。無血清状態で培養した細胞をLPAで刺激し、固定後に抗N-カドヘリン抗体とフルオレセイン標識された二次抗体で染色した。灰色の線は100 μmを示す。

で発現するとされる二つのクラシックカドヘリン、すなわちN-カドヘリン

と E-カドヘリンの発現レベルをウェスタンブロットングで調べた。B103 細胞では過去の報告通り、N-カドヘリンが豊富に発現していたが(図 1-6B)、E-カドヘリンの発現は検出できなかった(データ略)。LPA 処理による N-カドヘリンの発現レベルの変化はなかった。Ca/トリプシン処理後の N-カドヘリンはウェスタンブロットングで見える限り無傷であったが、EDTA/トリプシン処理したときは完全に切断されていることが観察された(データ略)。LPA で刺激後の B103-LPA₄ 細胞では、細胞間接着面に N-カドヘリンの集積が太く明るいバンドとして認められた(図 1-6C)。B103-vector 細胞ではこのような変化は認められなかった。

1-D. 考察

過去の多くの研究で、Rho-ROCK 経路を介して LPA が神経細胞に形態変化を引き起こすことが示されてきた。この現象の責任受容体としては、LPA₁ と LPA₂ が報告されている。最近我々は、p2y₉/GPR23 が第 4 番目の LPA 受容体であること、そしてこの分子が一次構造上 EDG ファミリーの LPA 受容体には属さないことを報告した。LPA₄ が神経細胞に発現することは、この分子が神経系において重要な役割を持つことを示唆する。本研究では、LPA₄ が B103 神経細胞に円形化や N-カドヘリン依存的な凝集化などの形態変化をもたらすことを明らかにした。しかもこれらの形態変化が Rho-ROCK 経路を介していることも併せて明らかにした。

Ca 反応とアデニル酸シクラーゼ活性抑制反応は、LPA がもたらす細胞応答の主なものである。実際、B103 神経細胞に発現した EDG ファミリーの 3 つの LPA 受容体が、これら 2 つの細胞応答を惹起することが報告されている。LPA₁ は Ca 反応を G_{q/11} を介して惹起しているようである(図 1-3)。アデニル酸シクラーゼ活性抑制反応が PTX 感受性であることは(図 1-2A)、LPA₁ が G_{i/o} にも共役していることを示唆している。今回、LPA₄ が B103 細胞で Ca 反応を惹起することを示したが、この結果は以前に我々が LPA₄ を安定発現した CHO 細胞で観察した LPA による Ca 反応と矛盾しない。YM-254890 を使った今回の結果から、LPA₄ はおそらく G_{q/11} を介して Ca 反応を惹起すると考えられる。しかしながら、B103-LPA₄ 細胞では LPA はアデニル酸シクラーゼ活性を抑制しなかった。(図 1-2A) ゆえに、他の LPA 受容体と違い、LPA₄ はこの細胞において G_{i/o} には共役していないらしい。

神経突起の退縮と進展は、神経ガイダンス時の神経細胞のリモデリングやシナプスの可塑性のために重要である。神経突起の退縮は、セマフォリンやネトリン、エフリンに加え、LPA やスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)を含むリゾリン脂質によってももたらされる。B103 細胞に発現した LPA₁ と LPA₂ は LPA 刺激を細胞内に伝え、神経突起の退縮によって細胞を円形化させることが明らかになっている。そして本研究では、LPA₄ が B103 細胞を円形化させることを示した(図 1-4A)。Sugiura らは、ラットの脳が 1 g あたり 3.73

nmol の LPA を含むことを報告している。以上のことは、LPA による神経突起の退縮に LPA₄ が関与する可能性を示している。神経突起の形成にはアクチン骨格の再構成が必要であり、その調節因子としての Rho の影響は大きい。例えば、S1P は S1P₂、S1P₃、S1P₅ 受容体を介して Rho 依存的な神経突起の退縮を引き起こすことが知られている。幾つかの研究で、LPA による神経突起の退縮に Rho と ROCK の重要な役割が明らかにされている。C3 細胞外酵素と Y-27632 を用いた本研究で明らかになったように、LPA₄ による B103 細胞の円形化反応も Rho と ROCK に依存していた(図 1-4B と C)。

一般的に G_{12/13} の活性化は Rho や ROCK の活性化とアクチン重合を伴う。G_{q/11} もまた Rho を活性化する報告もあるが、Y-27632 が B103-LPA₁ 及び B103-LPA₄ 細胞の円形化反応を完全に抑制したという本研究の結果は、この細胞において LPA₁ と LPA₄ から Rho の活性化に至る経路には主に G_{12/13} が介在しているように思われる。LPA による神経突起の退縮現象は多くの論文で扱われているが、責任受容体に言及したものはなく、mRNA の発現をもとに LPA₁ や LPA₂ が候補受容体として示唆されているにとどまっている。本研究は、過去の論文で観察されていた LPA 関連現象の幾つかに LPA₄ が介在する可能性を示唆している。

LPA は細胞運動を刺激し、また癌細胞の浸潤を調節することが示されているが、両者には主に LPA₁ と G_{1/6} が介在している。血清存在下において、

B103-LPA₁ 細胞は扁平な形態をしており、ディッシュ全体にあまねく分散していた(図 1-1B)。この形態学的特徴は、おそらく LPA₁-G_{1/6}-Rac シグナル経路を介した LPA の作用によるものであろう。B103-LPA₁ 細胞とは対照的に、B103-LPA₄ 細胞は血清存在下で凝集していた(図 1-1B)。こちらには G_{12/13}-Rho-ROCK シグナル経路が介在しているように思われる(図 1-5)。この細胞間接着には *de novo* 合成を伴わない N-カドヘリンの関与があった(図 1-6)。Rho はアクチン骨格の再構成を促すので、LPA で誘発される細胞骨格の変化が図 1-6 で示すように N-カドヘリンの細胞内局在に影響を与えていると考えられる。その結果、強い細胞間接着を B103-LPA₄ 細胞にもたらしめているのであろう。Y-27632 やサイトカラシン D で処理した細胞では LPA による細胞凝集が消失していること(図 1-5 と一部データ略)は、この考えに矛盾しない。N-カドヘリンは神経系細胞に広く発現しており、シナプス形成やミエリン化を含む神経の発生や機能発現に重要な分子である。Weiner らは以前、ラットのシュワン細胞において N-カドヘリンを含む細胞間結合が LPA によって生じることを報告している。さらに LPA は、ラット胎児由来海馬の神経前駆細胞や分裂終了したマウス大脳皮質神経細胞に対して凝集反応を引き起こすことも報告されている。本研究で得られた結果は、LPA₁ や LPA₂ に加え LPA₄ もまた、LPA が上述したような薬理作用を神経細胞へ及ぼす際の責任受容体である可能性を高めている。Rac や G_{1/6} を活性化す

る LPA₁ や LPA₂ とは対照的に、LPA₄ は G_{1/0}-Rac 経路を活性化することはないようであるので (図 1-3A)、神経の発生や機能発現に重要とされる Rho と Rac の活性化の適切なバランスを維持するのに独特の役割を果たす受容体なのかもしれない。

PTX は LPA₁ を介した細胞円形化反応を促進した (図 1-4B)。以前の報告でも、LPA が 1321N アストロサイトーマ細胞を円形化させる反応を PTX はやはり促進している。Rho の活性が G_{1/0} を介した Rac の活性化によって阻害されることが知られている。実際、上述の 1321N アストロサイトーマ細胞でも Rho を介した神経突起退縮が Rac によって抑制されている。B103 細胞やマウス胎児髄膜線維芽細胞、マウス皮膚線維芽細胞などにおいて、LPA₁ は G_{1/0} と共役し、Rac を強く活性化することが報告されている。以上をまとめると、B103-LPA₁ 細胞を PTX で処理すると LPA 刺激時の G_{1/0} の活性化、さらには Rac の活性化は抑制され、結果的に Rho を介した細胞円形化反応を亢進するに至ると考えられる。LPA による B103-LPA₁ 細胞の凝集を PTX 処理が亢進する現象 (図 1-5A-h と B) も、おそらくこの機構によって説明できるであろう。

LPA₄ が Rho 依存的な細胞の形態変化をもたらすことを本研究で示した。LPA による Rho の活性化には LPA₁ と LPA₂ を介する過去の報告がある。しかしながら、LPA₁ と LPA₂ に依存しない経路も提唱されている。Contos らは、LPA₁ と LPA₂ の両方を欠損したマウスに由来する胎児髄膜線維芽細胞

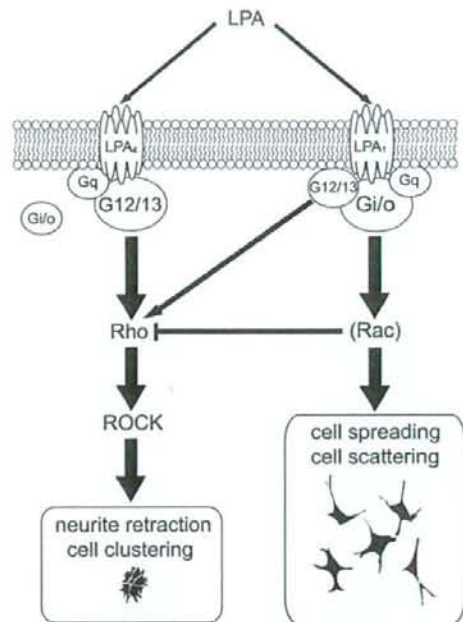


図 1-7 B103 細胞に異なる形態をもたらす LPA₁ と LPA₄ の独特な細胞内シグナル経路。LPA₄ の発現は G_{12/13}-Rho-ROCK 経路を介して細胞を円形化及び凝集化させる。これとは対照的に、LPA₁ の発現は細胞を扁平化及び分散化させる。PTX 処理で G_{1/0} の活性を阻害した LPA₁ 発現細胞は、LPA₄ 発現細胞のように凝集化する。このことはおそらく G_{1/0}-Rac 経路を介した Rho の活性化抑制機構の存在を反映したものであろう。LPA₁ と LPA₄ はともに G_q と共役しているが、このシグナル経路は細胞形態には影響を与えない。

が LPA に反応してストレスファイバー形成することを示している。この細胞は LPA₃ mRNA を発現していないので、未知の LPA 受容体が存在する可能性を示している。さらにこの可能性を支持するのは、LPA₁ と LPA₂ の両方を欠損したマウスに由来する皮膚線維芽細胞が LPA に反応して Rho を活性化することを示した Hama らの報告である。マウス皮膚線維芽細胞に LPA₄ が高発現することと本研究結果を併せて考えると、この細胞では LPA₄ も LPA による Rho の活性化に関わって

いるのかもしれない。さらに、HamaらはLPAによるRacの活性化が完全にLPA₁とLPA₂に依存することを観察しており、このことは本研究の結果から導かれた「LPA₄がG_{1/o}-Racシグナル経路を活性化しない」という仮説を支持する。

LPA₁またはLPA₄を安定発現したB103細胞ではLPA刺激前から円形化した細胞の割合がわずかに上昇していた(図1-4B)。さらに、無血清培養したB103-LPA₄細胞は、B103-vectorやB103-LPA₁細胞よりもお互いにより強く接着していた(図1-6A)。これら細胞形態学的効果はLPA受容体の構成的活性化によるものかもしれない。実際、リゾリン脂質やプロスタノイドなどの脂質メディエーターGPCRが構成的に活性化されていて発現細胞に形態変化を及ぼす報告が幾つもある。例えば、プロスタグランジンF_{2α}受容体のアイソフォームであるFP_Bをトランスフェクションしたヒト胎児腎臓HEK293細胞において、リガンド非存在下で細胞円形化やカドヘリン依存性細胞間接着が観察されている。なお、この構成的活性化にホスファチジルイノシトール-3-キナーゼとβ-カテニン

が関わることを提唱されている。無血清状態でのB103-LPA₁やB103-LPA₄細胞で観察された円形反応の亢進は、細胞が産生したLPAがオートクリンに自らの発現する受容体に作用したことに起因する可能性も考えられる。以上2つの仮説は、Y-27632で細胞を処理すると、円形化した細胞の割合が減少することと矛盾しない(図1-4B)。

1-E. 結論

本研究では図1-7に示すように、新規LPA受容体LPA₄がラット神経細胞株においてRhoの活性化に寄与することをはじめて示した。LPA₄を介したRhoの活性化は、細胞の円形化や凝集などの形態変化を引き起こした。LPAは神経細胞に対して神経突起の退縮や細胞塊の形成を誘導することがよく知られている。LPA₄のエフェクターとしてRhoが同定されたことは、EDGファミリーのLPA受容体では説明が付かないLPAの薬理作用の幾つかについて、新たな解釈を与えてくれるであろう。神経系における内在性LPA₄の機能についてより理解を深めるには、さらなる研究が必要である。

2) 新規リゾホスファチジン酸受容体p2y₅の同定と機能解析

2-A. 研究目的

7回の膜貫通部位を持つGタンパク質共役型受容体(GPCR)は哺乳動物では数百種類存在し、タンパク質の中で最大のスーパーファミリーを形成している。細胞膜上に存在して多彩な細

胞内シグナルを惹起するGPCRは、匂いやフェロモン、味、光など外来刺激に反応するものと、脂質やペプチド、アミン、核酸など生体の代謝産物(天然リガンド)に反応するものに大別される。後者のGPCRはヒトの生理現象

や病態に重要な役割を果たしていると考えられている。事実、現在販売されている薬の多くは天然リガンドに反応するGPCRをターゲットとしており、その割合は30%とも50%とも言われている。

ヒトゲノム解析の結果から100を超えるリガンド不明のGPCR、いわゆるオーファンGPCRの存在が明らかになった(図2-1参照)。そこで、生理活性脂質を長年研究してきた我々は、一部のオーファンGPCRは脂質を認識する可能性が高いのではないかと考えた。オーファンGPCRの脂質リガンドを見つける(脱オーファン化)研究は、脂質が関与する生理機能や疾患を理解することに加え、新規薬剤の開発を介して疾患治療にも役立つ可能性を持って

いる点で意義深い。我々はこの作業仮説に基づき研究を進め、上述したように、2003年にオーファンGPCRの一つであるp2y₉/LPA₄をリゾホスファチジン酸(LPA: 図2-2)に対する第4番目の受容体として同定することができた。

LPAは多彩な生理機能(細胞増殖促進、細胞死抑制、細胞遊走促進、神経突起退縮等)を発揮する脂質メディエーターであるが、複数存在するとされる受容体の全貌は当時も今も明らかになっていない。p2y₉/LPA₄と最も高い相同性(56%)を示すオーファンGPCRであるp2y₅(図2-1参照)については、細胞内シグナル伝達の観察(Ca応答とアデニル酸シクラーゼの活性変化)やLPA結合実験の結果などからLPAの受容体である可能性は低いと我々は考え

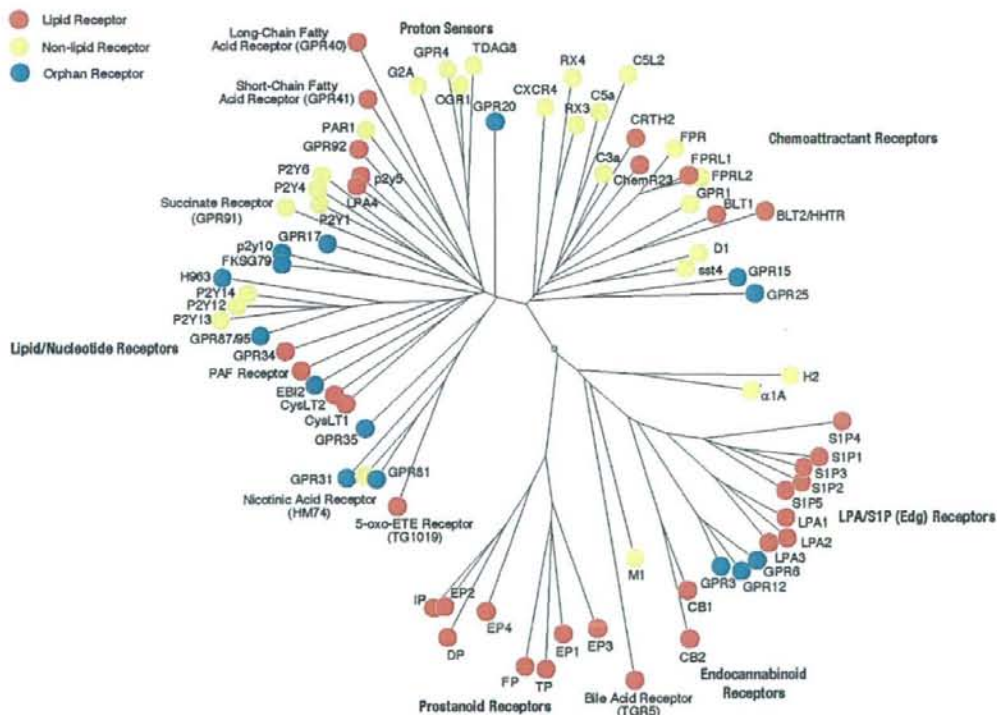


図 2-1 種々のヒト GPCR のアミノ酸配列をもとに構築した系統樹。任意の2つの受容体を結ぶ線の長さの総和が小さい程、お互いは近縁でアミノ酸相同性が高い。リガンドが同じまたは類似の化学構造をもつ GPCR どうし、また機能が類似する GPCR どうしはこの系統樹上で集まる傾向がある。

ていた。しかしながら、その後の検討により p2y₅ が他の LPA 受容体に比べて例外的な性質を有する LPA 受容体であること、すなわち Ca 応答やアデニル酸シクラーゼの活性に作用を及ぼさず、また LPA に対する親和性が低い受容体であることを突きとめたのでここに報告する。

2-B. 研究方法

p2y₅ 安定発現細胞株の樹立

ヒト p2y₅ 遺伝子のオープンリーディングフレーム内にはイントロンが存在しない。そこでヒトゲノム DNA を鋳型とした入れ子 PCR により、p2y₅ をコードする DNA をクローニングした。この際、N 末端に 9 アミノ酸より成る HA エピトープタグを付加した。このクローンを、強力な mRNA 発現を可能にする CAG プロモーターとネオマイシン耐性遺伝子を持つ発現用プラスミドベクター (pCXN2.1) に挿入し、ラット神経芽細胞腫由来の B103 細胞とラット肝細胞由来の RH7777 細胞にトランスフェクションした。その後、1 mg/ml の G418 で薬剤選択をかけ、トランスフェクションの 20 日後に G418 耐性細胞群を得た。GPCR は 7 回膜貫通型構造をとっており、その N 末端は空間配置的には細胞膜の外側に位置する。従って、HA エピトープタグが細胞膜表面に多く検出される細胞株は、受容体を高発現していると考えられる。

この理論に基づき、この G418 耐性細胞株群について抗 HA 抗体 (3F10; Roche 社) で蛍光染色して蛍光強度の強い細胞を選択的に、ポリクローナルな状態で p2y₅ の安定高発現細胞群を分取した。この分取には、抗体磁気ビーズを利用した Miltenyi 社の autoMACS システムを用いた。この細胞群はモノクローナルな細胞と比べ、細胞機能に偏りがないと考えられるので、導入した p2y₅ の機能を観察するのに適している。N 末に HA タグを付加したヒト LPA₁ と LPA₃ をコードする DNA は、オープンリーディングフレーム内にイントロンが存在するため、ゲノム DNA ではなく cDNA を鋳型に上記と同様の方法でクローニングした。これらの DNA を pCXN2.1 に組み込み、受容体の安定発現細胞株を樹立した。

LPA 受容体の一過性発現と膜画分調製

コラーゲンでコートした 10 cm ディッシュに RH7777 細胞 (4 × 10⁴ 個) を播種し、リポフェクトアミン 2000 (Invitrogen 社) を用いて LPA 受容体発現プラスミドをトランスフェクションした。0.1% BSA を含む無血清 DMEM 培地で 24 時間培養した後に PBS で細胞を 2 回洗い、細胞をディッシュから剥がし取った。さらに細胞を結合バッファー (25 mM

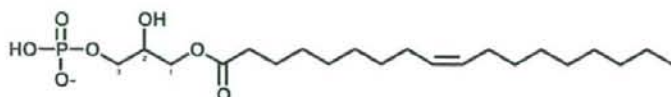


図 2-2 LPA の化学構造。LPA は 3 価のアルコールであるグリセロールに脂肪酸が sn-1 位または sn-2 位に、そしてリン酸が sn-3 位に結合したリン脂質の総称である。この図では sn-1 位にオレイン酸が結合した 1-オレイル LPA を示したが、断りのない限り以降の実験ではこの LPA を用いた。

HEPES-NaOH [pH 7.4], 10 mM MgCl₂, 0.25 M シュークロース) で洗浄し、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Complete; Roche 社) を加えた結合バッファーで懸濁してソニケーションによって細胞を破碎した。4℃において 8000 × *g* で 60 分間の遠心によって得られた上清を、さらに 4℃において 100,000 × *g* で 60 分間遠心して膜画分沈殿を得た。これを氷冷した結合バッファーでホモゲナイズし、タンパク濃度を決定後に実験に供した。

放射性リガンド結合実験

上記の方法で調製した 20 μg の膜画分タンパク質を 1-オレオイル [³H]-LPA (57 Ci/mmol; PerkinElmer 社) とともに、0.25% BSA を含む結合バッファー中で 4℃において 70 分間インキュベートした (計 200 μl)。膜に結合した [³H]-LPA は Unifilter-96-GF/C (PerkinElmer 社) でろ過して吸着させ、非結合状態のものとは分離した。GF/C フィルターはその後、氷冷した結合バッファーで 10 回リンスした。GF/C フィルターを 50℃で 12 時間乾燥させ、25 μl の MicroScint-0 シンチレーターカクテル (PerkinElmer 社) の存在下で、フィルター上の放射能を TopCount マイクロプレートシンチレーションカウンター (PerkinElmer 社) で測定した。非特異的結合は、10 μM の非放射ラベル化 1-オレオイル LPA の存在下での値とした。

[³⁵S]-GTPγS 結合実験

上記の方法で調製した 5 μg の膜画

分タンパク質を、0.5 nM [³⁵S]-GTPγS と種々の濃度の 1-オレオイル LPA (Avanti 社) とともに GTPγS 結合バッファー (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.3 μM GDP, 0.1% BSA) 中で 30℃において 30 分間インキュベートした (計 100 μl)。膜に結合した [³⁵S]-GTPγS は Unifilter-96-GF/C (PerkinElmer 社) でろ過して吸着させ、非結合状態のものとは分離した。GF/C フィルターはその後、氷冷した TMN バッファー (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 25 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) で 10 回リンスした。GF/C フィルター上の放射能は上記と同様の方法で測定した。

G_s/G₁₃ キメラタンパク質発現プラスミドの構築

ヒト G_s タンパク質をコードする cDNA を鋳型にして C 末のアミノ酸 5 残基 (QYELL) を G₁₃ のもの (QLMLQ) へと、PCR による変位導入法により置換した。用いたプライマーは以下の通りである：センスプライマー、5'-ATTAATACGACTCACTATAGG-3'; アンチセンスプライマー、5'-GGTCTAGATTACTGTAGCATAA GCTGACGAAGGTGCATGCGCTGA A-3'。得られた DNA を KpnI と XbaI で切断し、pcDNA3.1 ベクターに挿入した。そこから G_s/G₁₃ をコードする DNA を含む NheI-XbaI 断片を切り出し、pRL-CMV ベクター (Promega 社) の *Renilla* ルシフェラーゼをコードする DNA と置き換えた。

cAMP 濃度の測定

コラーゲンでコートした 96 ウェルプレートに細胞 (4×10^4 個) を播種し、100 ng/ml の百日咳毒素 (PTX) 含有または非含有無血清培地で 12 時間培養した。バッファー A (25 mM HEPES-NaOH [pH 7.4] と 0.1% BSA を含む HBSS) で二回洗い、0.5 mM IBMX を含む 100 μ l のバッファー A で常温において 20 分間処理した。その後、10 μ M フォルスコリンの存在下で細胞を種々の濃度の LPA で常温において 30 分間刺激し、反応を停止するために終濃度 0.625% Tween 20 を加えた。4°C で一晩静置した後、上清に含まれる cAMP 濃度を PerkinElmer 社の AlphaScreen cAMP Functional Assay Kit と Fusion システムで検出した。

LPA によって誘導されるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の形態変化の計測

Roche 社の xCELLigence システムを用いて、LPA によって誘導される HUVEC の細胞形態変化を、"Cell Index" を計測することで定量的に捉えた。Cell Index は E-プレート上に設けられた電極間の抵抗に相当するパラメーターであり、電極間で培養される細胞の接着や形態の変化に応じてこのパラメーターも変化する。

E-プレートと呼ばれる専用の 96 穴プレートをポリ-D-リジンでコートし、HUVEC を 8000 個ずつ播種した。Endothelial cell growth medium (Cell Applications 社) 中で 12 時間の培養の後、培地を 0.1% BSA を含む

Endothelial cell basal medium (Cell Applications 社) に交換し、細胞を血清飢餓状態で 4 時間培養した。LPA 刺激後は 15 秒毎に Cell Index を測定し続けた。siRNA を用いた実験では、コラーゲンコートした 12 穴プレートに HUVEC を播種し、5 nM のヒト p2y₅ siRNA (Silencer Select siRNA: s19796 と s1978) またはコントロール siRNA (Silencer Select negative control 1) をリポフェクトアミン RNAiMAX (Invitrogen 社) でトランスフェクションした。24 時間の培養後、8000 個の細胞をポリ-D-リジンでコートした E-プレートに播種し直し、上記と同様の実験に供した。

定量的 PCR

siRNA をトランスフェクションした実験において、LPA₁、p2y₅、 β -アクトチンの mRNA 発現レベルを、Roche 社の LightCycler システムを用いて定量した。

siRNA をトランスフェクションした細胞から抽出した RNA を鋳型に逆転写した cDNA を 2 μ l に 1 \times FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche 社) と 0.5 μ M のセンス及びアンチセンスプライマーを加え計 20 μ l とした。PCR 反応は以下の通りである: 95°C · 3 分 (1 サイクル) \rightarrow 95°C · 15 秒 / 65°C · 5 秒 / 72°C · 7 秒 (45 サイクル)。LPA₁ 用のプライマー配列は: センスプライマー, 5'-GGCTATGTTCCGCCAGAGGACT AT-3'; アンチセンスプライマー, 5'-TCCAGGAGTCCAGCAGATGAT AA-3' であり、135 bp の DNA 断片が

増幅された。p2y₅用のプライマー配列は：センスプライマー，5'-GGTAAGCGTTAACAGCTCCCACT-3'；アンチセンスプライマー，5'-TTTGAGGACGCAGATGAAAATGT-3'であり，139 bp の DNA 断片が増幅された。β-アクチン用のプライマー配列は：センスプライマー，5'-CAGGATGCAGAAGGAGATCAC TG-3'；アンチセンスプライマー，5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3'であり，153 bp の DNA 断片が増幅された。各サンプル中の cDNA レベルは，LightCycler 解析ソフトウェアでの"Fit Point Method"により定量した。

統計解析

図中のすべての値は平均±標準誤差で示した。統計学的な有意さは，t 検定または分散分析で値を比較することによって判定した。p<0.05 のときを「有意差有り」と判定した。

(倫理面への配慮)

すべて試験管内における研究であり，またヒトのサンプルは研究者本人のもの若しくは試薬として購入したものであり，倫理的問題発生しないと判断し特別な措置は講じていない。

2-C. 研究結果

LPA による B103-p2y₅ 細胞の神経突起退縮と RH7777-p2y₅ 細胞の膜小疱形成

p2y₅ を安定発現する B103 細

胞と RH7777 細胞（それぞれ B103-p2y₅ 細胞、RH7777-p2y₅ 細胞と命名）のそれぞれに対して約 200 種類の脂質分子を作用させ、細胞に及ぶ変化を観察した。具体的には、細胞内カルシウムや細胞内サイクリック AMP (cAMP) という GPCR の活性化に伴って濃度が変化するセカンドメッセンジャーに加え、細胞形態も変化の指標とした。その結果、リゾホスファチジン酸(LPA：図 2-2)が神経突起の退縮と細胞膜上に小疱形成を B103-p2y₅ 細胞と RH7777-p2y₅ 細胞に引き起こすことが明らかとなった

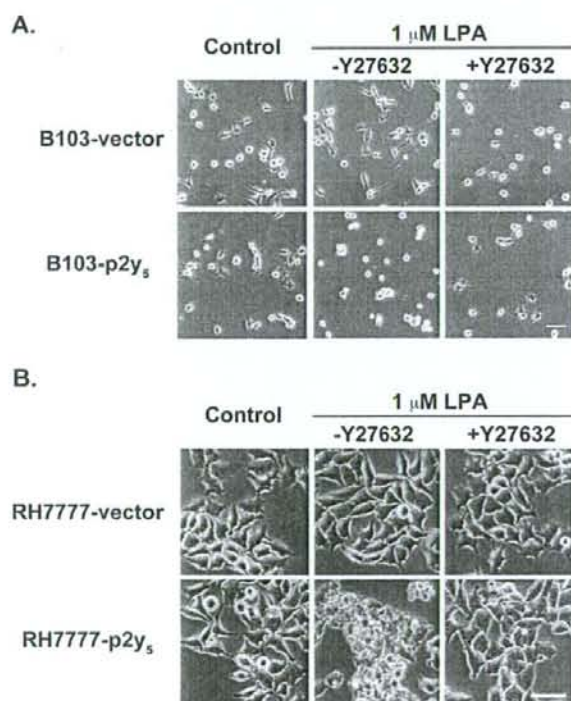


図 2-3 LPA による B103 細胞の神経突起退縮と RH7777 細胞の小疱形成。A. p2y₅ 安定発現 B103 細胞を血清飢餓条件で 12 時間培養した後に，1 μM LPA で 15 分間刺激した。2%パラホルムアルデヒドで固定した細胞を写真撮影した。Rho キナーゼを阻害した実験では，5 μM Y27632 で予め 10 分間処理した。横向きのパールは 50 μm を表す。B. p2y₅ 安定発現 RH7777 細胞を A と同じ実験条件で処理した。横向きのパールは 50 μm を表す。

(図 2-3)。LPA が p2y₅ を介して引き起こす細胞形態変化は、Rho キナーゼ阻害剤である Y27632 の前処理によってほぼ抑制できたことから (図 2-3)、低分子量 G タンパク質の一種である Rho が関与する現象であると考えられた。なお、LPA はどの細胞に対しても細胞内カルシウムや cAMP 濃度に影響を及ぼさなかった。

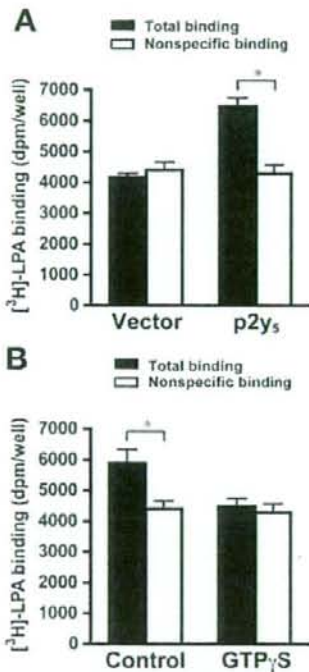


図 2-4 RH7777-p2y₅ 細胞膜画分への LPA の結合。A. RH7777-p2y₅ 細胞と RH7777-Vector 細胞由来の細胞膜画分へのトリチウムラベル化 1-オレオイル LPA の結合。30 nM の [³H]-1-オレオイル LPA を膜画分と 4°C で 70 分間インキュベートした。反応液をガラスフィルターでろ過し、洗浄した後にフィルターに吸着している放射能を計測した (総結合)。非特異的結合を検出するために 10 μM のトリチウムラベルしていない 1-オレオイル LPA を共存させた実験も平行して行った。「特異的結合」とは「総結合」から「非特異的結合」を差し引いた値を指す。n = 3, *P < 0.05 (t検定)。B. GTPγS への感受性。100 μM の GTPγS で 30 分間処理した RH7777-p2y₅ 細胞由来の膜画分を A. と同じ条件で [³H]-1-オレオイル LPA への結合実験を行い、特異的結合を観察した。n = 3, *P < 0.05 (t検定)。

RH7777-p2y₅ 細胞膜画分への LPA の結合

以前の我々の検討では、p2y₅ を一過性に発現した RH7777 細胞の膜画分には、LPA を特異的に結合する活性は認められなかった (データ略)。本研究では、樹立した p2y₅ 安定発現 RH7777 細胞 (RH7777-p2y₅ 細胞) から膜画分を調製し、これをトリチウムで放射ラベル化した 1-オレオイル LPA ([³H]-LPA) と反応させた。その結果、LPA の特異的結合を僅かではあるが観察することができた (図 2-4A)。ネガティブコントロールのベクターのみをトランスフェクションした細胞 (RH7777-Vector 細胞) から調製し

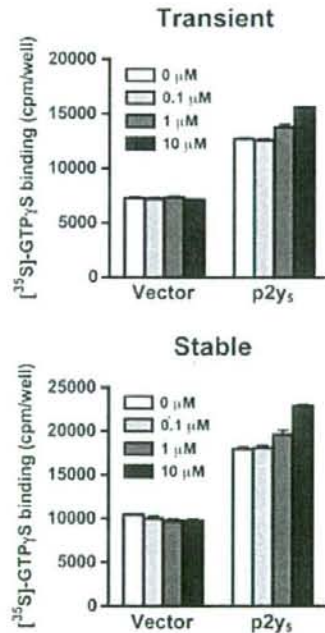


図 2-5 p2y₅ を介した LPA による GTPγS の細胞膜画分への結合。一過性 (上) または安定的 (下) に p2y₅ を発現させた RH7777 細胞から膜画分を調製し、0.5 nM [³⁵S]-GTPγS と種々の濃度の 1-オレオイル LPA を加え、30°C で 30 分間インキュベーションした。n = 3, p < 0.001 for Vector vs p2y₅ (2-way ANOVA)。

た膜画分では LPA の特異的結合は認められなかった。また、100 μ M GTP γ S で膜画分を前処理することにより、 $[^3\text{H}]$ -LPA の特異的結合が大きく減少することが観察された (図 2-4B)。このことは、 $[^3\text{H}]$ -LPA の膜画分への結合が GPCR を介していることを示唆する。

p2y₅ を介した LPA による GTP γ S の細胞膜画分への結合

さらに、p2y₅ を一過的にまたは安定的に発現させた RH7777 細胞の膜画分に対し、LPA によって濃度依存的に $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S が結合する現象 (G タンパク質 α サブユニットにおける GDP/GTP 交換反応の促進) が観察された (図 2-5)。この結果も LPA が GPCR を介して細胞を刺激していることと矛盾しない。

G_s/G₁₃ キメラタンパク質を介した p2y₅ によるアデニル酸シクラーゼの活性化

G タンパク質にはいくつかの種類があり、GPCR によって共役する G タンパク質は異なることが知られている。p2y₅ の場合、低分子量 G タンパク質 Rho の活性化に伴う形態変化を細胞に惹起したが、過去の報告を考慮すると p2y₅ は G₁₂ または G₁₃ タンパク質と共役することが予想された。そこで、B103-p2y₅ 細胞にさらに G_s/G₁₃ キメラタンパク質を発現させて 1-オレオイル LPA で刺激した。このキメ

ランタンパク質の存在下で G₁₃ タンパク質と共役する GPCR が活性化すると、アデニル酸シクラーゼが活性化されるために cAMP 産生量が増加することが知られている。今回の実験でも予想通り、LPA 濃度依存的な cAMP 産生の亢進がこのキメラタンパク質発現 B103-p2y₅ 細胞で観察された (図 2-6)。ただし、この現象を観察するには細胞を PTX で処理することが必須であった。この理由を明らかにするには、p2y₅ が Gi/Go に共役する可能性を含め今後の検討が必要であると考えている

p2y₅ のリガンド選択性

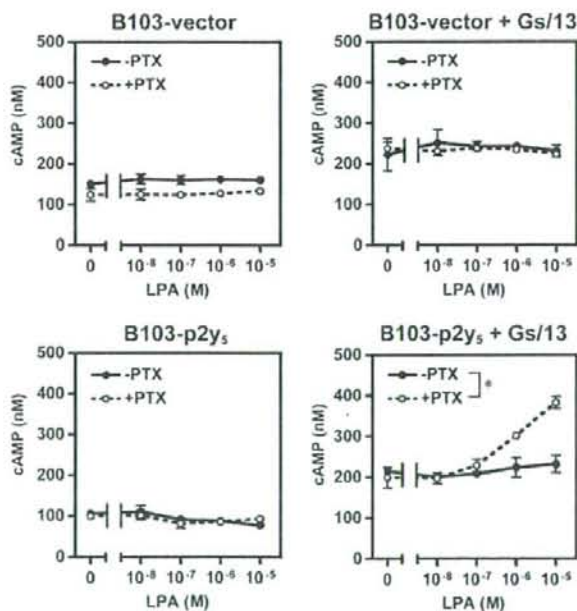


図 2-6 G_s/G₁₃ キメラタンパク質を介した p2y₅ によるアデニル酸シクラーゼの活性化。B103-Vector 細胞と B103-p2y₅ 細胞に G_s/G₁₃ キメラタンパク質発現ベクターまたはコントロールベクターをトランスフェクションした。この細胞を 100 ng/ml PTX 存在下または非存在下、血清飢餓培地で 12 時間処理した。その後、種々の濃度の 1-オレオイル LPA で 30 分間、室温で刺激した。細胞溶解液中の cAMP 濃度を示す。n = 3, *P < 0.001 (2-way ANOVA)。