

Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1) を中心としたプロトン感知性GPCRの解 析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-07-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 持丸, 雄太 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10291/19578

2017年度 農学研究科

博士学位請求論文 (要旨)

Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1)を中心とした

プロトン感知性 GPCR の解析

Analysis of proton-sensing GPCRs focused on
ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1)

生命科学専攻
持丸 雄太

1. 問題意識と目的

動物体内の恒常性はホルモンや神経伝達物質などの一次情報伝達物質を介して保たれており、その破綻は各種疾病の原因となる。これら一次情報伝達物質はチャネルや受容体を介して細胞に受容され、さまざまな細胞応答を引き起こす。近年、古典的なホルモンや神経伝達物質の他にプロトンやミネラルなどの恒常的に体内に存在する物質が、チャネルの他、受容体を介して作用を発揮することが明らかとなりつつある。しかしながらこれらの一次情報伝達物質がどのような受容体を介して、どのような作用を生体に引き起こしているのかに関しては不明である。本論文は、これまで私が行ってきた ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1) を中心としたプロトン感知性 G タンパク質共役型受容体 (プロトン感知性 GPCR) の解析結果をまとめたものである。本研究の結果から、OGR1 の個体レベルでの生理作用の解析、特にそのリガンドの解析には、ゼブラフィッシュなどマウス以外の動物種を併用して解析していくことが必要であること、またその際には実験に用いる動物種におけるリガンド応答性の違いに注意すべきであることが明らかとなった。

2. 構成及び各章の要約

第1章 本研究の背景

私達の体の約60%は水分であるとされ、血液をはじめとする様々な液体が体内のいたる場所に存在している。そのため、私達の体は常にプロトンの影響を受けている。私達の血液は pH 7.4 付近を保つように制御されている。血液が pH 7.4 よりも酸性側に傾く病態はアシドーシス、反対に pH 7.4 よりも塩基性側に傾く病態はアルカローシスと呼ばれ、最悪の場合には死に至る。一方生体内の局所では、積極的に酸性化を利用した機能調節が存在する。例えば破骨細胞から塩酸が分泌されることにより、骨吸収が行われる。細胞が酸性化を感知する機構としてはイオンチャネルが知られていたが、これで細胞応答のすべてを説明することはできていない。一方 OGR1 を中心としたプロトン感知性 GPCR が、局所的な pH 低下に伴う細胞応答にどのように関与しているのかに関しては、ほとんど明らかとなっていない。このことから、これまで不明であった細胞応答の一部が、これらの GPCR を介した応答として説明できる可能性がある。

生体を構成する元素のなかで、酸素、炭素、水素、窒素の4つを除いた他の元素をミネラルと呼ぶ。ミネラルはさまざまな生理機能に関与している。ミネラルは食物から摂取する他なく、欠かせないものであるが

その過剰摂取は生体に害を及ぼす。カリウムやカルシウムチャネルなど、ミネラルはイオンチャネルに作用する。一方、副甲状腺細胞に存在するカルシウム受容体や近年注目されている亜鉛受容体に代表されるように、ミネラルをリガンドとする GPCR も存在する。2003 年の Ludwig らによる報告以降、OGR1 はプロトン感知性受容体としてののみ、その作用が説明されてきた。しかしながら 2015 年 Abe-Ohya らによりヒト、マウスの OGR1 がプロトンの他、ミネラルによっても活性化されるとの報告がなされた。この報告は、これまでにプロトンのみで説明されようとしてきた OGR1 の作用報告に、再考が必要であることを示している。

第 2 章 下垂体ホルモン産生細胞株における OGR1 の作用解析

ホルモンとして最初に報告されたセクレチンは、pH 低下が刺激となり分泌される。pH 低下とホルモン分泌の関係は、 β 細胞からのインスリン分泌においても観察される。このようにホルモン分泌と細胞外 pH の低下の関連は古来より指摘されている。しかしながらその分子的メカニズムの全容は解明されていない。本章では生殖調節の要に位置する性腺刺激ホルモン産生細胞(ゴナドトロフ)の細胞株(L β T2)を用いて、そのホルモン分泌に対する OGR1 の役割を細胞レベルで解析した。その結果 OGR1 は細胞外 pH の低下により活性化し、GnRH 刺激によるホルモン分泌応答を修飾することが明らかとなった。生体内においても実際に生殖調節に関与しているものと予想される。これまでいくつかの OGR1 欠損マウスの報告がなされているが、生殖調節に関する報告はない。本研究の結果を個体レベルへの研究へと展開する場合、第一章で述べたように個体内の pH を人為的に変化させることが困難であることが、OGR1 の個体レベルでの解析を難しくしている。そこで私は次にその問題を克服するために、より実験に適した動物種を探索するため、他の動物種の OGR1 の応答を比較検討することとした。

第 3 章 ゼブラフィッシュ OGR1 の解析

まず私はゼブラフィッシュに着目した。ゼブラフィッシュは骨代謝のモデルとしても使用されている。特に鱗は体表面に露出しているため、飼育水に各種リガンドを添加することでその骨組織や骨代謝への影響をより直接的に観察できるモデルとして使用されている。哺乳類の OGR1 は細胞レベル、個体レベルで骨代謝や骨組織の構築への関与が示唆されているので、ゼブラフィッシュが OGR1 の骨代謝解析に有用であると予想した。ゼブラフィッシュには OGR1 相同遺伝子が存在したが、その機能解析はまだなされていなかった。そこで私はこの相同遺伝子産物の解析を行い、ヒトやマウスの OGR1 の機能と比較することで、ゼブラフィッシュがモデルとして使用できるかどうかを調べた。その結果、ゼブラフィッシュ OGR1 相同遺伝子産物がヒト OGR1 と同様にプロトンを感じて活性化し、様々なシグナル伝達経路を活性化させるプロトン感知性 GPCR であることが明らかになった。また 2015 年に、ヒトやマウスの OGR1 が抗不安薬であるロラゼパムの標的の一つであることが報告された。今回の解析の結果、ロラゼパムがゼブラフィッシュ OGR1 に対してもヒトと同様に作用することが明らかとなった。今後、ゼブラフィッシュを用いた OGR1 の病態生理的応答の解析に、この薬物が使用できる可能性が示唆された。一方ミネラルによる活性化は、ヒトとゼブラフィッシュ OGR1 間で違いが観察された。すなわちプロトンとは異なりミネラルによる活性化には種による違いがあることが、本研究により初めて明らかとなった。

第 4 章 様々な動物種における OGR1 相同遺伝子の応答解析

活性化するミネラル種の違いが、ゼブラフィッシュ OGR1 に特異的なものであるのかを明らかにするため、本章では様々な生物由来の OGR1 のキャラクタリゼーションを行った。データベースの情報から、ゼブラフィッシュ以外にヒト OGR1 遺伝子と相同な遺伝子が、ブタ、ラット、マウス、ニワトリ、ネッタイツメガエルで登録されていた。なおネッタイツメガエルでは相同遺伝子が 2 種類登録されていた。しかしながら、ラット、マウス OGR1 以外の OGR1 相同遺伝子の解析はまだ報告されていなかった。そこで私はこれらの OGR1 相同遺伝子産物が、プロトンやミネラルまたロラゼパムに対してどのような活性化パターンを示すのかを解析した。その結果、調べたすべての動物種由来の OGR1 がヒト、ラット、マウス OGR1 と同様に、プロトンによって活性化された。すなわちプロトンが OGR1 の共通のリガンドとして進化的に保存されていることが明らかとなった。一方、ヒト、ゼブラフィッシュ以外の動物種においても、ミネラルの種類による活性化に差が存在することが明らかとなった。またこのミネラルによる応答の特異性には、少なくとも受容体の細胞外領域が、関与していることが明らかとなった。ロラゼパムは、ネッタイツメガエル OGR1 以外のすべての OGR1 において作用した。近年のゲノム編集技術の向上により、標的遺伝子の生理的または病態生理学的機能の解析を、様々な生物を用いて行うことが可能となってきた。本章で得られた結果が今後、これらの動物を用いた OGR1 の個体レベルでの作用を解析していくための基礎データとなることが期待された。

第5章 ヒト GPR4 とゼブラフィッシュ GPR4 のプロトンとミネラルに対する応答解析

プロトン感知性 GPCR は OGR1 の他、GPR4、TDAG8、G2A の3種がこれまでに報告されている (OGR1 ファミリー)。しかしながらこれまで、OGR1 以外のプロトン感知性 GPCR がミネラルによっても活性化されるかどうかを、調べた報告はなかった。本研究の結果、ゼブラフィッシュ GPR4 がヒト GPR4 と同様にプロトンを感じて、様々なシグナル伝達経路を活性化させるプロトン感知性 GPCR であることが明らかとなった。一方ミネラルに対してはヒト GPR4、ゼブラフィッシュ GPR4 とも活性化を示さなかった。すなわちミネラルを用いることにより、OGR1 と GPR4 の作用を分けることができる可能性が示唆された。

最後に第6章で本研究の総括と今後の展望を記した。

本研究の結果、細胞外 pH の低下は OGR1 を介してゴナドトロフ細胞株からのホルモン分泌を修飾することが明らかとなり、pH の低下は OGR1 を介してホルモン分泌を調節している可能性が示唆された。OGR1 によるこのホルモン分泌の修飾作用にどのくらいの共通性があるのかに関しては、他のホルモン産生細胞の解析結果を待たなければならない。またこの細胞レベルでの結果が、個体レベルでの生理的、病態生理的な作用にどのくらい反映されているのかに関する問題は、今後の課題である。マウスを用いた OGR1 の解析は困難なため、私は本研究で他の動物種に着目し、その OGR1 の解析を行った。その結果、動物種間で共通の応答と異なる応答があることが明らかとなった。すなわち、ある動物種を用いて解析を行う場合、その対象となる生物の相同遺伝子産物の解析を事前に十分に行う必要があることが明らかとなった。そのうえで今後、種々の動物種の特徴を生かした解析を行うことで、OGR1 の個体レベルでの生理・病態生理的役割の解明が今後進展する可能性が本研究の結果より示唆された。