

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

明治大学大学院農学研究科

2017 年度

博士学位請求論文

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)

学位請求者 生命科学専攻

持丸 雄太

目次

第 1 章 本研究の背景	6
1-1 緒言	6
1-2 プロトン感知性 GPCR 研究の背景	7
1-2-1 プロトンと生体機能	7
1-2-2 ミネラルと生体機能	11
1-2-3 イオンチャネル	14
1-2-4 GPCR	17
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	22
2-1 緒言と目的	22
2-2 材料と方法	24
2-2-1 細胞培養	24
2-2-2 受容体 cDNA プラスミドの準備と発現	24
2-2-3 RNA 抽出	25
2-2-4 cDNA 合成	25
2-2-5 RT-PCR	26
2-2-6 ガウシアルシフェラーゼアッセイ	27
2-2-7 ウェスタンブロッティング	28
2-2-8 酵素結合免疫測定 (ELISA)	29
2-2-9 免疫組織染色	30

2-2-10	細胞内カルシウム濃度測定	31
2-2-11	データ表示.....	31
2-3	結果.....	32
2-3-1	ゴナドトロフにおける OGR1 の発現.....	32
2-3-2	ホルモン分泌を検出する簡便なアッセイ系の構築	34
2-3-2-1	GnRH 刺激によるガウシアルシフェラーゼ活性の増加.....	34
2-3-2-2	ガウシアルシフェラーゼ活性の増加に対する GnRH 受容体 アンタゴニストの効果	37
2-3-2-3	ガウシアルシフェラーゼの細胞内局在	39
2-3-3	LβT2 細胞からのホルモン分泌に対する OGR1 の役割.....	41
2-3-3-1	pH 低下に伴う細胞内カルシウム濃度の変化	41
2-3-3-2	ガウシアルシフェラーゼを用いた LβT2 細胞からの分泌応答の解析	43
2-4	考察.....	45
第3章	ゼブラフィッシュ OGR1 の解析.....	51
3-1	緒言と目的.....	51
3-2	材料と方法.....	56
3-2-1	細胞培養	56
3-2-2	受容体 cDNA プラスミドの準備と発現.....	56
3-2-3	デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ	57
3-2-4	細胞内カルシウム濃度測定	58
3-2-5	GloSensor™ cAMP アッセイ	58

3-2-6 データ表示	59
3-3 結果.....	60
3-3-1 pH 低下に伴うゼブラフィッシュ OGR1 相同遺伝子産物を介した CRE、 SRE、NFAT 系の活性化	60
3-3-2 pH 低下に伴うゼブラフィッシュ OGR1 活性化とヒスチジン残基	60
3-3-3 ミネラルによるゼブラフィッシュ OGR1 の活性化	64
3-3-4 ロラゼパムによるゼブラフィッシュ OGR1 の活性化	68
3-3-5 リゾ脂質によるゼブラフィッシュ OGR1 の活性化	68
3-4 考察.....	71
第 4 章 様々な動物種における OGR1 相同遺伝子産物の応答解析.....	75
4-1 緒言と目的.....	75
4-2 材料と方法.....	76
4-2-1 細胞培養	76
4-2-2 受容体 cDNA プラスミドの準備と発現	76
4-2-3 デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ	77
4-2-4 GloSensor™ cAMP アッセイ	78
4-2-5 データ表示	78
4-3 結果.....	79
4-3-1 各動物種間における OGR1 相同遺伝子産物のアミノ酸配列の比較	79
4-3-2 プロトンによる活性化	82
4-3-3 ミネラルによる活性化	84
4-3-4 各動物種由来の OGR1 活性化に対するプロトンとミネラルの影響	86

4-3-5	ミネラルに対する活性化の違いに關与する OGR1 の領域	88
4-3-6	ロラゼパムによる各動物種 OGR1 の活性化	89
4-4	考察	92
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	96
5-1	緒言と目的	96
5-2	材料と方法	99
5-2-1	細胞培養	99
5-2-2	受容体 cDNA プラスミドの準備と発現	99
5-2-3	デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ	99
5-2-4	データ表示	100
5-3	結果	101
5-3-1	ヒト GPR4 とゼブラフィッシュ GPR4 相同遺伝子産物間のアミノ酸配列の比較	101
5-3-2	pH 低下に伴うゼブラフィッシュ GPR4 相同遺伝子産物を介した CRE、SRE、NFAT 系の活性化	101
5-3-3	pH 低下に伴うゼブラフィッシュ GPR4 活性化とヒスチジン残基	102
5-3-4	ミネラルによるゼブラフィッシュ GPR4 の活性化	106
5-3-5	リゾ脂質によるゼブラフィッシュ GPR4 の活性化	106
5-4	考察	110
第 6 章	総括と今後の展望	113

謝辭.....117

参考文献.....118

第1章 本研究の背景

1-1 緒言

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はまだ多くが不明である。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。第1章ではこの研究の背景となるプロトンやミネラルによる生体調節作用と、さらにそれらを受容するイオンチャネルや GPCR についての背景を述べる。第2章では細胞レベルでの OGR1 の作用を、下垂体ホルモン分泌細胞株を用いて解析した結果を示す。第3章ではプロトンやミネラルなどのリガンドが OGR1 を介してどのような作用を生体に及ぼしているのかを解析するための第一歩として、ゼブラフィッシュ OGR1 の解析結果を示した。第4章ではゼブラフィッシュ OGR1 の解析過程で新たに明らかとなったリガンドの特異性に関連して、各種動物由来の OGR1 相同遺伝子産物の解析を行った結果を示した。そして第5章では、OGR1 以外のプロトン感知性 GPCR である GPR4 に対するリガンドの応答解析結果を示した。本研究におけるこれらの結果から、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有用であること、またその際には用いている動物種の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。

1-2 プロトン感知性 GPCR 研究の背景

1-2-1 プロトンと生体機能

pH は水溶液中に含まれる水素イオン（プロトン）濃度を表す物理量である。すなわち水分には普遍的にプロトンが存在している。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、主に重炭酸緩衝系により制御されている。血液を pH 7.4 付近に保つことは細胞が正常に活動するために必要であり、pH 7.4 よりも酸性側あるいは塩基性側に傾けば正常に活動することが困難となる。

血液が pH 7.4 よりも酸性側に保たれてしまう病態はアシドーシス、反対に pH 7.4 よりも塩基性側に保たれてしまう病態はアルカローシスと呼ばれ、高または低カリウム血症、循環不全、中枢神経系の抑制、筋肉の麻痺などを引き起こし、最悪の場合には死に至る可能性がある。そのため私達の体には血液の pH を感知し、一定に保つための機構が存在する。

血液の pH は主に延髄に存在する中枢性化学受容器と、大動脈小体・頸動脈小体に存在する末梢性化学受容器が酸素分圧を感知し、呼吸機能と腎機能を調節することにより一定に調節されることが報告されている[Gao *et al.* 2014, Milsom and Burtleson 2007, Gleadle 2009]。

私達は生命を維持するために呼吸をするが、呼吸は血液の pH を一定に保つ役割も担っている。呼吸時には空気中から体内に酸素を取り込み二酸化炭素を排

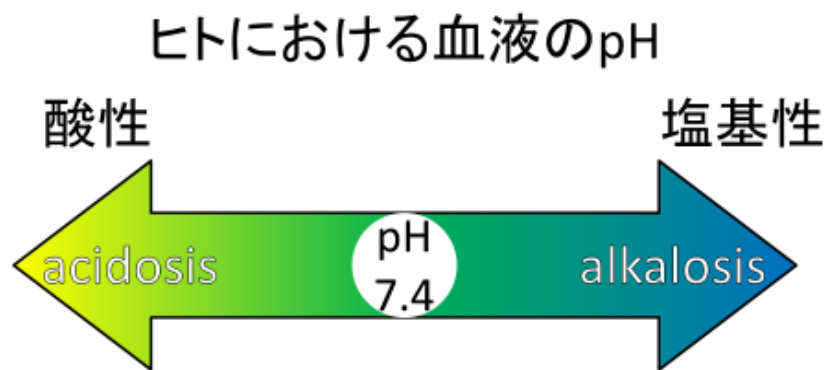
出する。二酸化炭素は揮発性酸と呼ばれる。血中の炭酸濃度は呼吸による二酸化炭素の排出量により調節されるので、肺に障害が生じた場合には揮発性酸の排出が困難となり呼吸性アシドーシスを引き起こす。また私達が摂取する食物の消化産物や細胞の代謝産物には乳酸などの不揮発性酸が含まれる。この不揮発性酸は腎臓を介して、尿中へと排出される。腎機能に障害が生じた場合にはこれらの不揮発性酸を排出することが困難となり、代謝性アシドーシスを引き起こす。一方過呼吸により二酸化炭素の排出量が増加し、血中の炭酸濃度が減少する、または激しい嘔吐によって胃酸が排出されると、逆にアルカローシスが引き起こされる。

アシドーシスやアルカローシスは全身の pH が酸性あるいは塩基性に傾いてしまった病態であるが、生体内の局所では積極的に酸性化を利用して生体機能が調節されている。例えば骨代謝では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 [Rousselle and Heymann 2002]。がんでは、解糖系の亢進により乳酸の産生が増加しており、がん組織内部とその周囲の酸性化が局所的に生じている。その局所的な酸性化ががんそのものや免疫細胞を含むがん周辺組織における応答を調節し、がんの増殖・転移に影響を及ぼしている [Liberti and Locasale 2016, Payen *et al.* 2016]。また細菌感染時などに生じる炎症部位においても局所的な pH の低下が起こっており、免疫細胞や炎症周辺の細胞の応答に影響を及ぼしている [Okajima 2013]。さらに運動や虚血時に代表されるように、血流量の増減に伴って周囲の組織の pH が変化することも報告されており [Spranger *et al.* 2015, Pan *et al.* 1999, Opie 1973, Poole-Wilson 1978]、この pH の変化が周辺細胞の応答に影響を及ぼしている可能性が示唆される。

血中の pH 調節は上述のように中枢性化学受容器、末梢性化学受容器を介して主になされている。その pH 感知は、延髄や各小体に存在する特定のカリウムチャンネルや TRPA1 チャンネルが血液や体液の低酸素状態を感知して活性化すると

いうモデルが提出されている[Guyenet *et al.* 2016, Gao *et al.* 2014, Peers *et al.* 2010, Earley 2012]。

一方局所的な pH の低下は、上述のように塩酸や乳酸産生に伴うプロトン濃度の増加によって引き起こされる。細胞が局所的なプロトン濃度の変化を感知する機構としては、これまで transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) や acid-sensing ion channels (ASICs) といったイオンチャネルが知られており、それらの解析がこれまで主になされてきた[Tominaga and Tominaga 2005, Gründer and Pusch 2015, Holzer 2009]。しかしながらこれらイオンチャネルを介した応答のみでは、上述の局所的な pH 低下に伴う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イオンチャネルでは説明できない細胞応答の一部が、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[Damaghi *et al.* 2013, Ludwig *et al.* 2003]。



○局所的pHの変化

- ・骨代謝
- ・がん細胞の発達
- ・炎症

etc.

図1 生体内におけるpHの影響

生体内のpHは厳密に調節されており、pH 7.4付近である。生体内のpHがpH 7.4よりも酸性側に保たれてしまう病態をアシドーシス、塩基性側に保たれてしまう病態をアルカローシスと呼ぶ。また生体内では骨代謝やがん細胞の発達、炎症時に、局所的pHの低下が起こる。

1-2-2 ミネラルと生体機能

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び、さらにそのなかでも極めて少量しか存在しないものを微量元素、超微量元素と呼ぶ。ミネラルはさまざまな生理機能に関与している。またこれらの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。例えばマンガンやニッケル、コバルト、鉄、銅といったミネラルの過剰摂取および欠乏はヒトの身体に悪影響を及ぼす。過剰摂取によりマンガンは精神障害を[Greger 1998]、コバルトは喘息や赤血球の過剰産生を[Czarnek *et al.* 2015]、鉄は臓器機能不全を[Gozzelino and Arosio 2016]、銅は酸化による損傷や脂質代謝の変化を引き起こす[Gaetke *et al.* 2014]。一方欠乏すると、マンガンは骨変形および膵 β 細胞変性を[Greger 1998]、コバルトはビタミン B12 の合成障害を[Czarnek *et al.* 2015]、鉄は貧血や消化管出血を[Gozzelino and Arosio 2016]、銅は骨粗鬆症や心臓血管疾患を引き起こす[Camakaris *et al.* 1999]。ニッケルのように過剰摂取や欠乏による影響がまだ報告されていないものもあるが、今後新たな知見が出てくる可能性がある。

ミネラルの種類によってそれらの生体内での局在は異なっていることも報告されている。マンガンはミトコンドリア、コバルトは心臓や肝臓や腎臓、亜鉛は前立腺といった場所に局在することが報告されている[Martinez-Finley *et al.* 2013, Czarnek *et al.* 2015, Costello and Franklin 2016]。

細胞レベルでは、ミネラルは酸素の運搬や酵素の補因子としての他、一次情報伝達物質として細胞・生理機能の調節に重要な役割を担っている。

カリウムやカルシウムチャンネルをはじめとして、ミネラルはイオンチャンネルのメディエーターとしての役割を担っている。そして神経細胞やホルモン産生細胞の興奮調節に代表されるように、細胞機能の調節に重要な役割を果たして

いる。一方副甲状腺細胞に存在するカルシウム受容体や、近年新たな情報伝達物質として脚光を浴びている亜鉛をリガンドとする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 [Chen and Goodman 2004, Hershinkel *et al.* 2001]。このことはプロトンと同様に、ミネラルもイオンチャネルに加えて GPCR を介してその生理作用を発揮することを示している。2003 年の Ludwig らによる報告以降 [Ludwig *et al.* 2003]、OGR1 はプロトン感知性受容体としてのみその作用が細胞レベル、個体レベルで説明されてきた。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 [Abe-Ohya *et al.* 2015]。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。

生体内の微量元素



ヒトにおける微量元素の過剰摂取もしくは欠乏の例

	マンガン	ニッケル	コバルト	鉄	銅
過剰	精神障害	特になし	喘息 赤血球過剰産生	臓器機能不全	酸化的損傷 脂質代謝の変化
欠乏	骨変形 膵臓β細胞変性	特になし	ビタミンB12 合成障害	貧血 消化管出血	骨粗鬆症 心臓血管疾患

図2 生体内におけるミネラルの影響

生体内において様々な種類のミネラルが存在しており、生体内のミネラルの含有量は厳密に調節されている。微量元素は生体内において体重1kg当たり1mg以下もしくは鉄よりも生体における含有量が少ない元素である。しかしながらミネラルは生体内の酵素の補因子などとして重要な役割の他、一次情報伝達物質としての役割も担っている。ミネラルの過剰摂取もしくは欠乏は生体に多大な影響を与える。

1-2-3 イオンチャネル

イオンチャネルは、特定イオンを細胞内外へ透過させる役割を担う膜タンパク質である。イオンチャネルの種類によって透過させるイオンの種類が異なっている。細胞膜はリン脂質二重層によって構成されており、そのままではイオンが細胞膜を透過することはほとんどない。イオンチャネルは細胞内外のイオン濃度差の維持に重要であるばかりでなく、イオンを介した細胞内への情報伝達にも重要な役割を担っている。イオンチャネルはその開閉機構の違いからいくつもの種類に分類されている。膜電位によって開口する電位依存性チャネル、特定のリガンドによって開口されるリガンド依存性チャネル、チャネル分子の変形などによって開口する機械刺激依存性チャネル、特定の温度によって開口する温度依存性チャネル、通常の状態でも開口しており特定のイオンを少しずつ輸送する漏洩チャネル、他からのリン酸化シグナルを受けることにより開口するリン酸化依存性チャネルに大別される。イオンチャネルが開口すると、細胞内外のイオン濃度の勾配に依存して、細胞内外へのイオンの輸送が起こる結果、細胞内に情報が伝達される[Catterall 2010, Absalom *et al.* 2004, Ranade *et al.* 2015, Bagriantsev and Gracheva 2015, Li and Toyoda 2015, Gadsby and Nairn 1999]。

イオンチャネルのうちプロトンを感じ取るイオンチャネルには、TRPV1 や ASICs といったものがある。これらのイオンチャネルは細胞外 pH の低下を感じ取って、特定のイオンを輸送する[Holzer 2011]。これらのイオンチャネルは主に知覚神経に発現しており、痛みや味覚といった感覚を伝える役割を持つことが知られている[Holzer 2009]。これらのチャネルは、pH 4.0~pH 7.0 という生理的 pH より酸性側で活性化するという特徴を有する。また 2006 年には、細胞内 pH の低下を感じ取って水素イオンを選択的に細胞外に排出する、電位依存性プロトン

チャンネルである VSOP/Hv1 が発見されている[Ramsey *et al.* 2006, Sasaki *et al.* 2006]。

イオンチャネルの種類

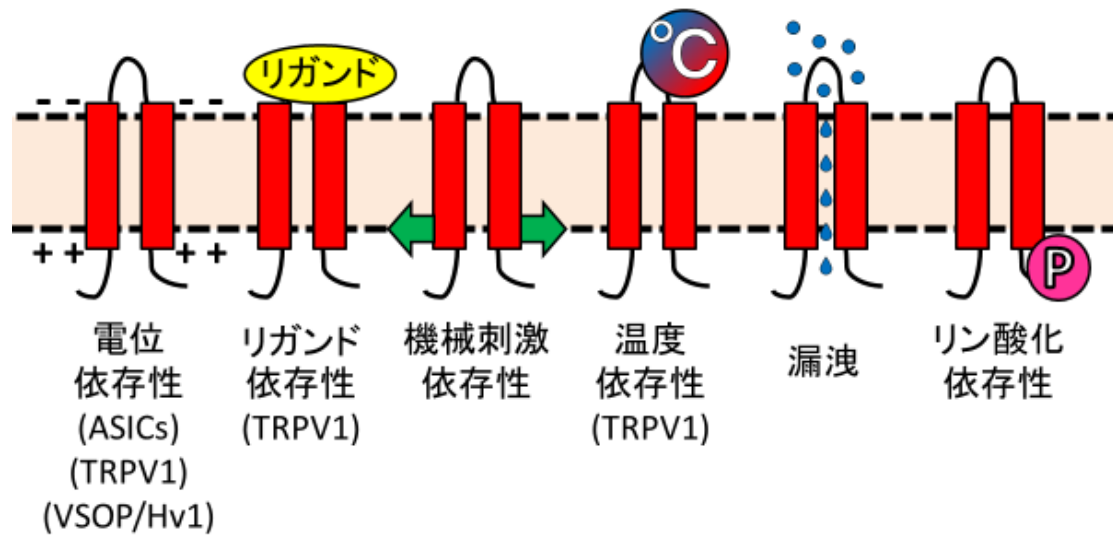


図3 イオンチャネルの分類

イオンチャネルは、電位依存性チャネル、リガンド依存性チャネル、機械刺激依存性チャネル、温度依存性チャネル、漏洩チャネル、リン酸化依存性チャネルの6種類に大別される。このうち、プロトン感知するイオンチャネルは電位依存性チャネル、リガンド依存性チャネル、温度依存性チャネルがある。

1-2-4 GPCR

GPCR は 7 回細胞膜を貫通する膜タンパクである。リガンドが結合し GPCR が活性化すると共役している三量体 G タンパク質が続いて活性化され、その結果細胞内に情報が伝達される。GPCR は酵母からヒトまで保存されておりアミノ酸配列や機能の類似性に基づき、ロドプシン様受容体ファミリー、セクレチン受容体ファミリー、代謝性グルタミン酸受容体ファミリー、接着因子受容体ファミリー、フリズルド/苦味受容体ファミリー、その他の 6 つにクラス分けされている。ヒトでは約 800 種の GPCR が存在しているが、そのうちの約 100 種類がリガンドや機能がわかっていないオーファン受容体である[Fredriksson *et al.* 2003]。

GPCR は視覚、嗅覚、味覚のほか、ペプチドホルモン、アミン、プロスタノイドなど、多種多彩な刺激を受容することが知られており、その特徴から生体のセンサーとも呼ばれている。また現在使用されている薬の約 30%は GPCR を標的にしていると言われている[大嶋 *et al.* 2014]。

ロドプシンファミリーに属する OGR1、GPR4、T cell death- associated gene 8 (TDAG8)、G2A は最初、リゾ脂質をリガンドとする GPCR ファミリーとして報告された (OGR1 ファミリー) [Xu *et al.* 2002]。しかしながらこれら脂質の結合実験の結果から、現在この報告には疑問が呈されている。一方 2003 年に Ludwig らにより OGR1、GPR4 が、2004 年には TDAG8、G2A がそれぞれ細胞外プロトンにより活性化するプロトン感知性 GPCR であることが報告された [Ludwig *et al.* 2003, Wang *et al.* 2004, Ishii *et al.* 2005, Murakami *et al.* 2004]。その後 G2A に関しては、プロトン感知能に関して疑問が呈されている[Radu *et al.* 2005]。OGR1 ファミリーはおよそ pH 6.0~pH 8.0 付近で活性化することが知られており、イオンチャネルよりもより生理的 pH 付近の pH 変化で活性化するという特徴を

有する。またイオンチャネルではプロトンが直接細胞内に入り作用するイオノトロピックな作用形式をとるが、**OGR1** ファミリーを介したプロトンの作用は、細胞外のプロトン刺激が細胞内で **cAMP** やカルシウムなどといった異なる二次情報に変換されるというメタボトロピックな作用形式をとるという違いを有する。

2015年にはヒトやマウス **OGR1** に関して、この受容体がプロトン以外にミネラルによっても活性化されることも明らかとなった[Abe-Ohya *et al.* 2015]。このことは **OGR1** が、水素イオン、ミネラルによる生理作用の接点として生体内のキープレイヤーとして作用している可能性を示唆しているのかもしれない。また最近、**OGR1** が抗不安薬の一種であるロラゼパムにより、アロステリックに活性化すると報告もなされ[Huang *et al.* 2015]、この受容体が精神疾患に関与する可能性が示唆されている。しかしながらこれが生体内において、水素イオン、ミネラルのどちらの刺激により活性化された **OGR1** にロラゼパムが作用した結果なのかは明らかとなっていない。

ヒトゲノム中に存在するGPCRの分類 大嶋、一條、持丸 他, 明治大学農学部研究報告63, 103-110 (2014)		
ファミリー名	種類数	オーファン受容体数
ロドプシン様受容体ファミリー	約460 (嗅覚に関与するGPCR)	約100
	241 (嗅覚以外に関与するGPCR)	
セクレチン受容体ファミリー	15	
代謝性グルタミン酸受容体ファミリー	15	
接着因子受容体ファミリー	24	
フリズルド/苦味受容体ファミリー	24	
その他	23	

表 1 ヒトゲノムに存在する GPCR の分類

ヒトゲノムに存在する GPCR は約 800 種類存在するとされる。これらの GPCR は 6 種類のクラスに大別される。約 100 種類の GPCR はリガンドが解明されていないオーファン受容体である[大嶋 *et al.* 2014]。

細胞外pH変化感知機構

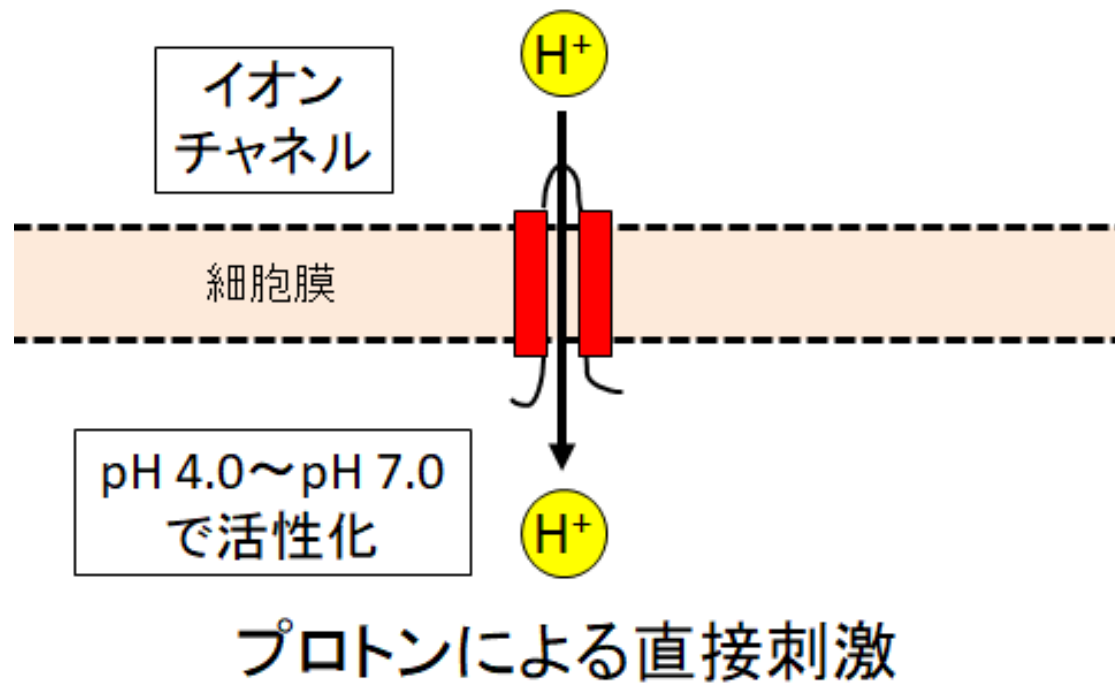


図4 プロトン刺激時のイオンチャネル

イオンチャネルには、TRPV1 や ASICs といったプロトンを感じて活性化するイオンチャネルがある。イオンチャネルは主に生理的 pH よりも酸性側で活性化することで、細胞膜内外へのプロトンの輸送を濃度勾配に依存して行う。また、細胞内への情報伝達は一次メッセンジャーであるプロトンが形を変えずに作用する。

細胞外pH変化感知機構

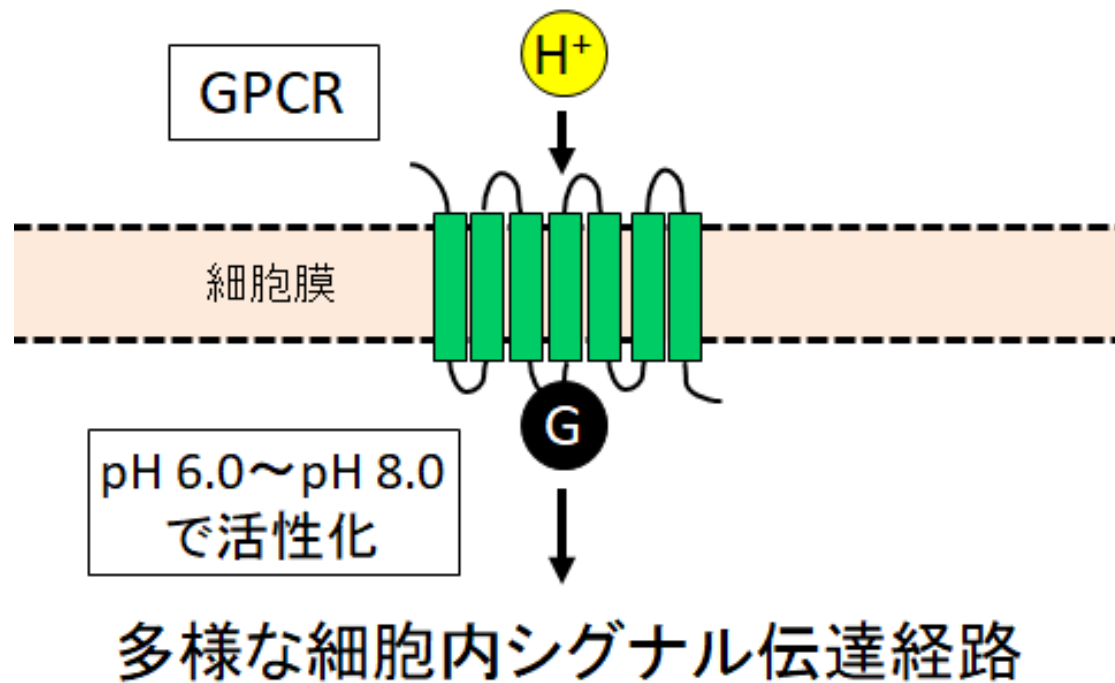


図5 プロトン刺激時の GPCR

GPCR には、プロトン感知性 GPCR ファミリーである OGR1 ファミリーが存在する。OGR1 ファミリーは OGR1、GPR4、G2A、TDAG8 で構成され、プロトンを感じて活性化する。OGR1 ファミリーは主に生理的 pH 付近のプロトン濃度変化を感じて活性化し、細胞内へはプロトンが直接作用するのではなく、cAMP やカルシウムといった二次メッセンジャーに情報が変換され、情報が伝達される。

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

2-1 緒言と目的

ホルモンは体内の特定の場所に存在するホルモン産生細胞により合成、分泌される。そして血液を介して標的細胞まで運ばれ、作用する。ホルモンは、1902年に William M. Bayliss と Ernest H. Starling らによって最初に報告された[Bayliss and Starling 1902]。この最初のホルモンはセクレチンと呼ばれるホルモンであり、十二指腸や小腸上部に存在する S 細胞から分泌される。セクレチンは pH が低下することにより分泌されることが知られており、十二指腸腺などからの重炭酸塩の分泌を亢進し、同時にガストリンや胃液の分泌を抑制する[Hansky *et al.* 1971, Chey *et al.* 1970, Sandvik *et al.* 1987]。セクレチンは、主に胃酸によって放出され、脂肪やタンパク質、胆汁酸、ハーブ抽出物の消化産物によっても放出される[Chey and Chang 2003]。またセクレチン放出ペプチドの存在も報告されている[Li *et al.* 1990]。しかしながら pH 低下に伴う S 細胞からのセクレチン分泌の詳しいメカニズムは、まだ明らかとなっていない。pH 低下とホルモン分泌の関連は他のホルモン分泌細胞においても観察されている。インスリンは血糖降下作用をもつ唯一のホルモンであるが、このホルモンはすい臓 β 細胞から分泌される。この β 細胞からのインスリン分泌が酸性条件下で促進されることは知られていた[Hyder *et al.* 2001]が、この促進作用に OGR1 が関与することが明らかとなった[Nakakura *et al.* 2012]。このようにある種のホルモン分泌細胞からのホルモン分泌と細胞外 pH の低下との間には関係があり、そこに OGR1 が関与する場合があることが明らかとなっている。

生殖は、下垂体前葉に存在する性腺刺激ホルモン産生細胞（ゴナドトロフ）から分泌される性腺刺激ホルモン（ゴナドトロピン）によって主に調節されて

いる[Rivier and Rivest 1991]。ゴナドトロピン（FSH、LH）は性腺に作用して性ホルモン産生を促す[Rivier and Rivest 1991]。ゴナドトロピンの欠乏は性腺機能低下症をもたらす、不妊の原因となる[Suzuki *et al.* 2004]。ゴナドトロフからのゴナドトロピンの分泌は、主に視床下部から放出される性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）によって制御されている[Gharib *et al.* 1990]。排卵誘発剤は視床下部からの GnRH の分泌を促進させ、ゴナドトロフからのゴナドトロピンの分泌を介して、排卵を促進する[Conn and Crowley 1991]。このようにゴナドトロフは生殖調節の要に位置している。ゴナドトロフからのゴナドトロピンの分泌は上述のように GnRH により主に制御されているが、近年、GnRH 以外の刺激がゴナドトロピンの分泌を修飾しているという報告もなされている。例えば下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド（PACAP）は単独でゴナドトロピンの分泌を促進すること、また PACAP は GnRH 刺激によるゴナドトロピン分泌を促進することが報告されている[Tsujii *et al.* 1994]。GnRH 受容体と PACAP 受容体とも GPCR であること、また上述のようにホルモン分泌と pH 低下とは関係があることから私は、ゴナドトロフにも OGR1 が発現しゴナドトロピンの分泌に関与しているという仮説を立て、その検証を試みた。

2-2 材料と方法

2-2-1 細胞培養

実験に用いた L β T2 細胞は Dr. Pamela Mellon から、NIH3T3 細胞は ATCC から提供していただいた。これらの細胞は 100 U/ml benzylpenicillin potassium (023-07731, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、100 μ g/ml streptomycin sulfate (SSDN209, Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo, Japan)、10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS) (SH30910.03, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) を含んだ Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (D5648, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) (DMEM) を用いて、5% CO₂、37°C条件のインキュベーターで培養した。

2-2-2 受容体 cDNA プラスミドの準備と発現

ヒト OGR1 (1098bp, GenBank accession No. NM_003485) のコード領域を、1 番目のメチオニンコドンの前にコザック配列 (CCACC) をつけて合成し (Eurofins Genomics K.K., Tokyo, Japan)、pcDNA3.1 ベクターに組み込んだ。pCMV-Gluc2 (N8081S, New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)、ヒト OGR1 発現ベクター、pcDNA3.1 ベクター (V79020, Life Technologies Japan Ltd., Tokyo, Japan) は、Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (11668019, Life Technologies Japan Ltd., Tokyo, Japan) を用いて細胞に遺伝子導入した。

2-2-3 RNA 抽出

6 cm dish 1 枚分 (3.0×10^5 cells) の L β T2 細胞を回収し、TRIzol™ Reagent (15596-026, Life Technologies Japan Ltd., Tokyo, Japan) を 1 ml 加えてよく混ぜた。Chloroform (038-02606, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を 200 μ l 加え、よく混ぜた後、室温に数分静置した。172 g、4°Cで 15 分間遠心して上清を 500 μ l 回収し、2-Propanol (166-04836, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を 500 μ l 加えてよく混ぜ、室温に 10 分間静置した。172 g、4°Cで 10 分間遠心し、上清を除いた。75% (v/v) Ethanol (057-00451, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を 1 ml 加え、107 g、4°Cで 5 分間遠心した。遠心後、上清を除去し、DEPC treated Water (314-90205, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を 88 μ l 加えた。その後 55°Cで 10 分間インキュベートし、氷上に静置した。DNase (M610A, Promega, Madison, WI, USA) を 1 μ l、DNase buffer を 10 μ l、Recombinant RNase Inhibitor (2313A, Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を 1 μ l 加えて混ぜ、37°Cで 1 時間インキュベートした。インキュベート後、TRIzol™ Reagent を 1 ml と 75% (v/v) Ethanol を 1 ml 加え、107 g、4°Cで 5 分間遠心した。遠心後、上清を除去し、DEPC treated Water を 100 μ l 加えた。その後、吸光度計を用いて 260 nm の吸光度から濃度を計算した。

2-2-4 cDNA 合成

L β T2 細胞の RNA 溶液を使用して以下の方法で cDNA を合成した。

1 μ g の RNA に Oligo (dT) を 0.5 μ g を加え、DEPC treated Water を加えて 12.5 μ l までメスアップし、75°Cで 15 分間インキュベートした。インキュベート後、M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus (Deletion Mutant) (MMLV RT)

(M5301, Promega, Madison, WI, USA) を 1 μ l、MMLV RT buffer を 5 μ l、10 mM dNTP (28-4065-51, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) を 1.25 μ l、RNase inhibitor を 0.5 μ l、DEPC treated Water を 4.75 μ l 加え、42°C で 1 時間、その後 70°C で 15 分間インキュベートし、逆転写反応を行った (RT+)。また、RT-PCR の際のコントロールとして MMLV RT の代わりに DEPC treated Water を加えたものを同様の方法で用意した (RT-)。逆転写後、RT+ と RT- のそれぞれに Ribonuclease H (2150A, Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を 0.5 μ l 加え、37°C で 20 分間インキュベートし、これを cDNA とした。Oligo (dT) は Eurofins Genomics K.K. (Tokyo, Japan) に委託して合成した。

2-2-5 RT-PCR

RT+、RT-それぞれに、マウス OGR1 Forward primer、マウス OGR1 Reverse primer、dNTP、Taq DNA Polymerase (M0267S, New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)、ThermoPol Buffer、DEPC treated Water を加え、RT-PCR を行った。コントロールとしてハウスキーピング遺伝子である Hypoxanthine phospho-ribosyl- transferase (HPRT) に対しても同様の方法で RT-PCR を行った。RT-PCR の条件は、94°C で 3 分間インキュベートした後に、95°C で 30 秒間、52°C で 30 秒間、68°C で 1 分間のインキュベートを 34 サイクルで行った。RT-PCR 後、1% (w/w) アガロースゲルによる電気泳動を行った。RT-PCR に用いたマウス OGR1 primer と HPRT primer の配列は以下の通りである。Eurofins Genomics K.K. (Tokyo, Japan) に合成を依頼した。

マウス OGR1 Forward primer 配列 (5'to3') : ACCGAGTCTGCTTTGAGCAT

マウス OGR1 Reverse primer 配列 (5'to3') : AAAGCAAGCCAGGAAGATGA

HPRT Forward primer 配列 (5'to3') : GGGCTTACCTCACTGCTTTC

HPRT Reverse primer 配列 (5'to3') : TCTCCACCAATAACTTTTATGTCC

2-2-6 ガウシアルシフェラーゼアッセイ

pCMV-Gluc2、OGR1 発現ベクター、pcDNA3.1 ベクターを L β T2 細胞 (3.0×10^5 cells) に前述のように遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞を 12 ウェルプレートもしくは 24 ウェルプレートに播種した。刺激試薬 (0.01 nM~25 nM GnRH (L7134-1MG, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)、50 mM KCl (163-03545, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、100 nM アンチド (A8802-1MG, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) は無血清培地 (25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (GB10, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)、0.1% (w/w) Albumin, Bovine Serum, Fraction V, Fatty Acid-Free (BSA) (126575, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を加えた DMEM- low glucose (D5523, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)) に溶解した。なお、無血清培地に HCl (080-01066, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) または NaOH (198-13765, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を加え各種 pH の無血清培地を作製した。L β T2 細胞は上記各種刺激試薬入りの無血清培地もしくは各種 pH の無血清培地を 1 ml/well (12 ウェルプレート) もしくは 500 μ l/well (24 ウェルプレート) で刺激した。刺激後の上清を 50 μ l 回収し、PBS (-) で 20 倍希釈した。希釈したサンプルのガウシアルシフェラーゼ活性を、BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit (E3300L, New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) で測定した。測定には luminometer (GLOMAX, Promega, Madison, WI, USA) を使用した。

2-2-7 ウェスタンブロッティング

pCMV-Gluc2 を L β T2 細胞 (3.0×10^5 cells) に前述のように遺伝子導入し、6 cm dish に播種した。遺伝子導入した細胞は、遺伝子導入 2 日後に刺激試薬 (10 nM GnRH、50 mM KCl) を添加した HEPES 緩衝液 3 ml で刺激した。HEPES 緩衝液の組成は、20 mM HEPES、3.6 mM NaHCO₃ (191-01305, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、5 mM glucose (049-31165, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、140 mM NaCl (191-01665, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、1.2 mM KH₂PO₄ (169-04245, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、2.4 mM MgSO₄ (131-00405, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、4.8 mM KCl、0.1% (v/v) BSA、2 mM CaCl₂ (038-24985, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) である。緩衝液はすべて回収後、分泌したガウシアルシフェラーゼを濃縮するために Amicon Ultra-15 10K filter (UFC901024, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) を使用した。Amicon Ultra-15 10K filter により 20 倍に濃縮されたサンプル 150 μ l のうちの 25 μ l を、0.1% (v/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) (191-07145, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) のポリアクリルアミドゲル電気泳動に使用した。細胞のライセートは下記の通り用意した。細胞は PBS (-) で洗浄し、50 mM Tris (207-06275, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、30 mM NaCl、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (311-90075, NIPPON GENE CO., LTD., Tokyo, Japan)、0.1% (v/v) SDS、1% (v/v) Triton® X-100、1 mM NaF (S7920, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)、10% (v/v) glycerol (075-00616, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、0.5% (v/v) aprotinin (A1153, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)、1% (v/v) leupeptin (4041, PEPTIDE INSTITUTE, INC., Osaka, Japan)、0.5% (v/v) pepstatin (4397, PEPTIDE INSTITUTE, INC., Osaka,

Japan)、0.2% (v/v) PMSF (P7626, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)、1% (v/v) PNPd (71768, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)、5% (v/v) Na₃VO₄ (S6508, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) を含んだ pH 7.5 の lysis buffer 200 μ l で溶解した。タンパク質の総量は、Takara BCA protein assay kit (T9300A, Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて測定した。細胞上清およびライセート (タンパク質 5 μ g/lane) は、0.1% SDS のポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、Immobilon-P transfer membrane (IPVH00010, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。メンブレンは、TBS-T で洗浄後、4% (w/v) Block Ace Powder (UK-B80, DS Pharma Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan) で 1 時間ブロッキングした。TBS-T (20 mM Tris、150 mM NaCl、0.1% (v/v) Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (166-21115, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)) は、pH 7.4 に調整した。再度 TBS-T で洗浄し、rabbit anti-GLuc Antibody (1:5000; E8023S, New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) を用いて、4°Cで一晩インキュベートした。TBS-T で洗浄後、メンブレンを Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey (NA934-1ML, GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) を用いて、室温で 3 時間インキュベートし、再び TBS-T で洗浄後、Western Lightning® Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate (NEL104001EA, PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA) と ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA, USA) を用いて検出した。

2-2-8 酵素結合免疫測定 (ELISA)

L β T2 細胞 (3.0×10^5 cells) を 24 ウェルプレートに播種し、アンチドを添加、もしくは添加していない無血清培地 (300 μ l/well) を用いて、4 時間インキュベートした。その後、刺激試薬 (10nM GnRH、50mM KCl) を含んだ無血清培地を 200 μ l 加え、さらに 4 時間インキュベートした。刺激後、培養液を 150 μ l 回収

し、172 g で 5 分間遠心し、上清を回収した。L β T2 細胞中の LH 量を測定するために、細胞を 1% (v/v) Triton® X-100 (T8787, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) を含んだ PBS (-) 100 μ l で溶解した。上清中および細胞中の LH 量は、rat LH ELISA kit (S-type) (AKRLH-010S, Shibayagi Co. Ltd., Gunma, Japan) を使用して測定した。

2-2-9 免疫組織染色

免疫組織染色は 2015 年の Nakakura らの報告と同様の方法で行った[Nakakura *et al.* 2015]。pCMV-Gluc2 もしくは pcDNA3.1 ベクターを前述のように遺伝子導入し、poly-D-lysine (P6407, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) でコートしたカバーガラス上で培養した L β T2 細胞を使用した。細胞は 10% (w/w) formalin を含む PBS (-) を用いて室温で 15 分間固定し、3 回 PBS (-) で洗浄後、0.1% Triton を含んだ PBS (-) を用いて室温で 2 回 10 分間処理した。細胞は rabbit anti-GLuc antibody (1:100)、mouse monoclonal antibody against ovine LH β (1:1000) [Nakakura *et al.* 2009]を、それぞれ 1% BSA を含んだ PBS (-) で 2 時間インキュベートした。一次抗体の付加後、PBS (-) で細胞を 3 回洗浄し、Cy3-labeled affinity-purified donkey anti-rabbit IgG (1:600; 711-165-152 , Jackson Immunoresearch, PA, USA)、Alexa 488-labeled affinity-purified donkey anti-mouse IgG (1:400; 715-545-150, Jackson Immunoresearch, PA, USA) を用いて、室温で 1 時間、染色した。2 次抗体溶液は 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; D212, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を含んでおり、核を対比染色した。細胞を PBS (-) で洗浄し、Lab Vision™ PermaFluor™ Aqueous Mounting Medium (TA-030-FM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で封入し、共焦点レーザー走査顕微鏡システム (A1, Nikon, Tokyo, Japan) を使用して観察した。

2-2-10 細胞内カルシウム濃度測定

細胞内カルシウム濃度の変化は、Fura 2-AM (F015, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いた方法により測定した。LβT2 細胞 (3.0×10^5 cells) を回収し、1.5 μM Fura 2-AM を添加した無血清培地を 5 ml 加え、37°C で振とうしながら 20 分間インキュベートした。遠心後、上清を除去し、HEPES 緩衝液を 5 ml 加え、再び遠心した。遠心後、上清を除去し、HEPES 緩衝液を 15 ml 加え、刺激試薬 (HCl、300 nM 塩化銅 (039-04135, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、25 nM GnRH) を加えた際の 540nm の蛍光の強度の変化 (340 nm および 380 nm の励起) を分光蛍光光度計 (FP-8200, JASCO, Tokyo, Japan) を使用して測定した。

2-2-11 データ表示

すべての実験は 2 回もしくは 3 回以上行った。他に特に記載がない限り、3 つ以上の異なる細胞のバッチからの結果を平均±標準誤差として示した。統計的有意性は、ANOVA によって評価した。値は $p < 0.05$ を有意とした。

2-3 結果

2-3-1 ゴナドトロフにおける OGR1 の発現

2014 年の Horiguchi らの報告により、ラット下垂体前葉において OGR1 が発現していることが報告されている[Horiguchi *et al.* 2014]。Horiguchi らは下垂体前葉の非ホルモン産生細胞である S100 β 陽性細胞に着目していたが、私は前述の仮説を検証するため、ゴナドトロフに着目した。ゴナドトロフの解析には、マウスゴナドトロフ株である L β T2 細胞がよく用いられている[Windle *et al.* 1990]。

L β T2 細胞は、GnRH 受容体や LH α および β サブユニットを発現しており、GnRH に応答して LH を分泌する。そして、この分泌は GnRH やステロイドホルモンによって調節されるなどゴナドトロフの特徴を有している[Turgeon *et al.* 1996]。

そこで L β T2 細胞に OGR1 が発現しているのかを RT-PCR を用いて調べた。その結果、図 6 に示すように OGR1 の発現が検出された。そこで私は L β T2 細胞を用いて、細胞外 pH の低下による OGR1 の活性化が LH 分泌にどのような影響を及ぼしているのかを調べることにした。

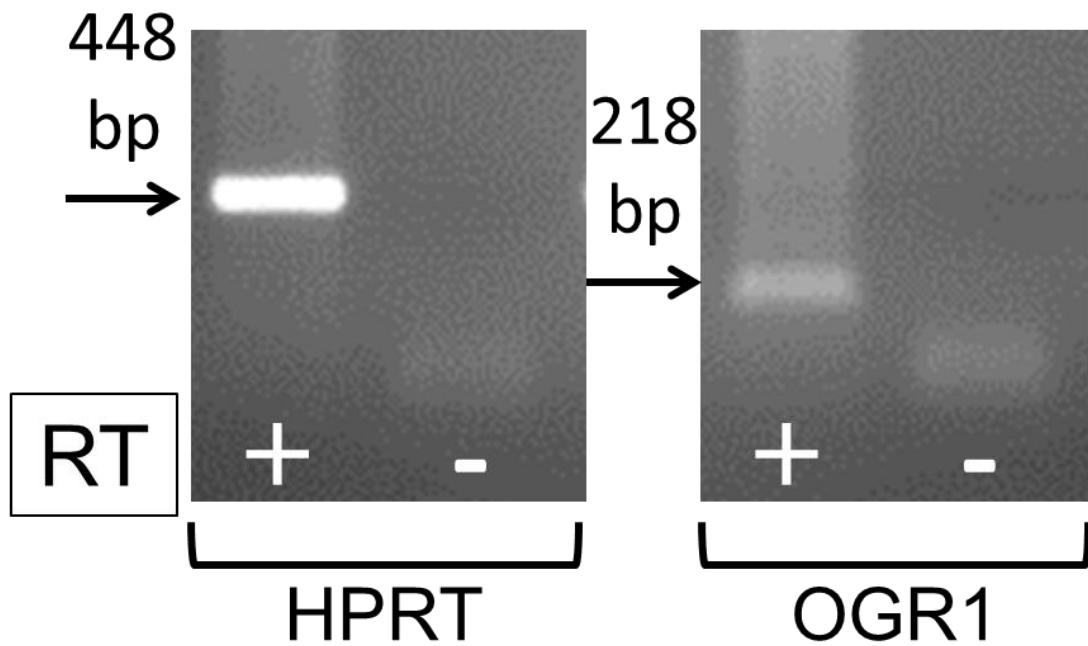


図 6 LβT2 細胞に発現する OGR1

LβT2 細胞から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作製した。作製した cDNA を基質として RT-PCR を行い、OGR1 の発現を検出した。またコントロールとしてハウスキーピング遺伝子である HPRT も同様にして検出した。詳細は「材料と方法」を参照。

2-3-2 ホルモン分泌を検出する簡便なアッセイ系の構築

ホルモン産生細胞株から培養液中へと放出されたホルモンの検出および定量化には、放射性免疫測定 (RIA) や ELISA が用いられてきた。これらの方法は標的ホルモンの検出および定量化に高い特異性と感度を示すが、標的ホルモンに特異的な抗体が必要である。加えてこれらの方法は解析結果を得るまでに時間がかかり、RIA に関してはさらに放射能を使用する必要がある。そこで私は OGR1 がホルモン分泌応答にどのように関与するのかを、より簡便に検出する方法の開発をまず行った。

ガウシアルシフェラーゼは、海洋性動物プランクトン的一种、*Gaussia Princeps* 由来の分泌型ルシフェラーゼである。ガウシアルシフェラーゼを用いる利点として、活性の測定に細胞溶解が不要であり経時的に培養上清中の分泌されたルシフェラーゼの活性を簡便に測定できること、同一サンプルを PCR や ELISA などの他の実験に転用可能であることなどが挙げられる。そこでガウシアルシフェラーゼが、ホルモン分泌のリアルタイムな検出に使用できるのかどうかをまず調べた。

2-3-2-1 GnRH 刺激によるガウシアルシフェラーゼ活性の増加

ガウシアルシフェラーゼを L β T2 細胞に過剰発現させると、培養液中のガウシアルシフェラーゼ活性は、刺激なしの状態でも 2 時間、経時的に増加した。その活性の増加は、GnRH もしくは KCl によって細胞が刺激された際にさらに増加した (図 7A)。実際にこの活性の増加が、培養液中へのガウシアルシフェラーゼタンパク質の分泌の増加を反映しているのかを調べたところ、培養液中へのガウシアルシフェラーゼタンパク質の分泌が増加していることが明らかとなっ

た (図 7C)。一方、GnRH もしくは KCl によるガウシアルシフェラーゼ活性の増加は、非ホルモン分泌細胞である NIH3T3 細胞では検出されなかった (図 7B) ことから、この活性の増加分は刺激によるホルモン分泌を反映するものと考えられた。

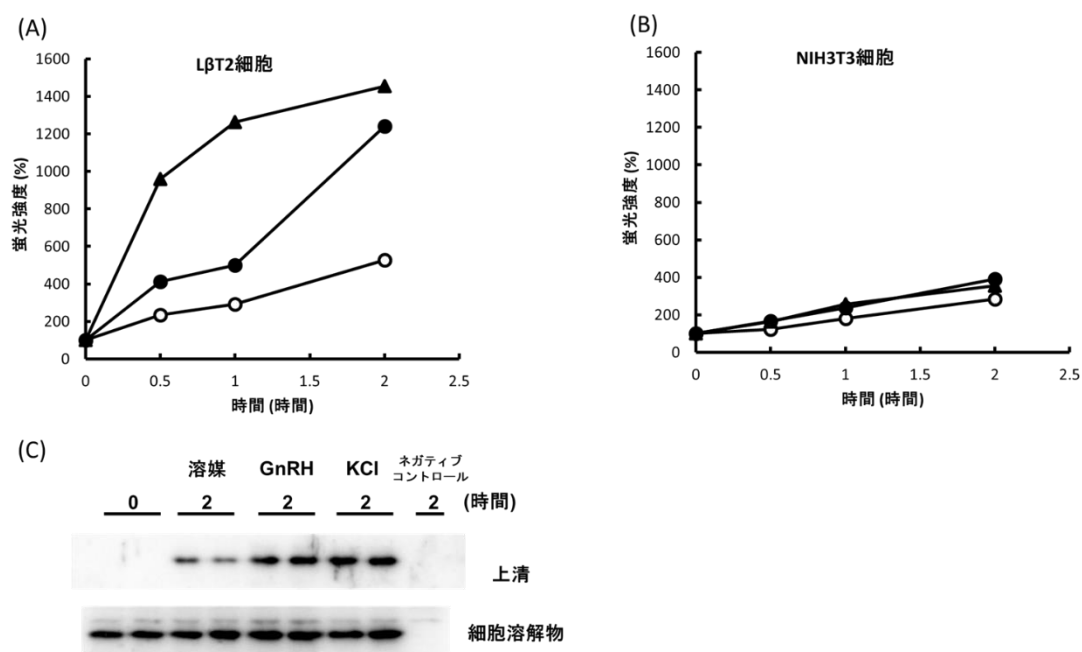


図 7 ガウシアルシフェラーゼ過剰発現細胞の培養液中のガウシアルシフェラーゼ活性およびガウシアルシフェラーゼタンパク質の増加

(A、B) LβT2 細胞もしくは NIH3T3 細胞に pCMV-Gluc2 を遺伝子導入した。ガウシアルシフェラーゼを過剰発現させた細胞を刺激物なし (○)、10 nM の GnRH (●) もしくは 50 mM の KCl (▲) 存在下で図に示す時間、培養した。「材料と方法」に記した手順でガウシアルシフェラーゼ活性を測定した。(C) ガウシアルシフェラーゼを過剰発現させた LβT2 細胞もしくはベクターコントロールを刺激物なし、GnRH もしくは KCl 存在下で 2 時間刺激した。培養液中および細胞内のガウシアルシフェラーゼタンパク質は、ガウシアルシフェラーゼ抗体を用いて検出した。

2-3-2-2 ガウシアルシフェラーゼ活性の増加に対する GnRH 受容体アンタゴニストの効果

実際に GnRH によるガウシアルシフェラーゼ活性の増加が、GnRH 受容体を介したものであるのかを次に調べた。GnRH 受容体のアンタゴニストであるアンチドにより GnRH によるガウシアルシフェラーゼ活性の増加は阻害されたことから、この増加は GnRH 受容体を介しているものであることが示された(図 8A)。このガウシアルシフェラーゼ活性の増加が GnRH 受容体を介したゴナドトロピンの分泌を反映しているのかを調べるために、次に私は ELISA を用いて培養液中の LH 量を測定した。その結果、アンチドは GnRH による LH の分泌をガウシアルシフェラーゼ活性と同様に阻害した。KCl は電位依存性カルシウムイオンチャンネルを直接活性化し、GnRH 受容体の活性化を介さずに L β T2 細胞の LH の分泌を増加させる。アンチドは KCl による LH の分泌(図 8B) やガウシアルシフェラーゼ活性の増加(図 8A) を阻害しなかった。したがって、GnRH 刺激によるガウシアルシフェラーゼ活性の増加は、同刺激による LH の分泌を反映しているものであることが示された。GnRH によるガウシアルシフェラーゼ活性の増加は 0.01 nM の GnRH から検出され、10 nM まで濃度依存的に増加した(図 8C)。この検出範囲は、本研究で使用した ELISA での検出可能範囲(0.01 nM~3 nM)と同程度であった。すなわちガウシアルシフェラーゼ法は ELISA に匹敵する感度を有することが明らかとなった。

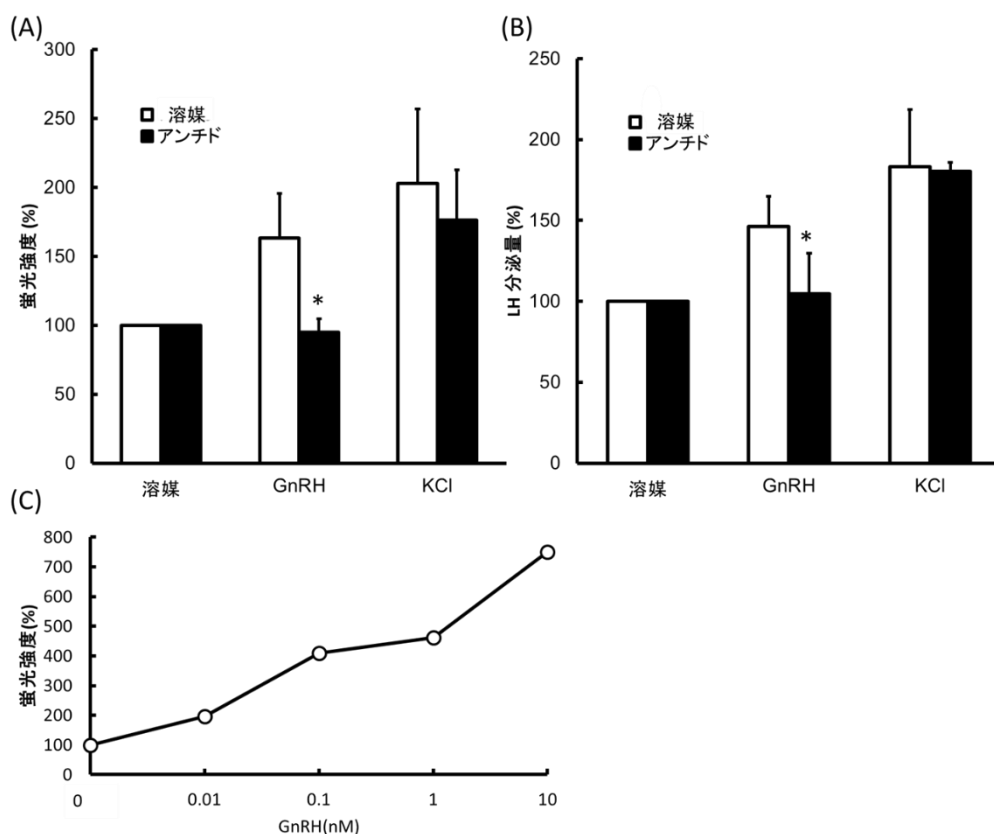


図 8 L β T2 細胞における GnRH によるガウシアルシフェラーゼ活性もしくは LH 分泌促進に対するアンチドの効果

(A) L β T2 細胞に pCMV-Gluc2 を遺伝子導入し、ガウシアルシフェラーゼを過剰発現させた。過剰発現細胞を 10 nM の GnRH もしくは 50 mM の KCl 存在下で 2 時間、100 nM のアンチド存在下 (黒) あるいは非存在下 (白) で刺激した。結果は刺激なしの値を 100% として示した。(B) L β T2 細胞を 10 nM の GnRH もしくは 50 mM の KCl 存在下で 4 時間、100 nM のアンチド存在下 (黒) あるいは非存在下 (白) で刺激した。培養液中に分泌された LH 量を、「材料と方法」で述べたように測定した。刺激なしの値を 100% として示した。* は分泌された LH 量がアンチド処理により有意に減少したことを示す。(P<0.05) (C) 図に示す GnRH 濃度におけるガウシアルシフェラーゼ活性増加を GnRH 刺激なしの値を 100% として示した。

2-3-2-3 ガウシアルシフェラーゼの細胞内局在

前述のように **GnRH** 刺激によるガウシアルシフェラーゼ活性の増加は、**LβT2** 細胞からのホルモン分泌を反映している可能性がある。そこで **LβT2** 細胞内でガウシアルシフェラーゼと **LH** が共局在しているのかどうかを免疫組織染色を用いて調べた。その結果図 9 に示すように、ガウシアルシフェラーゼは **LH** と部分的に共局在していることが明らかになった。

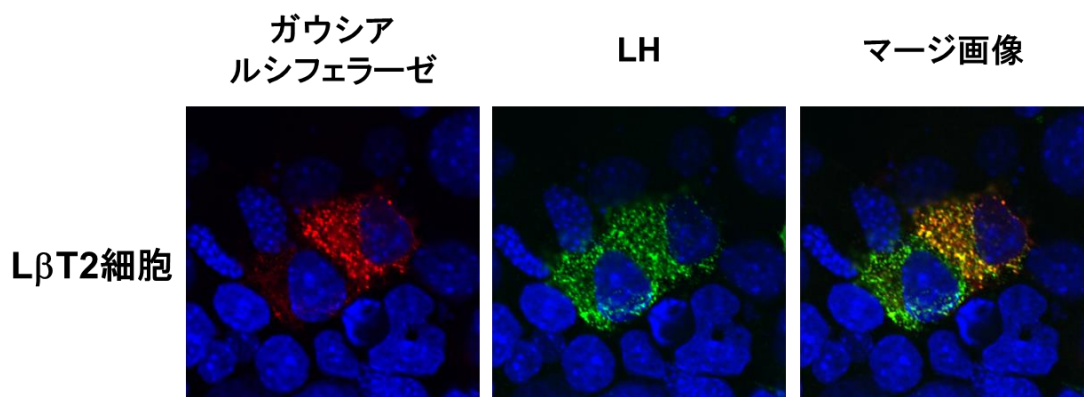


図9 ガウシアルシフェラーゼ抗体（赤）、LHβ抗体（緑）を用いたガウシアルシフェラーゼを過剰発現するLβT2細胞の免疫組織染色

免疫組織染色は「材料と方法」に従って行った。マージ画像は、LβT2細胞に発現したガウシアルシフェラーゼタンパク質とLHが部分的に共局在（黄）していることを示す。細胞核はDAPI（青）で染色した。

2-3-3 LβT2 細胞からのホルモン分泌に対する OGR1 の役割

2-3-3-1 pH 低下に伴う細胞内カルシウム濃度の変化

前述の結果から、LβT2 細胞からのホルモン分泌の検出に、ガウシアルシフェラーゼが使用できることが明らかとなった。OGR1 はプロトンによって活性化されること、G タンパク質のうち G_q タンパク質を活性化し、イノシトールリン酸の産生により細胞内カルシウム濃度を上昇させることが報告されている [Ludwig *et al.* 2003, Tomura *et al.* 2005a]。またプロトンによる OGR1 の活性化に対して、銅イオンが OGR1 のアンタゴニストとして作用することも報告されている [Ludwig *et al.* 2003]。図 10 (A) に示すように、細胞外 pH の低下により LβT2 細胞内の一過性のカルシウム濃度の上昇が観察された。またこの細胞内カルシウム濃度の上昇は、銅イオンによって有意に抑制された (図 10B)。一方、銅イオンによる細胞内カルシウム濃度の上昇の抑制は、GnRH による細胞内カルシウム濃度の上昇には影響を及ぼさなかった (図 10C、D)。このことから、銅イオンは細胞外 pH の低下による細胞内カルシウム濃度の上昇、すなわち OGR1 を介した細胞内カルシウム濃度の上昇を特異的に抑制したものと考えられた。これらの結果は、LβT2 細胞に発現する OGR1 が実際にプロトンを感知して細胞応答を引き起こすことを示している。

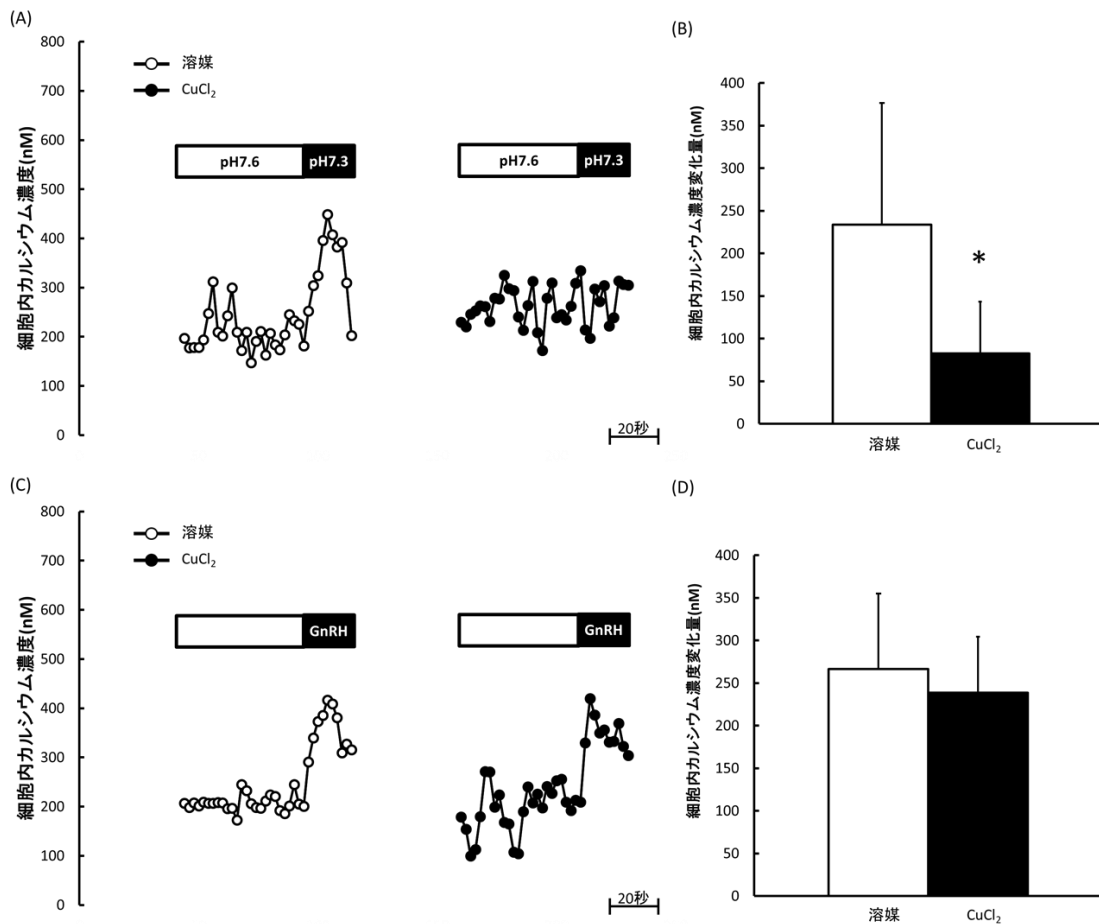


図 10 LβT2 細胞における細胞外 pH 低下による細胞内カルシウム濃度の上昇

LβT2 細胞において細胞外 pH を低下させた場合 (A) と 25 nM の GnRH を添加した場合 (C) の細胞内カルシウム濃度変化を Fura 2-AM により測定した (○)。また 300 nM の塩化銅存在下での細胞内カルシウム濃度変化も同様に測定した (●)。細胞内カルシウム濃度変化の結果は複数回行った実験結果のうち、代表例を示した。(B、D) プロトン刺激もしくは GnRH 刺激による細胞内カルシウム濃度の変化量。変化量は、応答最大値から刺激前の細胞内カルシウム濃度を引いた値として算出した。結果は 7 回の実験結果の平均値±標準誤差で示した。*は塩化銅の添加により、細胞内カルシウム濃度変化が有意に低下したことを示す (P<0.05)。

2-3-3-2 ガウシアルシフェラーゼを用いた L β T2 細胞からの分泌応答の解析

L β T2 細胞に発現する OGR1 がホルモン分泌に関与するのかどうかを、L β T2 細胞にガウシアルシフェラーゼを発現させ測定した (図 11A)。図 11 (B) に示すように、pH 7.6 の状態では OGR1 の過剰発現により GnRH 刺激によるガウシアルシフェラーゼ活性が変化することはなかった。GnRH 刺激によるガウシアルシフェラーゼ活性の変化量は、アンチド存在下、非存在下での活性の差として求めた (図 11C)。一方、pH 6.6 という条件下では、OGR1 を過剰発現させた細胞では、GnRH 刺激によるガウシアルシフェラーゼ活性の変化量がベクターを導入したコントロール細胞のものに比べて有意に減少した (図 11C)。この結果は酸性条件下では OGR1 の活性化により、GnRH 刺激由来のホルモン分泌が OGR1 由来の分泌へと変化した可能性を示唆している。

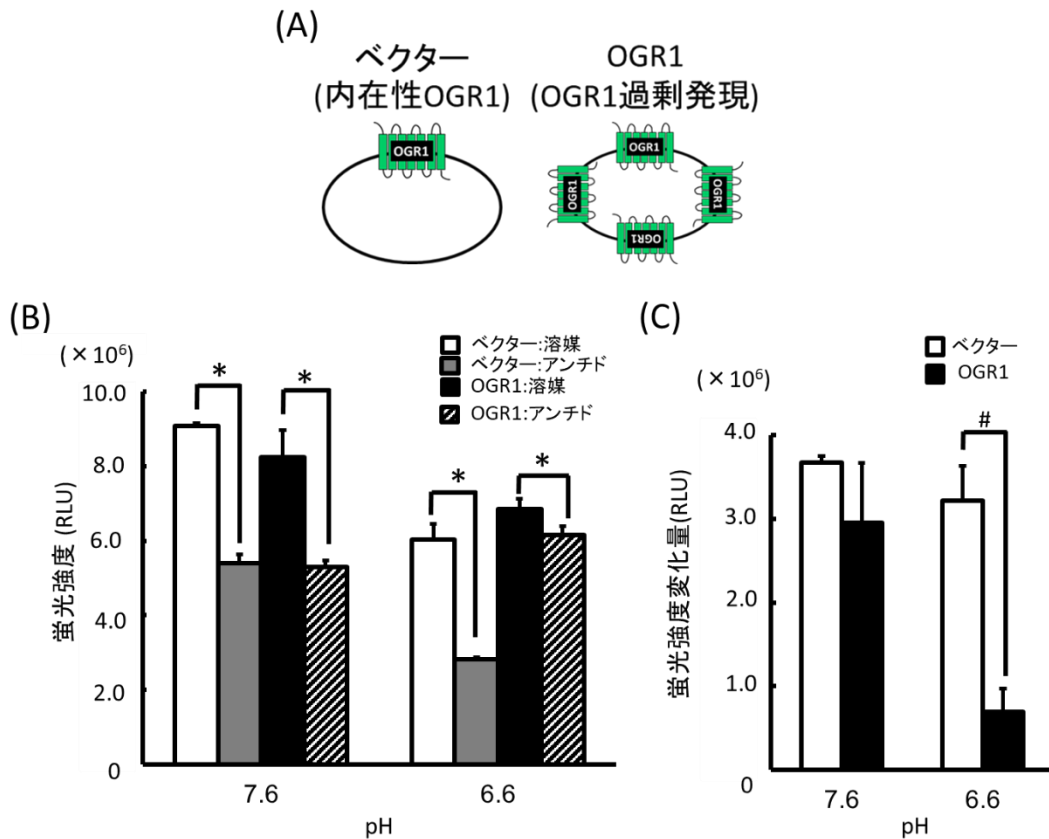


図 11 L β T2 細胞における GnRH を介したガウシアルシフェラーゼ活性の変化に対する OGR1 の関与

(A) L β T2 細胞に pCMV-Gluc2 とベクターもしくはヒト OGR1 発現ベクターを遺伝子導入し、ガウシアルシフェラーゼまたは OGR1 を発現させた。(B) それぞれの細胞を図に示すような pH 条件下で 25 nM の GnRH で 2 時間刺激した。その際、100 nM のアンチド存在下あるいは非存在下で刺激した。培養液中のガウシアルシフェラーゼ活性は「材料と方法」に述べたように測定した。*はアンチドにより活性が有意に減少したことを示す (P<0.05)。(C) ベクター導入細胞および OGR1 過剰発現細胞において、図に示す pH 条件下での GnRH 刺激由来の活性の変化を (B) を用いて算出した。GnRH 刺激由来の活性は、アンチド非存在下でガウシアルシフェラーゼ活性から存在下での活性を差し引いて求めた。#は活性変化に有意な差があることを示す (P<0.05)。

2-4 考察

本研究の結果、OGR1 が細胞外 pH 低下時に、GnRH 刺激によるゴナドトロフからのホルモン分泌（ガウシアルシフエラーゼ活性）を修飾する可能性が示唆された。図 11 の結果より、生理的 pH よりアルカリ条件下では、L β T2 細胞に発現する OGR1 を増加させても GnRH 刺激によるホルモン分泌に影響を与えなかったが、酸性条件下では分泌の全体量はベクターコントロールのものと差がないにも関わらず、GnRH 刺激によるホルモン分泌の割合が減弱していた。この結果は、酸性条件下では L β T2 細胞での GnRH 刺激によるホルモン分泌が OGR1 刺激によるホルモン分泌に変化している可能性を示唆している（図 13）。ちなみに、コントロールベクター細胞では pH の低下に伴う分泌量の有意な差が観察されなかった（図 11）。この測定条件下では、内在性に発現する OGR1 による微細な分泌量の差が検出できなかった可能性がある。OGR1 は TNF α など、炎症性サイトカイン刺激によりその発現が増加することが知られている[de Vallière *et al.* 2015]。炎症時など pH が低下し各種サイトカインの濃度が高まっているときには、OGR1 の発現が亢進する可能性がある。OGR1 が関与する他のホルモン分泌としては、すい臓 β 細胞からのインスリン分泌が報告されている[Nakakura *et al.* 2012]。この報告ではグルコース刺激によるインスリン分泌が酸性条件下では OGR1 を介して増加することが示されている。今回の結果はインスリンの場合とは異なり、ホルモン分泌の総量が酸性条件下で増加するのではなく、その経路が OGR1 を介したものに变化する可能性を示唆している。この違いがホルモン産生細胞の種類の違いによるものなのかは、今後、他のホルモン産生細胞における OGR1 の作用解析の進展により、明らかとなっていくものと思われる。またこの違いは両方で用いられているホルモン測定系の違いによる可能性もある。インスリン分泌の測定にはインスリンの抗体を用いた ELISA が用いられている

が、今回はガウシアルシフェラーゼを利用した系を用いている。後述するようにガウシアルシフェラーゼを利用した系は ELISA 系に匹敵する感度と定量性を保持しているが、両者に差がある可能性も否定できない。この点に関しては今後、ガウシアルシフェラーゼを用いた結果が蓄積するにつれて、明らかとなっていくものと思われる。

本研究において、私はガウシアルシフェラーゼがホルモン産生細胞株である LβT2 細胞からのホルモン分泌をリアルタイムに検出できることを明らかにした。これまで細胞からのホルモン分泌を検出するためには、一般的に RIA や ELISA が用いられてきた。しかしながら、これらの検出方法は標的ホルモンの分泌を高い特異性および高感度で検出できるものの、標的ホルモンに特異的な抗体を用意する必要があり、また結果を得るために時間を要した。一方、本研究で用いたガウシアルシフェラーゼはホルモンに特異的な抗体をそれぞれ用意する必要がなく、ホルモン刺激による分泌応答を経時的にその活性増加として簡単に検出することが可能である (図 7A)。ガウシアルシフェラーゼを用いたホルモン分泌アッセイは、Min6 細胞からのインシュリン分泌の検出に用いられている [Suzuki *et al.* 2011]。この方法と私が今回報告した方法 [Satou *et al.* 2017] との違いは、Min6 細胞の報告ではインシュリンタンパク質の C 末端側にガウシアルシフェラーゼを融合したものをを用いているのに対して、私はガウシアルシフェラーゼそのものをを用いていることにある。今回の方法は融合たんぱく質を作製すると分泌できないホルモン、例えば ACTH などの分泌応答の検出にも利用できるという利点を有している。実際私は、ACTH 産生細胞株である AtT20 細胞を用いて ACTH の分泌応答を、ガウシアルシフェラーゼを用いて検出できることを示した [Satou *et al.* 2017]。

GnRH もしくは KCl によるガウシアルシフェラーゼ活性の増加は、培養液中に分泌されたガウシアルシフェラーゼ活性の増加の一部しか占めていない (図

7A)。これはこの細胞培養液中のガウシアルシフェラーゼ活性の大部分は構成的分泌経路を介してなされていることを示している。細胞には、図 12 のような構成的分泌と調節性分泌の異なる 2 つの分泌経路が存在する[Kelly 1985]。ホルモン分泌は、細胞が刺激を受けた時のみ分泌されるという調節性分泌経路を介して行われる。一方細胞には、アルブミンの分泌など、刺激にかかわらず構成的に分泌される構成的分泌経路が存在する。ホルモン産生細胞株ではアーティファクトとして、細胞の継代数の増加に伴い調節性分泌経路を介した分泌から、構成的分泌経路を介した分泌へと徐々にスイッチすることが知られている[Kayo *et al.* 1996]。ゴナドトロピンのうち LH は調節性分泌経路を介して分泌されるが、細胞の継代が進むとこのホルモンが構成的分泌経路を介して構成的に培養液中に分泌されるようになる。この培養によるアーティファクト、すなわち構成的分泌の亢進は、あらゆるホルモン産生細胞株を用いた実験で問題となっている。そのため今回の研究では、GnRH 受容体に対するアンチドを用いることにより、GnRH 刺激由来の分泌、すなわち調節性分泌によるホルモン分泌を測定した。

本研究によって、ゴナドトロフ株には OGR1 が発現し、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に影響を及ぼすことが明らかとなった。同様の現象が下垂体組織に存在するゴナドトロフにも起こり、生殖調節に影響を及ぼすものと予想される。実際にげっ歯類の下垂体に存在するゴナドトロフの一部に OGR1 の発現が観察されることを予備的に得ている。本研究では、もう一つの OGR1 アゴニストであるミネラルやモデュレーター活性をもつロラゼパムのゴナドトロフ株への影響は調べていない。これは今後の課題である。特にこれまで抗不安薬として使用されているロラゼパムにホルモン分泌調節作用があるのかどうかは、今後、この薬物の新たな作用を考えるうえで重要な知見となると思われる。

これまでに **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まだなされていない。本研究の細胞レベルの結果を個体レベルへの研究へと展開する場合、マウス体内の **pH** を人為的に変化させることは一般に困難であることが、**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困難を克服するために、より実験に適した動物を探索するため、他の動物種の **OGR1** の比較検討を行った。

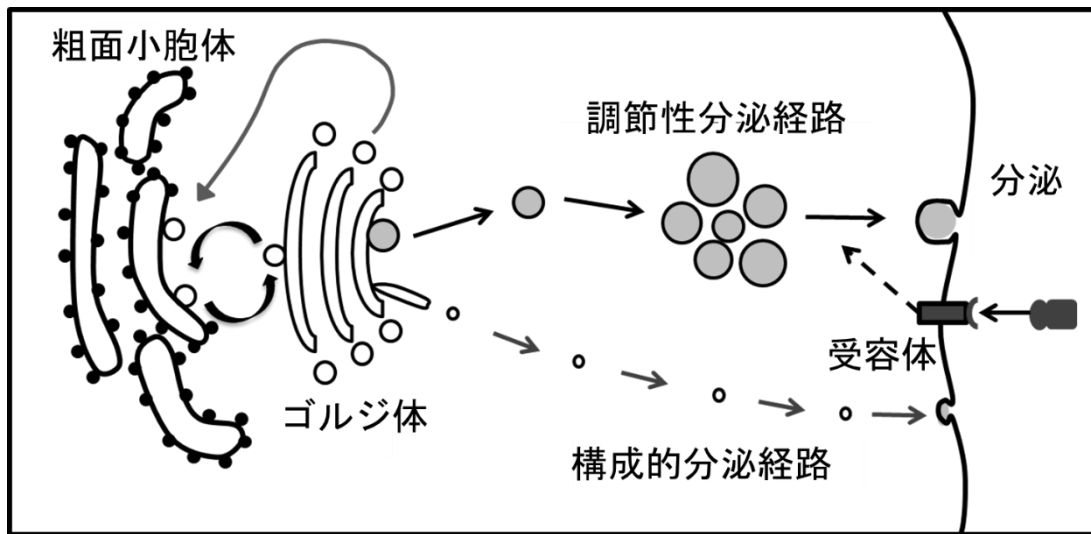


図 12 構成的分泌経路と調節性分泌経路

細胞の分泌経路には、構成的分泌経路と調節性分泌経路の 2 種類が存在する。構成的分泌経路は刺激にかかわらず構成的に分泌される分泌経路であり、調節性分泌経路は細胞が刺激を受けることにより分泌される分泌経路である。

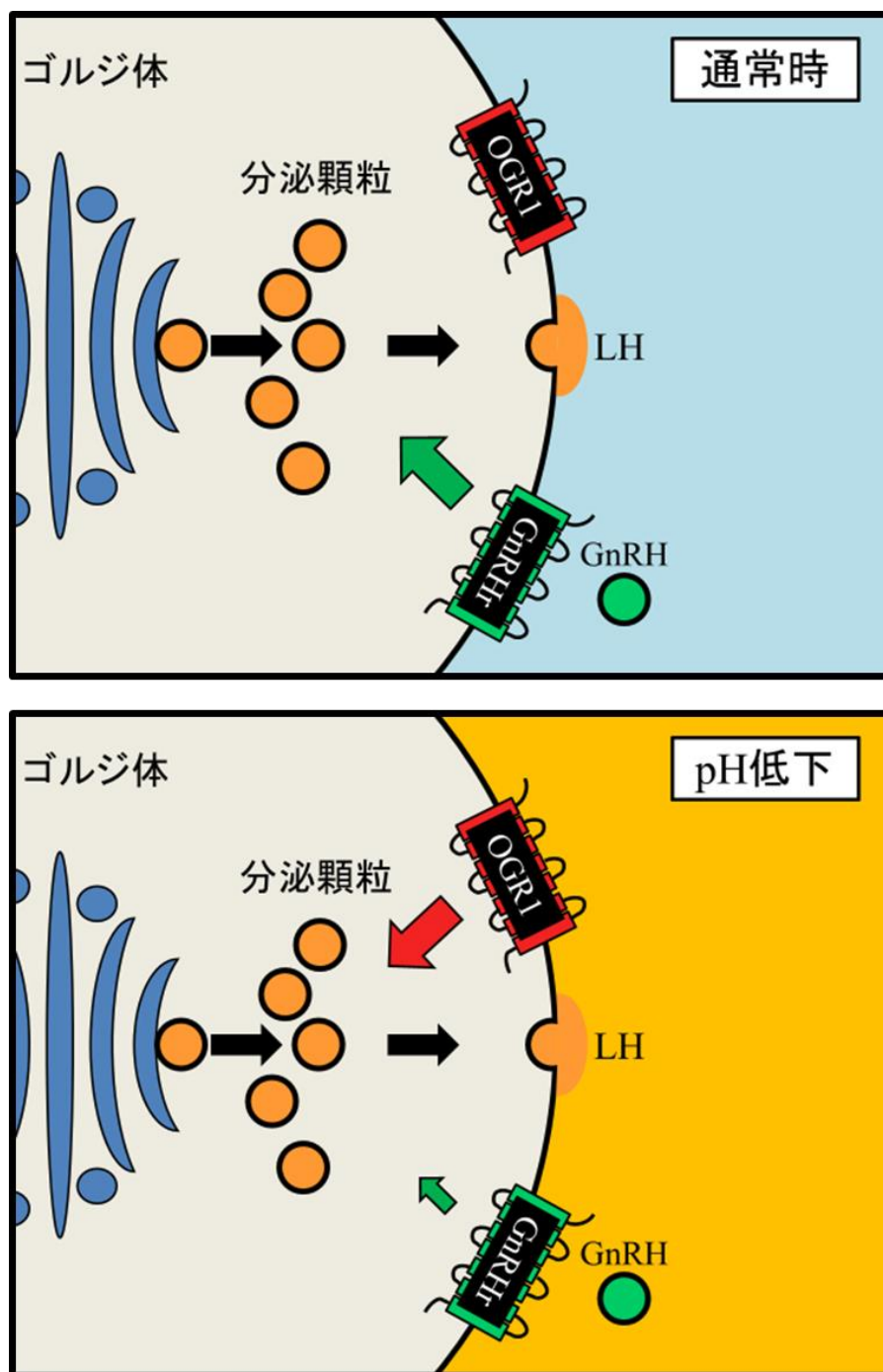


図 13 LβT2 細胞の細胞外 pH 低下による LH 分泌経路の変化

細胞外 pH が低下した際には LβT2 細胞に発現している OGR1 がプロトンを感じることによって活性化し、LH の分泌を促す経路が存在することが予想される。また細胞外 pH 低下に伴い、GnRH を介した分泌の促進は減弱する可能性がある。

第3章 ゼブラフィッシュ OGR1 の解析

3-1 緒言と目的

細胞レベルでの pH 低下に伴う OGR1 の作用解析に関しては、私たちのグループからのものを含めて、これまでにいくつかの報告がなされている (表 2) [Tomura *et al.* 2008, Wang *et al.* 2012, Iwai *et al.* 2007, Yang *et al.* 2006, Pereverzev *et al.* 2008, Horiguchi *et al.* 2014, Liu *et al.* 2010a, Tomura *et al.* 2005b, Mohebbi *et al.* 2012, Ichimonji *et al.* 2010, Matsuzaki *et al.* 2011, Kotake *et al.* 2014]。また個体レベルでの OGR1 の解析に関しても、私たちのグループからのものを含めて OGR1 遺伝子欠損マウスの報告がこれまでにいくつかなされている (表 2) [Li *et al.* 2009, Nakakura *et al.* 2012, Yan *et al.* 2014, Aoki *et al.* 2013]。しかしながらこれらの欠損マウスを用いた研究では、個体レベルでの pH 低下の実験結果は示されておらず、表現型そのままの観察結果となっている。したがって観察された表現型の変化が pH 低下による OGR1 の直接作用の結果なのか、それとも組織間の代償作用の結果なのかどうかは不明である。またさらに第 1 章で述べたように、ヒトやマウスの OGR1 はプロトン以外にミネラルや薬物によっても活性化されるなど、多様な刺激により活性化されることが近年明らかになっていることから、個体レベルでの表現型の変化がプロトンや他のどのような刺激の結果で起こっているのかも不明である。

このような問題点に対して新たにアプローチする手段はないかと考え、私はゼブラフィッシュに着目した。ゼブラフィッシュは脊椎動物のモデル生物として 1960 年代から使用されてきた。胚発生は母体外で進み、かつ胚が透明であることから、生体観察に適したモデル生物である。2013 年にはゼブラフィッシュの全ゲノム配列が解読され、約 70% がヒトと同様の遺伝子構造を持っており、

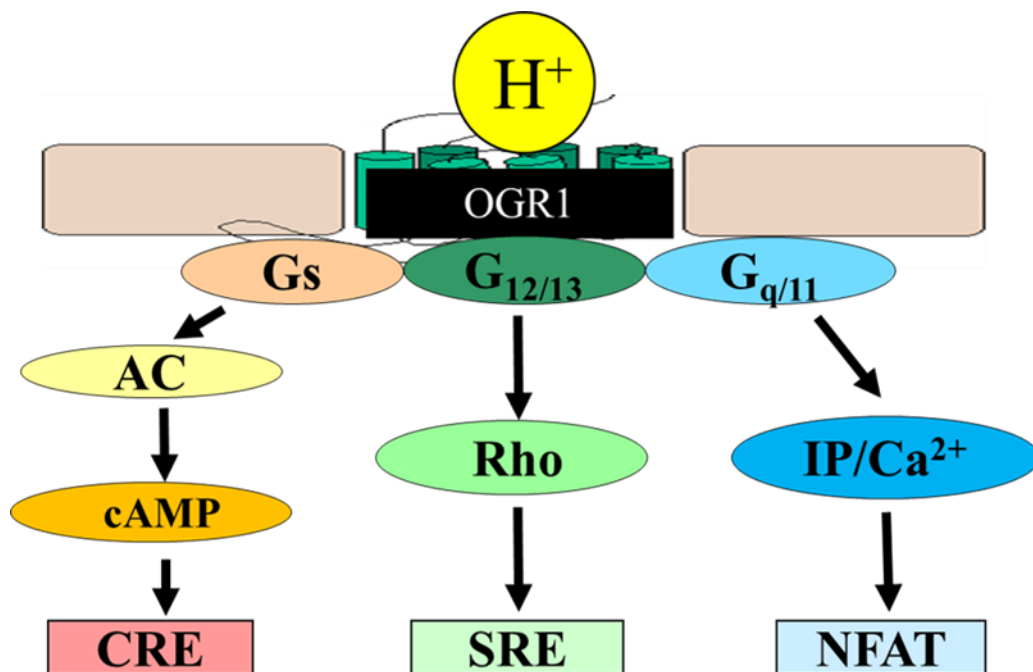
ヒト疾患と関係するとされる遺伝子の約 80%が相同遺伝子として保有されていることが明らかになっている[Howe *et al.* 2013]。近年ゼブラフィッシュは、マウスと同等の遺伝子操作が可能となりつつあることもこの動物を使用する利点である。ゼブラフィッシュの筋肉や目はヒトと似た特徴を持っている[Shi *et al.* 2017, St Clair *et al.* 2017]。さらにゼブラフィッシュは、筋ジストロフィーの解明にも用いられており[Gibbs *et al.* 2013]、がんや血管新生のメカニズムの解析においても重要なモデル生物として利用されている[Kirchberger *et al.* 2017, Ibrahim and Richardson 2017]。

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。特に哺乳類には存在しない魚の鱗は、骨のモデルとして使用されている[Carnovali *et al.* 2016, Mariotti *et al.* 2015]。鱗は哺乳類と異なり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なる。表 2 に示したように 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。そこでゼブラフィッシュを用いた OGR1 の解析、特にその鱗に着目した骨形成、骨代謝の解析が上記問題を克服する一助になると予想し、ゼブラフィッシュ OGR1 の解析を行うこととした。

ゼブラフィッシュ OGR1 の解析を行うために、まず OGR1 の相同遺伝子の探索をデータベースで行った。その結果、ゼブラフィッシュには、OGR1 相同遺伝子が存在した。しかしながらその機能に関する報告はなかった。そこで本研究で私は、この相同遺伝子産物がヒトやマウスの OGR1 と同様の機能を有するのかを、まず調べることにした。

これまでにプロトンヒト・マウスの OGR1 を介して、 $G_{q/11}$ /ホスホリパーゼ C (PLC) \cdot Ca^{2+} /NFAT 系、 G_s /cAMP/CRE 系、 $G_{12/13}$ /Rho/SRE 系を活性化することが報告されている [Ludwig *et al.* 2003, Mogi *et al.* 2005, Tobo *et al.* 2007] (図 14)。

プロトンによるヒト・マウスの OGR1 活性化には、受容体内の細胞膜外領域にある特定のヒスチジン残基が重要であることが明らかとなっている[Ludwig *et al.* 2003]。またこれらの OGR1 はミネラルによって、G_{q/11}/PLC・Ca²⁺系が活性化されることも報告されている[Abe-Ohya *et al.* 2015]。またロラゼパムはヒト・マウス OGR1 の活性化を修飾することが報告されている[Huang *et al.* 2015]



G_s , $G_{12/13}$, $G_{q/11}$: 三量体Gタンパク質
 AC : アデニル酸シクラーゼ
 Rho : 低分子量Gタンパク質
 IP : イノシトールリン酸
 CRE : cAMP応答配列
 SRE : 血清応答配列
 NFAT : 活性化T細胞核内因子

図 14 OGR1 を介した細胞内シグナル伝達経路

プロトンはヒト・マウス OGR1 を介して、 G_s /cAMP/CRE 系、 $G_{12/13}$ /Rho/SRE 系、 $G_{q/11}$ /PLC・ Ca^{2+} /NFAT 系経路を活性化する。

細胞レベルでのOGR1の表現型

概要	著者 発表年
骨芽細胞：PGE ₂ の産生	Tomura <i>et al.</i> 2008, Wang <i>et al.</i> 2012
破骨細胞：細胞分化、生存	Iwai <i>et al.</i> 2007, Yang <i>et al.</i> 2006, Pereverzev <i>et al.</i> 2008
下垂体前葉S100β細胞：IL-6の産生	Horiguchi <i>et al.</i> 2014
大動脈平滑筋：プロスタサイクリンの産生	Liu <i>et al.</i> 2010, Tomura <i>et al.</i> 2005b
腎臓上皮細胞：プロトン輸送体活性の調節	Mohebbi <i>et al.</i> 2012
気管支平滑筋：IL-6, CTGFの産生	Ichimonji <i>et al.</i> 2010, Matsuzaki <i>et al.</i> 2011
神経細胞株：cGMPの産生	Kotake <i>et al.</i> 2014

OGR1欠損マウスでのOGR1の表現型

概要	著者 発表年
破骨細胞形成の異常 腫瘍形成の減少	Li <i>et al.</i> 2009
グルコース刺激による インスリン分泌の減少	Nakakura <i>et al.</i> 2012
前立腺がんの浸潤の抑制	Yan <i>et al.</i> 2014
喘息性炎症と気道過敏の軽減	Aoki <i>et al.</i> 2013

持丸、戸村
明治大学農学部研究報告65, 9-16 (2015)

表 2 細胞レベル、個体レベルでの OGR1 の作用

これまでに報告されている OGR1 作用を、細胞レベルでの報告と個体レベルでの報告に分けて示した[持丸 and 戸村 2015]。細胞レベルでの報告では、細胞外 pH を低下させた際の応答に関する報告であるが、個体レベルでの報告では OGR1 を欠損させた際の表現型に関する報告である。

3-2 材料と方法

3-2-1 細胞培養

実験に用いた HEK293T 細胞は理研 BRC より提供された。細胞は 100 U/ml benzylpenicillin potassium、100 µg/ml streptomycin sulfate、10% (v/v) FBS を含んだ DMEM - low glucose を用いて、5% CO₂、37°C条件のインキュベーターで培養した。

3-2-2 受容体 cDNA プラスミドの準備と発現

ゼブラフィッシュ OGR1 (1048 bp, GenBank accession No. XM_009293224) のコード領域を、1 番目のメチオニンコドンの前にコザック配列 (CCACC) をつけて合成し (Eurofins Genomics, Tokyo, Japan)、pBApo-CMV Neo ベクターに組み込んだ。H4F はゼブラフィッシュ OGR1 の N 末端から 12、15、162、264 番目のヒスチジン残基をフェニルアラニン残基に置換した人工遺伝子であり、ゼブラフィッシュ OGR1 と同様に pBApo-CMV Neo ベクターに組み込んだ。ヒト OGR1 発現ベクター、ゼブラフィッシュ OGR1 発現ベクター、H4F 発現ベクター、pBApo-CMV Neo ベクター (3240, Takara Bio Inc., Shiga, Japan)、pCRE-luc (219076, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)、pSRE-luc、pNFAT-luc (219088, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) および pRL-TK は、Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent を用いて細胞に遺伝子導入した。ヒト OGR1 発現ベクターは第 2 章と同じものを使用した。

3-2-3 デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ

cAMP 応答配列 (cAMP response element, CRE)、血清応答配列 (serum response element, SRE)、活性化 T 細胞核因子 (Nuclear Factor of Activated T cells, NFAT) プロモーター活性は、The PathDetect Signal Transduction Pathway cis-Reporting Systems (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて測定した。HEK293T 細胞 (3.0×10^5 cells) に cis-レポーター、pRL-TK、それぞれの受容体発現プラスミドを Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent により遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞は 12 ウェルプレートもしくは 24 ウェルプレートに播種し、10% (v/v) FBS DMEM - low glucose で 12 時間 (12 ウェルプレートは 1 ml/well、24 ウェルプレートは 500 μ l/well)、無血清培地で 16 時間 (12 ウェルプレートは 1 ml/well、24 ウェルプレートは 500 μ l/well) 培養した。その後、刺激 pH もしくは刺激試薬 (塩化マンガン (II) (139-00722, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、硫酸ニッケル (II) (144-01172, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、塩化コバルト (II) (035-10982, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、塩化鉄 (III) (091-00872, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)、L- α -Lysophosphatidylcholine (LPC) (62963, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)、Sphingosylphosphorylcholine (SPC) (S4257, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)) をそれぞれ図に示すような濃度で添加した無血清培地に変え (12 ウェルプレートは 1 ml/well、24 ウェルプレートは 500 μ l/well)、6 時間インキュベートした。それぞれの細胞はインキュベート後、PBS (-) で 1 回洗浄し (12 ウェルプレートは 1 ml/well、24 ウェルプレートは 500 μ l/well)、Reporter Lysis Buffer (E3971, Promega, Madison, WI, USA) で溶解した (12 ウェルプレートは 100 μ l/well、24 ウェルプレートは 50 μ l/well)。ルシフェラーゼ活性は Dual-Luciferase® Reporter Assay System (E1980, Promega, Madison, WI, USA) を使

用して測定した。それぞれのウェルのホタルルシフェラーゼ活性（pCRE-luc、pSRE-luc、pNFAT-luc）は、レニーラルシフェラーゼ活性（pRL-TK）で標準化した。ホタルルシフェラーゼ活性とレニーラルシフェラーゼ活性の比率を、活性の指標として使用した。

3-2-4 細胞内カルシウム濃度測定

HEK293T 細胞（ 1.0×10^6 cells）にゼブラフィッシュ OGR1 発現ベクターもしくは pBApo-CMV Neo ベクターを、In Vitro 遺伝子導入装置（CUY21Pro-Vitro, Nepa Gene Co., Ltd., Chiba, Japan）を使用したエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。遺伝子導入 3 日後に、第 2 章と同様の方法で刺激試薬（HCl）を添加した際の細胞内カルシウム濃度測定を行った。

3-2-5 GloSensor™ cAMP アッセイ

HEK293T 細胞（ 3.0×10^5 cells）に pGloSensor™-22F cAMP プラスミド（E2301, Promega, Madison, WI, USA）、ヒト OGR1 もしくはゼブラフィッシュ OGR1 発現ベクターを Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent により遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞は 96 ウェルプレートに播種した（200 μ l/well）。遺伝子導入 2 日後に GloSensor™ cAMP Reagent（E1290, Promega, Madison, WI, USA）を使用して、刺激試薬添加後 6 分後の発光量を測定した。刺激試薬には、HCl、10 μ M ロラゼパム（SW-397, Sawai Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan）を使用し、500 μ M 3-Isobutyl-1-methylxanthine（IBMX; I5879, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA）も同時に添加した。

3-2-6 データ表示

すべての実験は3回以上行った。他に特に記載がない限り、3つ以上の異なる細胞のバッチからの結果を平均±標準誤差として示した。統計的有意性は、ANOVAによって評価した。値は $p < 0.05$ を有意とした。

3-3 結果

3-3-1 pH 低下に伴うゼブラフィッシュ OGR1 相同遺伝子産物を介した CRE、SRE、NFAT 系の活性化

まずゼブラフィッシュ OGR1 相同遺伝子産物（以下、ゼブラフィッシュ OGR1 と記す）が細胞外プロトンを感じて細胞内シグナル伝達経路を活性化させるかどうかを、HEK293T 細胞を用いて調べた。その結果、ゼブラフィッシュ OGR1 は細胞外 pH の低下に伴い、CRE、SRE、NFAT 系のすべての系を活性化した（図 15A）。なお、ベクターコントロールではこのような活性化が観察されなかったため、この活性化はゼブラフィッシュ OGR1 を介して引き起こされていることが明らかとなった（図 15A）。この結果は、ゼブラフィッシュ OGR1 はヒト・マウス OGR1 と同様に細胞外プロトンにより活性化されることを示している。実際に NFAT 系の活性化に PLC・Ca²⁺系が関与しているのかどうかを次に調べた。その結果、細胞外 pH の低下によりゼブラフィッシュ OGR1 を発現している細胞でのみ、一過性の細胞内カルシウム濃度の上昇が観察されたことから、ヒト OGR1 の場合と同様にゼブラフィッシュ OGR1 の活性化により、PLC・Ca²⁺系が活性化することが明らかとなった（図 15B）。

3-3-2 pH 低下に伴うゼブラフィッシュ OGR1 活性化とヒスチジン残基

ヒト OGR1 の細胞外の特定のヒスチジン残基は、プロトン感知に重要である [Ludwig *et al.* 2003]。ヒトとゼブラフィッシュ間の OGR1 のアミノ酸の相同性は 57%であった。ヒト OGR1 においてプロトン感知に重要な 5 つのヒスチジン残基のうち、4 つのヒスチジン残基がゼブラフィッシュ OGR1 に保存されていた

(図 16A)。これらのヒスチジン残基にプロトンを感じする役割があるのかを明らかにするために、これら 4 つのヒスチジン残基をフェニルアラニンに置換した変異体 (H4F) を作製し、細胞外 pH を pH 7.6 から pH 6.3 に低下させた際の CRE、SRE、NFAT 活性を調べた。その結果この変異体はこれら 3 種類のすべての系において、ほとんど活性を示さなかった (図 16B)。したがって、プロトン感知に重要なヒスチジン残基はヒトとゼブラフィッシュ間で保存されていることが明らかとなった。

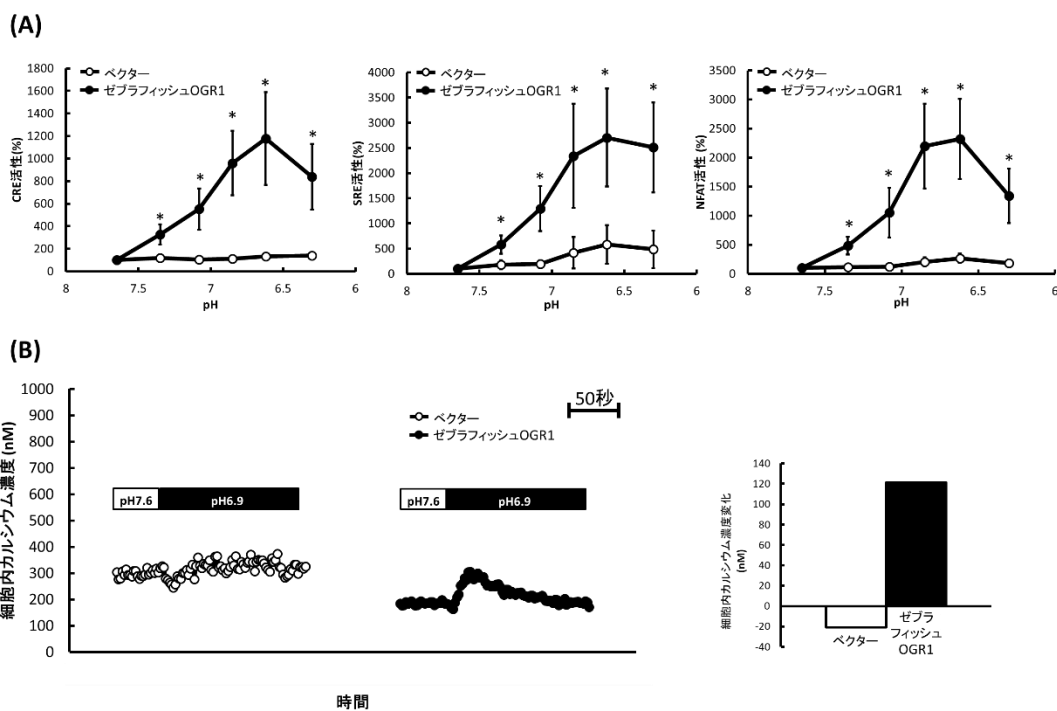


図 15 ゼブラフィッシュ OGR1 の発現による pH 低下に伴う CRE、SRE、NFAT 系の活性化 (A) と細胞内カルシウム濃度の上昇 (B)

ゼブラフィッシュ OGR1 発現ベクター (●) もしくはベクターコントロール (○) を pRL-TK と pCRE-luc、pSRE-luc もしくは pNFAT-luc とともに HEK293T 細胞に導入した。細胞は図に示す pH 条件下で 6 時間インキュベートし、CRE、SRE、NFAT プロモーター活性を測定した。詳細は「材料と方法」を参照。結果は平均値 ± 標準誤差で示し、* はゼブラフィッシュ OGR1 の値がベクターの値と比べて、有意であることを示す (P < 0.05)。(B) ゼブラフィッシュ OGR1 発現ベクター、ベクターを遺伝子導入した細胞内のカルシウム濃度を、Fura 2-AM を用いて測定した。詳細は「材料と方法」を参照。左側は代表的なトレースを示し、右側はその際の pH 刺激前後の細胞内のカルシウム濃度の変化量を表す。3 回以上行った実験においても同様の結果を示した。

(A)

```
hOGR1 1 MGNITADNSMSCTIETHTIETLAPVVVYVTVLVVGFANCLSLYFGYLQIKARNELGVYL 60
zOGR1 1 ---MNMSEEQINCTINFDIETIYLFVSVAYLLVLLVGLFANAYSLSYHAWLQIKARNELGVYL 57

I
hOGR1 61 CNLTVADLFYICSLPFWLQYVLCIDNWSHGDLSQCQVCGILLIYENIYISVGFLLCCISVDRY 120
zOGR1 58 LNLTIISDLLYLGSLPLWLQYIFQGDNWSGSEWLQCGFLLIYENIYVSIIGFLLCCISIDRY 117

II III
hOGR1 121 LAVAHFFRFHQFRTLKAAVGVSVVIWAKELTTSIYFLMHEEVIEDENQIRVCFEHYPIQA 180
zOGR1 118 LAVVYFFRFSAFRTVRAATLVSTVVWLKELAVGVVFLHKELSRDKIINQSVCFEHYPMKT 177

IV
hOGR1 181 WQRAINYYRFLVGLFPICLLLASYQGILRAVRRSHGTQKSRKDIQRLVLTSTVVIPLAC 240
zOGR1 178 WEYQINYYRFYIGFLFPLGILSVYFRVLRVAVGKSAQTSTQKIRIKYLVSTIIVFLVC 237

V VI
hOGR1 241 FLPYHVVLLVRSVWEASCDFAKGVFNAYEFSLLLTSTFNCVADPVLVCFVSETTHRDRLARL 300
zOGR1 238 FSPYHIFLLVRTIFERDCNFIESIFNYEYEFSLLTSTFNCVADPALYCFISESAQKGIQKA 297

VII
hOGR1 301 RGACLAFLTCSTRTGRAREAYPLGAPEASGKSGAQGEEPELLTKLHPAFQTPNSPGSGGF 360
zOGR1 298 HDACTRVFCCSKSHGRFNTHSTELAVTNDNVGTGSVVLLLQIKTEV----- 345

hOGR1 361 TGRLLA 365
zOGR1 345 ----- 345
```

(B)

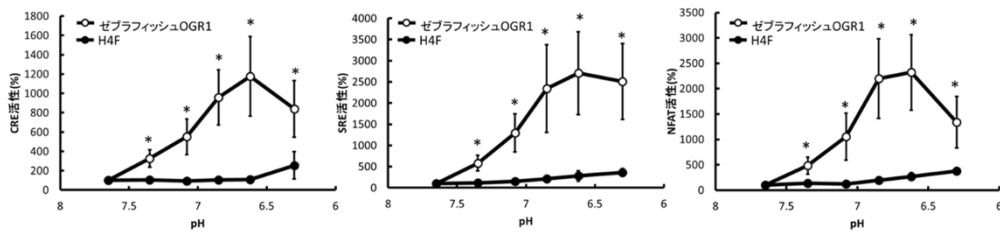


図 16 ヒト OGR1 とゼブラフィッシュ OGR1 間のアミノ酸配列の比較 (A) とゼブラフィッシュ OGR1 のプロトン感知に重要と予想されるヒスチジン残基をフェニルアラニン残基に置換した変異体による CRE、SRE、NFAT 活性への影響 (B)

(A) ヒト OGR1 (hOGR1) においてプロトン感知に重要なヒスチジン残基およびゼブラフィッシュ OGR1 (zOGR1) においてプロトン感知に重要であると予想されるヒスチジン残基を白抜きで示した。下線部は細胞膜貫通領域を示す。(B)

(A) で示したゼブラフィッシュ OGR1 のプロトン感知に重要であると予想されるヒスチジン残基すべてをフェニルアラニンに置換した変異体 H4F を作製した。H4F (●) もしくはゼブラフィッシュ OGR1 発現ベクター (○) を pRL-TK と pCRE-luc、pSRE-luc もしくは pNFAT-luc とともに導入した。細胞は図に示す pH で 6 時間インキュベートし、CRE、SRE、NFAT 活性を測定した。結果は平均値 ± 標準誤差で示し、* はゼブラフィッシュ OGR1 の活性が H4F の活性と比べ、有意であることを示す ($P < 0.05$)。

3-3-3 ミネラルによるゼブラフィッシュ OGR1 の活性化

2015 年に Abe-Ohya らにより、ヒト・マウス OGR1 がプロトンのみならず、ミネラルによっても活性化されるという報告がなされた。我々のグループではゼブラフィッシュ OGR1 がプロトン以外のリガンドにより活性化する結果を予備的に得ていた。そこで、ゼブラフィッシュ OGR1 がヒトやマウスの OGR1 と同様にプロトン以外にミネラルによっても活性化されるのかどうかを次に調べた。その結果、図 17 (A) に示すように、100 μM の塩化コバルト (II)、塩化マンガン (II)、硫酸ニッケル (II)、塩化鉄 (III) のうち、マンガンのみがゼブラフィッシュ OGR1 を活性化した。この結果はヒト OGR1 がこれらすべてのミネラルにより活性化されるのとは異なっている。そこでゼブラフィッシュ OGR1 はヒト OGR1 と比べて、マンガン以外のミネラルに対する応答が減弱している可能性を次に調べた。その結果、マンガン以外にコバルトにより、その活性化の程度は弱いもののゼブラフィッシュ OGR1 の活性化が観察された。しかしながらそれ以外のミネラルに関しては 1 mM までの濃度範囲でその活性化は観察されなかった (図 17B)。この結果は、ゼブラフィッシュ OGR1 はヒト OGR1 と同様にプロトンに加えてミネラルによっても活性化されるが、活性化するミネラルの種類がヒトのものとは異なっていることを示している。マンガンに関してはヒト、ゼブラフィッシュ OGR1 とともに活性化を引き起こした。そこで次に、プロトンによる活性化とミネラルによる活性化の間にどのような関係があるのかを、マンガンを用いてヒト、ゼブラフィッシュ OGR1 の活性化を各種 pH 条件下で測定した。その結果、図 17 (C) に示すようにマンガンによる活性化は、中性からアルカリ性の条件下で観察されるものの酸性条件下では、プロトンによる活性化をより促進することはなかった。また、プロトンによる活性化の程度と比較して、ゼブラフィッシュ OGR1 はヒト OGR1 に比べマンガンによる活性

化の程度が低いことも明らかとなった (図 17C)。このようにマンガンによる活性化がプロトンの影響を受けることから、プロトン感知に関わるゼブラフィッシュ OGR1 のヒスチジン残基が、マンガンの感知にも関与するのかどうかを調べた。その結果、図 18 に示すように H4F 変異体はプロトンの場合と同様に、マンガンにより活性化されなかった。このことから、プロトン感知に関わるゼブラフィッシュ OGR1 のヒスチジン残基が、マンガンの感知にも関与することが明らかとなった。

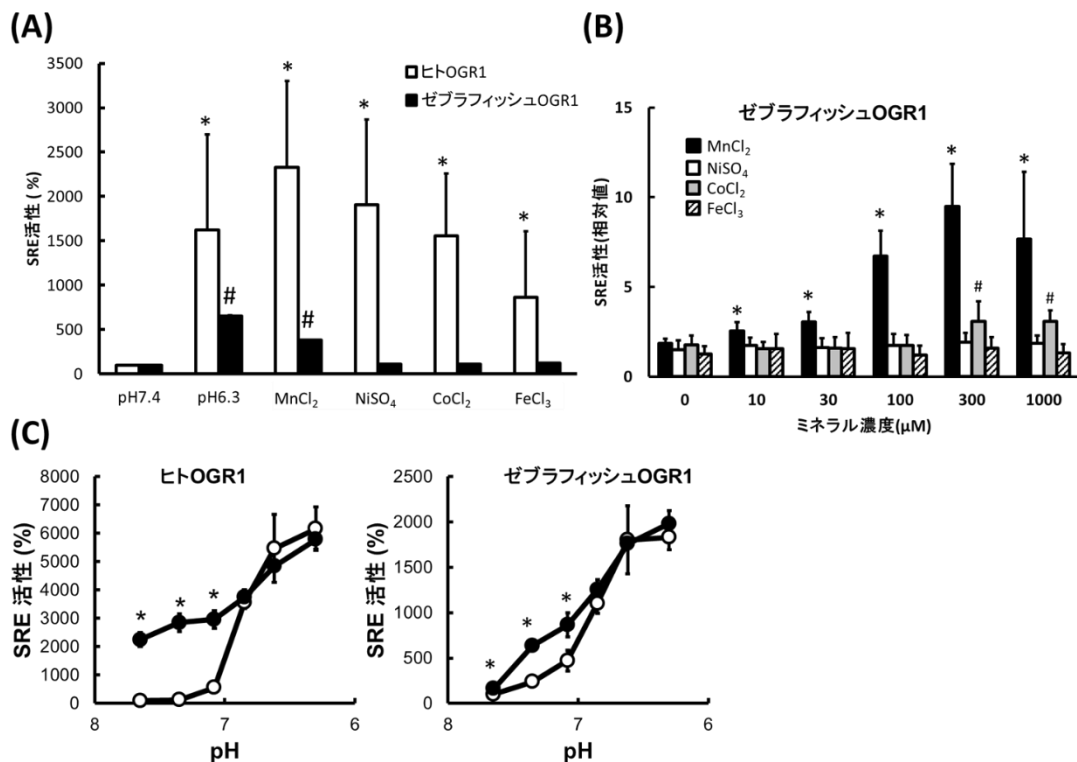


図 17 ミネラルによるヒト OGR1 もしくはゼブラフィッシュ OGR1 の活性化

(A、B) ヒト OGR1 もしくはゼブラフィッシュ OGR1 発現ベクターを pRL-TK と pSRE-luc とともに HEK293T 細胞に導入した。細胞を図に示した pH またはミネラルで 6 時間インキュベートし、SRE 活性を測定した。(C) マンガン非存在下 (○) または存在下 (●) での各種 pH 条件下でのヒト OGR1、ゼブラフィッシュ OGR1 の活性化を SRE 活性として測定した。値は pH 7.4 条件下での SRE 活性を 100% (A、B) もしくは pH 7.7 条件下での SRE 活性を 100% (C) とし、ヒト OGR1 およびゼブラフィッシュ OGR1 過剰発現細胞でのマンガン存在下 (●) もしくは非存在下での SRE 活性を測定した。結果は平均値±標準誤差で示した。

(A) *、# はミネラルまたはプロトンによる活性化が pH 7.4 条件下と比べ有意であることを示す (P<0.05)。(B) *、# は各金属濃度による活性化が金属なしの活性に比べ有意であることを示す (P<0.05)。(B) * はマンガン存在下の活性が非存在下の活性に比べ有意であることを示す (P<0.05)。

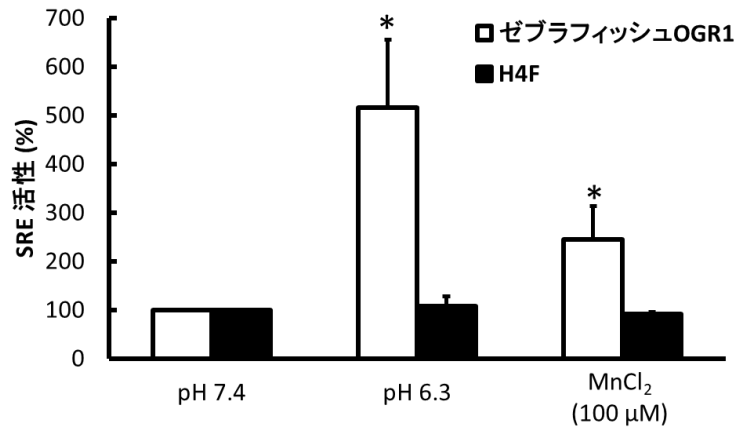


図 18 プロトンおよびマンガンによるゼブラフィッシュ OGR1 の活性化に対するヒスチジン残基の関与

ゼブラフィッシュ OGR1 もしくは H4F 発現ベクターを pRL-TK、pSRE-luc とともに HEK293T 細胞に導入した。細胞をマンガン存在下 (pH 7.4) あるいは非存在下 (pH 7.4 または pH 6.3) で 6 時間インキュベートし、SRE プロモーター活性を測定した。結果は 3 回の平均値±標準誤差で示した。*はゼブラフィッシュ OGR1 による SRE 活性が H4F の活性と比べて、有意であることを示す (P<0.05)。

3-3-4 ロラゼパムによるゼブラフィッシュ OGR1 の活性化

次にヒト OGR1 のアロステリックなリガンドとして報告されている抗不安薬、ロラゼパムがゼブラフィッシュ OGR1 に対しても効果を示すのかを調べた。その結果、ヒトと同様にゼブラフィッシュ OGR1 を介した応答もロラゼパムは増強した (図 19)。この結果は、マウスと同様にゼブラフィッシュをロラゼパムの作用解析に使用できることを示している。

3-3-5 リゾ脂質によるゼブラフィッシュ OGR1 の活性化

LPC と SPC は哺乳類の OGR1 を介した細胞応答に関与するとの報告がなされているが、その応答に関しては疑問が呈されている[Xu 2002]。そこで私はこれらのリゾ脂質がゼブラフィッシュ OGR1 を介した SRE の活性化に関与するのかを調べた。その結果、10 μ M の LPC は SRE を活性化しなかった (図 20A)。一方 10 μ M の SPC は SRE の活性化を誘導したが、同様の活性化はベクターを遺伝子導入した細胞においても観察されたため、OGR1 を介した活性化ではなく、HEK293T 細胞に内在性に発現する S1P 受容体の活性化を検出しているものと考えられた (図 20B)。これらの結果から、SPC、LPC はゼブラフィッシュ OGR1 を活性化しないことが明らかとなった。

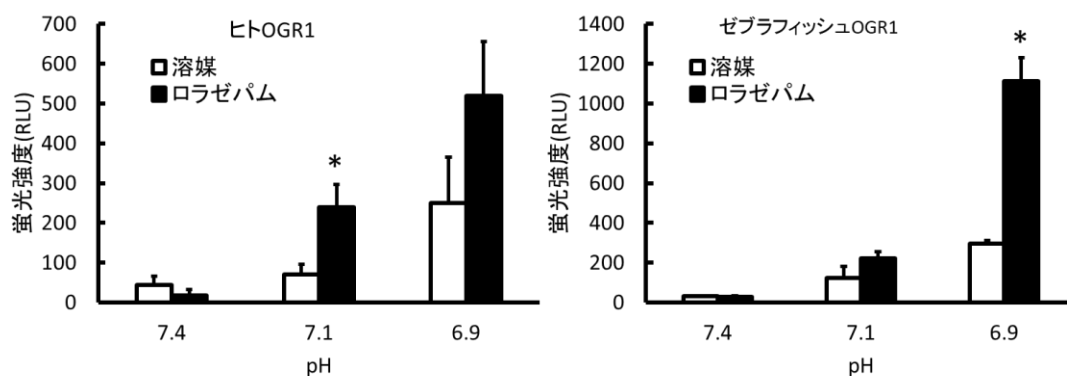


図 19 ロラゼパムによるヒト OGR1 およびゼブラフィッシュ OGR1 活性化への影響

ヒト OGR1 もしくはゼブラフィッシュ OGR1 発現ベクターを pGloSensor™-22F cAMP プラスミドとともに HEK293T 細胞に導入した。細胞を図に示した pH 条件下で 10 μM のロラゼパムあるいは溶媒と共に刺激後、6 分後に cAMP 量を測定した。測定の詳細は「材料と方法」を参照。なお刺激は 500 μM の IBMX 存在下で行った。結果は 3 回行った実験の代表例の結果を平均値 \pm 標準誤差で示した。他 2 回も同様の結果を示した。*はロラゼパム存在下の活性が非存在下の活性と比べて有意であることを示す ($P < 0.05$)。

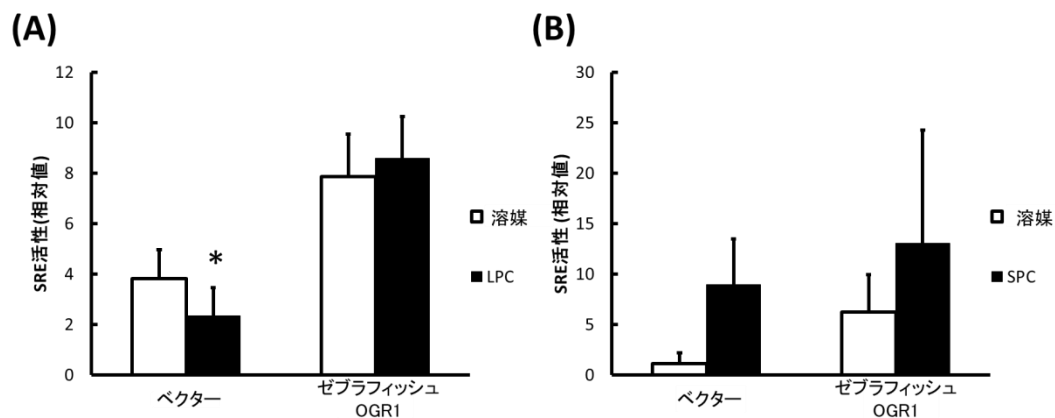


図 20 LPC および SPC によるゼブラフィッシュ OGR1 の活性化への影響

ゼブラフィッシュ OGR1 発現ベクターもしくはベクターを pRL-TK と pSRE-luc とともに HEK293T 細胞に発現させた。細胞を 10 μ M の LPC (A) もしくは 10 μ M の SPC (B) 存在下あるいは非存在下で 6 時間インキュベートし、SRE プロモーター活性を測定した。結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。*はベクターにおける LPC 存在下の活性が非存在下の活性と比べ有意に低下したことを示す(P<0.05)。

3-4 考察

本研究の結果、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[Mochimaru *et al.* 2015]。またそのプロトン感知機構も、感知するヒスチジンの数はヒト OGR1 が 5 つ[Ludwig *et al.* 2003]に対してゼブラフィッシュは 4 つであるが、ヒト OGR1 と同様の位置に存在するヒスチジン残基が担っていることも明らかとすることができた。

一方ミネラルに対する活性化は、ヒトとゼブラフィッシュ OGR1 間で違いが観察された[Negishi *et al.* 2017] (図 17A)。Abe-Ohya らによる報告のように[Abe-Ohya *et al.* 2015]、ヒト OGR1 はコバルト、マンガン、ニッケル、鉄によりすべて活性化された (図 17A)。一方ゼブラフィッシュ OGR1 はマンガンとコバルトでのみ活性化された (図 17B)。コバルトによる活性化は軽微でありかつ高濃度とその活性化に必要であることから、実質的にゼブラフィッシュ OGR1 を活性化するのはマンガンのみである。両者がプロトンにより同等に活性化されるのとは異なり、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。これらのミネラルは微量元素、超微量元素として、生体の維持に必要不可欠のものとされている[Mertz 1981]。この欠乏、過剰摂取は生体機能に様々な変化をもたらす[Mertz 1981]。ゼブラフィッシュにおいてマンガン以外のミネラルに関する応答が欠失している理由は現在、不明である。ヒトとゼブラフィッシュの生活環境の違いが影響しているのかもしれない。ヒトは地上で生活し、必要なこれらのミネラルを主に土中からの植物の吸収を通して摂取しているためその摂取量には増減がある。そのため、それらの濃度の増減を感知する機構が必要であるが、魚は水中で生活しており、周りの水に含まれるミネラルが一定量なため、その感知機能が不要であるせいなのか

もしれない。この仮説の真偽の検証は、今後の課題である。

プロトンとミネラルの関係に関しては、図 17 (C) に示すように異なる pH 条件下でミネラルによる活性化に変化が観察される。この理由としては、プロトン、ミネラルとも受容体内の同じヒスチジン残基が感知しているためと考えられる (図 18)。ヒスチジンはミネラルと結合することが知られている [Peano *et al.* 2013]。プロトン濃度が低いアルカリ条件下では、ミネラルによりヒスチジン残基のプロトネーションが生じ、その結果受容体の構造変化により活性化されるのに対して、プロトン濃度が高い酸性条件下ではプロトンによりすでに多くのヒスチジン残基がプロトネーションされており、残りのヒスチジン残基が少ないためミネラルによるさらなる活性化が観察されなかったのかもしれない。プロトンによる活性化と比較して、アルカリ条件下におけるマンガンによるヒトとゼブラフィッシュ OGR1 の活性化の程度に差が観察されたことから、ヒスチジン以外のアミノ酸の関与もあるものと推定される。

ロラゼパムは GABA 受容体に作用して、抗不安作用をしめす薬物である [Giersch *et al.* 2010]。この薬物の新たなターゲットとして、OGR1 が存在することが 2015 年に報告された [Huang *et al.* 2015]。このことはこの薬物の作用の一部は OGR1 によって担われていることを示している。事実マウスの不安行動の一部には OGR1 が関与していることが同報告に示されている [Huang *et al.* 2015]。ロラゼパムがゼブラフィッシュ OGR1 にもヒトと同様に作用するという今回の結果は今後、OGR1 が関与する骨代謝異常などの病態生理学的作用の制御 (表 2) に、この薬物が使用できる可能性を示している。ゼブラフィッシュの鱗を用いた解析はこの可能性に対して、ある程度のデータを供出できるかもしれない。

今回の研究ではゼブラフィッシュ OGR1 がヒト OGR1 と同様 [Tomura *et al.* 2005b] に SPC と LPC による SRE 活性化を引き起こさなかった。この結果から、これらのリゾ脂質が進化の初期には OGR1 のリガンドとして働いており、進化

に伴いその作用が減弱したという可能性は低いものと考えられた。

以上の結果を表3としてまとめた。

	脂質リガンド	プロトン感知性	ミネラル感知性				ロラゼパム
			Mn	Ni	Co	Fe	
ヒトOGR1	×	○	○	○	○	○	
ゼブラフィッシュ OGR1	×	○	○	×	×	×	

表3 ヒト OGR1 およびゼブラフィッシュ OGR1 の各種リガンドに対する応答

ゼブラフィッシュ OGR1 はヒト OGR1 と同様にプロトン、ミネラル、ロラゼパムによって活性化したが、リゾ脂質によっては活性化しなかった。また、ゼブラフィッシュ OGR1 とヒト OGR1 とでは活性化されるミネラルの種類が異なっていた。

第4章 様々な動物種における OGR1 相同遺伝子産物の応答解析

4-1 緒言と目的

第3章の結果から、ゼブラフィッシュ OGR1 はヒト OGR1 と同様にプロトン感知性 GPCR であることが明らかとなった。一方ミネラルによる活性化に関してはヒト OGR1 とゼブラフィッシュ OGR1 間で、活性化するミネラルの種類が異なることも明らかになった。そこで私は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調べるため、本章では様々な生物由来の OGR1 のキャラクター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い。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本章で解析した。

4-2 材料と方法

4-2-1 細胞培養

実験に用いた HEK293T 細胞は理研 BRC より提供された。細胞は第 3 章と同様の方法で培養した。

4-2-2 受容体 cDNA プラスミドの準備と発現

ブタ OGR1 (1086 bp, Ensembl accession No. ENSSSCT00000002709.2)、ラット OGR1 (1128 bp, GenBank accession No. NM_001108049)、マウス OGR1 (1098 bp, GenBank accession No. NM_001177673)、ニワトリ OGR1 (1128 bp, GenBank accession No. XM_015287747)、ネッタイツメガエル OGR1 (1071 bp, GenBank accession No. XM_002933225)、ネッタイツメガエル OGR1-like (1140 bp, GenBank accession No. XM_004917413) のコード領域を、1 番目のメチオニンコドンの前にコザック配列 (CCACC) をつけたプライマーを使用して PCR により増幅し、DNA Ligation Kit Ver.1 (6021, Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を使用して pcDNA3.1 ベクターに組み込み、発現ベクターを構築した。ヒト-ゼブラフィッシュ キメラ受容体は、ゼブラフィッシュ OGR1 の細胞外領域をヒト OGR1 の細胞外領域に置換したキメラ受容体であり、ゼブラフィッシュ-ヒト キメラ受容体はヒト OGR1 の細胞外領域をゼブラフィッシュ OGR1 の細胞外領域に置換したキメラ受容体である。それぞれのキメラ受容体は 1 番目のメチオニンコドンの前にコザック配列 (CCACC) をつけて合成し (Eurofins Genomics, Tokyo, Japan)、同様の方法で pcDNA3.1 ベクターに組み込んだ。ヒト OGR1 発現ベクター、ブタ OGR1 発現ベクター、ラット OGR1 発現ベクター、マウス OGR1 発現ベクター

一、ニワトリ OGR1 発現ベクター、ゼブラフィッシュ OGR1 発現ベクター、ネッタイツメガエル OGR1 発現ベクター、ネッタイツメガエル OGR1-like 発現ベクター、pcDNA3.1 ベクター、pSRE-luc および pRL-TK は、Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent を用いて細胞に遺伝子導入した。ヒト OGR1 およびゼブラフィッシュ OGR1 発現ベクターは第 3 章と同じものを使用した。本実験に使用したブタゲノム DNA は発生工学研究室の長嶋比呂志教授から、マウス mRNA は動物生理学研究室の中村孝博准教授から、ネッタイツメガエルの肝臓は静岡大学創造科学技術大学院・研究部統合バイオサイエンス部門の鈴木雅一教授から提供していただいた。またニワトリ OGR1 の作製には市販のニワトリのもも肉を使用した。ネッタイツメガエルの肝臓とニワトリのもも肉からのゲノム DNA 抽出には DNeasy Blood & Tissue Kits (69504, Qiagen, Hilden, Germany) を使用した。

4-2-3 デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ

SRE プロモーター活性は、The PathDetect Signal Transduction Pathway cis-Reporting Systems (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を使用して、第 3 章と同様の方法で測定した。実験には 24 ウェルプレートもしくは 96 ウェルプレートを使用し、刺激試薬には、100 μ M 塩化コバルト (II)、100 μ M 塩化マンガン (II)、100 μ M 硫酸ニッケル (II)、100 μ M 塩化鉄 (III) を使用した。96 ウェルプレートを使用した際は、10% (v/v) FBS DMEM - low glucose、無血清培地、刺激時の無血清培地、洗浄の PBS (-) は 200 μ l/well、Reporter Lysis Buffer は 12.5 μ l/well の容量で使用した。

4-2-4 GloSensor™ cAMP アッセイ

pGloSensor™-22F cAMP Plasmid、GloSensor™ cAMP Reagent (E1290, Promega, Madison, WI, USA) を使用して、第 3 章と同様の方法で測定した。刺激試薬には、HCl、10 μ M ロラゼパムを使用し、また 500 μ M IBMX も同時に添加した。

4-2-5 データ表示

すべての実験は 3 回以上行った。他に特に記載がない限り、3 つ以上の異なる細胞のバッチからの結果を平均 \pm 標準誤差として示した。統計的有意性は、ANOVA によって評価した。値は $p < 0.05$ を有意とした。

4-3 結果

4-3-1 各動物種間における OGR1 相同遺伝子産物のアミノ酸配列の比較

第3章で述べた通り、ヒト OGR1 およびゼブラフィッシュ OGR1 の細胞外領域に存在する特定のヒスチジン残基（図 21、白抜きで表示された H）はプロトン感知に重要な役割を担っている。私はヒト OGR1、ラット OGR1、マウス OGR1 およびゼブラフィッシュ OGR1 以外に、ブタ OGR1 相同遺伝子、ニワトリ OGR1 相同遺伝子、ネッタイツメガエル OGR1 相同遺伝子（ネッタイツメガエル OGR1、ネッタイツメガエル OGR1-like）配列をデータベースから抽出し、それらのアミノ酸配列を比較した（図 21）。図 21 に示したように、プロトン感知に重要なヒスチジン残基とその位置は動物種間でほぼ保存されていた。またヒト OGR1 との アミノ酸相同性は、ブタ OGR1 が 87%、ラット OGR1 が 93%、マウス OGR1 が 92%、ニワトリ OGR1 が 62%、ゼブラフィッシュ OGR1 が 57%、ネッタイツメガエル OGR1 が 63%、ネッタイツメガエル OGR1-like が 59%であった。ヒト OGR1 とその他の OGR1 相同遺伝子との細胞外領域におけるアミノ酸相同性は、ブタ OGR1 が 80%、ラット OGR1 が 85%、マウス OGR1 が 84%、ニワトリ OGR1 が 55%、ゼブラフィッシュ OGR1 が 43%、ネッタイツメガエル OGR1 が 54%、ネッタイツメガエル OGR1-like が 47%であった。細胞膜貫通領域に関しては、ブタ OGR1 が 97%、ラット OGR1 が 94%、マウス OGR1 が 95%、ニワトリ OGR1 が 73%、ゼブラフィッシュ OGR1 が 66%、ネッタイツメガエル OGR1 が 78%、ネッタイツメガエル OGR1-like が 79%であった。細胞内領域に関しては、ブタ OGR1 が 81%、ラット OGR1 が 94%、マウス OGR1 が 92%、ニワトリ OGR1 が 53%、ゼブラフィッシュ OGR1 が 51%、ネッタイツメガエル OGR1 が 48%、ネ

ツタイツメガエル OGR1-like が 42%であった。この結果より、動物種間で細胞膜貫通領域が最も保存されていることが明らかとなった。

```

hOGR1      1 -----MGNITADNSMSCTIDHDTLAPVYVTVLVVGFANCLSLYFGYL 48
pOGR1      1 -----MGNITADNASLHCAIDHDTLAPVYVTVLVVGFANCLSLYFGYL 48
rOGR1      1 --MRSKAFSGPKMGNITITENSSLPCPIDHDTLAPVYVTVLVVGFANCLSLYFGYL 58
mOGR1      1 -----MGNITITENSSLSCPIDHDTLAPVYVTVLVVGFANCLSLYFGYL 48
cOGR1      1 ----MVYVERQKMLNFTEENATEKCIIDHDTLSPVYVTVLVVGFANCLSLYFGYL 55
zOGR1      1 -----MNMSEEQINCTINHDTLSPVYVTVLVVGFANCLSLYFGYL 45
xOGR1      1 -----MENSTDDPESNLTFCIVDHLRQTLFPVYVTVLVVGFANCLSLYFGYL 51
xOGR1-like 1 MAARAGYGNSTLVMSTMPNSTEENCTLDHDTLFPVYVTVLVVGFANCLSLYFGYL 60

I
hOGR1      49 QIKARNELGVYLCNLTVADLFYICSLPFWLQYVLODHWSHGDLSCQVCGILLYENIYIS 108
pOGR1      49 QVKARNELGVYLCNLTVADLFYICSLPFWLQYVLODHWSHGDLSCQVCGILLYENIYIS 108
rOGR1      59 QIKARNELGVYLCNLTADLFYICSLPFWLQYVLODHWSHGDLSCQVCGILLYENIYIS 118
mOGR1      49 QIKARNELGVYLCNLTADLFYICSLPFWLQYVLODHWSHGDLSCQVCGILLYENIYIS 108
cOGR1      56 QIKARNELGVYLCNLTADLFYISLSPFWLQYVLODHWTYDELCKICGILLYENIYIS 115
zOGR1      46 QIKARNELGVYLLNLTISDLLYLGLSLPWLQYVLODHWYSGSEWLQCLGFLYENIYIS 105
xOGR1      52 QIKARNELGVYLCNLTVADLLYISLSPFWLQYVLODHWTYNETMCRICGILLYENIYIS 111
xOGR1-like 61 QIKARNELGVYLCNLTVADLLYISLSPFWLQYVLODHWTYNETMCKICGILLYENIYIS 120

II III
hOGR1      109 VGFLCCISVDRYLAVAHPPRFHQFRTLKAAGVSVVVIWAKELLSIYFLMHKEVEIDENQ 168
pOGR1      109 VGFLCCISIDRYLAVAHPPRFHQFRTLKAAGVSVVVIWAKELLSIYFLMHKEVVEDGDQ 168
rOGR1      119 VGFLCCISIDRYLAVAHPPRFHQFRTLKAAGVSVVLIWAKELLSIYFLMHKEVEIDEDR 178
mOGR1      109 VGFLCCISIDRYLAVAHPPRFHQFRTLKAAGVSVVLIWAKELLSIYFLNHKEVEIDEDQ 168
cOGR1      116 VGFLCCISIDRYLAVVHPRFHQFRTMKAAVIVSAIIVTKELVTCSEFVHGEISDMADES 175
zOGR1      106 IGFLLCCISIDRYLAVVHPRFHSAFRTVRAATLVSTVWMLKELAVGVVFFLHKEISRDKE 165
xOGR1      112 IGFLLCCISVDRYLALVHPRFHKLRTMKAAALVSMIIVLKEIMTSIYFFIHGEVSEDPES 171
xOGR1-like 121 IAFLLCCISVDRYLALVHPRFHKLRTMKTALLISVVIWAKELLSIYFFSHGEFTKDPES 180

IV
hOGR1      169 ERVCFEHYPIQAWQRAINIYRFLVGLFPICLLASVYQGLRAVRRSHGTQKSRKDIQR 228
pOGR1      169 ERVCFEHYPLEFRQGINIYRFLVGLFPICLLASVYQGLRAVRRSHGTQKSRKDIQR 228
rOGR1      179 ERVCFEHYPIQAWQRGINIYRFLVGLFPICLLASVYQGLRAVRRSHGTQKSRKDIQR 238
mOGR1      169 ERVCFEHYPIQAWQRINIYRFLVGLFPICLLASVYQGLRAVRRSHGTQKSRKDIQR 228
cOGR1      176 ERVCFEHYPIKWEHSINIYRFSAGLFPFFLLAFSYCGILRVVHRSHTQKRRKLIQR 235
zOGR1      166 QSVCFEHYPMKWEYQINIYRFGIYGLFPFLGILSVSYFRVLRVGRSAGTQSKIRIQ 225
xOGR1      172 ERVCFEHYPIKWEHNINIYRFFAGLFPFILLFVYCCIFREYVNSKGAQIKKLVQVQ 231
xOGR1-like 181 ERVCFEHYPMKWEHSINIYRFFVGLFPFILLGFVYCCIFRKYVRSQGTQKRRKLIQR 240

V
hOGR1      229 LVLSTVVIIFLACFLPYHVLVLRVSVWEASCDFAKGVFNAYHFSLLLT SFNCVADPVLYCF 288
pOGR1      229 LVLSTVVIIFLACFLPYHVLVLRVSLWESSCDFAKGIFNAYHFSLLLT SFNCVADPVLYCF 288
rOGR1      239 LVLSTVVIIFLACFLPYHVLVLRVSLWESSCDFAKSIFNAYHFSLLLT SFNCVADPVLYCF 298
mOGR1      229 LVLSTVVIIFLACFLPYHVLVLRVSLWERNCEFAKSIFNAYHFSLLLT SFNCVADPVLYCF 288
cOGR1      236 LVSSTVVIIFLVCFGPYHVLVLRVSVFE SNCSFAGKIFNAYHFSLLLT SFNCVADPVLYCF 295
zOGR1      226 LVTSTVVIIFLVCFGPYHVLVLRVIFERDCNFIESIFNAYHFSLLLT SFNCVADPVLYCF 285
xOGR1      232 LVLSTVVIIFLVCFGPYHVLVLRVIRSFERNCFFAVKIFNAYHFSLLLT SLNCVADPVLYCF 291
xOGR1-like 241 LVLSTVVIIFLVCFGPYHVLVLRVIRSVFETNCVFAARIFNAYHFSLLLT SFNCVADPVLYCF 300

VI VII
hOGR1      289 VSETTHRDALARLRGACLAFLTCSRTGRAREAYPLGAPEASGKSGAQGEEPELLTKLHPAF 348
pOGR1      289 VSETTHRDALARLRGACRAFLACARTGRAREAYPLGTPEVSRKSEEDPELLAKLHPAF 344
rOGR1      299 VSETTHRDALARLRGACLAFLTCSRTSRAREAYPLGAPEASGKSGAQGEEPELLTKLHSAF 358
mOGR1      289 VSETTHRDALARLRGACLAFLTCSRTSRAREAYPLGAPEASGKSGAQGEEPELLTKLHSAF 348
cOGR1      296 SSETSTYLVNFVMMRDSCLRHLGCLRTETKESYQLNAPETPSRAQHEHQPRLLQESQGETGA 355
zOGR1      286 ISESAQKGIQKAHDACTRVFCCCSKSHGRFNTHSTELAVTNDNVTGT SVVTLQIQIKTEV 345
xOGR1      292 ASENTYKDFIKLSSCMTSLGCL---KDKQKEPQQLNSAETYTATQVPEIEPVELHEK 348
xOGR1-like 301 ASENTYRDFLKMMDTCTMCTRYLEIGKKKANKQPVNSLEGTAINTKQITSENEAVVLYEQR 360

hOGR1      349 QTPNSPGSGGFPPTGRLA--- 365
pOGR1      345 QAPHPLGAGSGPAGALN--- 361
rOGR1      359 QTPNSLGLGGFPPTVGLA--- 375
mOGR1      349 QTPSSLVGGSPSTVGLA--- 365
cOGR1      356 KDSSTRADHLQHPAKGALV 375
zOGR1      345 ----- 345
xOGR1      349 FFSKHSV----- 356
xOGR1-like 361 VSSITCAENGVDESINCSL- 379

```

図 21 各動物種間における OGR1 相同遺伝子産物のアミノ酸配列の比較

プロトン感知に重要であるヒスチジン残基に相当すると予想されるヒスチジン残基を白抜きで示す。下線部は細胞膜貫通領域と予想される部分を示す。OGR1 相同遺伝子は上からヒト OGR1 (hOGR1)、ブタ OGR1 (pOGR1)、ラット OGR1 (rOGR1)、マウス OGR1 (mOGR1)、ニワトリ OGR1 (cOGR1)、ゼブラフィッシュ OGR1 (zOGR1)、ネッタイツメガエル OGR1 (xOGR1)、ネッタイツメガエル OGR1-like (xOGR1-like) である。

4-3-2 プロトンによる活性化

まずこれらの OGR1 相同遺伝子産物が、プロトンにより活性化されるのかどうかを調べた。その結果図 22 に示すように、調べたすべての OGR1 相同遺伝子産物がプロトンにより活性化されることが明らかとなった。それぞれの OGR1 相同遺伝子産物に対するプロトンの 50% 効果濃度 (EC₅₀) は pH 6.7~pH 6.9 であり、これはヒト、ラット、マウス、ゼブラフィッシュ OGR1 のものと同じであった。ヒスチジンの pKa は約 6 であり、ヒト、ラット、マウスの OGR1 では、酸性条件下で受容体内の特定のヒスチジン残基がプロトネーションされ、その結果、受容体構造が活性型に変化するというモデルが提出されている[Ludwig *et al.* 2003]。図 21 の結果から、プロトンを感じ取るヒスチジン残基は種間で保存されているため、これら OGR1 相同遺伝子産物はヒト、ラット、マウス OGR1 の場合と同様のメカニズムで、プロトンを感じ取って活性化していることが考えられた。この結果から、OGR1 がプロトンを感じ取って活性化するという特性は、種間で保存されていることが明らかになった。そこで以降、各動物種由来の OGR1 相同遺伝子産物をその動物の OGR1 と記すこととした。

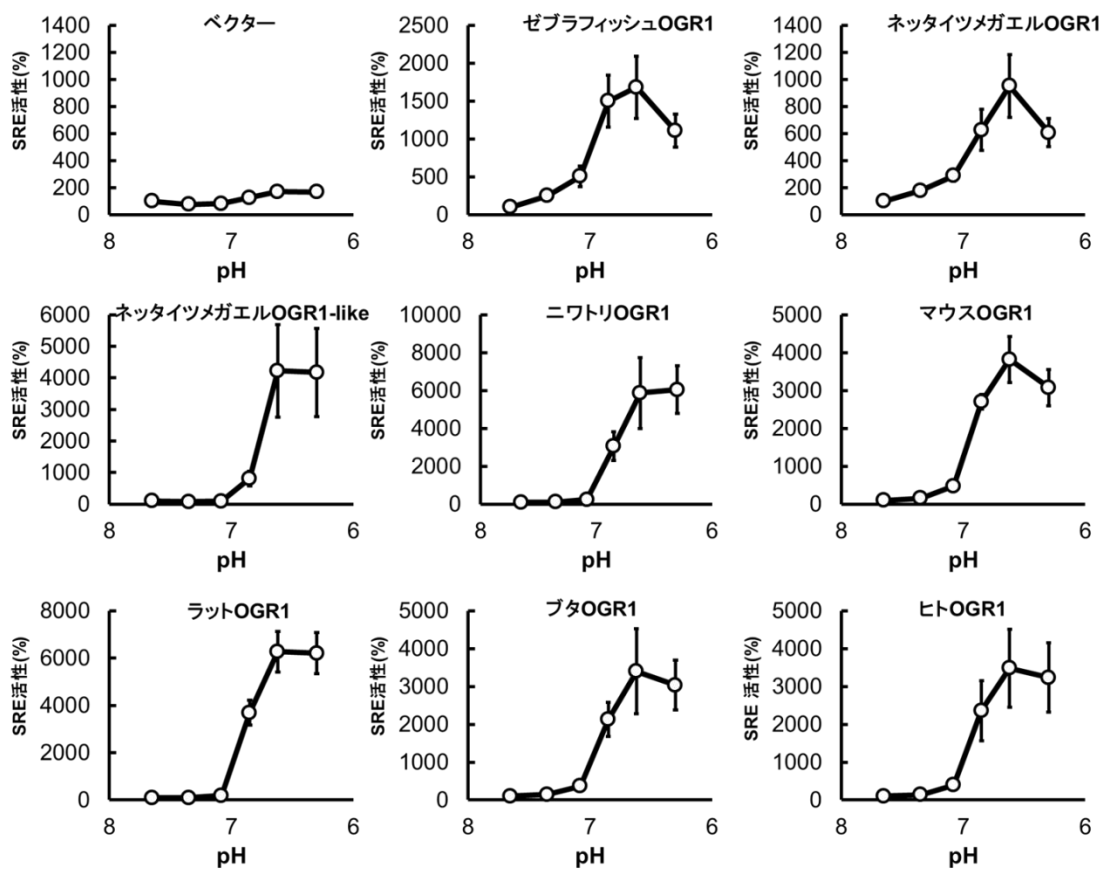


図 22 各動物種由来の OGR1、OGR1 相同遺伝子産物の活性化に対するプロトンの影響

各 OGR1、OGR1 相同遺伝子産物発現ベクターもしくはベクターを pRL-TK と pSRE-luc とともに HEK293T 細胞に導入した。細胞は図に示す pH 条件下で 6 時間インキュベートし、SRE プロモーター活性を測定した。結果は pH 7.7 における値を 100% として表した。結果は 3 回以上の実験結果の平均値±標準誤差で示した。

4-3-3 ミネラルによる活性化

次に各動物種由来の OGR1 のミネラルに対する活性化応答を調べた。図 23 に示すように、ヒト、マウス OGR1 は Abe-Ohya らの報告にあるように[Abe-Ohya *et al.* 2015]、調べたすべてのミネラルで活性化された。一方ゼブラフィッシュ OGR1 はマンガン刺激でのみ、その活性化が検出された。このような条件下で他の動物種 OGR1 のミネラルによる活性化を調べた結果、ラット、ブタ、ニワトリ OGR1、ネッタイツメガエル OGR1-like はヒト、マウス OGR1 と同様にすべてのミネラルにより活性化された。一方ネッタイツメガエル OGR1 は、調べたどのミネラルによってもその活性化が検出できなかった。この結果は、プロトンがこれら各動物種の OGR1 の共通のリガンドであるのに対して、ミネラルは種によって異なるリガンド活性を有することを示している。

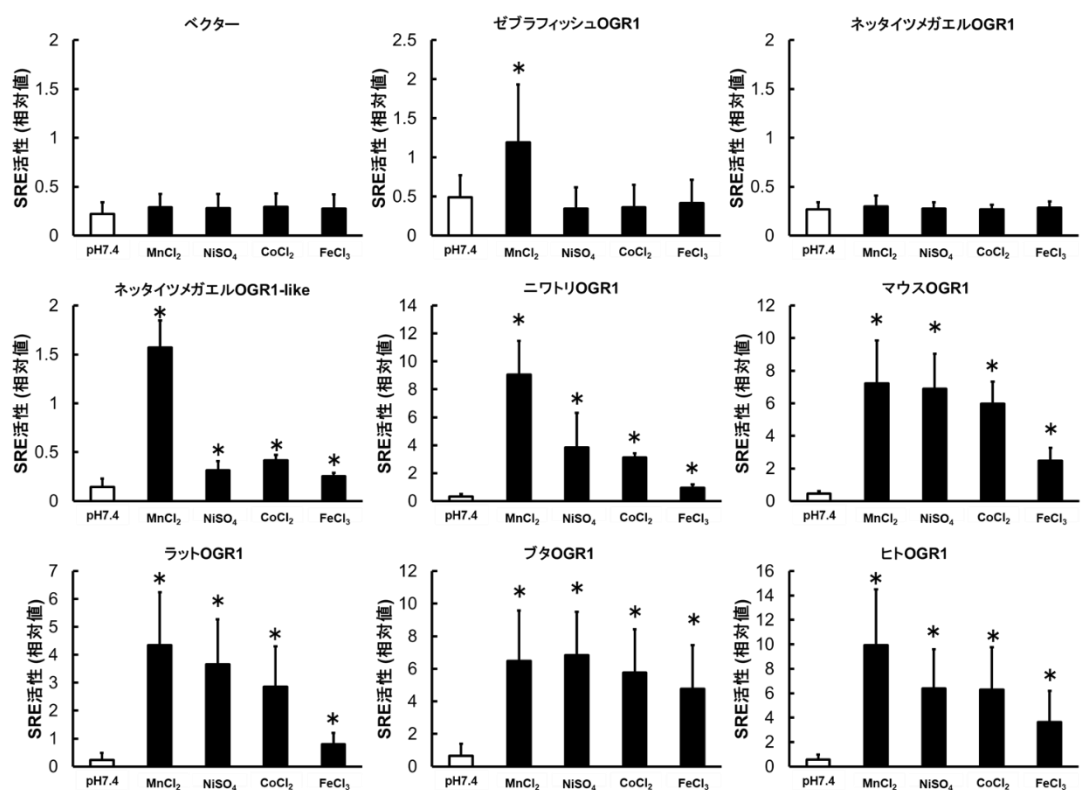


図 23 ミネラルによる各動物由来の OGR1 の活性化

各動物種由来の OGR1 発現ベクターもしくはベクターを pRL-TK と pSRE-luc とともに HEK293T に導入した。細胞は pH 7.4 条件下において、または pH 7.4 条件下で 100 μ M の塩化マンガン (II)、硫酸ニッケル (II)、塩化コバルト (II)、塩化鉄 (III) 存在下で 6 時間インキュベートし、SRE プロモーター活性を測定した。結果は 3 回の実験結果の平均値 \pm 標準誤差で示した。*は pH 7.4 条件下での活性と比べ、有意に変化したことを示す (P<0.05)。

4-3-4 各動物種由来の OGR1 活性化に対するプロトンとミネラルの影響

第3章で示したように、ヒトとゼブラフィッシュ OGR1 は、(1) アルカリから中性領域では主にマンガンにより、酸性領域では主にプロトンにより活性化されること、(2) 酸性領域でのプロトンによる活性化をマンガンは促進しないこと、(3) プロトンによる活性化の程度に比べ、マンガンによる活性化の程度はヒトとゼブラフィッシュ OGR1 間で異なることが明らかとなった。4-3-2の結果から、調べた動物種すべての OGR1 はプロトンにより活性化されること、4-3-3で示すようにミネラルによる活性化は動物種により異なることが明らかとなった。そこで、これら動物種 OGR1 のプロトンとミネラルによる活性化の関係を調べた。解析には、最も多くの種類の OGR1 を活性化させたミネラルであるマンガンを使用した。

その結果図 24 に示すように、ネッタイツメガエル OGR1 は調べたすべての pH 条件下でマンガンによる活性化が認められなかった。またブタ、ラット、マウス、ニワトリ OGR1 はヒト OGR1 と同様に pH 7.7 でマンガンにより、すでにほぼ最大のミネラルによる活性化を示した。一方、ネッタイツメガエル OGR1-like はゼブラフィッシュ OGR1 と同様に、pH 7.7 ではマンガンによる活性化の程度が pH 7.4 や pH 7.2 のものよりも低かった。このように各種 pH 条件下におけるミネラルによる各動物種 OGR1 の活性化様式は、異なっていることが明らかとなった。

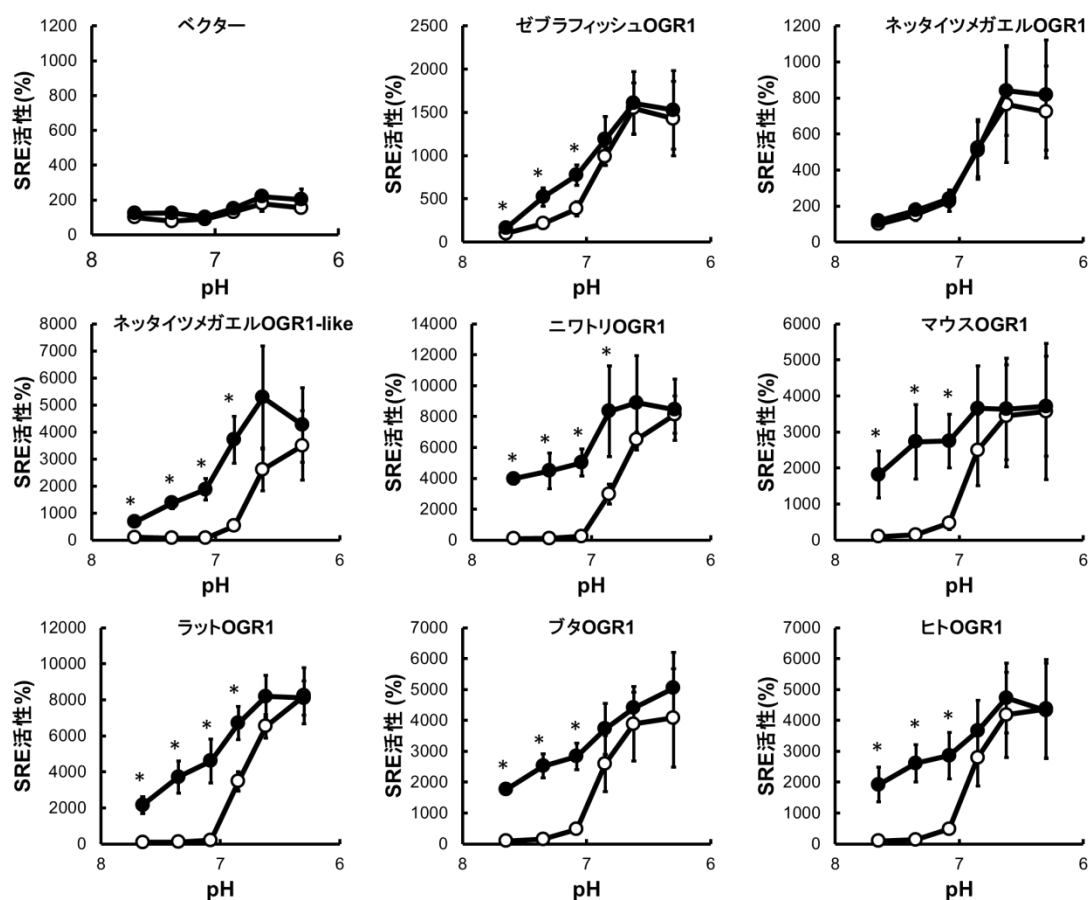


図 24 各動物種 OGR1 の SRE プロモーター活性へのマンガンとプロトンの影響

各動物種 OGR1 発現ベクターもしくはベクターを pRL-TK と pSRE-luc とともに HEK293T 細胞に導入した。細胞は図に示した pH 条件下において 100 μ M のマンガン存在下 (●) あるいは非存在下 (○) で 6 時間刺激し、SRE プロモーター活性を測定した。結果はマンガン非存在下での pH 7.7 条件下での値を 100% とし、3 回以上の実験の平均値 \pm 標準誤差で示した。* は活性がマンガンによって有意に変化したことを示す (P<0.05)。

4-3-5 ミネラルに対する活性化の違いに関与する OGR1 の領域

図 21、図 22 の結果から、OGR1 の細胞外領域に存在しプロトンの感知に重要なヒスチジン残基が保存されていること、また調べたすべての動物種の OGR1 はプロトンにより同じように活性化されることから、ミネラルによる各動物種 OGR1 の異なる活性化には、ヒスチジン残基以外のアミノ酸配列が関与している可能性がある。そこで OGR1 のどの領域が、ミネラルによる活性化に重要な役割を担っているのかを調べた。私はヒト-ゼブラフィッシュ OGR1 キメラ受容体とゼブラフィッシュ-ヒト OGR1 キメラ受容体の2種類のキメラ受容体を作製した。ヒト-ゼブラフィッシュ キメラ受容体はゼブラフィッシュ OGR1 の細胞外領域がヒト OGR1 の細胞外領域に置換されたキメラ受容体である (図 25A)。一方、ゼブラフィッシュ-ヒト キメラ受容体はヒト OGR1 の細胞外領域がゼブラフィッシュ OGR1 の細胞外領域に置換されたキメラ受容体である (図 25B)。図 25 (C、D) で示すように、ヒト-ゼブラフィッシュ キメラ受容体はプロトンおよびマンガンに加えて、ニッケル、コバルト、鉄によっても活性化された。一方、ゼブラフィッシュ-ヒト キメラ受容体はプロトンおよびマンガンによるのみ活性化された (図 25D)。この結果は、ヒト-ゼブラフィッシュキメラ受容体はヒト OGR1 と同じ活性化様式となり、ゼブラフィッシュ-ヒト キメラ受容体はゼブラフィッシュ OGR1 と同じ活性化様式となることを示している。したがって、OGR1 の細胞外領域に、OGR1 を活性化するミネラルの特異性を決定するアミノ酸配列が存在することが明らかになった。

4-3-6 ロラゼパムによる各動物種 OGR1 の活性化

各動物種 OGR1 に対してもロラゼパムが効果を示すのかを調べた。その結果 図 26 に示すように、ネッタイツメガエル OGR1 以外の OGR1 はロラゼパムにより活性が増強された。ネッタイツメガエル OGR1 に関しては、プロトンによる cAMP 系の活性化応答も観察されなかった。第 3 章 図 19 でのヒト、ゼブラフィッシュ OGR1 の結果と合わせ、ロラゼパムはネッタイツメガエル OGR1 以外の OGR1 すべての活性化を増強することが明らかとなった。

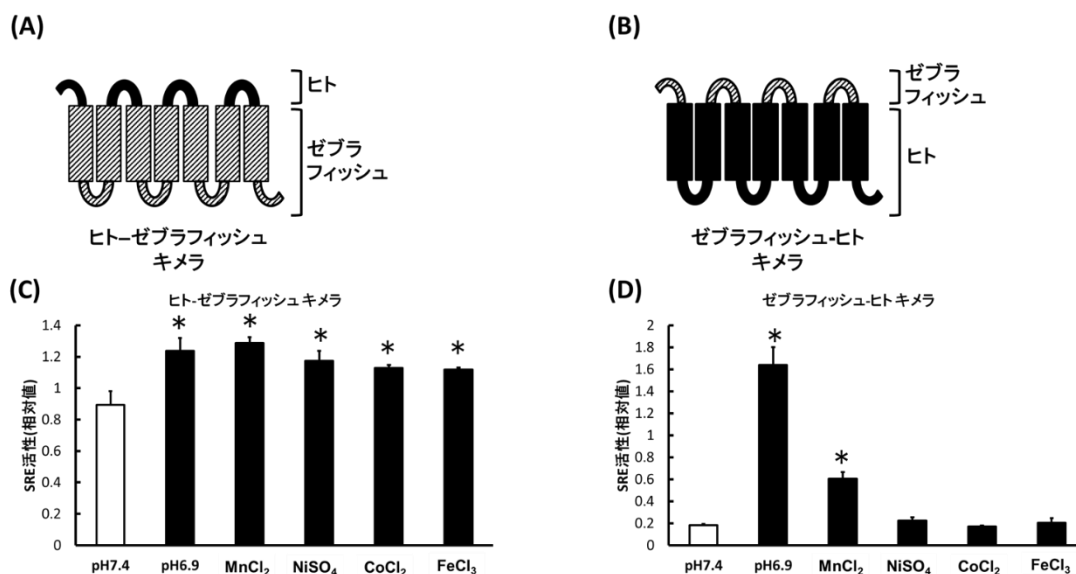


図 25 ヒト-ゼブラフィッシュ キメラ受容体もしくはゼブラフィッシュ-ヒト キメラ受容体を発現させた HEK293T 細胞の SRE 活性

ヒト-ゼブラフィッシュ キメラ受容体もしくはゼブラフィッシュ-ヒト キメラ受容体発現ベクターを pRL-TK と pSRE-luc とともに HEK293T 細胞に導入した。細胞は pH 7.4 の条件下で 100 μ M の図に示すようなミネラル存在下あるいは非存在下 (○) で 6 時間刺激し、SRE プロモーター活性を測定した。また pH 6.9 の条件下で 6 時間刺激し、SRE プロモーター活性を測定した。ヒト-ゼブラフィッシュ キメラ受容体は (A) に示すようにゼブラフィッシュ OGR1 の細胞外領域をヒト OGR1 に置換したキメラ受容体である。また、ゼブラフィッシュ-ヒト キメラ受容体は (B) に示すようにヒト OGR1 の細胞外領域をゼブラフィッシュ OGR1 に置換したキメラ受容体である。結果は 3 回行った実験の代表例の結果を平均値 \pm 標準誤差で示した。他 2 回も同様の結果を示した。*はプロトンあるいはミネラル存在下の値が pH 7.4 条件下の値と比べ有意であることを示す (P<0.05)。

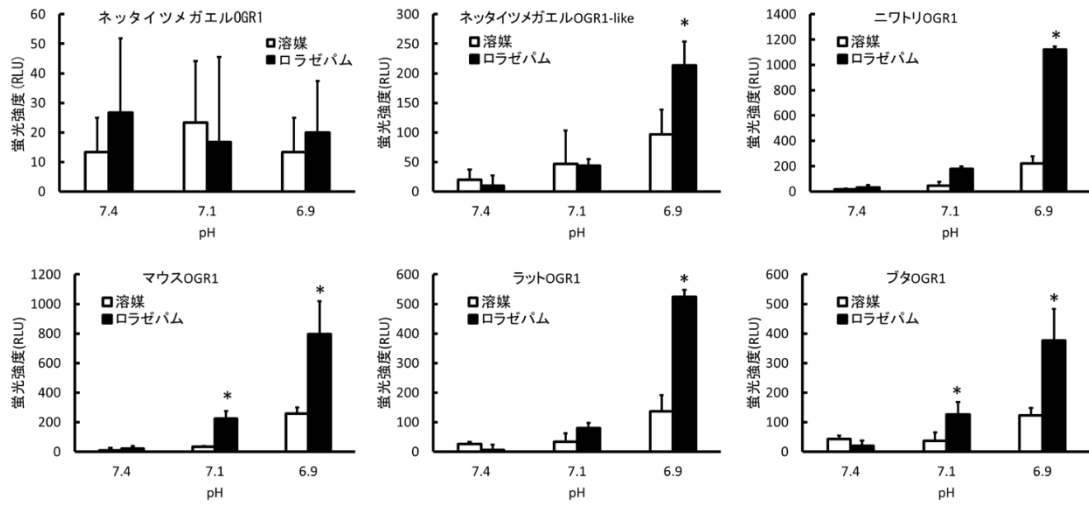


図 26 ロラゼパムによる各動物種 OGR1 の活性化への影響

各動物種 OGR1 発現ベクターを pGloSensor™-22F cAMP プラスミドとともに HEK293T 細胞に導入した。細胞は図に示す pH 条件下で 10 μ M のロラゼパムあるいは溶媒と共に刺激し、刺激後 6 分後に cAMP 量を測定した。なお刺激は、500 μ M の IBMX 存在下で行った。結果は 3 回行った実験の代表例の結果を平均値±標準誤差で示した。他 2 回も同様の結果を示した。*はロラゼパム存在下の活性が非存在下の活性と比べて有意であることを示す (P<0.05)。

4-4 考察

本章の結果をまとめると、表 4 のようになった。

本章での実験の結果、様々な動物種由来の 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ること、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 [Mochimaru *et al.* 2017]。図 22 で示したように、各動物種 OGR1 の EC₅₀ は、およそ pH 7.0 であり、ヒスチジンの pKa 値に近いこと、図 21 で示したように各動物種 OGR1 間で、ヒト OGR1 およびゼブラフィッシュ OGR1 のプロトン感知に重要なヒスチジン残基が保存されていることは、この結果を支持している。

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。特にネッタイツメガエル OGR1 に関しては、今回用いたどのミネラルの種類によっても活性化が観察されなかった (図 23)。このミネラルの種類による活性化応答の差は、各受容体を各種 pH 条件下で刺激したときも観察されたこと (図 24) から、プロトンの影響の結果ではないものと考えられる。この点に関しては今後の解析が必要であるが、今回ヒトとゼブラフィッシュ OGR1 間のキメラ受容体を用いた結果から、少なくとも受容体の細胞外領域が、ミネラルによる応答の特異性に関与していることが明らかとなった (図 25) [Mochimaru *et al.* 2017]。しかしながら細胞外領域のどのアミノ酸配列がその特異性に関与しているのかは、まだ明らかとなっていない。

ネッタイツメガエルに関しては、今回の研究でミネラルにまったく応答しない OGR1 と、ヒトと同様に用いたすべてのミネラルに応答する OGR1-like の 2 種類が同一個体内に存在することが明らかとなった。この 2 種類の受容体の生理的役割の違いに関しては、今後の研究の進展を待たなくてはならないが、こ

れら 2 種類の OGR1 を持つ生物が両生類であることは興味深い。第 3 章の考察で、ヒトとゼブラフィッシュの生活環境の違い、すなわち陸生と水生の環境の違いがミネラルに対する応答性の違いを生み出す可能性を論じた。両生類は水生と陸生の生活を併せ持つ種である。そのためこの種には、ミネラルの応答性の違う 2 種類の OGR1、すなわちミネラルに応答しなくてもよい水生生活の OGR1 が残存する一方、陸生の生活に適応するためのすなわちミネラル応答性の OGR1 を新たに必要とした可能性がある。この可能性の検証にはまず、他の両生類の OGR1 を調べていく必要がある。

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、プロトン刺激に対するアロステリックなリガンドとして作用した (図 26)。ネッタイツメガエル OGR1 については、Rho 系 (SRE) と異なり、プロトンによる活性化が観察されなかったため、プロトン刺激に対するアロステリックなリガンドとして、ロラゼパムが作用するのかどうかは不明である。今回、プロトンによる cAMP 系の活性化が観察されなかった理由としては、ネッタイツメガエル OGR1 と cAMP 系のシグナル経路との共役が弱い可能性が考えられる。ロラゼパムは、ヒトを含むどの動物種由来の OGR1 のプロトンによる Rho 系 (SRE) の活性化も増強しなかった (未発表データ)。その理由は不明であるが、測定の感度が関わっているのかもしれない。Rho 系 (SRE) の測定には 6 時間のインキュベーション時間が必要であるが、cAMP 系の測定には数分のインキュベーション時間で十分であることから、cAMP 系の測定の方が Rho 系 (SRE) の測定に比べてより鋭敏に受容体の活性変化を捉えることができるのかもしれない。

今後マウスに加え、これらの動物種を用いたロラゼパムの作用解析が可能であることを、この結果は示している。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[Housden *et al.* 2017]。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る。

	プロトン感知性	ミネラル感知性				ロラゼパム
		Mn	Ni	Co	Fe	
ヒトOGR1	○	○	○	○	○	○
ブタOGR1	○	○	○	○	○	○
ラットOGR1	○	○	○	○	○	○
マウスOGR1	○	○	○	○	○	○
ニワトリOGR1	○	○	○	○	○	○
ゼブラフィッシュ OGR1	○	○	×	×	×	○
ネッタイツメガエル OGR1	○	×	×	×	×	?
ネッタイツメガエル OGR1-like	○	○	○	○	○	○

表 4 各動物種 OGR1 の複数種のリガンドに対する応答結果

ネッタイツメガエル OGR1 を除き、プロトン、ミネラル、ロラゼパムによってすべての動物種の OGR1 は活性化した。一方、ネッタイツメガエル OGR1 は本研究ではプロトンによってのみ、活性化した（ロラゼパムは不明）。

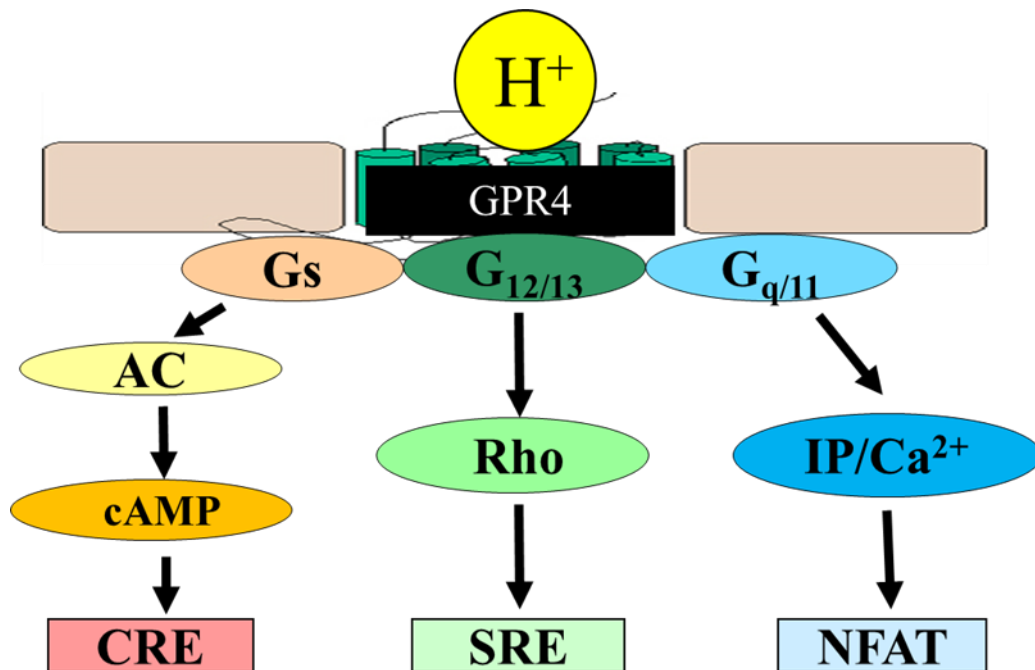
第5章 ヒト GPR4 とゼブラフィッシュ GPR4 のプロトンとミネラルに対する応答解析

5-1 緒言と目的

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) [Ludwig *et al.* 2003, Wang *et al.* 2004, Murakami *et al.* 2004]。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。またその受容体のプロトンやミネラルに対する応答能が、動物種間で保存されているのかに関しても、明らかとはなっていなかった。私はこれらの点を明らかにする目的で実験を行った。プロトン感知性 GPCR のうち GPR4 を今回の解析対象に選んだ。その理由は以下のとおりである。

- (1) G2A に関しては、ゼブラフィッシュには2種類の G2A 相同遺伝子が存在し、どちらの遺伝子にもヒト G2A でプロトン感知に関与するヒスチジン残基[Murakami *et al.* 2004]が保存されていること、また酸性条件下ではどちらの遺伝子産物も活性化することを私は報告した[Ichijo *et al.* 2016]。しかしながらヒトやゼブラフィッシュ G2A で保存されているこのヒスチジン残基は、マウスでは保存されていない。実際マウス G2A はプロトン感知能を示さない[Radu *et al.* 2005]など、G2A のプロトン感知能に関しては未だ議論が多い。
- (2) TDAG8 に関しては、NCBI のデータベースではゼブラフィッシュにおける相同遺伝子が登録されておらず、まだその存在が確固たるものとはなっていない。

一方 GPR4 に関しては、ゼブラフィッシュにもその相同遺伝子が存在することがデータベース検索により明らかとなった。これまでにプロトンはヒト・マウスの GPR4 を介して、G_{q/11}/PLC・Ca²⁺/NFAT 系、G_s/cAMP/CRE 系、G_{12/13}/Rho/SRE 系を活性化することが報告されている [Ludwig *et al.* 2003, Tobo *et al.* 2007] (図 27)。しかしながらゼブラフィッシュ GPR4 のキャラクタリゼーションは、本研究以前には為されていなかった。そこでこの受容体の解析を行った。



G_s , $G_{12/13}$, $G_{q/11}$: 三量体Gタンパク質
 AC : アデニル酸シクラーゼ
 Rho : 低分子量Gタンパク質
 IP : イノシトールリン酸
 CRE : cAMP応答配列
 SRE : 血清応答配列
 NFAT : 活性化T細胞核内因子

図 27 GPR4 を介した細胞内シグナル伝達経路

プロトンはヒト・マウス OGR1 を介して、 $G_{q/11}/PLC \cdot Ca^{2+}/NFAT$ 系、 $G_s/cAMP/CRE$ 系、 $G_{12/13}/Rho/SRE$ 系を活性化する。

5-2 材料と方法

5-2-1 細胞培養

実験に用いた HEK293T 細胞は理研 BRC より提供された。細胞は第 3 章と同様の方法で培養した。

5-2-2 受容体 cDNA プラスミドの準備と発現

ヒト GPR4 (1089 bp, GenBank accession No. NM_005282)、ゼブラフィッシュ GPR4 (1122bp, GenBank accession No. XM_005157675) のコード領域を、1 番目のメチオニンコドンの前にコザック配列 (CCACC) をつけて合成し (Eurofins Genomics, Tokyo, Japan)、pBApo-CMV Neo ベクターに組み込んだ。H78F はゼブラフィッシュ GPR4 の N 末端から 78 番目のヒスチジン残基をフェニルアラニン残基に置換した人工遺伝子であり、H84F はゼブラフィッシュ GPR4 の N 末端から 84 番目のヒスチジン残基をフェニルアラニン残基に置換した人工遺伝子である。それぞれの変異体はゼブラフィッシュ GPR4 と同様に pBApo-CMV Neo ベクターに組み込んだ。ヒト GPR4 発現ベクター、ゼブラフィッシュ GPR4 発現ベクター、H78F 発現ベクター、H84F 発現ベクター、pBApo-CMV Neo ベクター、pCRE-luc、pSRE-luc、pNFAT-luc および pRL-TK は、Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent を用いて細胞に遺伝子導入した。

5-2-3 デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ

CRE、SRE、NFAT プロモーター活性は、The PathDetect Signal Transduction

Pathway cis-Reporting Systems (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いて第 3 章と同様の方法で測定した。刺激試薬には、図に示した濃度の塩化コバルト (II)、塩化マンガン (II)、硫酸ニッケル (II)、塩化鉄 (III) を使用した。

5-2-4 データ表示

すべての実験は 2 回以上行った。他に特に記載がない限り、3 つ以上の異なる細胞のバッチからの結果を平均±標準誤差として示した。統計的有意性は、ANOVA によって評価した。値は $p < 0.05$ で有意であるとみなした。

5-3 結果

5-3-1 ヒト GPR4 とゼブラフィッシュ GPR4 相同遺伝子産物間のアミノ酸配列の比較

ヒトとゼブラフィッシュ間の GPR4 のアミノ酸の相同性は 73%であった。また図 28 に示すように、ヒト GPR4 のプロトン感知に重要なヒスチジン残基はゼブラフィッシュ GPR4 においても保存されていた。

5-3-2 pH 低下に伴うゼブラフィッシュ GPR4 相同遺伝子産物を介した CRE、SRE、NFAT 系の活性化

ゼブラフィッシュ GPR4 相同遺伝子産物（以下、ゼブラフィッシュ GPR4 と記す）が細胞外プロトンを感じて細胞内シグナル伝達経路を活性化させるかどうかを、HEK293T 細胞を用いて調べた。その結果、ゼブラフィッシュ GPR4 は細胞外 pH の低下に伴い、CRE、SRE 系を活性化した（図 29）。しかしながら NFAT 系は活性化されなかった（図 29）。この結果は、ゼブラフィッシュ GPR4 は、ヒト・マウス GPR4 と同様に細胞外プロトンにより活性化されることを示している。NFAT 系に関しては、ヒト GPR4 は pH の低下によりこの系を活性化したので[Tobo *et al.* 2007]、ゼブラフィッシュ GPR4 はヒト GPR4 とは異なり $G_q/PLC \cdot Ca^{2+}$ 系を活性化しないことが示唆された。

5-3-3 pH 低下に伴うゼブラフィッシュ GPR4 活性化とヒスチジン残基

OGR1 と同様にヒト GPR4 の細胞外のヒスチジン残基は、プロトン感知に重要な役割を担っている[Liu *et al.* 2010b]。ヒト GPR4 においてプロトン感知に重要な 3 つのヒスチジン残基が、ゼブラフィッシュ GPR4 においても保存されていた (図 28)。これらゼブラフィッシュ GPR4 のヒスチジン残基が実際にプロトン感知するのかどうかを明らかにするために、変異体を作製した。ヒト GPR4 の結果[Liu *et al.* 2010b]から、ゼブラフィッシュ GPR4 の N 末端から 78 番目のヒスチジン残基がプロトン感知する一方、84 番目のヒスチジン残基はプロトン感知しないことが予想された。そこで私は 78 番目のヒスチジン残基をフェニルアラニンに変えた変異体 (H78F) と、84 番目のヒスチジン残基をフェニルアラニンに変えた変異体 (H84F) の 2 つの変異体を作製し、pH 低下によるそれら変異体の活性化を測定した。その結果、H78F の SRE プロモーター活性は正常型のゼブラフィッシュ GPR4 の活性と比べ減弱したが、H84F 由来の SRE プロモーター活性は正常型と同等であった (図 30)。この結果は、プロトン感知するヒスチジン残基は、ヒトとゼブラフィッシュ間で保存されていることを示唆している。

hGPR4	1	-----MGNHTWEGCHVDSRVDHLFPPSLYIFVIGVGLPTNCLALWAAQRVQQRNEL	52
zGPR4	1	MASLRGSETMCNITTS CNVDSNIDQFFQPTLYIIIVIVLGFPTNCMALWAAVMQVKQKNEL	60
		<u>I</u>	
hGPR4	53	GVYLMNLSIADLLYICTLPLWVDYFLHHDNWIHGPGSCKLFGFI FYTNIYISIAFLCCIS	112
zGPR4	61	GIYLMNLSIADLLYITTLPLWIDYFVHHDNWIHQVSCCKLFGFI FYTNIYVSI AFLCCIS	120
		<u>II</u> <u>III</u>	
hGPR4	113	VDRYLAVAHPLRFARLRRVKTAVAVSSVVWATELGANSAPLFHDELFRDRYNETFCFEKF	172
zGPR4	121	VDRYLAVAHPLKFAKVRVRVKTALLVSAIVWLTEIVANSAPLFHDELFRDRYNETFCFEKY	180
		<u>IV</u>	
hGPR4	173	PMEGWVAVMNLRYRVFVGF LFPWALMLLSYRGILRAVRG SVSTERQE KAKIKRLALS LIAI	232
zGPR4	181	PMEPWVAGMNLRYRTFLGFLAPWGIMLAAYRGILRAVRGNVSTERQE KAKIKRLALS LILI	240
		<u>V</u>	
hGPR4	233	VLVCFAPYHVLLLSRSAYLGRPWDCGFEERVFSAYHSSLAFTSLNCVADPILYCLVNEG	292
zGPR4	241	VLLCFAPYHVLLLWRSVLF LINPCDCGGEENLFGAYHVTALTS LNCVADPILYCFVNEG	300
		<u>VI</u> <u>VII</u>	
hGPR4	293	ARSDVAKALHNLLRFLASDK-PQEMANASLTLETPLTSKRNSTAKAMTGSWAATPPSQGD	351
zGPR4	301	ARHDVGRALATLLGLFQRGKS PETLMGASITVETPLAVKKPDFYSEVKTNAYKNDIEVLK	360
hGPR4	352	QVQLKMLPPAQ--	362
zGPR4	361	DECLQMTILSVKK	373

図 28 ヒト GPR4 (hGPR4) とゼブラフィッシュ GPR4 (zGPR4) 間のアミノ酸配列の比較

ヒト GPR4 においてプロトン感知に重要なヒスチジン残基[Liu *et al.* 2010b]と対応するゼブラフィッシュ GPR4 のヒスチジン残基を白抜きで示す。下線部は GPR4 の細胞膜貫通領域を示す。

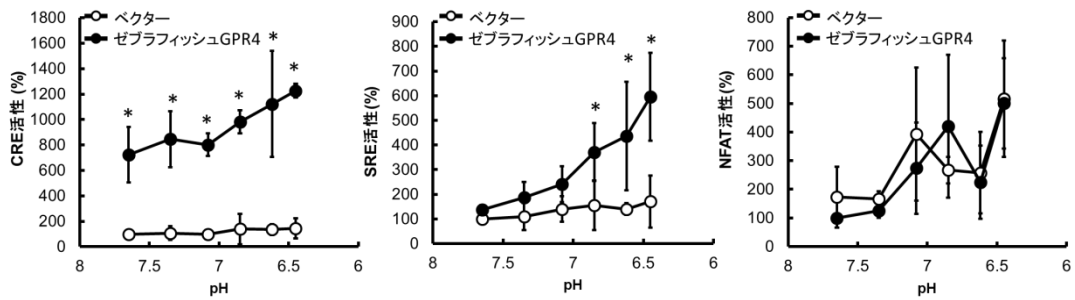


図29 ゼブラフィッシュ GPR4 発現細胞における細胞外 pH 低下による CRE、SRE、NFAT 系の活性化

ゼブラフィッシュ GPR4 発現ベクター (●) もしくはベクター (○) を pRL-TK と pCRE-luc、pSRE-luc もしくは pNFAT-luc とともに HEK293T 細胞に導入した。細胞は図に示した pH で 6 時間インキュベートし、CRE、SRE、NFAT プロモーター活性を測定した。詳細は「材料と方法」を参照。結果は 2 回以上の実験結果の平均値±標準誤差で示す。*はゼブラフィッシュ GPR4 発現細胞の活性がベクター細胞の活性に比べて有意に変化したことを示す (P<0.05)。

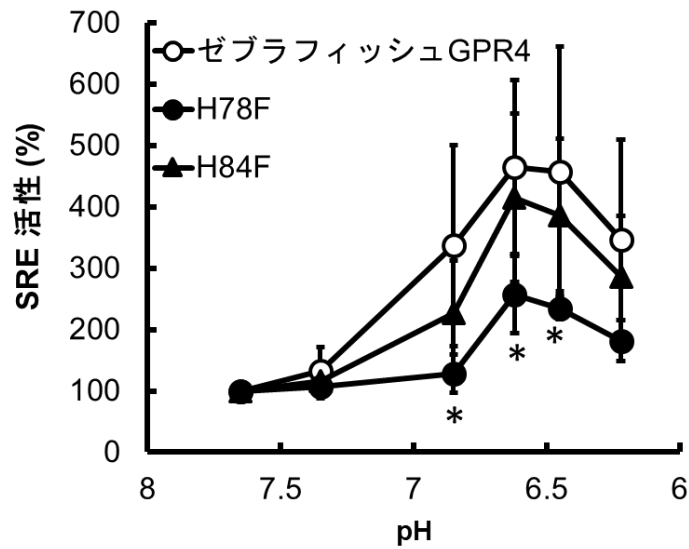


図 30 ゼブラフィッシュ GPR4 のヒスチジン残基をフェニルアラニン残基に置換した変異体の SRE プロモーター活性

ゼブラフィッシュ GPR4 のプロトン感知能に関与する、または関与しないと予想されるヒスチジン残基をフェニルアラニンに置換した変異体 H78F もしくは H84F をそれぞれ作製した。ゼブラフィッシュ GPR4 発現ベクター (○)、H78F 発現ベクター (●)、H84F 発現ベクター (▲) を pRL-TK と pSRE-luc とともに HEK293T 細胞に導入した。細胞は図に示された pH で 6 時間インキュベートし、SRE プロモーター活性を測定した。結果は pH 7.7 条件下の値を 100% として表示した。3 回以上の実験の平均値±標準誤差を示す。* は図示した pH 条件下において、H78F の活性がゼブラフィッシュ GPR4 の活性と比べ、有意に変化したことを示す (P<0.05)。

5-3-4 ミネラルによるゼブラフィッシュ GPR4 の活性化

5-3-2、5-3-3 の結果から、ゼブラフィッシュ GPR4 もヒト GPR4 や OGR1 と同様に、細胞外のコヒスチジン残基を介して pH の低下を感知し、活性化することが明らかとなった。しかしながら GPR4 とミネラルの関係は明らかとなっていなかった。そこで次にミネラルが GPR4 を活性化するのかを調べた。その結果、図 31 に示すように、ヒト GPR4、ゼブラフィッシュ GPR4 は、用いた 100 μM のどのミネラル種によっても活性化されなかった。一方、この条件下でヒト OGR1 やゼブラフィッシュ OGR1 は活性化した。そこでミネラルに対する活性化の閾値が、GPR4 と OGR1 間で異なる可能性を次に検証した。ミネラル濃度を 1 mM まで変化させたときのヒト GPR4、ゼブラフィッシュ GPR4 の活性化を測定した (図 32)。その結果、どのミネラル濃度においてもヒト GPR4、ゼブラフィッシュ GPR4 は活性化応答を示さなかった。

5-3-5 リゾ脂質によるゼブラフィッシュ GPR4 の活性化

LPC と SPC は哺乳類の GPR4 を介した細胞応答に関与するとの報告がなされているが、その応答に関しては疑問が呈されている[Xu 2002, Kim *et al.* 2005]。そこで私はこれらのリゾ脂質がゼブラフィッシュ GPR4 を介した SRE の活性化に関与するのかを調べた。その結果、10 μM の LPC は SRE を活性化しなかった (図 33A)。一方 10 μM の SPC は SRE の活性化を誘導したが、同様の活性化はベクターを遺伝子導入した細胞においても観察されたため、GPR4 を介した活性化ではなく、HEK293T 細胞に内在性に発現する S1P 受容体の活性化を検出しているものと考えられた (図 33B)。これらの結果から、SPC、LPC はゼブラフィッシュ GPR4 を活性化しないことが明らかとなった。

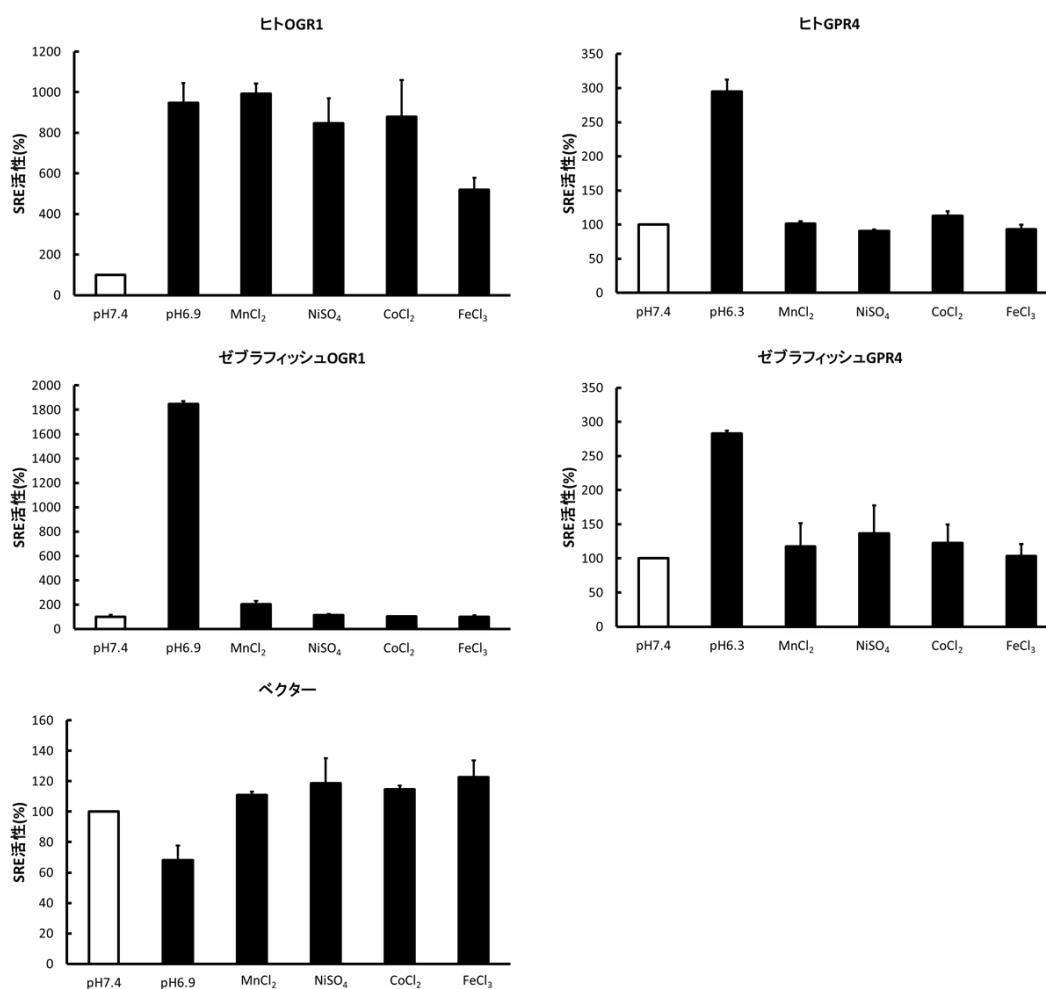


図 31 ヒト GPR4 およびゼブラフィッシュ GPR4 のミネラルによる活性化

ヒト OGR1 発現ベクター、ヒト GPR4 発現ベクター、ゼブラフィッシュ OGR1 発現ベクター、ゼブラフィッシュ GPR4 発現ベクターもしくはベクターを pRL-TK と pSRE-luc とともに HEK293T 細胞に導入した。pH 7.4 条件下において 100 μ M の塩化マンガン (II)、硫酸ニッケル (II)、塩化コバルト (II)、塩化鉄 (III) で細胞を刺激した。細胞は pH 7.4 条件下において上記ミネラル存在下あるいは、pH 6.9 もしくは pH 6.3 条件下で 6 時間インキュベートし、SRE プロモーター活性を測定した。結果は 3 回行った実験の代表例を示した。他 2 回も同様の結果を示した。pH 7.4 条件下時の活性の値を 100% として、平均値 \pm 標準誤差で示した。

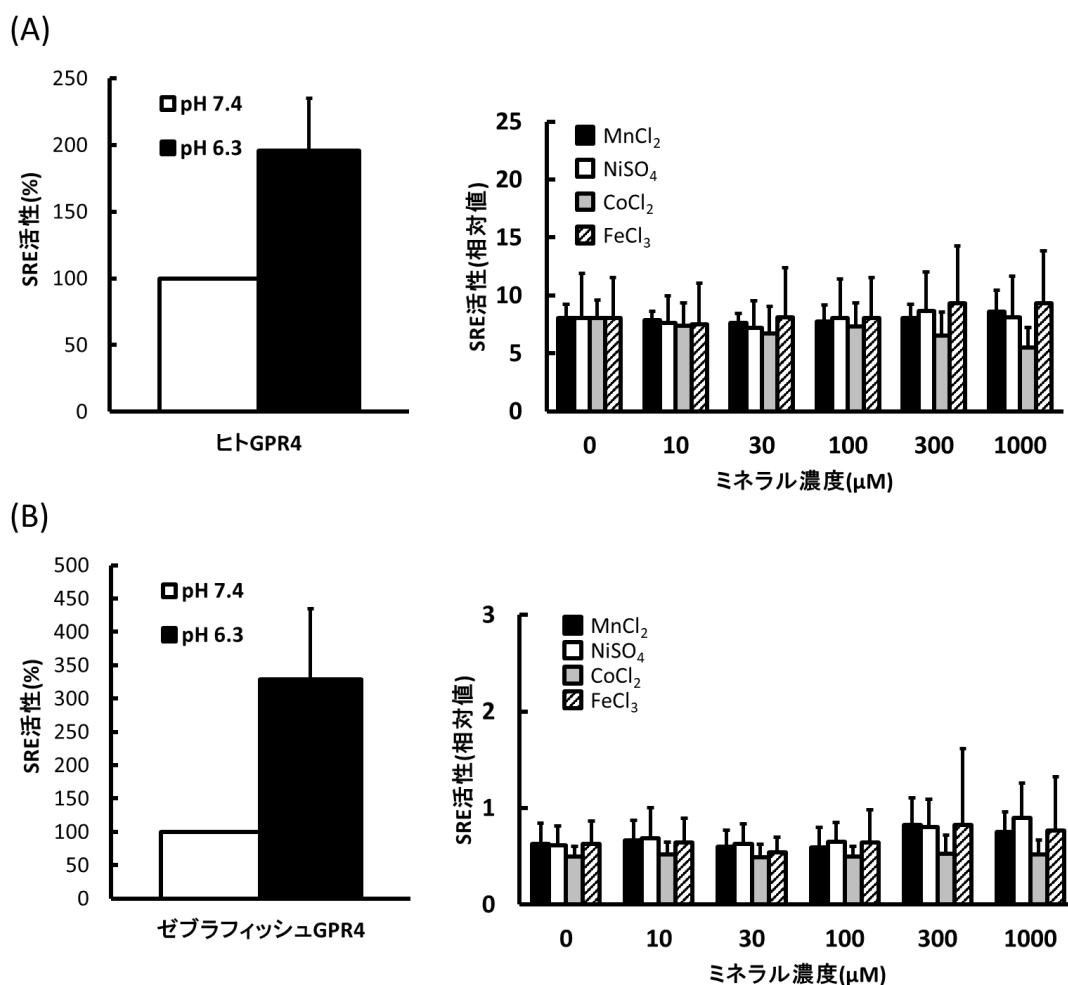


図 32 ヒト GPR4 (A) もしくはゼブラフィッシュ GPR4 (B) 発現 HEK293T 細胞の SRE プロモーター活性に対するミネラル濃度の影響

ヒト GPR4 (A) もしくはゼブラフィッシュ GPR4 発現ベクター (B) を pRL-TK と pSRE-luc とともに HEK293T 細胞に導入した。図 (A)、(B) の左側の図は、pH 7.4 または pH 6.3 で刺激後の SRE プロモーター活性を、pH 7.4 条件下での値を 100% として示した。図 (A)、(B) の右側の図は、pH 7.4 の条件下で各種ミネラルを図で示す濃度で 6 時間インキュベートし、SRE プロモーター活性を測定した。結果は 3 回の実験の平均値±標準誤差で示す。

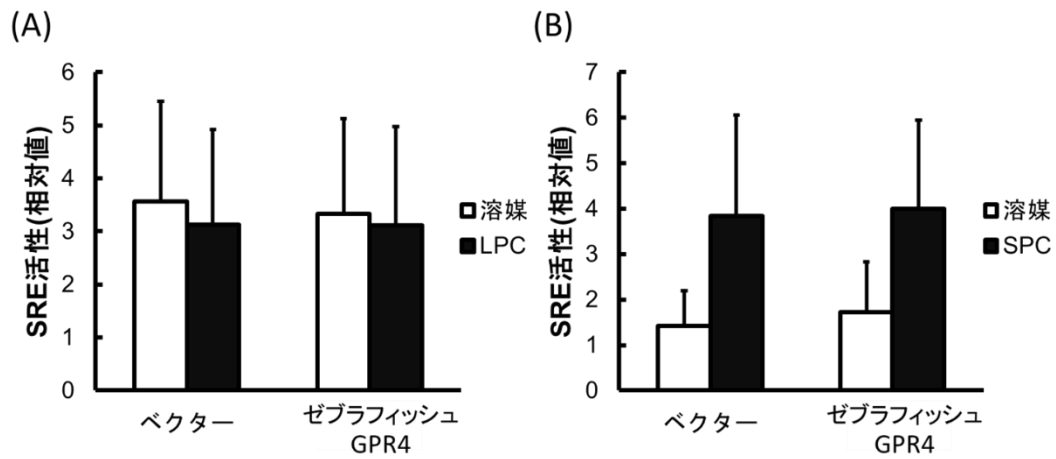


図33 ゼブラフィッシュ GPR4発現細胞における SRE プロモーター活性への LPC (A) および SPC (B) の影響

ゼブラフィッシュ GPR4 発現ベクターもしくはベクターを pRL-TK と pSRE-luc とともに HEK293T 細胞に導入した。細胞は 10 μ M の LPC (A) もしくは 10 μ M の SPC (B) 存在下あるいは非存在下で 6 時間インキュベートし、SRE プロモーター活性を測定した。結果は 3 回の実験の平均値 \pm 標準誤差で示す。

5-4 考察

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となった[Mochimaru *et al.* 2015]。またそのプロトン感知機構もヒト GPR4 と同様であること[Liu *et al.* 2010b, Mochimaru *et al.* 2015]が、変異体 (H79F、H84F) を用いた解析で明らかとなった。しかしながら HEK293T 細胞において、ゼブラフィッシュ OGR1 がヒト OGR1 と同様に酸性条件下で G_s/cAMP/CRE 系、G_{12/13}/Rho/SRE 系、G_{q/11}/PLC・Ca²⁺/NFAT 系の 3 種類のシグナル系を活性化するのに対して、ゼブラフィッシュ GPR4 は、酸性条件下で G_s/cAMP/CRE 系、G_{12/13}/Rho/SRE 系を活性化するが G_{q/11}/PLC・Ca²⁺/NFAT 系を活性化しなかった (図 29) [Ludwig *et al.* 2003, Mogi *et al.* 2005, Tobo *et al.* 2007, Mochimaru *et al.* 2015]。これはヒト GPR4 がこれら 3 種のシグナル系を OGR1 の場合と同様に活性化するのは、異なっていた[Tobo *et al.* 2007]。この理由として、ヒト GPR4 に比べゼブラフィッシュ GPR4 では G_{q/11} への連関が減弱している可能性が考えられる。この点に関してはさらなる解析が必要である。SRE の活性化に比べて CRE の活性化は pH 7.6 ですでに観察され、酸性化に伴いさらにその活性化が促進された (図 29)。このアルカリ側での高い活性はヒト GPR4 でも報告されている[Ludwig *et al.* 2003]。また腎細胞では、pH 7.8 においてもすでに cAMP の蓄積が報告されている[Sun *et al.* 2010]。このことから今回の CRE の結果は、ゼブラフィッシュ GPR4 に特異的な現象ではない。

ミネラルによる活性化に関しては、ヒト GPR4、ゼブラフィッシュ GPR4 とも活性化を示さなかった (図 31、図 32)。この結果は、同じプロトン感知性 GPCR であってもミネラルに対する応答性には差があることを示している。OGR1 に関しても第 4 章で示したように、動物種により活性化に関与するミネラルが異な

ること（図 23）や、その活性化パターンも動物種により異なるという結果（図 24）はこの結果を支持している。ヒスチジン残基だけではミネラルによる活性化機構をすべて説明することはできず、その他のアミノ酸残基の影響を考慮する必要がある（図 25）。この結果は、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も示唆している。OGR1 や GPR4 はプロトンにより活性化され、それぞれ複数のシグナル伝達系を活性化するが（図 14、図 27）、OGR1 と GPR4 が同一の細胞に発現している場合も多く、その場合はプロトン刺激により観察された応答が OGR1 を介しているのか、または GPR4 を介しているのかを簡便に判別することはできなかった。プロトンの代わりにミネラルを用いることにより、この点を明らかにすることができる可能性がある。

ヒト GPR4 は SPC と LPC の受容体として報告されたが、後にその報告は撤回されている。今回の研究で、ゼブラフィッシュ GPR4 がヒト GPR4 と同様に SPC と LPC による SRE 活性化を引き起こさないことが明らかとなった[Mochimaru *et al.* 2015]。この結果から OGR1 の場合と同様に、これらのリゾ脂質が進化の初期には GPR4 のリガンドとして働いており、進化に伴いその作用が減弱したという可能性は低いものと考えられた。

以上の結果を表 5 としてまとめた。

	脂質リガンド	プロトン感知性	ミネラル感知性			
			Mn	Ni	Co	Fe
ヒトGPR4	×	○	×	×	×	×
ゼブラフィッシュ GPR4	×	○	×	×	×	×

表 5 ヒト GPR4 およびゼブラフィッシュ GPR4 のリガンドに対する応答のまとめ

ゼブラフィッシュ GPR4 はヒト GPR4 と同様にプロトンによって活性化されたが、リゾ脂質およびミネラルによっては活性化されなかった。

第6章 総括と今後の展望

本研究の結果から、細胞外 pH の低下は細胞レベルで OGR1 を介してゴナドトロフ株からのホルモン分泌を修飾することが明らかとなった。この細胞外 pH の低下による OGR1 を介したホルモン分泌の修飾は、すい臓 β 細胞からのインスリン分泌応答においても観察されている[Nakakura *et al.* 2012]。この結果は OGR1 が pH 低下時に各種ホルモン分泌を制御している可能性を示唆する。OGR1 によるこのホルモン分泌の修飾作用には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。またその生理的、病態生理的な意義の解明は今後の課題である。実際、個体レベルでも表 2 で示したように、OGR1 欠損マウスではグルコースによるインスリン分泌応答の減少が観察されている[Nakakura *et al.* 2012]。しかしながらこの報告では、個体レベルで pH 低下に伴うインスリン分泌の変化を解析した結果は記載されていない。すなわちインスリン分泌の減少が OGR1 欠損による直接作用の結果であるのか、または OGR1 欠損に伴う 2 次的、3 次的な生体の代償作用の結果なのかを判別することはできない。この問題はインスリン分泌の報告のみならず、他のすべての欠損マウスの報告に関しても同様である（表 2）。この理由の一つとして第 1 章で述べたように、哺乳類の血液の pH は厳密に pH 7.4 に調節されており、わずかな pH の変化が重篤な作用を引き起こしてしまうため、人為的に pH を変化させる実験が困難な点があげられる。

この点を克服することを目指し今回は、より広範囲な pH 環境下で耐性を示す魚類に着目した。ゼブラフィッシュは飼育が容易であり多産であること、胚は母体外で発生しかつ透明であることから組織観察が容易であること、また胚発生が速く約 3 日で稚魚となること、全ゲノム配列が公開されており遺伝子操作が可能であること、ヒトとゼブラフィッシュ間のゲノムのシンテニーは約 70

～80%と高いことから、マウスと同様に近年よく使用されるようになったモデル動物である。実際 OGR1 や GPR4 に関しても、ゼブラフィッシュゲノム上にヒトのものと相同な遺伝子が登録されていた。しかしながら本研究を始めた時点ではその機能は解析されていなかったため、私は上記問題点の克服への第一歩として、これら相同遺伝子産物がヒトと同様の機能を有しているのかに焦点をあて、本研究を行った。その結果 pH 低下に対する応答はゼブラフィッシュとヒト間で同様であり、ゼブラフィッシュをモデル系として使用できることが明らかとなった。一方この解析の途中で「ヒト OGR1 がプロトン以外にミネラルやロラゼパムによっても活性化される」との報告が新たになされたことから [Abe-Ohya *et al.* 2015, Huang *et al.* 2015]、本研究ではこれらのリガンドに対してもゼブラフィッシュ OGR1 の解析を付け加えることになった。その結果第 3 章で示したようにミネラルに対してゼブラフィッシュ OGR1 は、ヒト OGR1 とは異なる応答を示した。このことは異なる生物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を示している。

このミネラルに対する応答の違いが、ゼブラフィッシュのみで観察されるのかどうかに関して、私はさらにデータベース上で相同遺伝子が登録されている動物種由来の OGR1 の解析を、第 4 章で行った。その結果、細胞外 pH の低下に対して、調べたすべての OGR1 相同遺伝子産物がヒトと同様の活性化パターンを示したのに対して、ミネラルに対する応答性はその動物種により異なっていた (図 23)。今回解析した動物種の数が少ないため、まだ明確な答えは得られていないが、その応答パターンは水生動物であるカエル (両生類) やゼブラフィッシュ (魚類) のグループと、陸生動物であるニワトリ (鳥類) やラット・マウス・ブタ・ヒト (哺乳類) とに大きく分けられる可能性が示唆された。すなわち生息環境により OGR1 のミネラルに対する応答性が変化した可能性が考え

られる。この観点からみると、カエルの結果（図 23）は興味深い。両生類は水と陸の両環境で生息する。カエルには、水型（ネッタイツメガエル OGR1）と陸型（ネッタイツメガエル OGR1-like）の 2 種類の OGR1 が登録されており、それら OGR1 はミネラルに対して異なる応答性を示した。この 2 種類の OGR1 が水中環境と陸上環境とで、どのように使い分けられているのか、またどのような生理作用に関与しているのかは全く不明である。

調べたすべての動物種由来の OGR1 がプロトンに同様に応答する一方、ミネラルに対しては異なる応答性を示すことから、受容体がプロトンとミネラルを感知する機構は部分的に異なることが本研究により、明らかとなった。実際、プロトンを感じする他の OGR1 ファミリー受容体である GPR4 は、プロトンには応答するがミネラルにはまったく応答しないという第 5 章の解析結果(図 31) は、この考えを支持している。また図 25 の結果から、少なくとも受容体の細胞外領域にはミネラルによる感知を決定する部位が存在することも本研究により明らかとなった。

最後に本研究の結果から今後、どのように上記の個体レベルでの問題にアプローチしていけるのかについて展望を述べたい。これまで述べてきたように、個体レベルで pH を人為的に変化させたマウスの実験結果はまだない。表 2 の中で骨代謝に関しては、細胞レベル、個体レベルともに OGR1 の関与が観察されている。骨代謝には破骨細胞からの塩酸の分泌とその作用が不可欠であること [Rousselle and Heymann 2002]、骨は生体の構造維持以外にもミネラルの貯蔵庫としての役割も果たしていることから[Sarko 2005]、OGR1 が個体レベルで局所的な pH やミネラル濃度の変化を感知して、骨代謝を調節している可能性は高い。ゼブラフィッシュを含む魚類では、鱗は体表面に存在するため、周りの飼育水の影響を直接に受ける。また鱗は骨代謝のモデル系として近年用いられていることから[Carnovali *et al.* 2016, Mariotti *et al.* 2015]、上記問題の克服に向けて私は

まず骨代謝に着目し、OGR1 を介したプロトンやミネラルの個体レベルでの作用をゼブラフィッシュの鱗の解析を中心にして行うのがよいと考えている。OGR1 を欠失するゼブラフィッシュが最近当研究室で作製されている。正常型、OGR1 欠損型のゼブラフィッシュ飼育水の pH を変化させる、またはマンガンを添加後、その鱗の形状変化、骨芽細胞、破骨細胞の活性変化を測定することにより、OGR1 の骨代謝への直接の関与を明らかにできることが期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、実験の指導や論文作製、サイエンスの面白さに至るまで親切かつ熱心なご指導を賜りました、明治大学農学部生命科学科・細胞情報制御学研究室の戸村秀明教授に深く御礼申し上げます。

本研究に関するご指導ご鞭撻や実験機器の貸し出しを快諾してくださった、遺伝情報制御学研究室の加藤幸雄教授と加藤たか子博士に深く御礼申し上げます。

本研究内容や実験技術に関するご指導ご鞭撻やサイエンスに対する姿勢を熱く伝授してくださった、帝京大学医学部・解剖学講座の中倉敬助教、杏林大学保健学部解剖学・細胞生物学研究室の堀口幸太郎講師に深く御礼申し上げます。

本研究内容に関するご指導ご鞭撻を賜りました自治医科大学医学部・解剖講座の藤原研准教授と東邦大学理学部・生物分子科学科の塚田岳大講師、研究内容のご指導だけでなく精神面においても支えてくださった、自治医科大学医学部・解剖講座の東森生助教並びに東京慈恵会医科大学医学部・生化学講座の吉田彩舟助教、そして八子尚子博士に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり貴重なサンプルをご提供してくださいました、発生工学研究室の長嶋比呂志教授、動物生理学研究室の中村孝博准教授、静岡大学創造科学技術大学院・研究部統合バイオサイエンス部門の鈴木雅一教授に深く御礼申し上げます。

本研究の副査を担当して頂きました、分子発生学研究室の吉田健一教授並びに生体機能物質学研究室の渡辺寛人教授に深く御礼申し上げます。

最後になりましたが、本研究を遂行するにあたり様々な面で支えてくださった、卒業された方を含む、細胞情報制御学研究室および遺伝情報制御学研究室の皆様に深く御礼申し上げます。

参考文献

Abe-Ohya R, Ishikawa T, Shiozawa H, Suda K, Nara F Identification of metals from osteoblastic ST-2 cell supernatants as novel OGR1 agonists. *J Recept Signal Transduct Res.* **35**:485-92. 2015

Absalom NL, Lewis TM, Schofield PR Mechanisms of channel gating of the ligand-gated ion channel superfamily inferred from protein structure. *Exp Physiol.* **89**:145-53. 2004

Aoki H, Mogi C, Hisada T, Nakakura T, Kamide Y, Ichimonji I, Tomura H, Tobo M, Sato K, Tsurumaki H, Dobashi K, Mori T, Harada A, Yamada M, Mori M, Ishizuka T, Okajima F Proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 on dendritic cells is required for airway responses in a murine asthma model. *PLoS One.* **8**:e79985. 2013

Bagriantsev SN, Gracheva EO Molecular mechanisms of temperature adaptation. *J Physiol.* **593**:3483-91. 2015

Bayliss WM, Starling EH The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol.* **28**:325-53. 1902

Camakaris J, Voskoboinik I, Mercer JF Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun.* **261**:225-32. 1999

Carnovali M, Luzi L, Banfi G, Mariotti M Chronic hyperglycemia affects bone metabolism in adult zebrafish scale model. *Endocrine*. **54**:808-817. 2016

Catterall WA Ion channel voltage sensors: structure, function, and pathophysiology. *Neuron*. **67**:915-28. 2010

Chen RA, Goodman WG Role of the calcium-sensing receptor in parathyroid gland physiology. *Am J Physiol Renal Physiol*. **286**:F1005-11. 2004

Chey WY, Chang TM Secretin, 100 years later. *J Gastroenterol*. **38**:1025-35. 2003

Chey WY, Hitanant S, Hendricks J, Lorber SH Effect of secretin and cholecystokinin on gastric emptying and gastric secretion in man. *Gastroenterology*. **58**:820-7. 1970

Conn PM, Crowley WF Jr Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med*. **324**:93-103. 1991

Costello LC, Franklin RB A comprehensive review of the role of zinc in normal prostate function and metabolism; and its implications in prostate cancer. *Arch Biochem Biophys*. **611**:100-112. 2016

Czarnek K, Terpiłowska S, Siwicki AK Selected aspects of the action of cobalt ions in the human body. *Cent Eur J Immunol*. **40**:236-42. 2015

Damaghi M, Wojtkowiak JW, Gillies RJ pH sensing and regulation in cancer. *Front*

Physiol. **4**:370. 2013

de Vallière C, Wang Y, Eloranta JJ, Vidal S, Clay I, Spalinger MR, Tcymbarevich I, Terhalle A, Ludwig MG, Suply T, Fried M, Kullak-Ublick GA, Frey-Wagner I, Scharl M, Seuwen K, Wagner CA, Rogler G G Protein-coupled pH-sensing Receptor OGR1 Is a Regulator of Intestinal Inflammation. *Inflamm Bowel Dis.* **21**:1269-81. 2015

Earley S TRPA1 channels in the vasculature. *Br J Pharmacol.* **167**:13-22. 2012

Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* **63**:1256-72. 2003

Gadsby DC, Nairn AC Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev.* **79**:S77-S107. 1999

Gaetke LM, Chow-Johnson HS, Chow CK Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Arch Toxicol.* **88**:1929-38. 2014

Gao L, Ortega-Sáenz P, García-Fernández M, González-Rodríguez P, Caballero-Eraso C, López-Barneo J Glucose sensing by carotid body glomus cells: potential implications in disease. *Front Physiol.* **5**:398. 2014

Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev.* **11**:177-99. 1990

Gibbs EM, Horstick EJ, Dowling JJ Swimming into prominence: the zebrafish as a valuable tool for studying human myopathies and muscular dystrophies. *FEBS J.* **280**:4187-97. 2013

Giersch A, Boucart M, Elliott M, Vidailhet P Atypical behavioural effects of lorazepam: clues to the design of novel therapies? *Pharmacol Ther.* **126**:94-108. 2010

Gleadle JM Review article: How cells sense oxygen: lessons from and for the kidney. *Nephrology (Carlton).* **14**:86-93. 2009

Gozzelino R, Arosio P Iron Homeostasis in Health and Disease. *Int J Mol Sci.* **17** (1) . 2016

Greger JL Dietary standards for manganese: overlap between nutritional and toxicological studies. *J Nutr.* **128**:368S-371S. 1998

Gründer S, Pusch M Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs). *Neuropharmacology.* **94**:9-18. 2015

Guyenet PG, Bayliss DA, Stornetta RL, Ludwig MG, Kumar NN, Shi Y, Burke PG, Kanbar R, Basting TM, Holloway BB, Wenker IC Proton detection and breathing regulation by the retrotrapezoid nucleus. *J Physiol.* **594**:1529-51. 2016

Hansky J, Soveny C, Korman MG Effect of secretin on serum gastrin as measured by immunoassay. *Gastroenterology.* **61**:62-8. 1971

Hershinkel M, Moran A, Grossman N, Sekler I A zinc-sensing receptor triggers the release of intracellular Ca²⁺ and regulates ion transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**:11749-54. 2001

Holzer P Acid sensing by visceral afferent neurones. *Acta Physiol (Oxf)* . **201**:63-75. 2011

Holzer P Acid-sensitive ion channels and receptors. *Handb Exp Pharmacol* .:283-332. 2009

Horiguchi K, Higuchi M, Yoshida S, Nakakura T, Tateno K, Hasegawa R, Takigami S, Ohsako S, Kato T, Kato Y Proton receptor GPR68 expression in dendritic-cell-like S100 β -positive cells of rat anterior pituitary gland: GPR68 induces interleukin-6 gene expression in extracellular acidification. *Cell Tissue Res*. **358**:515-25. 2014

Housden BE, Muhar M, Gemberling M, Gersbach CA, Stainier DY, Seydoux G, Mohr SE, Zuber J, Perrimon N Loss-of-function genetic tools for animal models: cross-species and cross-platform differences. *Nat Rev Genet*. **18**:24-40. 2017

Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assunção JA, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel JH, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire SF, Laird GK, Lloyd D, Kenyon E, Donaldson S, Sehra H, Almeida-King J, Loveland J, Trevanion S, Jones M, Quail M, Willey D, Hunt

A, Burton J, Sims S, McLay K, Plumb B, Davis J, Clee C, Oliver K, Clark R, Riddle C, Elliot D, Threadgold G, Harden G, Ware D, Begum S, Mortimore B, Kerry G, Heath P, Phillimore B, Tracey A, Corby N, Dunn M, Johnson C, Wood J, Clark S, Pelan S, Griffiths G, Smith M, Glithero R, Howden P, Barker N, Lloyd C, Stevens C, Harley J, Holt K, Panagiotidis G, Lovell J, Beasley H, Henderson C, Gordon D, Auger K, Wright D, Collins J, Raisen C, Dyer L, Leung K, Robertson L, Ambridge K, Leongamornlert D, McGuire S, Gilderthorp R, Griffiths C, Manthravadi D, Nichol S, Barker G, Whitehead S, Kay M, Brown J, Murnane C, Gray E, Humphries M, Sycamore N, Barker D, Saunders D, Wallis J, Babbage A, Hammond S, Mashreghi-Mohammadi M, Barr L, Martin S, Wray P, Ellington A, Matthews N, Ellwood M, Woodmansey R, Clark G, Cooper J, Tromans A, Grafham D, Skuce C, Pandian R, Andrews R, Harrison E, Kimberley A, Garnett J, Fosker N, Hall R, Garner P, Kelly D, Bird C, Palmer S, Gehring I, Berger A, Dooley CM, Ersan-Ürün Z, Eser C, Geiger H, Geisler M, Karotki L, Kirn A, Konantz J, Konantz M, Oberländer M, Rudolph-Geiger S, Teucke M, Lanz C, Raddatz G, Osoegawa K, Zhu B, Rapp A, Widaa S, Langford C, Yang F, Schuster SC, Carter NP, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle SM, Enright A, Geisler R, Plasterk RH, Lee C, Westerfield M, de Jong PJ, Zon LI, Postlethwait JH, Nüsslein-Volhard C, Hubbard TJ, Roest Crollius H, Rogers J, Stemple DL The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. **496**:498-503. 2013

Huang XP, Karpiak J, Kroeze WK, Zhu H, Chen X, Moy SS, Sadoris KA, Nikolova VD, Farrell MS, Wang S, Mangano TJ, Deshpande DA, Jiang A, Penn RB, Jin J, Koller BH, Kenakin T, Shoichet BK, Roth BL Allosteric ligands for the pharmacologically dark receptors GPR68 and GPR65. *Nature*. **527**:477-83. 2015

Hyder A, Laue C, Schrezenmeir J Effect of extracellular pH on insulin secretion and glucose metabolism in neonatal and adult rat pancreatic islets. *Acta Diabetol.* **38**:171-8. 2001

Ibrahim M, Richardson MK Beyond organoids: In vitro vasculogenesis and angiogenesis using cells from mammals and zebrafish. *Reprod Toxicol.* **73**:292-311. 2017

Ichijo Y, Mochimaru Y, Azuma M, Satou K, Negishi J, Nakakura T, Oshima N, Mogi C, Sato K, Matsuda K, Okajima F, Tomura H Two zebrafish G2A homologs activate multiple intracellular signaling pathways in acidic environment. *Biochem Biophys Res Commun.* **469**:81-86. 2016

Ichimonji I, Tomura H, Mogi C, Sato K, Aoki H, Hisada T, Dobashi K, Ishizuka T, Mori M, Okajima F Extracellular acidification stimulates IL-6 production and Ca (2+) mobilization through proton-sensing OGR1 receptors in human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **299**:L567-77. 2010

Ishii S, Kihara Y, Shimizu T Identification of T cell death-associated gene 8 (TDAG8) as a novel acid sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem.* **280**:9083-7. 2005

Iwai K, Koike M, Ohshima S, Miyatake K, Uchiyama Y, Saeki Y, Ishii M RGS18 acts as a negative regulator of osteoclastogenesis by modulating the acid-sensing OGR1/NFAT signaling pathway. *J Bone Miner Res.* **22**:1612-20. 2007

Kayo T, Sawada Y, Suzuki Y, Suda M, Tanaka S, Konda Y, Miyazaki J, Takeuchi T Proprotein-processing endoprotease furin decreases regulated secretory pathway-specific proteins in the pancreatic beta cell line MIN6. *J Biol Chem.* **271**:10731-7. 1996

Kelly RB Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science.* **230**:25-32. 1985

Kim KS, Ren J, Jiang Y, Ebrahim Q, Tipps R, Cristina K, Xiao YJ, Qiao J, Taylor KL, Lum H, Anand-Apte B, Xu Y GPR4 plays a critical role in endothelial cell function and mediates the effects of sphingosylphosphorylcholine. *FASEB J.* **19**:819-21. 2005

Kirchberger S, Sturtzel C, Pascoal S, Distel M Quo natas, Danio?-Recent Progress in Modeling Cancer in Zebrafish. *Front Oncol.* **7**:186. 2017

Kotake M, Sato K, Mogi C, Tobo M, Aoki H, Ishizuka T, Sunaga N, Imai H, Kaira K, Hisada T, Yamada M, Okajima F Acidic pH increases cGMP accumulation through the OGR1/phospholipase C/Ca²⁺/neuronal NOS pathway in N1E-115 neuronal cells. *Cell Signal.* **26**:2326-32. 2014

Li H, Wang D, Singh LS, Berk M, Tan H, Zhao Z, Steinmetz R, Kirmani K, Wei G, Xu Y Abnormalities in osteoclastogenesis and decreased tumorigenesis in mice deficient for ovarian cancer G protein-coupled receptor 1. *PLoS One.* **4**:e5705. 2009

Li P, Lee KY, Chang TM, Chey WY Mechanism of acid-induced release of secretin in rats. Presence of a secretin-releasing peptide. *J Clin Invest.* **86**:1474-9. 1990

Li XY, Toyoda H Role of leak potassium channels in pain signaling. *Brain Res Bull.* **119**:73-9. 2015

Liberti MV, Locasale JW The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* **41**:211-8. 2016

Liu JP, Komachi M, Tomura H, Mogi C, Damirin A, Tobo M, Takano M, Nochi H, Tamoto K, Sato K, Okajima F Ovarian cancer G protein-coupled receptor 1-dependent and -independent vascular actions to acidic pH in human aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **299**:H731-42. 2010a

Liu JP, Nakakura T, Tomura H, Tobo M, Mogi C, Wang JQ, He XD, Takano M, Damirin A, Komachi M, Sato K, Okajima F Each one of certain histidine residues in G-protein-coupled receptor GPR4 is critical for extracellular proton-induced stimulation of multiple G-protein-signaling pathways. *Pharmacol Res.* **61**:499-505. 2010b

Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, Hofstetter H, Wolf RM, Seuwen K Proton-sensing G-protein-coupled receptors. *Nature.* **425**:93-8. 2003

Mariotti M, Carnovali M, Banfi G Danio rerio: the Janus of the bone from embryo to scale. *Clin Cases Miner Bone Metab.* **12**:188-94. 2015

Martinez-Finley EJ, Gavin CE, Aschner M, Gunter TE Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* **62**:65-75. 2013

Matsuzaki S, Ishizuka T, Yamada H, Kamide Y, Hisada T, Ichimonji I, Aoki H, Yatomi M, Komachi M, Tsurumaki H, Ono A, Koga Y, Dobashi K, Mogi C, Sato K, Tomura H, Mori M, Okajima F Extracellular acidification induces connective tissue growth factor production through proton-sensing receptor OGR1 in human airway smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **413**:499-503. 2011

Mertz W The essential trace elements. *Science.* **213**:1332-8. 1981

Milsom WK, Bureson ML Peripheral arterial chemoreceptors and the evolution of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol.* **157**:4-11. 2007

Mochimaru Y, Negishi J, Murakami S, Musha S, Sato K, Okajima F, Tomura H Comparison of metals-induced ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 activation from various species. *Zoolog Sci.* 2017 in press

Mochimaru Y, Azuma M, Oshima N, Ichijo Y, Satou K, Matsuda K, Asaoka Y, Nishina H, Nakakura T, Mogi C, Sato K, Okajima F, Tomura H Extracellular acidification activates ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 and GPR4 homologs of zebra fish. *Biochem Biophys Res Commun.* **457**:493-9. 2015

Mogi C, Tomura H, Tobo M, Wang JQ, Damirin A, Kon J, Komachi M, Hashimoto K, Sato K, Okajima F Sphingosylphosphorylcholine antagonizes proton-sensing ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1) -mediated inositol phosphate production and cAMP accumulation. *J Pharmacol Sci.* **99**:160-7. 2005

Mohebbi N, Benabbas C, Vidal S, Daryadel A, Bourgeois S, Velic A, Ludwig MG, Seuwen K, Wagner CA The proton-activated G protein coupled receptor OGR1 acutely regulates the activity of epithelial proton transport proteins. *Cell Physiol Biochem.* **29**:313-24. 2012

Murakami N, Yokomizo T, Okuno T, Shimizu T G2A is a proton-sensing G-protein-coupled receptor antagonized by lysophosphatidylcholine. *J Biol Chem.* **279**:42484-91. 2004

Nakakura T, Asano-Hoshino A, Suzuki T, Arisawa K, Tanaka H, Sekino Y, Kiuchi Y, Kawai K, Hagiwara H The elongation of primary cilia via the acetylation of α -tubulin by the treatment with lithium chloride in human fibroblast KD cells. *Med Mol Morphol.* **48**:44-53. 2015

Nakakura T, Mogi C, Tobo M, Tomura H, Sato K, Kobayashi M, Ohnishi H, Tanaka S, Wayama M, Sugiyama T, Kitamura T, Harada A, Okajima F Deficiency of proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 attenuates glucose-stimulated insulin secretion. *Endocrinology.* **153**:4171-80. 2012

Nakakura T, Sato M, Suzuki M, Hatano O, Takemori H, Taniguchi Y, Minoshima Y, Tanaka S The spatial and temporal expression of delta-like protein 1 in the rat pituitary gland during development. *Histochem Cell Biol.* **131**:141-53. 2009

Negishi J, Omori Y, Shindo M, Takanashi H, Musha S, Nagayama S, Hirayama J, Nishina H, Nakakura T, Mogi C, Sato K, Okajima F, Mochimaru Y, Tomura H

Manganese and cobalt activate zebrafish ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 but not GPR4. *J Recept Signal Transduct Res.* **37**:401-408. 2017

Okajima F Regulation of inflammation by extracellular acidification and proton-sensing GPCRs. *Cell Signal.* **25**:2263-71. 2013

Opie LH, Owen P, Thomas M, Samson R Coronary sinus lactate measurements in assessment of myocardial ischemia. Comparison with changes in lactate-pyruvate and beta-hydroxybutyrate-acetoacetate ratios and with release of hydrogen, phosphate and potassium ions from the heart. *Am J Cardiol.* **32**:295-305. 1973

Pan HL, Longhurst JC, Eisenach JC, Chen SR Role of protons in activation of cardiac sympathetic C-fibre afferents during ischaemia in cats. *J Physiol.* **518**:857-66. 1999

Payen VL, Porporato PE, Baselet B, Sonveaux P Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Cell Mol Life Sci.* **73**:1333-48. 2016

Peana M, Medici S, Nurchi VM, Crisponi G, Lachowicz JI, Zoroddu MA Manganese and cobalt binding in a multi-histidinic fragment. *Dalton Trans.* **42**:16293-301. 2013

Peers C, Wyatt CN, Evans AM Mechanisms for acute oxygen sensing in the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol.* **174**:292-8. 2010

Pereverzev A, Komarova SV, Korcok J, Armstrong S, Tremblay GB, Dixon SJ, Sims

SM Extracellular acidification enhances osteoclast survival through an NFAT-independent, protein kinase C-dependent pathway. *Bone*. **42**:150-61. 2008

Pokorski M, Takeda K, Okada Y Oxygen sensing mechanisms: A physiological penumbra. *Adv Exp Med Biol*. **952**:1-8. 2016

Poole-Wilson PA Measurement of myocardial intracellular pH in pathological states. *J Mol Cell Cardiol*. **10**:511-26. 1978

Radu CG, Nijagal A, McLaughlin J, Wang L, Witte ON Differential proton sensitivity of related G protein-coupled receptors T cell death-associated gene 8 and G2A expressed in immune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**:1632-7. 2005

Ramsey IS, Moran MM, Chong JA, Clapham DE A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature*. **440**:1213-6. 2006

Ranade SS, Syeda R, Patapoutian A Mechanically Activated Ion Channels. *Neuron*. **87**:1162-79. 2015

Rivier C, Rivest S Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod*. **45**:523-32. 1991

Rousselle AV, Heymann D Osteoclastic acidification pathways during bone resorption. *Bone*. **30**:533-40. 2002

Sandvik AK, Kleveland PM, Waldum HL The effect of secretin on acid and pepsin secretion and gastrin release in the totally isolated vascularly perfused rat stomach. *Regul Pept.* **17**:143-9. 1987

Sarko J Bone and mineral metabolism. *Emerg Med Clin North Am.* **23**:703-21, viii. 2005

Sasaki M, Takagi M, Okamura Y A voltage sensor-domain protein is a voltage-gated proton channel. *Science.* **312**:589-92. 2006

Satou K, Mochimaru Y, Nakakura T, Kusada T, Negishi J, Musha S, Yoshimura N, Kato Y, Tomura H Easy detection of hormone secretion from L β T2 cells by using Gaussia luciferase. *J Reprod Dev.* **63**:199-204. 2017

Shi J, Bi P, Pei J, Li H, Grishin NV, Bassel-Duby R, Chen EH, Olson EN Requirement of the fusogenic micropeptide myomixer for muscle formation in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **114**:11950-11955. 2017

Spranger MD, Krishnan AC, Levy PD, O'Leary DS, Smith SA Blood flow restriction training and the exercise pressor reflex: a call for concern. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **309**:H1440-52. 2015

St Clair RM, Emerson SE, D'Elia KP, Weir ME, Schmoker AM, Ebert AM, Ballif BA Fyn-dependent phosphorylation of PlexinA1 and PlexinA2 at conserved tyrosines is essential for zebrafish eye development. *FEBS J.* doi: 10.1111/febs.14313. 2017

Sun X, Yang LV, Tiegs BC, Arend LJ, McGraw DW, Penn RB, Petrovic S Deletion of the pH sensor GPR4 decreases renal acid excretion. *J Am Soc Nephrol.* **21**:1745-55.

2010

Suzuki F, Shimizu C, Umetsu M, Nagai S, Takeuchi J, Endo M, Miyoshi H, Yoshioka N, Kubo M, Koike T Adult-onset idiopathic hypogonadotropic hypogonadism due to isolated pituitary gonadotropin deficiency. *Intern Med.* **43**:571-4. 2004

Suzuki T, Kondo C, Kanamori T, Inouye S Video rate bioluminescence imaging of secretory proteins in living cells: localization, secretory frequency, and quantification. *Anal Biochem.* **415**:182-9. 2011

Tobo M, Tomura H, Mogi C, Wang JQ, Liu JP, Komachi M, Damirin A, Kimura T, Murata N, Kurose H, Sato K, Okajima F Previously postulated "ligand-independent" signaling of GPR4 is mediated through proton-sensing mechanisms. *Cell Signal.* **19**:1745-53. 2007

Tominaga M, Tominaga T Structure and function of TRPV1. *Pflugers Arch.* **451**:143-50. 2005

Tomura H, Wang JQ, Liu JP, Komachi M, Damirin A, Mogi C, Tobo M, Nochi H, Tamoto K, Im DS, Sato K, Okajima F Cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in response to acidic pH through OGR1 in a human osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res.* **23**:1129-39. 2008

Tomura H, Mogi C, Sato K, Okajima F Proton-sensing and lysolipid-sensitive G-protein-coupled receptors: a novel type of multi-functional receptors. *Cell Signal.* **17**:1466-76. 2005a

Tomura H, Wang JQ, Komachi M, Damirin A, Mogi C, Tobo M, Kon J, Misawa N, Sato K, Okajima F Prostaglandin I (2) production and cAMP accumulation in response to acidic extracellular pH through OGR1 in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem.* **280**:34458-64. 2005b

Tsujii T, Ishizaka K, Winters SJ Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on gonadotropin secretion and subunit messenger ribonucleic acids in perfused rat pituitary cells. *Endocrinology.* **135**:826-33. 1994

Turgeon JL, Kimura Y, Waring DW, Mellon PL Steroid and pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Mol Endocrinol.* **10**:439-50. 1996

Wang J, Sun Y, Tomura H, Okajima F Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 induces the expression of the pain mediator prostaglandin E2 in response to an acidic extracellular environment in human osteoblast-like cells. *Int J Biochem Cell Biol.* **44**:1937-41. 2012

Wang JQ, Kon J, Mogi C, Tobo M, Damirin A, Sato K, Komachi M, Malchinkhuu E, Murata N, Kimura T, Kuwabara A, Wakamatsu K, Koizumi H, Uede T, Tsujimoto G, Kurose H, Sato T, Harada A, Misawa N, Tomura H, Okajima F TDAG8 is a

proton-sensing and psychosine-sensitive G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem.* **279**:45626-33. 2004

Windle JJ, Weiner RI, Mellon PL Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol Endocrinol.* **4**:597-603. 1990

Xu Y Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine: G protein-coupled receptors and receptor-mediated signal transduction. *Biochim Biophys Acta.* 1582:81-8. 2002

Yan L, Singh LS, Zhang L, Xu Y Role of OGR1 in myeloid-derived cells in prostate cancer. *Oncogene.* **33**:157-64. 2014

Yang M, Mailhot G, Birnbaum MJ, MacKay CA, Mason-Savas A, Odgren PR Expression of and role for ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1 (OGR1) during osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* **281**:23598-605. 2006

大嶋菜月, 一條祐太, 持丸雄太, 佐藤一裕, 戸村秀明 G タンパク質共役型受容体の活性化機構. *明治大学農学部研究報告.* **63**:103-110. 2014

持丸雄太, 戸村秀明 創薬のターゲットとしての ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1. *明治大学農学部研究報告* **65**:9-16. 2015