

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15113

研究課題名(和文) マスト細胞リゾホスファチジルセリン受容体の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of a mast cell lysophosphatidylserine receptor.

研究代表者

青木 淳賢 (Aoki, Junken)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：20250219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギーの中心的な細胞であるマスト細胞の細胞表面にはリゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルセリン(LysoPS)を特異的に認識する受容体の存在が示唆されている。本受容体は、アレルギーの増悪に関与しており、薬学的に重要な標的であるにもかかわらず、その性状は不明である。本研究では fawn-hooded rat が LysoPS に応答し脱顆粒しないことを見出した。本ラット由来のマスト細胞はカルシウムイオンフォアで誘導される脱顆粒は起こったことから、LysoPS受容体を欠損している可能性が想定される。今後、遺伝学的解析によりLysoPS受容体を同定するストラテジーが提案された。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that a receptor for lysophosphatidylserine (LysoPS), a kind of lysophospholipid mediators, is present on mast cells. Mast cells are immune cells involved in the development of allergy. Several preceding studies have shown that LysoPS strongly up-regulated the antigen-IgE-induced degranulation of mast cells. However, the molecular identification as well as the biochemical characterization of the mast cell LysoPS remained to be done. The present research aimed to identify this LysoPS receptor. In this study, we found that mast cells from fawn-hooded rat, a kind of rat strains, did not degranulate in response to LysoPS. Since mast cells derived from the fawn-hooded rat degranulated in response to a calcium ionophore as was observed in mast cells from Wister strain rats, it is strongly suggested that the fawn-hooded rats are deficient in the LysoPS receptor. A new strategy to identify LysoPS receptor by genetic analysis was proposed.

研究分野：脂質生物学

キーワード：マスト細胞 脱顆粒 リゾホスファチジルセリン

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は、アトピー性皮膚炎、花粉症、じんましんなどのアレルギー性疾患に關与する主要なエフェクター細胞である。アレルギー病態時には、マスト細胞の細胞表面に存在する IgE 受容体に抗原特異的な IgE が結合しており、この IgE に花粉などの抗原が結合すると脱顆粒反応とケミカルメディエーターによるアレルギー反応を引き起こされる。申請者は IgE 以外のマスト細胞の活性化制御因子としてリン脂質の一種、リゾホスファチジルセリン (LysoPS) に着目している。ラットやマウスの腹腔マスト細胞は IgE と抗原刺激だけでは応答せず、その系に LysoPS を系に加えることによりはじめて脱顆粒反応が起こる (Nature 1979)。この反応は LysoPS に特異的であり、また、ホスホセリンを含む LysoPS の全体構造が要求されることから、マスト細胞上には LysoPS の構造を厳密に認識する受容体の存在が想定されている。しかし、その分子実態は不明である。申請者は後述するように、この LysoPS 受容体を同定するためにさまざまな検討を行ってきた。その中で申請者は最近 LysoPS の数百倍強力なマスト細胞脱顆粒活性を示す LysoPS 誘導体 (Deoxy LysoPT C3-ph-o-O-Bn-m-ph) の創製に成功した。

2. 研究の目的

本研究では、2年間の研究期間の中で、同定した LysoPS 誘導体をプローブとして、申請者らの独自の二つの戦略によりマスト細胞上の LysoPS 受容体の同定を目指す。具体的には、(1) LysoPS 誘導体の脂肪酸部に有機化学的にアジド基を導入し、クリックケミストリーにより、マスト細胞膜に対して結合性を示す候補タンパク質を見出し、その部分構造を決定する。(2) 改良型 TGF α 切断アッセイ (Nature Methods 2012) と約 80 のオーファン GPCR、26 種類の TRP チャンネルをコードする cDNA を用い、同定した LysoPS 誘導体に応答する遺伝子を探索する。さらに、最近迅速かつ確実に受容体 KO マウスが作製できるようになった CRISPR/Cas9 システムにより候補分子の KO マウスを作製し、LysoPS 応答性を調べる。(3) 得られた受容体 KO マウスを用い、LysoPS 受容体の病理的機能を解明する。

3. 研究の方法

まず、LysoPS の数百倍強力なマスト細胞脱顆粒促進能を有する LysoPS 誘導体 (Deoxy LysoPT C3-ph-o-O-Bn-m-ph) のアジド化・ビオチニル化した化合物をラット腹腔マスト細胞あるいはその膜画分

に加え結合させ、光ラベルにより共有結合的に標的分子を標識する。プロテアーゼ処理により標的タンパク質をペプチド断片化し、最終的に LysoPS 誘導体の結合したペプチドを質量分析にて同定する。得られたペプチド配列情報から受容体候補遺伝子を見出す。一方、改良型 GPCR 活性化測定法 TGF 切断アッセイを用い、約 80 のオーファン GPCR の中に、LysoPS 誘導体と反応する GPCR を見出す。得られる候補受容体遺伝子を CRISPR/Cas9 システムを用い破壊した KO マウス (マウスホモログ情報が得られない場合は KO ラット) を作製する。最終的に、得られた KO 動物個体のマスト細胞の LysoPS 応答性を調べることにより候補受容体が目的の LysoPS 受容体であるかを確認する。具体的には以下の検討を行う。

- ・ LysoPS 誘導体結合タンパク質の同定
- ・ 改良型 TGF 切断アッセイを用いた LysoPS 誘導体応答性 GPCR の探索
- ・ 候補遺伝子 KO 動物の作製
- ・ 候補遺伝子 KO 動物の評価
- ・ 受容体の生化学的解析
- ・ 受容体 KO のマウスの表現型解析

4. 研究成果

LysoPS 誘導体結合タンパク質の同定
LysoPS 誘導体をビーズに結合させる試みを行ったが、LysoPS 誘導体 (Deoxy LysoPT C3-ph-o-O-Bn-m-ph) をビーズに結合させるための官能基導入によりマスト細胞の活性化能が劇的に低下し、固定化ビーズを作製するに至らなかった。

- ・ 改良型 TGF 切断アッセイを用いた LysoPS 誘導体応答性 GPCR の探索
- ・ 約 70 種類のオーファン GPCR に対し、改良型 TGF 切断アッセイを用い、LysoPS 誘導体 (Deoxy LysoPT C3-ph-o-O-Bn-m-ph) 応答性の GPCR を探索した。しかし、Deoxy LysoPT C3-ph-o-O-Bn-m-ph に応答する GPCR を見出すことはできなかった。
- ・ 候補遺伝子 KO 動物の作製
- ・ 候補遺伝子 KO 動物の評価
- ・ 受容体の生化学的解析
- ・ 受容体 KO のマウスの表現型解析

受容体を同定できなかったため、以上の解析を進めることはできなかった。

予定した受容体同定が難航したため受容体の性状解析、機能解析を実施することはできなかった。しかし、研究の過程で、ホスファチジルセリン (PS) に応答しにくい腹腔マスト細胞を持つラット系統を文献的に見出すことができた。そこで、このラット系統 (fawn-hooded rat) を導入し、LysoPS 応答性を確認することにした。

- ・ fawn-hooded rat 由来のマスト細胞の LysoPS 応答性の確認

fawn-hooded rat を導入・飼育し、LysoPS 依存的なマスト細胞の脱顆粒反応を評価した。その結果、PS だけでなく、LysoPS にも全く応答性を示さないことがわかった。また、LysoPS 誘導体 (Deoxy LysoPT C3-ph-o-0-Bn-m-ph) に対する応答性も顕著に減弱していることが判明した。一方、この fawn-hooded rat 由来の腹腔マスト細胞は通常のカルシウムイオンフォアに対する応答性は持っていることがわかった。よって、fawn-hooded rat は LysoPS に対する受容体を欠損している可能性が強く示唆された。

以上の結果は、fawn-hooded rat の腹腔マスト細胞は LysoPS 受容体を欠損している可能性を強く示唆している。今後、野生型 rat (Wister 系統) と fawn-hooded rat を掛け合わせ得られる F1 世代同士を掛け合わせた F2 世代のラットの LysoPS 応答性を調べ、それら F2 世代の genotype と対応させることにより、LysoPS 応答性を引き起こす遺伝子座を同定することで、目的の LysoPS 受容体を同定できると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- (1) Shinjo Y, Makide K, Satoh K, Fukami F, Inoue A, Kano K, Otani Y, Ohwada T, Aoki J., Lysophosphatidylserine suppresses IL-2 production in CD4 T cells through LPS3/GPR174. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Dec 9;494(1-2):332-338. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.028. 査読有
- (2) Sayama M, Inoue A, Nakamura S, Jung S, Ikubo M, Otani Y, Uwamizu A, Kishi T, Makide K, Aoki J., Hirokawa T, Ohwada T., Probing the Hydrophobic Binding Pocket of G-Protein-Coupled Lysophosphatidylserine Receptor GPR34/LPS1 by Docking-Aided Structure-Activity Analysis. *J Med Chem.* 2017 Jul 27;60(14):6384-6399. doi: 10.1021/acs.jmedchem. 査読有
- (3) Tokizane K, Konishi H, Makide K, Kawana H, Nakamuta S, Kaibuchi K, Ohwada T, Aoki J., Kiyama H. Phospholipid localization implies microglial morphology and function via Cdc42 in vitro. *Glia.* 2017 May;65(5):740-755. doi:10.1002/glia.23123. 査読有
- (4) Emoto S, Kurano M, Kano K, Matsusaki K, Yamashita H, Nishikawa M, Igarashi K, Ikeda H, Aoki J., Kitayama J, Yatomi Y., Analysis of glycerol-lysophospholipids in gastric cancerous ascites. *J Lipid Res.* 2017, 58(4):763-771. doi: 10.1194/jlr.P072090. 査読有
- (5) Kurano M, Kano K, Dohi T, Matsumoto H, Igarashi K, Nishikawa M, Ohkawa R, Ikeda H, Miyauchi K, Daida H, Aoki J., Yatomi Y., Different origins of lysophospholipid mediators between coronary and peripheral arteries in acute coronary syndrome. *J Lipid Res.* 2017, 58:433-442. doi: 10.1194/jlr.P071803. 査読有
- (6) Nagura Y, Tsuno NH, Kano K, Inoue A, Aoki J., Hirowatari Y, Kaneko M, Kurano M, Matsushashi M, Ohkawa R, Tozuka M, Yatomi Y, Okazaki H. Regulation of the lysophosphatidylserine and sphingosine 1-phosphate levels in autologous whole blood by the pre-storage leukocyte reduction. *Transfus Med.* 2016 Oct;26(5):365-372. doi: 10.1111/tme.12326. 査読有
- (7) Kishi T, Kawana H, Sayama M, Makide K, Inoue A, Otani Y, Ohwada T, Aoki J., Identification of lysophosphatidylthreonine with an aromatic fatty acid surrogate as a potent inducer of mast cell degranulation. *Biochem Biophys Rep.* 2016 Oct 8;8:346-351. doi: 10.1016/j.bbrep. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 青木淳賢、新規脂質メディエーターリゾホスファチジルセリン -機能と作動薬開発-、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25-28 日、石川県金沢市、口頭、国内
- (2) 佐山美紗、井上飛鳥、青木淳賢、広川貴次、関嶋政和、尾谷優子、大和田智彦 脂質リガンドの GPCR への結合機構の解明のための誘導体合成と計算科学の融合研究、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 25-28 日、石川県金沢市、口頭、国内
- (3) Junken Aoki, Two glycerolysophospholipid mediators, lysophosphatidic acid and lysophosphatidylserine: structures, receptors, synthetic

pathways and biological significance., FASEB Summer Research Conference, Lysophospholipid and Related Mediators - From Bench to Clinic, 2017年8月20-25日, New Orleans, United States, 口頭, 国外

- (4) 金藤奨、井上飛鳥、青木淳賢、LysoPS受容体のリガンド認識機構解明、日本生化学会東北支部第83回例会・シンポジウム、2017年5月27日、東北大学さくらホール、仙台、国内
- (5) 深見郁也、奥谷倫世、巻出久美子、青木淳賢、自己免疫性リンパ球増殖症における新規 LysoPS 受容体の機能解析、日本生化学会東北支部第83回例会・シンポジウム、2017年5月27日、東北大学さくらホール、仙台、国内
- (6) 深見郁也、佐藤慧太、根本祥李、巻出久美子、青木淳賢、急性腹膜炎におけるリゾリン脂質メディエーター LysoPS の変動及び機能解析、口頭、日本薬学会第137年会、仙台国際会議場、他、2017年3月24-27日、国内
- (7) 上水明治、巻出久美子、中村翔、井上飛鳥、尾谷優子、大和田智彦、青木淳賢、リゾホスファチジルセリン受容体 LPS1/GPR34 に対する強力且つ選択的アゴニストの開発とその応用、ポスター、第89回日本生化学会、仙台国際会議場、他、2016年9月25-27日、国内
- (8) 岸貴之、佐山美沙、巻出久美子、川名裕己、井上飛鳥、尾谷優子、大和田知彦、マスト細胞上の LysoPS 受容体探索ツールの開発、口頭、青木淳賢、第58回日本脂質生化学会、秋田市にぎわい交流館 AU、2016年6月9-10日、国内

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H28/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
青木 淳賢 (Aoki, Junken)
東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20250219