

平成 21 年 3 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790204  
 研究課題名（和文） 酸化脂質ライブラリーを用いた新規酸化脂質受容体の同定と生理機能の探索  
 研究課題名（英文） Search for novel lipid mediators and their receptors using oxidized lipid libraries  
 研究代表者 大日方 英（OBINATA HIDERU）  
 群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：50332557

## 研究成果の概要：

本研究の目的は、リノール酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸などの多価不飽和脂肪酸に由来する酸化脂質をターゲットとしてオーファンGPCRのリガンドスクリーニングを行い、受容体を同定することを通して新たな生理活性をもつ酸化脂質を発見することであった。そのために、以下のような実験を行った。

－候補となるオーファンGPCRの選択と安定発現細胞株の作製－

アミノ酸配列の相同性に基づいた系統樹解析から、脂溶性の物質をリガンドとする可能性が高いと予想されるオーファン受容体を10個選定した。定法により受容体を安定的に発現するCHO細胞を樹立した後、受容体のN末端に付与したFLAGタグを免疫染色し、フローサイトメトリーによる解析で受容体の発現量が高いクローンを各受容体につき数個ずつ選択した。

－酸化脂質ライブラリー作製－

リノール酸（C18:2）、 $\alpha$ -リノレン酸（C18:3、n-3系列）、 $\gamma$ -リノレン酸（C18:3、n-6系列）、アラキドン酸（C20:4）、エイコサペンタエン酸（C20:5）、ドコサヘキサエン酸（C22:6）およびこれらを構成成分として持つリン脂質を基質としてin vitroで酸化反応を行い、酸化脂質ライブラリーを作製した。酸化反応として、二価金属イオン（Cu<sup>2+</sup>またはFe<sup>2+</sup>）を用いた反応もしくはラジカルイニシエーター試薬を用いた反応を行い、反応時間を変化させることにより様々な程度に脂質を酸化させ、薄層クロマトグラフィー分析などにより酸化条件の至適化を行った。

－リガンドスクリーニングアッセイ－

作製した受容体安定発現細胞および酸化脂質ライブラリーを用いて、細胞内カルシウム上昇反応に基づくリガンドスクリーニングアッセイを行ったが、本研究期間中に陽性反応を得るには至らなかった。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：生化学・分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：受容体、脂質、オーファン、酸化

## 1. 研究開始当初の背景

申請者の属する研究グループでは、9-HODE (9-hydroxyoctadecadienoic acid; リノール酸の酸化代謝物) や 11-HETE (11-hydroxyeicosatetraenoic acid; アラキドン酸の酸化代謝物) をはじめとするいくつかの遊離酸化脂肪酸が G2A と呼ばれる Gタンパク質共役型受容体のリガンドとして作用することを発見し報告した (Obinata, H. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2005)。リノール酸を基質として 9-HODE を産生する酵素はヒトでは同定されておらず、9-HODE の生体内での産生機序としては種々の酸化ストレスで生じたフリーラジカルによるリノール酸の酸化反応が予想された。したがって、プロスタグランジンやロイコトリエンのように酵素的に産生される生理活性脂質だけでなく、フリーラジカルによる酸化反応で産生された酸化脂質が GPCR のリガンドとして作用し、多彩な生理機能を持つ可能性が考えられた。

生体内にはリノール酸・アラキドン酸のみならず、リノレン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸などの長鎖の多価不飽和脂肪酸が多種存在している。これらの多価不飽和脂肪酸は酸化される位置と数により多種多様な酸化脂肪酸を産生し得る。

一方、データベースサーチに基づく当時の報告では、嗅覚に関わる多重遺伝子ファミリーを除くと、ヒトで約 340 個の GPCR が存在すると推定されていた (Fredriksson, R. *et al.*, *Mol. Pharm-acol.*, 2003)。このうち 100 個程度に関してはリガンドが同定されておらず、オーファン GPCR と呼ばれていた。アミノ酸配列の相同性に基づく系統樹解析から、脂溶性の物質をリガンドとする可能性が高いと予想されるオーファン GPCR が 20 個程度あり、実際に G2A はこの中から脂質ライブラリーを用いてスクリーニングを行った結果、リガンド同定に至った受容体である。系統樹解析で G2A の近傍に位置するオーファン GPCR が複数残されており、G2A 以外にも酸化脂質をリガンドとする GPCR が存在する可能性が高いと考えられた。また、これらのオーファン

GPCR の中には、脳、心、精巣など特徴的な脂質組成を持つ組織に特異的に発現しているものがあり、新たな生理活性脂質が発見される可能性が高いと予想された。

## 2. 研究の目的

本研究ではリノール酸、アラキドン酸、ドコサヘキサエン酸などの多価不飽和脂肪酸に由来する酸化脂質の新規受容体を同定し、新たな生理機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) オーファン受容体の選定と受容体安定高発現細胞株の樹立

アミノ酸配列の相同性に基づいた系統樹解析から、脂溶性の物質をリガンドとする可能性が高いと予想されるオーファン受容体を 10 個選定した。定法により受容体を安定的に発現する CHO 細胞を樹立した後、受容体の N 末端に付与した FLAG タグを免疫染色し、フローサイトメトリーによる解析で受容体の発現量が高いクローンを各受容体につき数個ずつ選択した。

(2) 酸化脂質ライブラリーの作製

多価不飽和脂肪酸およびそれを含むリン脂質を基質として酸化処理を行い、ホスホリパーゼによる水解反応と組み合わせることで、多種多様な酸化脂肪酸および酸化リゾリン脂質のライブラリーを自ら作製し、リガンドスクリーニングに用いた。リガンド活性が認められた場合には、各酸化脂質ライブラリーが由来する不飽和脂肪酸が明らかであるため、酸化のパターンがある程度予測可能であり、液体クロマトグラフィーマススペクトロメトリー法を用いた解析により容易に活性をもつ脂質の同定が可能であると予想された。

(3) リガンドスクリーニングアッセイ

上記のように作製された受容体高発現細胞および酸化脂質ライブラリーを用いて、細胞内カルシウム濃度上昇反応あるいは細胞内 cAMP 濃度の変動を指標としたリガンドスクリーニングアッセイを行った。

#### 4. 研究成果

上記の研究方法に基づきリガンドスクリーニングアッセイを行ったが、本研究期間中に陽性反応を見出すには至らなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

① Hideru Obinata and Takashi Izumi. G2A as a receptor for oxidized free fatty acids. Prostaglandins and Other Lipid Mediators, in press, 査読有

② Yoshinori Sasaki, Takashi Tujii, Hideru Obinata, Takashi Izumi, Keiichi Yamada, and Rhoichi Katakai. Identification of novel peptide agonists from a random peptide library for a 5-oxo-ETE receptor, a receptor for bioactive lipids. Journal of Peptide Science, Vol. 14, 1251-1258, 2008, 査読有

③ Tomoyasu Hattori, Hideru Obinata, Ai Ogawa, Mikiko Kishi, Kazuaki Tatei, Osamu Ishikawa, and Takashi Izumi. G2A plays proinflammatory roles in human keratinocytes under oxidative stress as a receptor for 9-hydroxyoctadecadienoic acid. Journal of Investigative Dermatology, Vol. 128, 1123-1133, 2008, 査読有

④ Natsuyo Akuzawa, Hideru Obinata, Takashi Izumi, and Shigeki Takeda. Morphine is an exogenous ligand for MrgX2, a G protein-coupled receptor for cortistatin. Journal of Cell and Animal Biology, Vol. 2, 4-9, 2008, 査読有

⑤ 大日方 英、和泉 孝志、プロトン感知性GPCR研究の展開、生化学、80巻、113-118、2008、査読有

[学会発表] (計9件)

① Hideru Obinata, Ai Ogawa, Tomoyasu Hattori, Mikiko Kishi, Kazuaki Tatei, and Takashi Izumi. 9-hydroxyoctadecadienoic acid, one of the oxidized metabolites of linoleic acid, induces cell cycle arrest in the G1 phase in primary human keratinocytes. 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月11日、神戸

② 小川 愛、大日方 英、服部 友保、岸美紀子、陳 可欣、立井 一明、和泉 孝志、Gタンパク質共役型受容体G2Aの新規スプライシングバリエーションの同定と機能解析、第50回脂質生化学会、2008年6月5日、徳島

③ 和泉 孝志、大日方 英、服部 友保、小川 愛、岸 美紀子、立井 一明、酸化遊離脂肪酸をリガンドとするG2Aの生理機能、第50回脂質生化学会、2008年6月5日、徳島

④ Hideru Obinata and Takashi Izumi. 9-hydroxyoctadecadienoic acid, one of the oxidized metabolites of linoleic acid, induces cell cycle arrest in the G1 phase in primary human keratinocytes. The 3<sup>rd</sup> international workshop on cell regulations in division and arrest under stress、2008年4月6日、沖縄

⑤ 小川 愛、大日方 英、服部 友保、立井 一明、和泉 孝志、Gタンパク質共役型受容体G2Aのスプライシングバリエーションの同定と機能解析、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月14日、横浜

⑥ 陳 可欣、大日方 英、和泉 孝志、生細胞におけるGPCR活性の表面プラズモン共鳴(SPR)による観察、第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会合同大会、2007年12月14日、横浜

⑦ 大日方 英、服部 友保、小川 愛、平野 瞳子、陳 可欣、Melisa Intan Barliana、岸 美紀子、立井 一明、和泉 孝志、表皮角化細胞におけるGタンパク質共役型受容体G2Aの生理作用、第49回脂質生化学会、2007年6月5日、札幌

⑧ Hideru Obinata, Tomoyasu Hattori, Ai Ogawa, Kazuaki Tatei, and Takashi Izumi. G2A mediates signals of oxidized free fatty acids in human keratinocytes. 3rd International conference on phospholipase A2 and lipid mediators, 2007年5月9日、Italy

⑨ Takashi Izumi, Hideru Obinata, Tomoyasu Hattori, Ai Ogawa, Kexin Chen, Melisa Intan Barliana, Mikiko Kishi, and Kazuaki Tatei. Oxidized free fatty acid-G2A signaling mediates alarm signal under oxidative stresses. 3rd International conference on phospholipase A2 and lipid mediators, 2007年5月9日、Italy

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大日方 英 (OBINATA HIDERU)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50332557