

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21590256
 研究課題名（和文） RNAi コレクションによるエストロゲン応答性 G 蛋白結合型受容体の網羅的解析
 研究課題名（英文） High throughput screening for G protein-coupled receptor(s) activated in response to estrogen by RNAi collection
 研究代表者
 水上 洋一（MIZUKAMI YOICHI）
 山口大学・総合科学実験センター・教授
 研究者番号：80274158

研究成果の概要（和文）：

女性ホルモンであるエストロゲンは転写活性を有しているが、細胞内カルシウムの上昇など数分以内での活性も有している。この急性期の反応は細胞膜に作用しているが、そのメカニズムは不明であった。そこで急性期の作用を解明するため細胞膜受容体である G 蛋白結合型受容体 (GPCR) に対する RNAi を合成した。しかし、エストロゲンの作用は予想外に弱く、内因性受容体では明確な細胞応答が観察されず、アッセイ系の再検討が必要であった。

研究成果の概要（英文）：

Estrogen induces the increase of intracellular Ca^{2+} concentrations in addition to transcriptional activity via nuclear receptor, but the membrane receptor except for GPR30 remains unknown. We have produced RNAi collection for GPCR, and examined the Ca^{2+} response and cell impedance in response to estrogen in the presence of RNAi collection. The membrane receptor did not be identified under the experimental conditions due to the weak response of estrogen. The other assay system will be requested to elucidate the estrogen membrane receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：女性ホルモン、細胞膜受容体、G 蛋白結合型受容体、RNAi、スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

女性ホルモンである E2 は、女性生殖器はもちろん、心血管や脳などに多彩な生理作用を有している。これらの作用は核内受容体であり転写因子であるエストロゲン受容体 (ER)

がタンパク合成を介してこれらの作用に関与している。

ところが、E2 は、血管の弛緩作用や細胞内 Ca^{2+} の流入など転写が関与しない急性期の反応を引き起こすことが知られている。このた

め、細胞膜に E2 受容体が存在することが示唆され続けてきた。

私たちは心筋細胞でストレスに応答する受容体を探索し、GPR30 (ratGPR41)がストレスに応答して転写誘導されることを示した。GPR30 がガン抑制遺伝子を活性化しアポトーシスを誘導することを示した (Kimura, JBC, 2000)。

その後、米国のグループから GPR30 は小胞体に存在する E2 の受容体であることが発表された (Revankar, Science, 2005)。

私たちは、同時期に GPR30 が細胞膜に存在する E2 の受容体であることを初めて証明した (Funakoshi, BBRC, 2006)。しかし、E2 は細胞増殖に関与していると考えられていることから、GPR30 が E2 の細胞膜受容体でアポトーシスを誘導するという結果に懐疑的な意見も出された。しかし、GPR30 のノックアウトマウスが初めて作出され、E2 が GPR30 を介してアポトーシスを誘導していることが証明され、私たちの結果が間違いないことが示された (Mol. Endocrinol. 2008)。

その一方で、GPR30 は E2 の受容体ではないという論文 (Endocrinology, 2008) や生殖器で機能を果たしていないという論文 (Biol. Reprod. 2008) が出され、一部で混乱した結果になっている。

2. 研究の目的

そこで、私たちは GPR30 の組織発現を調べ、胃・子宮など収縮する組織で発現することが解明された。また、GPR30 が発現すると緑色を発する遺伝子組換え動物を作成し、血管で強く発現することを示したが、生殖器で機能している証拠はまだ得られていない。

E2 は女性ホルモン応答性の腫瘍の増殖を促進するが、抗女性ホルモン剤は、腫瘍の増殖を抑制するケースと促進するケースが存

在し、E2 の作用は謎に包まれている。このような混乱の最大限の原因は、E2 の細胞膜受容体に対する網羅的な解析が行われていないことにある。GPR30 が E2 の受容体であることを示したのは、乳がん細胞で GPR30 の発現が高いというデータから推測した決め打ちであった。しかし、細胞膜受容体の発現クローニングやタンパク精製による解析は、これまでの技術では不可能であった。なぜならば、細胞膜受容体を過剰発現させた場合、多くが細胞膜に移行せず、一部の遺伝子しか解析できないためである。

また、タンパク精製の場合、7回膜貫通型受容体は細胞膜を貫通する疎水構造を多く含むため、溶液に溶かすことができず、カラムにアプライすることができない。このような実験上の制約のため、これまで開発された網羅的な解析方法では、細胞膜受容体を同定することは不可能であった。そこで、私は、このような問題点を解消する唯一の手段としてリバーストランスフェクション法を用いた RNAi コレクション解析法を確立する。この方法を用いて、ゲノム上、GPCR と予測される全ての遺伝子に対し、3領域ずつ RNAi を作成する。この RNAi をハイスループットに対応したリバーストランスフェクション法で細胞に導入し、活性の消去で対応する遺伝子を探索する手法である。

GPR30 以外に E2 と反応する受容体が存在するのかわかる。あるいは、反応は応答に違いがあるのかといった詳細な情報が確実に得られる。

この実験手法は間違いなく革命的な研究手段になる。

なぜならば、細胞膜受容体の網羅的な解析法はこれまで全く存在せず、多くの研究者が多大な労力を払いながら、ほとんどが解明されなかった受容体未知のリガンドは多数存在しているからである。このようなリガンド

一受容体の解明は、これまで最も困難で、全く手つかずの状態にあったため、最も重要な生命現象が解明されていない。この研究は、抗がん剤やイオンチャンネルなど生命現象や疾患の根幹に関わる説明につながる。

3. 研究の方法

(1)細胞培養

RNAi コレクションをヒトの遺伝子で作成しているため、ヒト由来の培養細胞を使い、特に E2 の応答が研究に観察される HeLa, SiHa, Hep2 細胞(子宮頸ガン), MCF7 (乳がん), Ishikawa 細胞(子宮体がん), で検討する。これらの細胞の中で、E2 の応答が最も強い細胞のアッセイシステムを優先して行う。

(2)RNAi コレクションの作成

嗅覚の遺伝子を除き、ゲノム上、G 蛋白結合型受容体であることが予想される GPCR 411 種類をアルゴリズムにかけ、RNAi として用いる 3 領域を決定する。(Aki, JCP, 2008)

(3)RNAi コレクションでの発現ベクターの作成

各領域に対するオリゴ DNA を合成し、RNAi 発現ベクターを作成する。作成した発現ベクターを 1 本のチューブにまとめ、1 遺伝子のノックダウンを確実に行うシステムを作成する発現ベクターには導入細胞を選別、確認するため、緑色蛍光蛋白と抗生物質耐性遺伝子を挿入する。(Aki, JCP, 2008)。

(4)RNAi 遺伝子の導入

現在、行っているリポソームによる RNAi ベクターの遺伝子導入の手法を 96well に対応するため、small スケールでの条件検討を行う。特にリバーストランスフェクション法は、細胞分散と同時に遺伝子を導入できる簡便法であり、ハイスループットに向いている。このため、リバース法を含めて条件を検討する。

(5)E2 刺激後の活性測定

これまでに確立した細胞内 Ca²⁺の測定 (Funakoshi, BBRC, 2006, Mizukami, Cardiovasc Res. 2008) や NO 測定の手法 (Mogami, FEBS, 1999, Omura, FEBS. 2000) を Flex station (高感度蛍光マイクロプレートリーダー) によるアッセイシステムに変更する。

(6)E2 標的受容体遺伝子の確認①

Alexa555 による蛍光ラベル E2 を用いて同定された E2 の細胞膜受容体との直接的な結合を確認する。また、E2 刺激後の同定された受容体の局在を調べ、E2 刺激との関連を調べる。

(7)E2 刺激後の転写活性の測定

ERK のリン酸化を指標にハイスループットシステムで活性を測定する。

(Mizukami, JBC, 2000, Mizkaumi, JBC, 1997, Mizukami, BJ, 1997)。また、ERK の下流で活性化される AP-1 サイトの転写活性をルシフェラーゼベクターを用いて測定する

(Kimura, JBC, 2001, Nishina, Gastroenterology, 2008)。

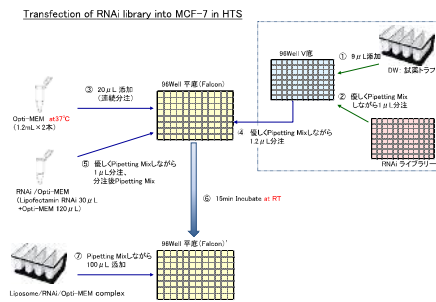
(8)E2 標的受容体遺伝子の確認②

同定された受容体遺伝子を再度、細胞でノックダウンし、その効果を real-time PCR およびウエスタンブロットングで確認する。確認できた細胞について E2 の効果の抑制を確認する (Kimura, JBC, 2001, Hirata, Brain Res, 2007)。

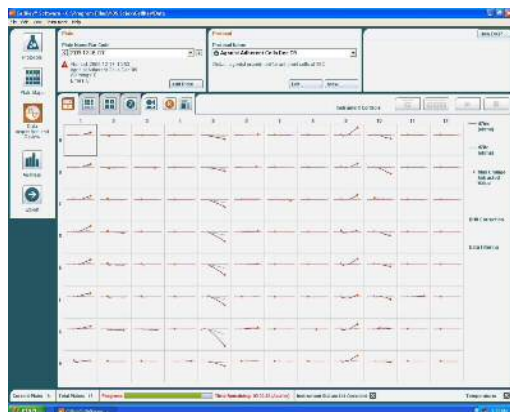
4. 研究成果

411 種類の GPCR 遺伝子に対する RNAi をそれぞれ 3 カ所ずつ合成し、これを混合した RNAi を予試験に使い、細胞導入し実験を行った。乳がん細胞には、リバーストランスフェクション法で導入する条件を検討し、RNAiMax を用いて効率よくノックダウンできることが蛍光標識 RNAi を用いて確認された。この実

験プロトコルをプログラムに組み自動化を試みた。自動化にはパーキンエルマー Janus を使い、細胞導入が無人で行えるシステムの構築に成功した。



遺伝子導入と並行して内因性受容体に対する応答をカルシウムアッセイで検討したが、Flex station のシステムが予想ほど感度が得られず、内因性受容体の存在を明確にすることは困難であると判断した。このため、アッセイシステムを変更し、細胞膜電位測定システム (Cellkey) を用いて受容体アッセイを行った。しかし、ポジティブコントロール以外は反応が認められず、少なくとも乳がん培養細胞 MCF-7 では現在までエストロゲンに反応する細胞膜受容体は検出されていない。



細胞培養中に一部の遺伝子が欠損あるいは、変異を起こし細胞応答が消失している可能性が考えられる。このため、正常ヒト乳腺上皮細胞や正常ヒト子宮平滑筋細胞を含めてエストロゲンに明確に反応する細胞をセレクションすると共に内因性受容体を明瞭に測定できるアッセイシステムの確立を行う

必要がある。

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 33 件)

1. Aihara, M., Yamamoto, S., Nishioka, H., Hamano, K., Oka, M., and Mizukami, Y., Optimizing high-resolution melting analysis for the detection of mutations of GPR30/GPER-1 in breast cancer, *Gene* in press, (2012) (**corresponding author**) 査読有
2. Sasaki, F., Okuno, T., Saeki, K., Min, L., Onohara, N., Kato, H., Shimizu, T. and Yokomizo, T. A high-affinity monoclonal antibody against the FLAG tag useful for G-protein coupled receptor study. *Anal. Biochem.* In press (2012) 査読有
3. 水上洋一 細胞膜エストロゲン受容体 GPER/GPR30 は、なぜ小胞体で見つかったのか！日本薬理学会誌，印刷中 (2012) 査読無
4. Back, M., Dahlen, S. E., Drazen, J. M., Evans, J. F., Serhan, C. N., Shimizu, T., Yokomizo, T. and Rovati, G. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIV: Leukotriene Receptor Nomenclature, Distribution, and Pathophysiological Functions. *Pharmacol. Rev.* 63, 539-584 (2011) 査読有
5. Yoshida M, Ohkusa T, Nakashima T, Takanari H, Yano M, Takemura G, Honjo H, Kodama I, Mizukami Y, Matsuzaki M., Alterations in adhesion junction precede gap junction remodeling during

- the development of heart failure in cardiomyopathic hamster., *Cardiovasc. Res.*, Oct 1;92(1):95-105. Epub 2011 Jun 21. (2011)査読有
6. Takemoto Y, Li TS, Kubo M, Ohshima M, Ueda K, Harada E, Enoki T, Okamoto M, Mizukami Y, Murata T, Hamano K., Operative injury accelerates tumor growth by inducing mobilization and recruitment of bone marrow-derived stem cells., *Surgery*. Jun;149(6):792-800. Epub (2011) Apr 20. 査読有
 7. Katagiri, T., Hatano, N., Aihara, M., Kawano, H., Okamoto, M., Xing, L., Izumi, T., Maekawa, T., Nakamura, S., Ishihara, T., Shirai, M., Mizukami, Y., Proteomic Analysis of Proteins Expressing in Regions of Rat Brain by Combination of SDS-PAGE with Nano-Liquid Chromatography-Quadrupole Tandem Mass spectrometry, *Proteome Science*, 8(1):41. (2010) Jul 27 (**corresponding author**) 査読有
 8. Mizukami, Y., In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen-From discovery to functions in vivo-, *Endocrine J.*, 57(2), 101-107 (2010). Epub 2009 Dec 8. Review. 査読有
 9. Matayoshi, H., Hirata, T., Yamashita S., Ishida, K., Mizukami, Y., Gondo, T., Matsumoto, M., Sakabe, T., Neutrophil elastase inhibitor, ONO-5046, attenuates hippocampal neuronal damage after transient forebrain ischemia in rats, *Brain Res.* 1259, 98-106 (2009) 査読有
 10. Yamashita, S., Hirata, T., Mizukami, Y. Cui, Y.J., Fukuda, S., Ishida, K., Matsumoto, M., Sakabe, T., Repeated preconditioning with hyperbaric oxygen induces neuroprotection against forebrain ischemia via suppression of p38 mitogen activated protein kinase, *Brain Res.*, 1301, 171-179 (2009) 査読有
 11. 水上洋一 性ステロイドホルモンと GPCR, *実験医学*, 8, 2080-2086, (2009) 査読無
- [学会発表] (計 73 件)
1. Yokomizo T. Generation of a novel anti-FLAG monoclonal antibody, The 7th Korea-Japan Conference on Cellular Signaling for Young Scientists, 2012/2/17-18, Ulsan, Korea
 2. Liu M., Saeki K., Yokomizo T. Crucial role of the leukotriene B4 receptor 2, BLT2 in epidermal wound healing. (Oral award), The 10th Global COE International Symposium & 7th Young Investigators Forum, 2011/12/23, Singapore Singapore
 3. 相原正宗, 山本滋, 西岡弘子, 岡本まり子, 岡正朗, 水上洋一, 新規細胞膜エストロゲン受容体GPR30 遺伝子の未知変異検出法の確立, 日本生化学会 2010. 12. 07 神戸市 神戸市民会館
 4. Yusuke Mimura, Ronan Kelly, Yoichi Mizukami, Margaret Goodall, Roy Jefferis, Pauline M Rudd, Impact of a 3-linked galactose-containing oligosaccharides of a recombinant mouse/human chimeric IgG mutant on its

Fc effector functions, 14th

International Congress of Immunology,
Aug. 22-27, 2010, Kobe, Japan Portpia
Hall

5. 相原正宗, 山本滋, 西岡弘子, 岡本まり子, 岡正朗, 水上洋一, 乳がん組織における細胞膜女性ホルモン受容体 GPR30 の遺伝子変異の検出
第 111 回山口大学医学会学術講演会
2010. 7. 18 宇部市 山口大学霜仁会館
6. Masahiko Ito, Kentaro Nagaoka, Keiji Kuroda, Natsuko Kawano, Keiichi, Yoshida, Yuichirou Harada, Tomohide Shikano, Mami Miyado, Shoji Oda, Kiyotaka Toshimori, Youichi Mizukami, Tomoaki Murata, Akihiro Umezawa, Shunichi Miyazaki, Kenji Miyado., Arrest of spermatogenesis at round spermatids in PLCZ1-deficient mice., 11th International Symposium on Spermatology. June. 24-29 2010, Okinawa, Japan conbention center
7. 相原正宗, 山本滋, 西岡弘子, 岡本まり子, 岡正朗, 水上洋一, 細胞膜女性ホルモン受容体 GPR30 の高速未知変異遺伝子検出法の確立と疾患への応用, 日本生化学会中四国地方会 May 15 2010 山口市 山口大学大学会館
8. 岡本まり子, 相原正宗, 水上洋一, TNF α シグナル伝達経路における新規細胞膜受容体 GPR30 の関与について
日本生化学会中四国地方会 May 15 2010 山口市 山口大学大学会館

[図書] (計 5 件)

1. 横溝岳彦: 丸善、イラストレイテッドハーバー・生化学原書 28 版(上代淑人、清水孝雄監訳) 翻訳担当 2011 年 22-24 章

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: エストロゲン疾患の判別方法

発明者: 水上洋一

権利者: 山口大学

種類: 特許

番号: 特開 2012-34633

出願年月日: 平成 22 年 8 月 6 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://gene.yamaguchi-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水上 洋一 (MIZUKAMI YOICHI)

山口大学・総合科学実験センター・教授

研究者番号: 80274158

(2) 研究分担者

横溝 岳彦 (YOKOMIZO TAKEHIKO)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号: 60302840