

# 様式 C-19

## 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 16 日現在

機関番号：11301  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2010～2011  
課題番号：22659013  
研究課題名（和文） 酸化LDLを認識する新規GPCRのリガンド同定とその動脈硬化進展における役割  
研究課題名（英文） Identification of a novel GPCR for oxidized LDL and its role in development of arteriosclerosis.  
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

### 研究成果の概要（和文）：

我々は、オーファン GPCR のリガンド同定を進める過程で酸化リン脂質に反応性を示す新規 GPCR を同定した。本研究では、この GPCR のリガンド特異性を含めた生化学的な性状を解析するとともに、機能解析、特に、動脈硬化における機能を探索する。

### 研究成果の概要（英文）：

We identified a novel orphan GPCR that reacted specifically with oxidized phospholipids. In this study we further perform biochemical characterization of the GPCR including precise ligand specificity. In addition, we also examine the patho-physiological roles of the GPCR, especially in the development of arteriosclerosis.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

### 研究分野：脂質生物学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：酸化リン脂質、Gタンパク質共役型受容体

#### 1. 研究開始当初の背景

我々は、オーファン GPCR のリガンド同定を進める過程で酸化リン脂質に反応性を示す新規 GPCR を同定した。本 GPCR (GPR X と表記) は MRG family に属し、DRG での発現は報告されているがその詳細な機能は全く未知である。

#### 2. 研究の目的

本研究では、この GPCR のリガンド特異性を含めた生化学的な性状を解析するとともに、機能解析、特に、動脈硬化における機能を探

索する。

#### 3. 研究の方法

##### (1) GPR X の活性化測定

申請者らが最近開発した GPCR 活性化測定法の TGF・切断アッセイを用いた。本アッセイは高感度・高精度に GPR X 活性化を検出可能である。

##### (2) GPR X のリガンド探索

購入可能な種々のリン脂質に対する反応性を検討した結果、GPR X はジリノレオイル (18:2) ホスファチジン酸 (PA) の酸化体が最も高い反応性を示した。そこで、逆相液体ク

ロマトグラフィーを用い酸化 PA 分子種の分離・分画を行い、各フラクション中に含まれる酸化リン脂質の GPR X に対する反応性を評価した。各フラクションに含まれる分子種の構造をフーリエ変換-リニアイオントラップハイブリッド質量分析計を用いて解析した。

(3) ゼブラフィッシュを用いた GPR X の機能解析

ゼブラフィッシュ胚に GPR X mRNA をマイクロインジェクションし、GPR X を過剰発現させ、発生期の形態を観察した。形態異常が認められたことから、抗酸化剤の存在下と非存在下でゼブラフィッシュ胚を培養し、酸化脂質による影響を調べた。

(4) 培養細胞における GPR X の機能解析

HEK293 細胞に GPR X を過剰発現させ、形態を観察したところ細胞増殖の低下が認められた。細胞数は MTT 法で定量した。

#### 4. 研究成果

(1) GPR X のリガンド同定

申請者らは、ヒト LDL を酸化処理することで、GPR X が顕著に活性化されることを見出した。酸化 LDL の活性成分の精製を試みたが、比活性が弱いため活性成分の同定には至らなかった。酸化 LDL は主にリン脂質の脂肪酸部分が酸化付加を受けることが知られている。そこで、種々のリン脂質を酸化させ、GPR X の反応性を検討した結果、ジリノレオイル (18:2) ホスファチジン酸 (PA) の酸化体が最も高い反応性を示した。逆相液体クロマトグラフィーを用い、酸化 PA の活性成分の精製を行ったところ、PA の脂肪酸鎖の末端部分が酸化によりアルデヒドまたはカルボン酸となった分子種により強く活性化されることを見出した。

(2) GPR X の機能解析

GPR X は霊長類に特異的な遺伝子であり、マウスに相同遺伝子が存在していなかった。そこで個体レベルの機能解析が容易なゼブラフィッシュの胚発生をモデルとして、GPR X の過剰発現時の影響を調べた。その結果、受精後 5~6 時間という非常に早いタイミングで胚の発生が停止した。また、この胚発生の停止は、抗酸化剤の存在下でレスキューされた。従って、ゼブラフィッシュ胚で内在的に酸化脂質が産生され、GPR X の過剰なシグナルを介して胚発生の停止を誘導していることが強く示唆された。実際、培養細胞に GPR X を一過的に過剰発現させると、トランスフェクション 48 時間後にはコントロール群に比べ、細胞数が約 8 割にまで減少した。細胞数の減少は、酸化 PA の存在下で促進され、抗酸化剤存在下でレスキューされた。また、TUNEL 法による染色の結果、DNA の断片化は検出できず、アポトーシスの関与は否定された。

#### 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 39 件)

1) Sato A, Kumagai T, Aoki J, Ebina K, Synthetic biotinylated peptide compounds derived from Asp-hemolysin: Novel potent inhibitors of platelet-activating factor. *Eur J Pharmacol.* (2012) [Epub ahead of print] 10.1016/j.ejphar.2012.04.025 (査読有)

2) Saigusa D, Shiba K, Inoue A, Hama K, Okutani M, Iida N, Saito M, Suzuki K, Kaneko T, Suzuki N, Yamaguchi H, Mano N, Goto J, Hishinuma T, Aoki J, Tomioka Y, Simultaneous quantitation of sphingoid bases and their phosphates in biological samples by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* (2012) [Epub ahead of print] 10.1007/s00216-012-6004-9 (査読有)

3) Shinkuma S, Inoue A, Aoki J, Nishie W, Natsuga K, Ujiie H, Nomura T, Abe R, Akiyama M, Shimizu H, The  $\beta$ 9 Loop Domain of PA-PLA(1) $\alpha$  Has a Crucial Role in Autosomal Recessive Woolly Hair/Hypotrichosis. *J Invest Dermatol.* (2012) 10.1038/jid.2012.96. (査読有)

4) Fukuhara S, Simmons S, Kawamura S, Inoue A, Orba Y, Tokudome T, Sunden Y, Arai Y, Moriwaki K, Ishida J, Uemura A, Kiyonari H, Abe T, Fukamizu A, Hirashima M, Sawa H, Aoki J, Ishii M, Mochizuki N, The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells

- regulates lymphocyte trafficking in mice. *J Clin Invest.* 122, 1416-1426 (2012) 10.1172/JCI60746. (査読有)
- 5) Kitamura H, Makide K, Shuto A, Ikubo M, Inoue A, Suzuki K, Sato Y, Nakamura S, Otani Y, Ohwada T, Aoki J, GPR34 is a receptor for lysophosphatidylserine with a fatty acid at the sn-2 position. *J Biochem.* 151, 511-518 (2012) 10.1093/jb/mvs011 (査読有)
- 6) Nishimasu H, Ishitani R, Aoki J, Nureki O, A 3D view of autotaxin. *Trends Pharmacol Sci.* 33, 138-145 (2012) 10.1016/j.tips.2011.12.004 (査読有)
- 7) Arima N, Inoue A, Makide K, Nonaka T, Aoki J. Surface loops of extracellular phospholipase A(1) determine both substrate specificity and preference for lysophospholipids. *J Lipid Res.* 53, 513-521 (2012) 10.1194/jlr.M022400 (査読有)
- 8) Uyama T, Ichi I, Kono N, Inoue A, Tsuboi K, Jin XH, Araki N, Aoki J, Arai H, Ueda N. Regulation of peroxisomal lipid metabolism by catalytic activity of tumor suppressor H-rev107. *J Biol Chem.* 287, 2706-2718 (2012) 10.1074/jbc.M111.267575 (査読有)
- 9) Hashimoto T, Okudaira S, Igarashi K, Hama K, Yatomi Y, Aoki J, Identification and biochemical characterization of a novel autotaxin isoform, ATX  $\delta$ , with a four-amino acid deletion. *J Biochem.* 151, 89-97 (2012) 10.1093/jb/mvr126 (査読有)
- 10) Yukiura H, Hama K, Nakanaga K, Tanaka M, Asaoka Y, Okudaira S, Arima N, Inoue A, Hashimoto T, Arai H, Kawahara A, Nishina H, Aoki J, Autotaxin regulates vascular development via multiple lysophosphatidic acid (LPA) receptors in zebrafish. *J Biol Chem.* 286, 43972-43983 (2011) 10.1074/jbc.M111.301093 (査読有)
- 11) Inoue A, Arima N, Ishiguro J, Prestwich GD, Arai H, Aoki J, LPA-producing enzyme PA-PLA $_1$   $\alpha$  regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling. *EMBO J.* 30, 4248-4260 (2011) 10.1038/emboj.2011.296. (査読有)
- 12) Masuda A, Fujii T, Iwasawa Y, Nakamura K, Ohkawa R, Igarashi K, Okudaira S, Ikeda H, Kozuma S, Aoki J, Yatomi Y, Serum autotaxin measurements in pregnant women: application for the differentiation of normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension. *Clin Chim Acta.* 412, 1944-1950 (2011) 10.1016/j.cca.2011.06.039 (査読有)
- 13) Kawaguchi M, Okabe T, Okudaira S, Hanaoka K, Fujikawa Y, Terai T, Komatsu T, Kojima H, Aoki J, Nagano T, Fluorescence probe for lysophospholipase C/NPP6 activity and a potent NPP6 inhibitor. *J Am Chem Soc.* 133, 12021-12030 (2011) 10.1021/ja201028t (査読有)
- 14) Nakai Y, Ikeda H, Nakamura K, Kume Y, Fujishiro M, Sasahira N, Hirano K, Isayama

- H, Tada M, Kawabe T, Komatsu Y, Omata M, Aoki J, Koike K, Yatomi Y, Specific increase in serum autotaxin activity in patients with pancreatic cancer. *Clin Biochem.* 44, 576-581 (2011) 10.1016/j.clinbiochem.2011.03.128 (査読有)
- 15) Nakagawa H, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Masuzaki R, Tateishi R, Yoshida H, Watanabe N, Tejima K, Kume Y, Iwai T, Suzuki A, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Omata M, Igarashi K, Aoki J, Koike K, Yatomi Y, Autotaxin as a novel serum marker of liver fibrosis. *Clin Chim Acta.* 412, 1201-1206 (2011) 10.1016/j.cca.2011.03.014 (査読有)
- 16) Nishimasu H, Okudaira S, Hama K, Mihara E, Dohmae N, Inoue A, Ishitani R, Takagi J, Aoki J, Nureki O, Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat Struct Mol Biol.* 18, 205-212. (2011) 10.1038/nsmb.1998 (査読有)
- 17) Kazama S, Kitayama J, Aoki J, Mori K, Nagawa H., Immunohistochemical detection of autotaxin (ATX)/lysophospholipase D (lysoPLD) in submucosal invasive colorectal cancer. *J Gastrointest Cancer.* 42, 204-211 (2011) (査読有)
- 18) Nagai J, Uchida H, Matsushita Y, Yano R, Ueda M, Niwa M, Aoki J, Chun J, Ueda H, Autotaxin and lysophosphatidic acid1 receptor-mediated demyelination of dorsal root fibers by sciatic nerve injury and intrathecal lysophosphatidylcholine. *Mol Pain.* 6, 78 (2010) 10.1186/1744-8069-6-78 (査読有)
- 19) Cavalli S, Houben AJ, Albers HM, van Tilburg EW, de Ru A, Aoki J, van Veelen P, Moolenaar WH, Ovaa H, Development of an activity-based probe for autotaxin. *Chembiochem.* 11, 2311-2317 (2010) 10.1002/cbic.201000349 (査読有)
- 20) Ohuchi H, Fukui H, Matsuyo A, Tomonari S, Tanaka M, Arai H, Noji S, Aoki J, Autotaxin controls caudal diencephalon-mesencephalon development in the chick. *Dev Dyn.* 239, 2647-2658 (2010) 10.1002/dvdy.22403 (査読有)
- 21) Hosono H, Homma M, Ogasawara Y, Makide K, Aoki J, Niwata H, Watanabe M, Inoue K, Ohkohchi N, Kohda Y, Expression of phosphatidylserine-specific phospholipase A(1) mRNA in human THP-1-derived macrophages. *Cell Transplant.* 19, 759-64 (2010) (査読有)
- 22) Takahashi K, Sasabe N, Ohshima K, Kitazato K, Kato R, Masuda Y, Tsurumaki M, Obama T, Okudaira S, Aoki J, Arai H, Yamaguchi T, Itabe H, Glucagon regulates intracellular distribution of adipose differentiation-related protein during triacylglycerol accumulation in the liver. *J Lipid Res.* 51, 2571-80 (2010) 10.1194/jlr.M004648 (査読有)
- 23) Nakanaga K, Hama K, Aoki J, Autotaxin--an LPA producing enzyme with

diverse functions. *J Biochem.* 148, 13-24 (2010) 10.1093/jb/mvq052 (査読有)

24) Okudaira S, Yukiura H, Aoki J, Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie.* 92, 698-706. (2010) 10.1016/j.biochi.2010.04.015 (査読有)

25) Nakamura K, Igarashi K, Ohkawa R, Saiki N, Nagasaki M, Uno K, Hayashi N, Sawada T, Syukuya K, Yokota H, Arai H, Ikeda H, Aoki J, Yatomi Y, A novel enzyme immunoassay for the determination of phosphatidylserine-specific phospholipase A(1) in human serum samples. *Clin Chim Acta.* 411, 1090-1094 (2010) 10.1016/j.cca.2010.04.006 (査読有)

26) David M, Wannecq E, Descotes F, Jansen S, Deux B, Ribeiro J, Serre CM, Grès S, Bendriss-Vermare N, Bollen M, Saez S, Aoki J, Saulnier-Blache JS, Clézardin P, Peyruchaud O, Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts. *PLoS One.* 17, e9741 (2010) 10.1371/journal.pone.0009741 (査読有)

27) Hama K, Aoki J, LPA(3), a unique G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *Prog Lipid Res.* 49, 335-342. (2010) 10.1016/j.plipres.2010.03.001 (査読有)

28) Shinkuma S, Akiyama M, Inoue A, Aoki

J, Natsuga K, Nomura T, Arita K, Abe R, Ito K, Nakamura H, Ujiie H, Shibaki A, Suga H, Tsunemi Y, Nishie W, Shimizu H, Prevalent LIPH founder mutations lead to loss of P2Y5 activation ability of PA-PLA1alpha in autosomal recessive hypotrichosis. *Hum Mutat.* 31, 602-10 (2010) 10.1002/humu.21235 (査読有)

29) Ma L, Uchida H, Nagai J, Inoue M, Aoki J, Ueda H, Evidence for de novo synthesis of lysophosphatidic acid in the spinal cord through phospholipase A2 and autotaxin in nerve injury-induced neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther.* 333, 540-546. (2010) 10.1124/jpet.109.164830 (査読有)

30) Otani K, Kitayama J, Yasuda K, Nio Y, Iwabu M, Okudaira S, Aoki J, Yamauchi T, Kadowaki T, Nagawa H, Adiponectin suppresses tumorigenesis in Apc(Min)(+/+) mice. *Cancer Lett.* 288, 177-82 (2010) 10.1016/j.canlet.2009.06.037 (査読有)

[学会発表] (計2件)

1. Junken Aoki, Autotaxin regulates vascular development via multiple LPA receptors in zebrafish, 2011 FASEB Summer Research Conference, Lucca, Italy, 2011年8月15日

2. Junken Aoki, Autotaxin and LPA Signaling in Cardiovascular Development, Keystone Symposia, Kyoto, Japan, 2010年6月8日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

1. 名称: オートタキシンアイソフォーム特異的抗体および検出方法  
発明者: 青木淳賢、五十嵐浩二

権利者：株式会社東ソー、東北大学  
種類：特許  
番号：特願 2011-150054 号  
出願年月日：2011年7月6日  
国内外の別：国内

2. 名称：自己免疫疾患治療薬のスクリーニング方法  
発明者：青木淳賢、巻出久美子、井上飛鳥、大和田智彦、井久保仁也、尾谷優子  
権利者：東北大学、東京大学  
種類：特許  
番号：特願 2011-112881  
出願年月日：2011年5月29日  
国内外の別：国内

3. 名称：ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼ A1 測定による全身性エリテマトーデスの検査方法および検査薬  
発明者：沢田哲治、矢富裕、中村和宏、青木淳賢、五十嵐浩二  
権利者：株式会社東ソー、東京大学、東北大学  
種類：特許  
番号：特願 2010-172068  
出願年月日：2010年7月30日  
国内外の別：国内

○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/H21/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