

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580436

研究課題名(和文)「細胞外pHをセンスするG蛋白共役型受容体」を介した血管形成、機能の解析

研究課題名(英文) The role of proton-sensing G protein-coupled receptors on blood vessel formation and function

研究代表者

戸村 秀明 (Tomura, Hideaki)

明治大学・農学部・教授

研究者番号：70217553

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：OGR1、GPR4、TDGA8、G2Aは細胞外プロトンを感じ取るユニークなGPCR群である(OGR1ファミリー)。私はpHの低下に伴う血管形成、機能の調節に、このファミリーが関与するものと予想している。個体レベルでの血管形成や機能の解析に、ゼブラフィッシュは有用な系を提供する。そこでこのファミリーの血管形成、機能への関与を調べる第一歩として、本研究ではゼブラフィッシュゲノムに存在するOGR1ファミリー相同遺伝子の解析を行った。その結果、これら相同遺伝子がヒトのものと同様に、細胞外プロトンを感じ取るGPCRをコードしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：OGR1, GPR4, TDGA8 and G2A are the unique GPCRs which sense extracellular proton (OGR1 family). I assume that this family participates in blood vessel formation and function under acidic condition. Zebrafish offers a useful system to analyze blood vessel formation and function. The homologous OGR1 family genes which exist in the zebrafish genome were analyzed by this research as the first step to prove the above hypothesis. The result shows that the homologous genes encode the GPCRs which sense extracellular proton like the human OGR1 family does.

研究分野：機能生物化学

キーワード：GPCR OGR1 GPR4 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

血管形成やその機能は、組織の生存やその機能発現に重要な役割を果たす。生殖においても、血管の新生、増殖、退行や透過性の変化が観察される。これら血管形成や機能の調節は生殖効率に多大な影響を及ぼすが、その機構に関しては未解明の部分が多い。血管形成や機能調節には、組織内部の酸素不足による解糖系の亢進による低酸素、低 pH (酸性) などの微小環境が大きく影響する。低酸素状態に関しては VEGF システムを介して血管新生を誘導する系の解析が進んでいる。一方、低酸素に付随して生じる低 pH 状態がどのような機構で血管形成、機能を制御しているのか、またその意義に関しては全く不明である。OGR1、GPR4、TDGA8、G2A は細胞外プロトンを感じ取るユニークな GPCR 群であることが我々のものを含め、報告されている (OGR1 ファミリー)。我々は pH の低下に伴う血管形成、機能の調節に、このファミリーが関与するものと予想している。

2. 研究の目的

GPCR ファミリーのうち OGR1 ファミリーは、生体内の中性から弱酸性のわずかな pH 変化を感じ、受容体の活性化、三量体 G タンパク質、細胞内シグナル伝達系の活性化へと情報を伝えることができるユニークな受容体ファミリーである。私は、「この OGR1 ファミリーが pH センサーとして機能し、血管形成、機能を制御している」との仮説を立てた。本研究ではこの仮説を検証する第一歩として、ゼブラフィッシュにおける OGR1 ファミリーの解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュのゲノムデータベース検索と PCR 法により、OGR1 ファミリーのうち、OGR1、GPR4、G2A ホモログがゲノムに存在するという結果を得た。これらの受容体

のコーディング領域を発現ベクターに挿入後、HEK293 細胞に強制発現させ、pH の低下による細胞内情報伝達系の活性化 (SRE プロモーターの活性化) を確認する。これまでにヒト OGR1 ファミリーはすべて SRE プロモーターを活性化することを、明らかにしている。SRE プロモーターの活性化はルシフェラーゼ活性により測定する。この SRE-ルシフェラーゼベクターはすでに所有しており、測定条件等はすでに確立している。

(2) ゼブラフィッシュの発生に対する pH の影響を観察する。卵膜を除いた受精卵を異なる pH 環境下で飼育し、その発生を観察する。また、銅イオンやサイコシンなどのアンタゴニストや報告されているアゴニストを用いてその発生に対する影響を観察する。

4. 研究成果

(1) ゼブラフィッシュのゲノムデータベースに存在する OGR1 ファミリーの各ホモログが、ヒト、マウスのもと同様に、細胞外プロトンを感じ取れるかどうかを、調べた。これらの受容体のコーディング領域を発現ベクターに挿入後、HEK293 細胞に強制発現させ、pH の低下による SRE プロモーターの活性化を測定した。その結果、これらホモログが発現した細胞では、細胞外プロトンにより SRE プロモーターの活性化が観察された。すなわち、ゼブラフィッシュに存在する OGR1 ファミリーの相同遺伝子は、プロトン感知性 GPCR をコードすることが明らかとなった。

(2) これら受容体のどのアミノ酸がプロトンを感じ取れるのか、またどのような物質が受容体のアンタゴニストとして作用するのかわ、調べた。その結果、受容体中の特定のヒスチジン残基がプロトンを感じ取ること、銅イオン、サイコシンがアンタゴニストとして作用しうることが、明らかとなった。

(3) ゼブラフィッシュの発生に対するプロトンの影響を調べた。卵膜を除いた受精卵

を異なる pH 環境下で飼育し、その発生を観察した。その結果、pH6.6 程度まで飼育水の pH を下げた状態でも、ゼブラフィッシュの発生に大きな影響は観察されなかった。pH の変化が生体内で打ち消されている可能性があるため、銅イオンやサイコシンなどのアンタゴニストではなく、すでに報告されている OGR1 アゴニストの影響を次に観察した。OGR1 アゴニストを飼育水に添加し、発生への影響を観察したところ、血管の形態に大きな変化はみられなかった。しかしながら、心臓周囲が膨潤している個体が多数観察された。この結果は、OGR1 が心臓周囲の血管を含む水の透過性に関与している可能性を示唆している。

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 7 件)

1. Mochimaru Y, Azuma M, Oshima N, Ichijo Y, Satou K, Matsuda K, Asaoka Y, Nishina H, Nakakura T, Mogi C, Sato K, Okajima F and 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) (査読有)
2. 一條祐太、戸村秀明 G2A 受容体のリガンドと活性化機構 明治大学農学部研究報告 64: 59-65 (2015) (査読有)
3. 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) (査読有)
4. 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 and 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) (査読有)
5. Wang J, Sun Y, Tomura H and 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) (査読有)
6. Nakakura T, Mogi C, Tobo M, Tomura H, Sato K, Kobayashi M, Ohnishi H, Tanaka S, Wayama M, Sugiyama T, Kitamura T, Harada A and Okajima F. Deficiency of proton-sensing ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 attenuates glucose-stimulated insulin secretion. *Endocrinology* 153:4171-80 (2012) (査読有)
7. Komachi M, Sato K, Tobo M, Mogi C, Yamada T, Ohta H, Tomura H, Kimura T, Im DS, Yanagida K, Ishii S, Takeyoshi I and Okajima F. An orally active lysophosphatidic acid receptor antagonist attenuates pancreatic cancer invasion and metastasis in vivo. *Cancer Sci.* 103: 1099-104 (2012) (査読有)

[学会発表](計 13 件)

1. Mochimaru Y, Oshima N, Nakakura T, Mogi C, Sato K, Okajima F and Tomura H. Characterization of OGR1 and GPR4 homologues in zebrafish genome. The 39th JSCE and 8th ISAREN 合同大会 11/7-9 (2014) 岡崎カンファレンスセンター(岡崎)
2. 大嶋菜月、持丸雄太、戸村秀明 ゼブラフィッシュ GPR4, OGR1 の分子的特徴 第 87 回日本生化学会大会 10/15-10/17 (2014) 京都国際会議場(京都)
3. 一條祐太、戸村秀明 ゼブラフィッシュ G2A の機能解析 第 87 回日本生化学会大会 10/15-10/17 (2014) 京都国際会議場(京都)

4. 佐藤一裕、加藤幸雄、戸村秀明 L T2 細胞における性腺刺激ホルモン放出ホルモンに対するシグナル応答解析 第 87 回日本生化学会大会 10/15-10/17 (2014) 京都国際会議場 (京都)
5. 佐藤一裕、加藤幸雄、戸村秀明 L T2 細胞における GnRH に対するシグナル活性化パターンの解析 第 107 回日本繁殖生物学会 8/20-8/23 (2014) 帯広畜産大学 (帯広)
6. 小金井健登、持丸雄太、大嶋菜月、戸村秀明 ゼブラフィッシュ OGR1 ファミリーのシグナリング解析 第 29 回日本下垂体研究会 8/8-8/10 (2014) 八王子セミナーハウス (東京)
7. 佐藤一裕、一條祐太、加藤幸雄、戸村秀明 L T2 細胞における GnRH に対するシグナル活性化様式の解析 第 29 回日本下垂体研究会 8/8-8/10 (2014) 八王子セミナーハウス (東京)
8. 勝部祐介、岡野真由子、植村健治、高瀬和典、高橋伸一郎、太田昭彦、戸村秀明 インスリン受容体基質結合タンパク質、PINCH2 を発現するトランスジェニックマウスにおけるインスリンシグナル・生理活性の解析 第 106 回日本繁殖生物学会 9/12-9/14 (2013) 東京農工大学 (東京)
9. 佐藤一裕、持丸雄太、大嶋菜月、一條祐太、中倉敬、茂木千尋、佐藤幸市、岡島史和、戸村秀明 ゼブラフィッシュ OGR1 ファミリー受容体の解析 第 106 回日本繁殖生物学会 9/12-9/14 (2013) 東京農工大学 (東京)
10. 大嶋菜月、戸村秀明 ゼブラフィッシュゲノムに存在する GPR4 相同遺伝子の機能解析 第 28 回日本下垂体研究会 8/7-8/9 (2013) 花巻温泉 (岩手)
11. 一條祐太、東森生、松田恒平、戸村秀明 ゼブラフィッシュゲノムに存在する 2 種類の G2A 相同遺伝子の解析 第 28 回日本

下垂体研究会 8/7-8/9 (2013) 花巻温泉 (岩手)

12. 持丸雄太、中倉敬、茂木千尋、佐藤幸市、岡島史和、戸村秀明 ゼブラフィッシュゲノムに存在する OGR1 相同遺伝子の機能解析 第 28 回日本下垂体研究会 8/7-8/9 (2013) 花巻温泉 (岩手)

13. 戸村秀明 血管平滑筋細胞におけるプロトンによるプロスタサイクリン産生応答に対するリゾホスファチジン酸の効果 第 105 回日本繁殖生物学会 9/5-9/8 (2012) 筑波大学 (茨城)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸村 秀明 (TOMURA HIDEAKI)
明治大学・農学部・教授
研究者番号：70217553

(2) 研究分担者

無