



Generation of a constitutively active mutant of human GPR48/LGR4, a G-protein-coupled receptor

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高, 芸 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/295

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 4 6 5 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 3 月 1 5 日
氏 名	高 芸		
論文題目	Generation of a constitutively active mutant of human GPR48/LGR4, a G-protein-coupled receptor (G タンパク共役型受容体ヒト GPR48/LGR4 の構成的活性型変異体の作製)		

博士(医学) 高 芸

論文題目

Generation of a constitutively active mutant of human GPR48/LGR4, a G-protein-coupled receptor
(Gタンパク共役型受容体ヒトGPR48/LGR4の構成的活性型変異体の作製)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

サイクリン依存性キナーゼ(CDK)阻害蛋白質p27はブレーキとして細胞周期の緻密な制御をつかさどっている。大腸癌、乳癌、胃癌、肺癌等多種の癌でp27蛋白質の分解亢進による発現量低下が報告され、それが予後と相関することが示されている。

我々はp27の発現量低下による予後不良化のメカニズムや下流遺伝子の実体を明らかにするために、ヒト大腸癌細胞HCT116の片側のp27遺伝子をジーンターゲットイングの手法で欠失させたヘテロノックアウト細胞(p27-hKO)を樹立し、p27発現低下のモデルとした。この細胞と親株のHCT116細胞を用いてマイクロアレイによる発現遺伝子解析を行い、p27低下状態で発現が亢進している遺伝子としてGPR48/LGR4を見出した。GPR48は構造的には甲状腺刺激ホルモンレセプター(TSHR)、黄体形成ホルモンレセプター(LHR)、卵胞刺激ホルモンレセプター(FSHR)に類似している7回膜貫通型Gタンパク共役型受容体である。しかしながらGPR48はリガンド未知で下流のシグナル伝達や生理機能も不明である。本研究ではGPR48を介したシグナル伝達と生理機能を解析するため、ヒト野生型GPR48のcDNA全長をクローニングしてGPR48発現プラスミドを作製した。これを培養細胞に強制発現させると細胞内サイクリクAMP産生が亢進することがわかった。さらにLHRおよびTSHRの知見を参考にしてGPR48にアミノ酸変異を導入し、数種の変異型GPR48発現プラスミドを作製した。これらを、培養細胞に強制発現させて、サイクリクAMPの産生能を指標に変異型GPR48の評価を行った。

〔材料ならびに方法〕

HeLa細胞RNAよりRT-PCR法によりヒト野生型GPR48を合成し、pcDNA4-HisMaxベクターにクローニングした。点変異の導入は野生型GPR48 cDNAを鋳型とし、変異プライマーを用いたPCRによって行った。野生型或いは点変異型GPR48発現プラスミドをヒト胚性腎由来293細胞にリン酸カルシウム法でトランスフェクトして一過性に発現させた。一方でヒト大腸癌HCT116細胞に野生型或いは点変異型GPR48発現プラスミドを導入して安定発現細胞を樹立した。GPR48をトランスフェクションした細胞は4%パラフォームアルデヒドにて固定後、蛍光免疫染色を施行し、GPR48の過剰発現を確認した。培養したGPR48過剰発現細胞を0.1M塩酸で処理して、Sigma-Aldrich社のcyclic AMP enzyme immunoassay kitを用い、細胞内サイクリクAMP(cAMP)の測定を施行した。マトリジェル浸潤アッセイについては、 5×10^4 の細胞をマトリジェル膜の上に播き、遊走因子として10 μ g/mlフィブロネクチンを下のチャンバーに入れた。36時間後Diff-Quik kitで染色して、顕微鏡で観察した。

〔結果〕

野生型GPR48発現プラスミド(pcDNA4-HisMax-WT-hGPR48)を293細胞に導入し、抗Xpressタグ抗体に

よるウェスタンブロットでGPR48の発現を確認し、免疫蛍光染色で細胞膜に発現していることを確認した。また、野生型GPR48は導入したプラスミドの用量依存的に細胞内cAMP量を増加させるた。構成的活性型GPR48の作成に関しては、家族性男性思春期早発症と甲状腺機能亢進症の患者でLHRとTSHRの点変異による活性化が発見され、それらを参考にして、野生型GPR48の膜貫通領域VIに点変異(A750V、I753L、T755I)を導入した。これらの点変異型GPR48或いは野生型GPR48発現プラスミドを293細胞に一過性に発現させてcAMPを測定した。A750V、I753Lの点変異型GPR48は野生型と同程度にcAMP産生を増加させる能力を示した。また725番以降のC末端欠失型GPR48(I724*)はcAMPの産生を増加させる能力を全く持たない不活性型GPR48であった。それに対し、T755I点変異GPR48はcAMP産生を野生型の16倍(900ng導入時)に上昇させ、構成的活性型GPR48の作成に成功したと考えられた。続いて野生型GPR48或いはT755I点変異GPR48を安定発現するヒト大腸癌HCT116細胞樹立し、cAMP産生を測定したところ、親株に比べ野生型GPR48導入株で約3倍、T755I点変異導入株で5～8倍の上昇が見られた。興味深いことにこの野生型GPR48安定発現細胞は親株に比べ浸潤能が亢進しており、T755I点変異GPR48安定発現細胞はさらに強い浸潤能を示した。さらにこの細胞をヌードマウスに皮下接種し転移に対する評価を行った結果、浸潤能と同様の転移促進活性が観察された。

〔考察〕

GPR48はリガンド、生理機能、シグナル伝達機構が未知なGタンパク共役型受容体であるが、我々の研究から癌の浸潤転移に関係することが明らかになってきた。リガンドが未知の受容体の機能解析は困難であり、本研究ではその解析に有用な構成的活性化型GPR48の作成を目指した。野生型GPR48の強制発現によりcAMP産生は量依存的に上昇したことから、GPR48の下流にadenylate cyclaseが位置することが示唆された。GPR48はGs-alpha proteinと作用してadenylate cyclaseを刺激し、cAMPの生産を促進すると予想された。T755I点変異GPR48強制発現によりcAMP産生が著しく上昇したことから、T755I点変異GPR48は構成的活性型であると結論した。

GPR48過剰発現している大腸癌HCT116細胞は浸潤能が亢進し、構成的活性型GPR48過剰発現細胞の浸潤能がさらに増強されることから、GPR48は癌の浸潤に関与すると考えている。今後本研究で作成した構成的活性化型および不活性型GPR48は、GPR48のシグナル伝達機構の解析およびGPR48を介した癌細胞の浸潤転移の研究に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

〔はじめに〕

申請者はp27による予後不良化のメカニズムや下流遺伝子の実体を明らかにするため、ヒト大腸癌細胞HCT116の片側のp27遺伝子をジーンターゲットングの手法で欠失させたヘテロノックアウト細胞(p27-hKO)を樹立し、p27発現低下のモデルとした。この細胞と親株のHCT116細胞を用いてマイクロアレイによる発現遺伝子解析を行い、p27低下状態で発現が亢進している遺伝子としてGPR48/LGR4を見出した。GPR48は構造的には甲状腺刺激ホルモンレセプター(TSHR)、黄体形成ホルモンレセプター(LHR)、卵巣刺激ホルモンレセプター(FSHR)に類似している7回膜貫通型Gタンパク共役型受容体である。しかしながらGPR48はリガンド未知で下流のシグナル伝達や生理機能も不明である。本研究ではGPR48を介したシグナル伝達と生理機能を解析するため、ヒト野生型GPR48のcDNA全長をクローニングしてGPR48発現プ

ラスミドを作製した。これを培養細胞に強制発現させると細胞内サイクリックAMP (cAMP) 産生が亢進することがわかった。さらにLHRおよびTSHRの知見を参考にしてGPR48にアミノ酸変異を導入し、数種の変異型GPR48発現プラスミドを作製した。これらを、培養細胞に強制発現させて、cAMPの産生能を指標に変異型GPR48の評価を行った。p27とヒト腫瘍との広範な関わりを明らかにしようとする所属研究室のプロジェクトの重要な一部である。

〔材料ならびに方法〕

HeLa細胞RNAよりRT-PCR法によりヒト野生型GPR48のcDNAを合成し、pcDNA4-HisMaxベクターにクローニングした。点変異の導入は野生型GPR48 cDNAを鋳型とし、変異プライマーを用いたPCRによって行った。野生型或いは点変異型GPR48発現プラスミドをヒト胚性腎由来293細胞にリン酸カルシウム法でトランスフェクトして一過性に発現させた。一方でヒト大腸癌HCT116細胞に野生型或いは点変異型GPR48発現プラスミドを導入して安定発現細胞を樹立した。GPR48をトランスフェクションした細胞は4%パラフォームアルデヒドにて固定後、蛍光免疫染色を施行し、GPR48の過剰発現を確認した。培養したGPR48過剰発現細胞を0.1M塩酸で処理して、Sigma-Aldrich社のcyclic AMP enzyme immunoassay kitを用い、細胞内cAMPの測定を施行した。マトリジェル浸潤アッセイについては、 5×10^4 の細胞をマトリジェル膜の上に播き、遊走因子として10 μ g/mlフィブロネクチンを下のチャンバーに入れた。36時間後Diff-Quik kitで染色して、顕微鏡で観察した。

〔結果〕

野生型GPR48発現プラスミド(pcDNA4-HisMax-WT-hGPR48)を293細胞に導入し、抗Xpressタグ抗体によるウェスタンブロットでGPR48の発現を確認し、免疫蛍光染色で細胞膜に発現していることを確認した。また、野生型GPR48は導入したプラスミドの用量依存的に細胞内cAMP量を増加させた。構成的活性化型GPR48の作製に関しては、家族性男性思春期早発症と甲状腺機能亢進症の患者でLHRとTSHRの点変異による活性化が発見され、それらを参考にして、野生型GPR48の膜貫通領域VIに点変異A750V、I753L、T755Iを導入した。これらの点変異型GPR48或いは野生型GPR48発現プラスミドを293細胞に一過性に発現させてcAMPを測定した。A750V、I753Lの点変異型GPR48は野生型と同程度にcAMP産生を増加させる能力を示した。また725番以降のC末端欠失型GPR48(I724*)はcAMPの産生を増加させる能力を全く持たない不活性化型GPR48であった。それに対し、T755I点変異GPR48はcAMP産生を野生型の16倍(900ng導入時)に上昇させ、構成的活性化型GPR48の作製に成功したと考えられた。続いて野生型GPR48或いはT755I点変異GPR48を安定発現するヒト大腸癌HCT116細胞樹立し、cAMP産生を測定したところ、親株に比べ野生型GPR48導入株で約3倍、T755I点変異導入株で5～8倍の上昇が見られた。興味深いことにこの野生型GPR48安定発現細胞は親株に比べ浸潤能が亢進しており、T755I点変異GPR48安定発現細胞はさらに強い浸潤能を示した。さらにこの細胞をヌードマウスに皮下接種し転移に対する評価を行った結果、浸潤能と同様の転移促進活性が観察された。

〔考察〕

GPR48はリガンド、生理機能、シグナル伝達機構が未知なGタンパク共役型受容体であるが、この研究から癌の浸潤転移に関係することが明らかになってきた。リガンドが未知の受容体の機能解析は困難であり、本研究ではその解析に有用な構成的活性化型GPR48の作製を目指した。野生型GPR48の強制発現によりcAMP産生は用量依存的に上昇したことから、GPR48の下流にadenylate cyclaseが位置することが示唆

された。GPR48はGs-alpha proteinと作用してadenylate cyclaseを刺激し、cAMPの生産を促進すると予想された。T755I点変異GPR48強制発現によりcAMP産生が著しく上昇したことから、T755I点変異GPR48は構成的活性型であると結論した。GPR48を過剰発現している大腸癌HCT116細胞は浸潤能が亢進し、構成的活性型GPR48過剰発現細胞の浸潤能がさらに増強されることから、GPR48は癌の浸潤に関与すると考えている。申請者は本研究で作製した構成的活性化型および不活性型GPR48は、GPR48のシグナル伝達機構の解析およびGPR48を介した癌細胞の浸潤転移の研究にも有用であると考えている。

審査委員会はこの論文について以下の質問を行った。

- 1) ヘテロ欠損株での発現レベルの減少度はどうか
- 2) neoベクターを導入した対照株との比較はどうか
- 3) マトリゲルアッセイの孔サイズは何故8ミクロンを使ったのか
- 4) HEK293はもともとGPR48を発現しているのか
- 5) ウェスタンブロットに用いた抗体はどのようなものか
- 6) 細胞へ導入する実験の回数は何回か
- 7) イソロイシンとロイシンがかわる多型で機能が変わるのは何故か
- 8) どうしてHeLa細胞を使ったのか
- 9) ノックダウンの方法について
- 10) cAMPと浸潤能の関係について

これらの質問の対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	梶	村	春	彦	
	副査	蓑	島	伸	生	副査 妹尾圭司