

## 審査の結果の要旨

氏名 吉田 浩平

本学位論文では、**Nanodisc** を活用した **GPCR**-低分子薬剤相互作用に対する物理化学解析手法を確立し、その相互作用が脂質の物性によって受ける影響の詳細を明らかにするとともに、得られた知見を基に新規薬剤探索手法の提案、及びその有効性の実証を目指している。

本論文は 6 章より構成されている。第 1 章は本論文の序論である。第 2 章は、モデル **GPCR** 及び **Nanodisc** の調製を行い、*in vitro* での相互作用解析系の確立について述べられている。ヒト由来セロトニン受容体 **2B** を安定に発現精製できるようにコンストラクトを改変し、精製時の基質添加などの検討も行うことで、精製標品の収量を飛躍的に向上させた。しかしながら界面活性剤の存在下では低分子薬剤との精密な相互作用解析が困難であるために、目的の受容体を **Nanodisc** に埋包することで溶液中における界面活性剤の除去ならびに受容体の安定化を図った。得られた **Nanodisc** に対して、表面プラズモン共鳴法 (**SPR**)、及びマイクロスケール熱泳動法 (**MST**) を用い、基質のセロトニン (**5-HT**) に対する結合活性を評価した。その結果、界面活性剤環境では測定が困難であった基質との特異的結合を観測することに成功した。**Nanodisc** を活用することで **GPCR** と低分子の定量的な物理化学的測定が可能になることを示した。

第 3 章では、リン脂質組成によって変化するの膜の物性が **GPCR** の基質結合活性に与える影響について、物理化学的手法を用いた相関解析を行った結果について述べられている。異なる尾部構造を有する 4 種類のリン脂質 **POPC**、**DLPC**、**DOPC**、**DMPC** をそれぞれ用いた **Nanodisc** を調製し、**MST** 及び **SPR** による **5-HT** 結合測定を行った。その結果、用いたリン脂質の中で比較的高い流動性を示す **DLPC** 膜に埋包された受容体は最も高い **5-HT** 結合活性を示した一方で、流動性の低い **DMPC** 膜中の受容体は結合活性が失われてしまっていることが明らかとなった。この結果から受容体の基質結合活性と周囲の膜の流動性には相関があることが示された。それぞれの膜中における受容体の熱安定性の差から、流動性の高い膜中において受容体の構造平衡はより活性型に近い状態を取ることで **5-HT** に対する結合活性が高く維持されている一方で、分子としての構造安定性が低くなっていることが示唆された。更に、本来の基質であり

アゴニストである **5-HT** と比較して、アンタゴニストであるヨヒンビン是对照的に、周囲の膜の流動性が比較的低く、受容体の構造平衡が不活性型に寄っている状態に対してより高親和に結合することが可能であり、その結合時の熱力学的な駆動力も **5-HT** とヨヒンビンでは異なることが明らかにされた。以上の結果から **Nanodisc** を用いた **GPCR** の物理化学的解析を駆使することによって、膜の流動性が **GPCR** の構造平衡に影響を与える可能性を示した。また、低分子薬剤との相互作用に関する物理化学的な知見を取得することが本研究成果より可能となった。

第 4 章は、3 章で示唆された、異なる流動性の膜中における受容体の構造平衡の違いについて、**MD** シミュレーションを駆使して明らかにすることを試みている。流動性の高い膜中において受容体の膜貫通ヘリックス (**TM**) 1 が **TM7** に対して近接し、細胞外領域付近において静電的相互作用を形成している傾向が高いことがシミュレーション結果から見出された。この静電的相互作用に変異を加えると、**5-HT** 結合親和性に影響が表れたことから、この **TM1-TM7** 間の相互作用が受容体の活性・不活性の構造平衡に寄与している可能性が示された。

第 5 章は前章までの知見を活かし、膜の流動性を高く維持した測定環境で薬剤探索を行うことにより新規アゴニスト候補化合物の取得を目指した結果を述べている。フラグメント化合物ライブラリーに対して **SPR**、**MST**、**ITC** といった各種物理化学的測定を駆使することで、受容体の基質結合ポケットに特異的かつ発熱的に結合するフラグメントの取得に成功した。これらヒット化合物はアゴニスト活性を有してはいなかったものの、既存のアゴニストにはない相互作用様式を有していることがドッキングシミュレーションの結果から示唆されているため、これを起点とした構造展開により、新規の相互作用様式を有したアゴニストの設計が可能になることが期待された。第 6 章は論文の総括と今後の展望となっている。

以上、本研究において **Nanodisc** を用いた **GPCR** と低分子薬剤の物理化学的解析手法を構築し、脂質膜の流動性が **GPCR** の機能に影響を与えることを実験的に明らかにしている。さらに、この膜の流動性が **GPCR** の構造平衡に対して影響を与える因果関係を明らかにするための重要な知見に迫った研究内容であると言える。さらに本発見は、有効な **GPCR** 薬剤を効率よく選抜するための重要なコンセプトも含んでいる。

よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。