

審査の結果の要旨

氏名 木戸 命

本研究は循環器疾患領域において近年その重要性が注目されている $G\alpha_{12/13}$ と共役する GPCR (G タンパク質共役型受容体) を創薬標的とした化合物スクリーニングのために、 $G\alpha_{12/13}$ シグナルを簡便かつ高感度に検出できる新規のアッセイ系を確立することを目的としたものであり、下記の結果を得ている。

1. $G\alpha_{12/13}$ シグナルに対する簡便・高感度なアッセイ系確立のために「 $G\alpha_{12/13}$ シグナルを増幅する人工遺伝子回路」の設計と、その機能の実証実験を行った。この人工遺伝子回路では $G\alpha_{12/13}$ シグナル依存的に発現する「膜型転写因子」を基質、「プロテアーゼ」を酵素、これら 2 因子によって発現する「遊離型転写因子」を生成物とした酵素反応を利用することで、相乗的に増幅された $G\alpha_{12/13}$ シグナルをレポーター遺伝子の発光によって検出できると考えた。上記の酵素反応によるシグナルの増幅について実証実験を行った結果、「膜結合型転写因子」と「プロテアーゼ」の細胞内濃度の積とレポーター遺伝子の発光強度が同等であったため、このシグナル増幅機能は実証された。
2. 全ヒト遺伝子を対象とした RNA seq 解析によって $G\alpha_{12/13}$ シグナルによって発現が誘導される遺伝子群を同定した。HeLa 細胞に対して $G\alpha_{12/13}$ と特異的に共役する GPCR である GPR55、LPAR6 のどちらかを一過性に遺伝子導入し、各リガンドで刺激した細胞から mRNA を回収して、RNA seq によって全ヒト遺伝子の発現量を解析した。その結果、両方の受容体で①リガンド刺激前後で発現量が 5 倍以上増加、かつ②刺激前の発現量が FPKM (fragments per kilobase of exon per million reads mapped) で 10 以上、である遺伝子は NR4A1 と CTGF であった。
3. 上記で設計した遺伝子回路をゲノムに組み込むため、CRISPR-Cas9 システムを用いて HeLa 細胞の NR4A1 遺伝子座 3'UTR に IRES-TMGV (細胞膜型転写因子) 断片を、CTGF 遺伝子座 3'UTR に IRES-TM3C (細胞膜型プロテアーゼ) 断片を順次ノックインしたアッセイ用細胞を作製した。各ノックインでは耐性遺伝子でセレクションした後、モノクローン化して PCR によってインサートを確認している。ノックインの成功細胞から更に GPR55、LPAR6 を用いたアッセイを行うことでより高感度に $G\alpha_{12/13}$ シグナルを検出できる新規アッセイ用細胞 (NCP41) を選別した。
4. 「膜型転写因子」と「プロテアーゼ」の 2 因子をノックインすることがアッセイ系の感度を高めることに関係しているのかを確かめるために、両方をノックインした細胞と TMGV のみをノックインした細胞で GPR55、LPAR6 を用いたアッセイ結果を比較

した。その結果、両方の GPCR で 2 因子をノックインした細胞の方が高いシグナル活性を示した。この結果から、TMGV と TM3C の両方に Gα12/13 シグナル依存的な発現誘導がかかることがアッセイの感度を高めるのに必要であると示された。

5. 今回確立した新規のアッセイ系と従来法で、GPR55、LPAR6 を用いたアッセイ結果を比較した。その結果、従来のアッセイ法では上記 2 つの受容体のリガンド刺激に対する反応をほとんど検出できなかったのに対して、新規アッセイ法では 2 つの受容体で共に 40 倍以上の S/B 比を示した。以上のことから、NCP41 細胞を用いた新規のアッセイ系は Gα12/13 シグナルを検出する優れたシステムであると示された。また、Gα12/13 以外の G タンパク質以外と共役する GPCR について、Gas と共役する ADORA2A、Gai/o と共役する OPRM1、Gαq/11 と共役する HRH1 について新規アッセイ系が適用できるかを検証した。結果、全ての受容体でシグナルを検出することができた。これらはまた、以前の研究で報告されている各受容体の用量反応曲線とよく一致したことから、本アッセイ系は当初の予定であった Gα12/13 シグナルだけでなく、Gas、Gai/o、Gαq/11 シグナルも検出できる網羅性と汎用性を有していることが示された。
6. NCP41 細胞による新規アッセイ系を用いて、リガンド既知全ヒト GPCR (218 種) に対してアッセイを行った。アッセイによって 197 種の受容体で良好な用量反応曲線が得られた。これは全体の 90% のカバー率であった。

以上、本論文は Gα12/13 シグナルによって発現誘導を受ける 2 つの遺伝子 (NR4A1、CTGF) の転写調節機構と「膜型転写因子」と「プロテアーゼ」の発現を連動させることで Gα12/13 シグナル依存的に酵素反応が起きる人工遺伝子回路を考案し、それを組み込んだ HeLa 細胞を用いて Gα12/13 を簡便かつ高感度に検出できる新規アッセイ系を確立した。更に、本アッセイ系は Gα12/13 以外の全ての G タンパク質と共役する GPCR のシグナルも検出が可能であり、従来のアッセイ系では活性の検出が困難であった GPCR やオーファン GPCR のリガンド探索にも有用である。本アッセイ系によって心血管系で発現する GPCR を対象に創薬スクリーニングを行うことで、循環器領域の革新的な治療薬開発が期待される。

よって本論文は博士 (医学) の学位請求論文として合格と認められる。