

# 論文審査の結果の要旨

氏名 西口 知輝

本論文は、Formyl Peptide Receptor 1 (FPR1)の活性化とシグナル伝達を定量評価する細胞系の確立と、活性伝達機序における FPR1 クラスター化の役割解明に関する論文である。

本論文は全4章からなる。第1章では細胞膜局在タンパク質であるGタンパク質共役型受容体(GPCR)が、ヘテロ三量体Gタンパク質とアレスチンとの相互作用により、生体内のシグナル伝達を引き起こす基本原理を説明している。このシグナル伝達は、GPCRに結合する下流シグナルタンパク質やGPCRの局在、そのオリゴマー形成によって複雑に制御されることに着目している。中でも活性伝達様式に偏りを持つリガンドバイアスに基づくシグナルの制御が、特異性の高い創薬において有用であると述べている。次に具体的な疾患として重症薬疹を取り上げ、GPCRの一つであるFPR1が創薬ターゲットになっていることを解説している。FPR1を標的とした有効な医薬品が見出されていないことから、FPR1の活性伝達機構の深い理解が創薬には必要であることを説明している。そこで本研究の目的が、多角的な活性伝達をもとにFPR1のリガンドバイアス評価系を確立すること、そしてFPR1のオリゴマー形成がシグナル伝達に及ぼす影響を明らかにすることであることを述べている。

第2章ではまず、FPR1のシグナル伝達が継時的に変化する可能性に言及し、本研究の目的が、生細胞内でFPR1の活性伝達能をリアルタイムに検出する手法の確立であることを述べている。具体的には、リガンドバインディングアッセイ、アレスチンアッセイ、cAMPアッセイ、Gタンパク質FRETアッセイの4つの測定系をヒト由来HEK293細胞を用いて樹立したことを報告している。いずれのアッセイ系においても蛍光あるいは発光シグナルがFPR1特異的作動薬に対し濃度依存的に応答することから、FPR1の活性伝達能を定量的に評価する系が確立されたことを立証している。既報と矛盾のない濃度域で、特異的阻害剤による競合阻害が起こることも確認されている。経時的な反応変化は、Gタンパク質FRETアッセイにおいては秒オーダー、他3つのアッセイ系においては分オーダーで追跡可能であると示している。アレスチンアッセイにおいては、作動薬刺激後の時間によってFPR1の作動薬認識能が変化することを実証している。4つのアッセイ系

の確立により、FPR1 の多角的な活性伝達を経時的に評価することが可能になったことを結論づけている。開発した手法は、FPR1 の活性伝達が作動薬の濃度と時間によって流動的に制御されることを示しており、リガンドバイアスを利用した特異性の高い創薬研究への有用性が期待される成果である。

第3章では、FPR1 のクラスター形成のシグナル伝達における役割を述べている。まず、全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡測定により、FPR1 が作動薬添加後 5 分でクラスターを形成することを見出している。クラスターに属する FPR1 は 40 分子程度であり、アレクチンの発現によって形成されることを確認している。次に一分子 TIRF 顕微鏡測定により、FPR1 のオリゴマー形成状態を評価している。本評価系では、2-4 分子からなる小さいオリゴマーと 5-11 分子からなる大きいオリゴマーとが識別できることを証明している。作動薬添加後 1 分以内で、FPR1 は小さいオリゴマーから大きいオリゴマーへと平衡が傾くことが示されている。二色一分子 TIRF 顕微鏡測定により、FPR1 と G タンパク質の結合時間を評価し、作動薬添加後の大きいオリゴマーで結合時間が増大していることを見出している。さらに三色一分子 TIRF 顕微鏡測定により作動薬結合 FPR1 と非結合 FPR1 を識別し、作動薬の結合した大きな FPR1 オリゴマーが高い G タンパク質結合能を示すことを立証している。阻害剤では上記の応答が見られなかったことも合わせて、FPR1 の G タンパク質を介した活性伝達には、作動薬結合 FPR1 の大きなオリゴマー形成が重要であると結論づけている。一連の成果は、FPR1 の幅広い大きさの分子集合体を検出するユニークな手法を実証するものであり、GPCR 以外の対象にも応用が可能な研究手技を確立した点で大きな波及効果が今後期待される成果である。

第4章は、本研究で開発した時間情報を含めた活性伝達能評価法を用いることの優位点、ならびに一定の FPR1 発現量でオリゴマーとクラスターの両方を評価する意義について述べている。本論文において、FPR1 活性伝達の生細胞内リアルタイム定量評価系は創薬開発における実用性が期待できる技術であり、また蛍光顕微鏡法により FPR1 のオリゴマー・クラスター形成がその活性伝達において役割を担うことを発見した点で学術的に意義深い研究成果である。

なお本論文は、吉村英哲氏、笠井倫志氏 (京都大学)、藤原敬宏氏 (京都大学) との共同研究の成果をまとめたものであるが、論文提出者が主体的に実験やデータ解析を行っており、論文提出者の寄与が十分であると判断した。

したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。