

審査の結果の要旨

氏名 井上 飛鳥

Gタンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) は7回膜貫通領域の特徴的な構造を有する膜型受容体であり、ヒトゲノムにおいて約900種類からなる最大の遺伝子ファミリーを形成する。この中でとくにロドプシンファミリーに分類される約280種類のGPCRは、主に水溶性のリガンドを介して体内で多様な生理機能・病理機能に関与すると考えられている。GPCRは創薬開発の最も重要な標的分子の一つであり、現在市販されている薬の約30%がGPCRに作用すると推定されている。従って、GPCRの機能を解明することは、創薬開発に密接に関わる。

GPCRのシグナル伝達は主に三量体Gタンパク質の $G\alpha$ サブユニットにより担われる。 $G\alpha$ は結合するエフェクター分子の種類により、4種類のサブファミリー ($G\alpha_s$ 、 $G\alpha_{i/o}$ 、 $G\alpha_{q/11}$ 、 $G\alpha_{12/13}$) に分類される。GPCRの活性化は $G\alpha$ の下流シグナルを測定することで評価される。しかし、GPCRは通常1種類か2種類の $G\alpha$ サブファミリーとしか共役しないことから、特定の細胞内イベントを測定するだけでは、網羅的にGPCRの活性化を検出できない。さらに、 $G\alpha_{12/13}$ シグナルの検出系の開発は遅れており、 $G\alpha_{12/13}$ 共役型受容体の機能を解明する上で大きな障壁となっている。

井上は本研究以前に、毛髪形成に生理活性脂質リゾホスファチジン酸 (LPA) が必須の役割を果たしていることを明らかにしている。その研究過程で、LPA₆受容体が $G\alpha_{12/13}$ を介して膜型プロテアーゼ TACE (Tumor necrosis factor- α -converting enzyme) を活性化し、TGF α の膜結合前駆体からのエクストドメイン切断を引き起こしていることを見出した。この研究から井上は、GPCRシグナルとTGF α 切断を指標としたTACE活性という機構に着目するに至った。そこで本研究において、井上はアルカリホスファターゼ (AP) 融合 TGF α (AP-TGF α) を用いて、TGF α の膜結合型前駆体からの切断を簡便に評価する手法 (TGF α 切断アッセイと命名) を開発した。本手法は $G\alpha_{12/13}$ シグナルに加えて $G\alpha_{q/11}$ シグナルを精度良く検出すること、各種 $G\alpha$ タンパクとの共発現により $G\alpha_s$ 共役型受容体や $G\alpha_{i/o}$ 共役型受容体を含めたGPCRを網羅的に検出可能なこと、GPCRリガンドの薬理学評価に応用できることを明らかにした。

まず井上は、ヒスタミンH1R受容体を用いて、TGF α 切断アッセイの精度と再現性を検証した。その結果アッセイ精度の指標であるZ' factorは96-wellプレートで0.84を示し、優れたアッセイ系であることを確認した。また、Z' factorは384-wellプレートでも0.76を示し、ハイスループットアッセイへの適用可能であることも示した。さらに、H1Rの容量反応曲線の再現性 (日間測定誤差) を検証し、CV値が13% (E_{max}) および27% (EC_{50}) と極めて安定したアッセイ法であることを確認された。

次に井上は、各 $G\alpha$ に共役するGPCRを用いてTGF α 切断のシグナル経路を解析した。その結果、 $G\alpha_{q/11}$ に共役することが知られている受容体と $G\alpha_{12/13}$ に共役することが知られている受容体の活性化により、TGF α 切断が引き起こされることを明らかにした。一方、 $G\alpha_s$ や $G\alpha_{i/o}$ のみに共役する受容体はTGF α 切断は起こらないことを確認した。以上の結果から井上は、 $G\alpha_{q/11}$ シグナルと $G\alpha_{12/13}$ シグナルが選択的にTGF α 切断に関与することを強く示唆した。

次に、キメラ $G\alpha$ を用いて上記の結果を検証した。ドパミンD2R受容体とC末端6アミノ酸に $G\alpha_{11}$ 由来配列に置換した各種 $G\alpha$ キメラを共発現し、TGF α 切断量を測定したところ、 $G\alpha_{q/11}$ シグナルや $G\alpha_{12/13}$ シグナルを誘導した際に反応性が増加し (ランクオーダーは $G\alpha_q = G\alpha_{11} > G\alpha_{13} > G\alpha_{12}$)、 $G\alpha_s$ シグナルや $G\alpha_{i/o}$ シグナルを誘導した際に反応性は変化しないことを見出した。以上から、 $G\alpha_{q/11}$ シグナルと $G\alpha_{12/13}$ シグナルがTGF α 切断に関与することを井上は明らかにした。

井上は次に、TGF α 切断アッセイがどの程度割合のGPCRの活性化を検出できるか、リガンドが既知の116種類のヒトGPCRを用いて検討した。その結果、75種類 (65%) のGPCRの活性化がTGF α 切断アッセイで検出可能であることを示した。TGF α 切断応答が低いGPCRの多くは $G\alpha_s$ 共役型も

しくは $G\alpha_{i/o}$ 共役型であったことから、次にキメラ $G\alpha$ を用いて反応性の向上が起こるか検証した。 $G\alpha_s$ サブファミリーと $G\alpha_{i/o}$ サブファミリーの全ての C 末アミノ酸残基を網羅するように、5 種類のキメラ $G\alpha$ ($G\alpha_{q/s}$, $G\alpha_{q/i1}$, $G\alpha_{q/i3}$, $G\alpha_{q/o}$, $G\alpha_{q/z}$) を作製した。 $G\alpha_q$ サブファミリーに属し、非特異的に GPCR と共役することが知られている $G\alpha_{16}$ ($G\alpha_{15}$ としても知られる) も利用した。この 6 種類の $G\alpha$ を 116 種類の GPCR に共発現させ、 $TGF\alpha$ 切断の反応性を検討した。その結果、ほとんどの $G\alpha_s$ や $G\alpha_{i/o}$ に共役する受容体で反応性が向上することを示し、検出可能な GPCR は 104 種類 (90%) にまで拡張できることを示唆した。

次に井上は、 $G\alpha_{12/13}$ シグナルを高感度・高精度に検出できるという $TGF\alpha$ 切断アッセイの特性を利用し、 $G\alpha_{12/13}$ に共役する新たな GPCR の探索を行った。リガンド既知の 116 種類の GPCRのうち、高い E_{max} ($\geq 10\%$) を示した 44 種類の GPCR について、 $G\alpha_{12/13}$ 経路の阻害 ($G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, RhoA RNAi) による抑制効果を検討した。その結果、25 種類の GPCR において、 $G\alpha_{12/13}$ 経路の阻害により $TGF\alpha$ 切断応答が抑制 (relative $E_{max} < 0.67$) されることを見出した。このうち 14 種類の GPCR は $G\alpha_{12/13}$ 経路との関連は全く報告がなく、本研究が初めての知見であると言える。

最後に、井上はリガンド未知 (オーファン) GPCR のリガンド探索への有用性を検証した。オーファン受容体と化合物ライブラリーを組み合わせてスクリーニングした結果、P2Y10、GPR174、A630033H20 が生理活性脂質リゾリン脂質として知られるリゾホスファチジルセリン (LysoPS) に特異的に応答することを見出した。これら 3 つの GPCR は $G\alpha_{12/13}$ 共役型であった。今後、本研究により同定した 3 つの GPCR を解析することで、LysoPS の生理的・病的機能が明らかになるものと期待される。

以上本研究において、井上は $TGF\alpha$ 切断という現象に着目し、高精度の GPCR 活性化検出系を確立することに成功した。 $G\alpha$ の共発現を活用することで、90% の GPCR が検出可能である。 $TGF\alpha$ 切断アッセイは、様々な GPCR の解析に応用可能である。今後、本手法を用いることで、特に $G\alpha_{12/13}$ に共役する GPCR の理解が進むことが期待され、本研究は医学薬学創薬領域において極めて重要な研究であり、博士 (薬学) に充分値するものと判断した。