

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 桜井 卓

Gタンパク質共役型受容体(GPCR)は7回膜貫通型の細胞膜受容体であり、外界からの信号を認識し細胞内に生理反応を惹起することで、細胞情報伝達機構の制御に深く関与する。特に GPCR は医薬品の標的分子として重要であり、現在臨床で使われている医薬品化合物の30%-50%は GPCR に作用していると考えられる。こうした創薬標的分子としての重要性から GPCR 研究が進む一方で、GPCR のシグナル伝達機構は従来考えられていた以上に複雑であることが近年明らかとなり、安全で効果的な新薬を創出するために、薬物と GPCR の相互作用の分子機構の理解がより一層必要となっている。本論文は、薬物と GPCR の相互作用の分子機構に関する新たな知見を得る目的で、異なる三種類の GPCR に作用するリード化合物の薬理的機能を解析したもので、序論に続く3章より構成されている。

序論で背景を述べた後、第1章では脂質異常症治療薬の標的と考えられる GPR81 の作動薬探索と得られたリード化合物の薬理的解析を実施している。まず GPR81 安定発現細胞を用いた細胞内 cAMP 濃度測定系を構築し、70 万化合物に対して HTS を実施した。その結果、アミノチアゾール系のヒット化合物 AT1 を見出した。続いて、活性向上と物性改善を指向した最適化研究を実施し、リード化合物 AT2 を創出した。AT2 は AT1 と同様に GPR81 に対する完全作動薬であり、60 nM の EC<sub>50</sub> 値で GPR81 を活性化した。一方で皮膚紅潮の原因分子である GPR109a に対しては 30 μM まで濃度を上げて活性を示さず、AT2 は GPR81 に対して選択的な化合物であることが示された。続いて 3T3-L1 脂肪細胞を用いて AT2 の作用を調べた結果、AT2 はトリグリセリドから加水分解で生じるグリセロール量を濃度依存的に抑制することから、脂肪細胞において脂肪分解抑制作用を有することが確認された。また、AT2 の脂肪分解抑制活性はニコチン酸と同程度であることが示された。そこで動物モデルを使って、AT2 の薬効及び副作用が調べられた。100 mg/kg の AT2 を絶食マウス及び給餌マウスに腹腔内投与したところ、血中遊離脂肪酸量はそれぞれ 35%及び 50%低下することが確認された。この条件下で AT2 が副作用を起こさないことを確認するために、皮膚紅潮の指標である皮膚血流量が測定された。その結果、ニコチン酸は顕著な血流量の上昇を惹起するのに対して、AT2 投与時には血流量の上昇は認められなかった。以上より、AT2 は GPR81 に対して選択的なリード化合物であり、その結果副作用を惹起することなく、目的の薬効を発揮することが示された。

第2章では、抗肥満薬創出を目指し、MCHR1 拮抗薬 MQ1 の阻害様式について解析している。MQ1 が MCHR1 の各シグナルに与える影響を調べたところ、Gai、Gaq そしてβ-アレスチンシグナルの全てのシグナルを同程度の強さで阻害することが示された。また、MQ1 は細胞フリーの結合試験系及び MCHR1 安定発現細胞を用いた細胞系いずれにおいても、反応時間を伸ばすことで阻害活性が増強することが示された。続いてウォッシュアウト実験を実施し、時間依存性の強い MQ1 の阻害活性がウォッシュアウトによって減弱しないことが示された。

さらに、MQ1 の解離速度を直接的に調べるために、LC/MS/MS を用いた結合試験系を構築し、速度論的解析を実施した結果、時間依存性の無い構造類縁体と比較すると、MQ1 は MCHR1 からゆっくりと解離する化合物であることが示された。また MQ1 の結合部位に関する検証を行い、MCH の最大活性を表す  $E_{max}$  が MQ1 の濃度依存的に低下することから、MQ1 がアロステリックモジュレーターとして作用する可能性が示された。さらに放射性ラベルした  $[^{125}\text{I}]\text{MCH}$ -(4-19) の解離実験ならびに変異体実験を実施し、MQ1 がアロステリックサイトに結合することが裏付けられた。以上、複数シグナルの阻害、受容体からの遅い解離及びアロステリックモジュレーションの 3 つの特徴は、いずれも *in vivo* で強力な薬効を発揮するために重要であり、MQ1 が拮抗薬とし優れたプロファイルを有していることが示された。

第 3 章では、新規睡眠障害治療薬の創出を目的として、 $\text{MT}_2$  メラトニン受容体のリード化合物 IF1 の受容体活性化機構の解析を実施している。2- $[^{125}\text{I}]$  iodomelatonin を用いた結合試験の結果、IF1 は  $\text{MT}_2$  受容体に対して高い選択性を有することが示された。続いて、IF1 の  $\text{MT}_2$  受容体作動活性を細胞ベースの評価系で測定したところ、IF1 は細胞内 cAMP 濃度測定系、ERK1/2 のリン酸化測定系及び  $\beta$ -アレスチンシグナル測定系のいずれの測定系においても、部分作動薬として挙動することが示された。さらに、IF1 は部分作動薬でありながら、生理的リガンドのメラトニンよりも強いインターナリゼーションを惹起することが確認され、インターナリゼーション強度と  $\beta$ -アレスチンシグナルや G タンパク質シグナルの活性化の間に相関関係は認められなかった。以上、IF1 は選択性及びインターナリゼーション誘発の観点から、新規概日リズム性睡眠障害治療薬として有効である可能性が示唆された。

以上、本論文は、 $\text{AT}_2$ 、MQ1 及び IF1 のそれぞれが作用する GPCR との相互作用を解析し、薬物と GPCR の相互作用の分子機構に関する基礎知見を得るとともに、それら化合物が新規脂質異常症治療薬、肥満治療薬及び概日リズム性睡眠障害治療薬のリード化合物として、優れたプロファイルを有していることを示したものであり、これらの結果は学術上応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。