

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 川 俣 裕 二

G タンパク質共役型受容体 (GPCR) あるいは7回膜貫通型受容体とも呼ばれる一群の受容体は、もっとも大きなファミリーを形成している。GPCR のリガンドとしては糖タンパク質、ペプチド、ケモカイン、アミン、核酸などが知られている。GPCR の多くはリガンドが未知であるためオーファン (孤児の) GPCR と呼ばれている。オーファン GPCR の内因性のリガンドを探索することにより、新しい生理活性物質の同定や既知の生体内分子の新たな生理作用を明らかにできる可能性がある。また、オーファン GPCR のリガンド同定は新規創薬ターゲットの発掘にも結びつく可能性がある。申請者は、オーファン GPCR を人工的に発現させた細胞を樹立し、ウシ胃組織抽出液からオーファン GPCR の一つである APJ リガンドペプチドとしてアペリンを同定している。本研究では生理機能解明の手がかりを得るためにアペリンの組織分布や受容体との結合などの性状を解析した。また低分子性リガンドについても探索を進めた結果、脂質代謝物である胆汁酸や遊離脂肪酸に応答する GPCR を見出し、それらの免疫系・内分泌系における機能を解明した。

第一章では、アペリンの組織分布および受容体 APJ との結合について解析した。アペリンの mRNA 発現量および免疫活性量をラット各組織で測定した結果、両者はともに正に相関する傾向が認められ、乳腺や肺で高い発現を認めた。ゲルろ過による分子種の検討の結果、肺、精巣、子宮では long form (約 36 アミノ酸残基) が主成分であったが、乳腺においては long form と short form (約 13 アミノ酸残基) が存在することを明らかにした。また、long form は short form に比べ受容体から解離しにくいことを明らかにした。以上、組織によって長さの異なるアペリンペプチドが生成され、それらは受容体との相互作用で異なる性質を持つことを明らかにした。

第二章では、胆汁酸に応答する GPCR として TGR5 を同定した。申請者はオーファン GPCR の一過性発現細胞を用いたレポーターアッセイ系を構築し低分子性化合物を含むライブラリーを作製してリガンド探索を実施した。その結果、TGR5 が胆汁酸の受容体であることを見出した。胆汁酸に対する核内受容体が知られていたが、細胞膜結合型受容体が同定されたのは TGR5 が初めての

例である。また、胆汁酸が **TGR5** に作用するとインターナリゼーションを起こし、細胞内 **cAMP** 産生が上昇することを明らかにした。**TGR5** は単球・マクロファージで高発現していることから、マクロファージ機能と **TGR5** との関連について解析した。ウサギ肺胞マクロファージを胆汁酸で処理すると、貧食能やリポ多糖(**LPS**)激によって誘導されるサイトカイン産生が抑制された。マクロファージ機能抑制に対する **TGR5** の関連について検証した結果、胆汁酸がマクロファージからの **TNF $\alpha$**  分泌を顕著に抑制することを認めた。

第三章では、**GPR40** が遊離脂肪酸の受容体であり、インスリン分泌制御に重要な役割を果たしていることを証明した。リガンドの探索は、**GPR40** を一過性に発現させた細胞での細胞内カルシウムイオン濃度変化を測定する系により行った。その結果、長鎖遊離脂肪酸が **GPR40** のリガンドとして機能することを見出した。**GPR40** はラット膵臓ランゲルハンス島の  $\beta$  細胞や **MIN6** などの  $\beta$  細胞株で高発現が認められた。**MIN6** を用いて検討した結果、長鎖遊離脂肪酸は細胞内カルシウムイオン濃度上昇を惹起し、グルコース依存性インスリン分泌を上昇させることが明らかとなった。また正常ラットから採取したランゲルハンス島でもインスリン分泌上昇が認められた。一方、**siRNA** を **MIN6** に導入して **GPR40** 発現をノックダウンすると長鎖遊離脂肪酸によるインスリン分泌が顕著に抑制されたことから、**GPR40** が遊離脂肪酸によるインスリン分泌機構の少なくとも一部に関与することを証明した。本章の結果は、**GPR40** が糖尿病の治療薬を研究開発するための標的分子として有用である可能性を示唆した。

以上、本研究は、オーファン **GPCR** のリガンド探索を行い、内因性リガンドを同定し、さらに機能を明らかにして生理的役割の解明・新たな創薬ターゲット発掘を目指すという、一連の研究構想に基づいて行ったものである。本研究によって得られた成績の中でも **TGR5**・**GPR40** に関する知見は胆汁酸や脂肪酸の新たな役割を明らかにしたと同時に、新しいメカニズムに基づく免疫機能調節薬あるいは糖尿病治療薬の研究開発に道を開くものと期待される。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。