

## 審査の結果の要旨

氏名 細井 健史

「Identification of a novel human 5-oxo-eicosatetraenoic acid receptor: 5-oxo-ETE 受容体の発見とその機能解析」と題する本研究では、これまで全く知られていなかったまたそのリガンドが明らかにされていなかった、即ちオーファン受容体である G タンパク質共役型受容体(GPCR)の一つを、ヒトゲノムから探索し、その遺伝子クローニングを行うとともにリガンドを同定し、その生理機能を解明した成果が述べられている。全体は General Introduction、Chapter 1、Chapter、2 及び General Conclusion から成り立っている。

General Introduction では本研究の背景と経緯が詳しくのべられている。すなわち、GPCR とはなにか、ヒトゲノム解析により、約 720 種類の GPCR が存在することが明らかとなった点、約半分が嗅覚や視覚などの感覚受容体であること、残り 360 個の GPCR のうち 210 個についてリガンドが同定されているが、リガンドが未知であるオーファン GPCR (oGPCR) がまだ 150 個残されていることが述べられている。さらに、ヒトゲノム解析の進行と遺伝子工学技術の発展から、逆薬理学 (Reverse Pharmacology) の手法に基づいたリガンド探索が可能となり、oGPCR のリガンド同定に関する研究が加速されているという背景が述べられている。

Chapter 1 では、新たに注目した oGPCR である TG1019 のクローニングとリガンド発見に至る経緯が述べられている。すなわち、ヒトゲノム配列に対する既知 GPCR との相同性検索によって GPCR と推測される配列を見出し、PCR 法によって新規 GPCR 遺伝子 (TG1019) の cDNA がクローニングされた。TG1019 は、1272 bp、423 アミノ酸残基からなり、ファミリー1に属する7回膜貫通型の GPCR であった。第2細胞内ループにファミリー1に属する GPCR に特異的なモチーフである DRY モチーフが存在し、また第7膜貫通領域に GPCR 内在化シグナルである N/DPxxY モチーフが存在したことから、実際に機能を持つ GPCR である可能性が高くなり、更なる解析を進めることになった。

C 末端に各種 G タンパク質を結合した融合タンパク質を発現させた昆虫細胞の膜画分を用い、種々のリガンド刺激に対する GTP $\gamma$ S 結合活性を測定した。また、融合タンパク質の発現の確認は、各 G タンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロット法によって行った。哺乳細胞を用いた TG1019 の機能解析は、TG1019 cDNA を発現ベクター-pcDNA3.1 に組み込んだプラスミド (pcDNA3-TG1019) を CHO 細胞に導入し、TG1019 を一過性に発現させた細胞を用い、細胞内 cAMP 濃度を測定することによって行った。リガンド探索に用いるライブラリーとして、74 種類の核酸、56 種類のアミン・ペプチド、199 種類の脂質などが用いられた。その結果、TG1019 はエイコサノイドである 5-oxo-ETE (5-oxo-eicosatetraenoic acid) あるいは 5 (S)-HPETE (5 (S)-hydroperoxy-eicosatetraenoic acid) などの脂肪酸

を特異的にリガンドとして認識し、Gai と共役する新規 GPCR であることが強く示唆された。5-oxo-ETE による TG1019 活性化は、DHA(docosahexaenoic acid)や EPA(eicosapentaenoic acid)などの n-3 不飽和脂肪酸によって阻害され、生体内においてもこれらの脂肪酸によって活性が調節されていると考えられた。

次に、TG1019 が細胞においても 5-oxo-ETE をリガンドとして認識するかを調べるため、TG1019 遺伝子を導入した CHO 細胞を用いた機能性試験を行った。TG1019 を一過性に発現させた CHO 細胞においてリガンド刺激による cAMP 産生抑制を調べた。その結果、アデニル酸シクラーゼを活性化する forskolin 刺激による細胞内 cAMP 濃度上昇は、5-oxo-ETE 刺激によって抑制された (IC50 値=33 nM)。また、MOCK トランスフェクタントでは、これらの反応は見られなかった。このことから、TG1019 が 5-oxo-ETE をリガンドとし Gai と共役する GPCR であることが、細胞系においても示された。

この遺伝子のヒト組織における発現を網羅的に解析したところ、肝臓、肺、脾臓、末梢白血球において高発現していることが示された。これらの臓器は免疫担当細胞が集積する部位であることから、TG1019 が免疫系の機能に関わる GPCR である可能性が示唆された。リガンドとして同定された 5-oxo-ETE はアラキドン酸の 5-リポキシゲナーゼ(5-LO)による代謝物として知られ、好酸球、好中球、樹状細胞などの免疫担当細胞によって産生され、好酸球や好中球の遊走因子であることが既に報告されていることも、免疫系における役割を示唆した。5-oxo-ETE は Gai と共役する GPCR を介してこれらのシグナルを伝達していることも示唆されていたが、その受容体については不明であった。すなわち Chapter 1 には、5-oxo-ETE 受容体である TG1019 が見出されたこと、これまで報告されている 5-oxo-ETE の生物活性に関与している可能性が推察されたという、重要な発見が記載されている。

Chapter 2 では、TG1019 を介した 5-oxo-ETE による細胞遊走およびシグナル伝達機構を解析した結果が述べられている。5-oxo-ETE は好酸球や好中球において、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇、p42/p44 MAPK (ERK)、phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K)活性化を引き起こすことが知られている。また、好酸球等の生存因子である GM-CSF の発現が単球で見られることが報告されており、炎症性応答を亢進することが明らかであった。しかし、炎症誘導において鍵となる細胞遊走に対する TG1019 の役割は不明であった。そこで、5-oxo-ETE 刺激による細胞遊走における TG1019 の重要性を検証することを目的とする研究を行った。

TG1019 安定発現細胞株(CHO/TG1019)を作製し、細胞内カルシウム濃度測定をカルシウム指示薬 Fura2-AM を用い、FDSS6000 を用いた蛍光測定法により測定した。TG1019 安定発現細胞株(CHO/TG1019)において、5-oxo-ETE、5(S)-HPETE が強い反応を示した。また、好中球の遊走因子として知られる LTB4 は TG1019 に対して全く反応しなかった。これらの結果から、LTB4 および 5-oxo-ETE はそれぞれ異なる受容体を介していることが示唆された。また、5-oxo-ETE のグルタチオン付加化合物である FOG9 が、5-HETE と同程度のアゴニスト活性を示すことを明らかにした。5-oxo-ETE による細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇反応は、百日咳毒素(PTX)処理および PLC 阻害剤(U73122)前処理により完全に抑制されたことから、TG1019 を介した細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度上昇反応は、Gai から解離した G $\beta\gamma$  を

介して PLC を活性化することが明らかとなった。さらに、CHO/TG1019 細胞における 5-oxo-EETE 刺激に対する ERK および Akt の活性化を調べた結果、TG1019 は 5-oxo-EETE 刺激による MEK-ERK、および PI3K-AKT のシグナル伝達経路の活性化を担う受容体であることが示された。

CHO/TG1019 細胞の 5-oxo-EETE に対するケモタキシス反応を調べた結果、TG1019 が 5-oxo-EETE によるケモタキシス反応に関与していることが示された。この 5-oxo-EETE に対するケモタキシス反応は、PTX、PLC 阻害剤、PI3K 阻害剤前処理によって顕著に抑制されたことから、5-oxo-EETE 刺激による細胞遊走反応には G $\alpha$ i から解離した G $\beta$  $\gamma$  による PLC の活性化と PI3K 活性化が重要であることが示唆された。

Chapter 1 と Chapter 2 を通して、アラキドン酸代謝産物である 5-oxo-EETE の受容体が TG1019 であることが見出され、その安定発現株が 5-oxo-EETE 依存的な遊走反応を示すことが明らかにされた。5-HPETE から 5-oxo-EETE に至る代謝産物を特異的に認識する TG1019 を介した新たなリガンドと受容体のシステムが生体内に存在することを示した本研究の成果は、この領域における重要な業績と見なされる。本研究における発見は、喘息等の病態における好酸球遊走シグナルの解明、5-oxo-EETE の生物活性の解明、および 5-oxo-EETE が関与するアレルギー反応を制御する医薬品の開発に新たな方向を切り開くものである。よって、本研究を行なった細井健史は博士(薬学)の学位を受けるにふさわしいと判断した。