

## 論文内容の要旨

論文題目      オーフアン G 蛋白質共役型受容体の内因性リガンドの探索

氏名            周郷 司

### [序論]

近年、ゲノム解析の進展に伴い、機能未知の遺伝子が多数発見されるようになってきている。そのような遺伝子の中には、7回膜貫通型の構造を持つ新規 G 蛋白質共役型受容体(GPCR)も多数報告されている。これらの GPCR は、そのリガンドが未知であることからオーファン GPCR と称されている。現在上市されている薬物の多くは GPCR を標的とした薬物であることから、オーファン GPCR も重要な創薬ターゲットとなる可能性が考えられるが、これらの創薬ターゲット化には多くの困難がある。オーファン GPCR の受容体特異的リガンド活性を見出せるか、そしてそのリガンド活性を精製出来るか、が最も困難な部分である。この部分を突破できた場合にも創薬に繋げるためには、まず基礎的な情報を明らかにし、拮抗薬の評価系を設定し、薬物の合成研究を完成するためにはさらに長い年月を要するので、可能な限り創薬の可能性まで含めてオーファン GPCR を検討しておくことが必要と考えられる。

本研究では、受容体の配列モチーフを徹底的に検討すること、相同性のある受容体を考察すること、さらに、創薬上の可能性を受容体の発現部位から推測することで、リガンドの発見の可能性が高く創薬化の期待が持てると考えられるオーファン GPCR として GPR34, GPR14 が適切であると考えた。これらの受容体に対するリガンド活性の鋭敏な検出のため、安定な発現細胞の作製、スクリーニングに適した安定発現細胞のクローニングを行った。また、リガンド探索源として組織抽出液をスクリーニングしたが、その際に非特異的活性の影響を避けるため、組織抽出液の細分画を HPLC により行い、妨害物質の少ない状態で各種臓器の抽出液画分の受容体刺激活性を検討していった。その結果、GPR34, GPR14 に対するリガンド活性を見出すことができた。

## 1) GPR34

GPR34はマスト細胞に高発現であり、低分子リガンドの受容体に相同性があることから、そのリガンドは炎症反応に関連性のある低分子物質である可能性が考えられた。GPR34発現 CHO 細胞に対する cAMP 合成抑制活性を指標にリガンド活性を検討した結果、ブタ、ラット脳抽出液の HPLC 画分に見出された GPR34 特異的刺激活性は、lysophosphatidylserine (lysoPS) であることが初めて明らかになった。LysoPS はラット腹腔マスト細胞に対する活性化因子であることが 1979 年から知られていたが、マスト細胞上に lysoPS に対する受容体が存在することを示したのは本報告が初めてである。LysoPS の GPR34 発現 CHO 細胞に対する cAMP 合成抑制活性は、EC<sub>50</sub> 値 270 nM、であり、構造類似のリゾリン脂質には活性が観察されなかった。マウス GPR34 発現 CHO 細胞、モルモット GPR34 発現 CHO 細胞においても、lysoPS は cAMP 合成抑制活性を示し（順に EC<sub>50</sub> 値 49 nM, EC<sub>50</sub> 値 240 nM）、リガンド活性が種を超えて保存されていることが判明した。また、lysoPS は GPR34 発現細胞膜画分に対して GTP  $\gamma$  S 結合促進活性を示した。この反応系で GPR34 活性化における lysoPS の構造要求性を調べたところ、カルボキシル基、アミノ基、L 型の絶対配置を持つセリン、炭素数 14 以上の脂肪酸側鎖が活性発現に重要であり、lysoPS のマスト細胞の脱顆粒反応増強活性に対する構造要求性とほぼ同等であったことから、lysoPS の脱顆粒シグナルを媒介する候補受容体の一つと考えられた。げっ歯類とヒトではマスト細胞の性質が大きく異なることが知られていたため、GPR34 を創薬ターゲットにするためにはヒトにおける GPR34 に関しての情報が必須である。ところが lysoPS のマスト細胞活性化作用はげっ歯類以外では報告が無かった。そこで本研究では GPR34 の発現、lysoPS の作用がヒトにおいても保存されているかという点を検討した。その結果、ヒト臍帯血由来培養マスト細胞やヒトマスト細胞株 LAD 2 細胞においても GPR34 が高発現していることを示し、さらにヒトマスト細胞株 LAD 2 細胞において lysoPS が濃度依存的に脱顆粒を惹起することが判明した。この反応は百日咳毒素処理により消失し、アミノ基、カルボキシル基、セリンの L 型の絶対配置が必要であったことから、ヒト GPR34 を介して反応が起きていることが示唆された。ヒトにおいて lysoPS がマスト細胞を活性化することを示したのは、ラットマスト細胞での報告がなされて以来、26 年目にして本報告が初めての報告である。これらの結果はヒトにおける抗炎症薬の開発に寄与するものと考えられた。

## 2) GPR14

GPR14 は神経性組織、筋肉系組織に発現があり、ペプチドリガンドの受容体に相同性があることから、そのリガンドは神経ペプチドである可能性が考えられた。GPR14 発現 CHO 細胞に対するアラキドン酸放出活性を指標に、ブタ脊髄抽出液から GPR14 特異的新規リガンド (GPTSECFWKYCV および、GPPSECFWKYCV) を精製、発見した。このリガ

ドは魚類のペプチドホルモン urotensin II (UII) のオルソログであるとわかった。UII が GPR14 のリガンドであるという報告は、本報告を含めて殆ど同時に4件の報告がなされたが、哺乳類にも UII が存在することを実際に精製して証明したのは本報告が唯一の報告である。合成ペプチドを用いた検討から、N 末の異なるブタ UII (GPTSECFWKYCV および、GPPSECFWKYCV)、ヒト UII (ETPDCFWKYCV)、ハゼ UII (AGTADCFWKYCV) とも、ラット GPR14 発現 CHO 細胞に対するアラキドン酸代謝物放出活性の EC<sub>50</sub> 値は 1.0 nM であり、C 末のジスルフィド結合により生じる環状構造が活性に重要であることがわかった。

創薬の過程でげっ歯類を実験動物として用いる必要性から、げっ歯類 UII 前駆体遺伝子を検討した。しかし前駆体からペプチドホルモンを生成するために必要な、典型的なプロセシング配列 KKR が保存されておらず、げっ歯類では KQH であった。このためげっ歯類で UII が成熟ペプチドとして生成するかという点が不明確であった。そこで、ラット全脳に検出されていた UII 様免疫活性を精製したところ、UII に配列が類似する新規ペプチドホルモン ACFWKYCV を見出し、urotensin II-related peptide (URP) と命名した。URP はラット、ヒト GPR14 発現細胞に対して、ヒト UII と同等以上の Ca 動員活性を有し、<sup>[125I]</sup>URP を用いた結合実験から UII と同様に GPR14 に結合する内因性リガンドであることを証明した。またラット、マウス、ヒト URP 前駆体遺伝子をクローニングしたところ、prepro-URP は prepro-UII と殆ど相同性がなく、それぞれが全く異なる前駆体蛋白質から生成することが明らかになった。Prepro-URP にはラット、マウス、ヒトにおいてもプロセシング配列が保存されていて、どの種においても URP が生成することが示唆された。これらの結果から、ヒトでは GPR14 は2つのリガンドによって刺激を受けることが示唆され、従来 UII のみで進められてきた研究の流れを一新する発見となった。げっ歯類においては、プロセシング配列が一般的でない prepro-UII からの成熟 UII ペプチドの生成が確認できないならば、ヒト UII の機能は、モデル実験動物を用いた UII の研究からは推定が容易では無いと考えられる。げっ歯類とヒトに共通して存在する URP から研究を進めるべきで、その際、ラット脳から精製された GPR14 リガンドは URP のみであったという著者の結果を考えれば、げっ歯類の脳が GPR14 研究に適していることを示唆した。この結果を受けて脳室内に GPR14 リガンド類を投与すると不安作用を惹起するという結果が続いて同研究室から報告され、GPR14 拮抗薬を抗不安薬として開発出来る可能性が示された。

#### [総括]

オーファン GPCR のリガンドを見出し、その基礎的研究を行うことによって新たな創薬ターゲットを創出できると考えた。その考えを実践するため最も適切と考えられる受容体として GPR34, GPR14 を選択しリガンド探索を行った結果、GPR34 リガンドとして lysoPS を、GPR14 リガンドとして UII 及び URP を同定した。これらのリガンドの受容体はこれ

まで知られておらず、生物学における新規知見である。また、本研究で見出された URP は、新規ペプチドホルモンである。

リガンドの同定によって、これらの受容体をターゲットとしたヒトでの創薬研究に道を拓いた。GPR34 をターゲットとしたヒトでの抗炎症薬、GPR14 をターゲットとした抗不安薬等は、従来これらの分野で想定されていなかったものであり、新規の創薬ターゲットとしての可能性を示した。これにより、オーファン GPCR のリガンド発見～創薬ターゲットの提案という創薬分野の研究手法が実際に有効であるということを示す 2 つの受容体で実証した。これらの手法は新たな創薬ターゲットを開発していく上で重要な手法となることを確信している。