

## 審査の結果の要旨

氏名 周 郷 司

ゲノム解析の進展に伴い、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)が多数報告され、その多く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を標的としており、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。特に、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を同定できるか否かが鍵となる。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によって、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とGPR14が適切と考え、これらの受容体に対するリガンドの探索を実施した。

### 1) GPR34

リガンド活性の鋭敏な検出、スクリーニングに適したヒトGPR34を安定発現するCHO細胞を作製した。また、リガンド探索源としてブタ、ラットの組織抽出液を用いたが、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た。その結果、脳抽出液のHPLC画分にGPR34発現CHO細胞に対するcAMP合成抑制活性を見出し、その本体はlysophosphatidylserine (lysoPS)であることを明らかにした。マウスやモルモットのGPR34発現CHO細胞においても、lysoPSはcAMP合成抑制活性を示し、種を超えてリガンド活性を示すことを明らかにした。ラット、マウスのGPR34のmRNAをリアルタイムPCR法で定量したところ、マスト細胞に高発現していること、lysoPSがラット、マウスのマスト細胞に対し、ERKの活性化や脱顆粒促進作用を示すこと等から、マスト細胞上にlysoPSに対する受容体が存在することを初めて示した。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るため、GPR34を創薬ターゲットにするためにはヒトにおけるGPR34に関する情報が必須である。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なかった。そこで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LAD2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LAD2細胞においてlysoPSが濃度依存的に脱顆粒を惹起することを明らかにした。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年目にして初めてである。これらの結果から、GPR34がヒトでの抗炎症薬開発の標的と成り得ることを示唆した。

## 2) GPR14

GPR14 は神経性組織、筋肉系組織に発現があり、ペプチドをリガンドとする受容体に相同性が高いことから、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、ブタの臓器抽出物をスクリーニングした。その結果、ブタ脊髄抽出液の HPLC 画分に活性を認め、GPR14 特異的新規リガンドを単離し、それらの構造 (GPTSECFWKYCV および GPPSECFWKYCV) を決定した。このリガンドは魚類のペプチドホルモン urotensin II (UII) のオルソログであり、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唯一の報告となった。次に、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プロセシング配列が保存されておらず、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疑問として浮上した。そこで、ラット全脳に検出されていた UII 様免疫活性分子を精製したところ、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、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結果、URP は UII とは異なる前駆体蛋白質から生成することを明らかにした。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 ペプチドの生成は確認できていないこと、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結果から、げっ歯類の脳が URP を用いた 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得られ、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。

以上、本論文はオーファン GPCR として GPR34, GPR14 を選択しリガンド探索を行ない、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、また、URP は新規ペプチドホルモンであった。新規リガンドの同定によって、これらの受容体を標的とするヒトでの創薬研究に道を拓いたものであり、博士 (薬学) の学位授与に値すると判断した。