

論文の内容の要旨

論文題目 Namalwa 細胞を用いた GPCR アッセイ系の構築と応用
(Establishment and application of novel assay systems for G-protein-coupled receptors using Namalwa cells.)

氏名 佐伯 智

G 蛋白質共役型受容体(GPCR)ファミリーは真核生物における多様な細胞間シグナル伝達の鍵となる遺伝子群である。その機能解明は、高等生物の複雑な生命現象ネットワークを理解する上で欠かせないばかりか、新たな医薬品創製のためにも重要である。本学位論文では、リバースケミカルジェネティクスアプローチを用いた GPCR 研究の成果を報告する。

リバースケミカルジェネティクスアプローチにおいては、目的遺伝子に選択的に作用するツール化合物の取得と選択性の重要となるため、それに適した新たな宿主ベクター系を開発した。本系は Namalwa 細胞を用いており、EBNA1-oriP 系によって導入プラスミドがエピゾーマルに安定維持される。しかし、長期培養においてポリクローナル細胞集団中では GPCR 高発現クローンは比較的増殖が遅く、細胞集団の GPCR 発現レベルが不安定になる。この課題は、ON-OFF が明確な誘導発現系を組み込むことによって解決した。そのため、ベクター導入から 2 週間で簡単に大量のポリクローナル発現細胞を取得でき、化合物の選択性評価のために多種の GPCR アッセイ系を並行して構築することが容易である。また本アッセイ細胞には CRE ルシフェラーゼレポーターとキメラ G 蛋白質が組み込まれているため、同一のアッセイ手順で Gs、Gq、Gi のいずれの G 蛋白質に共役する受容体のシグナルも検出できた。したがって、共役 G 蛋白質が不明なオーファン GPCR のリガンド探索に特に好適である。また、頑強性が高いことから化合物の大規模スクリーニングにも適している。

本宿主ベクター系の優位性を生かした研究の結果、以下の2つの成果があった。第一に、オーファン GPCR である GPR97 の生理リガンドが甲状腺ホルモン thyroxine である可能性を新たに見出した。Thyroxine が核内受容体 TR を介さない non-genomic な作用を持つことは既に知られていたが、その作用を介する受容体は未だ同定されておらず、GPR97 はその初めての候補である。GPR97 が高発現している

好中球において、thyroxine が ERK リン酸化レベルを低下させた。このことから、血中の thyroxine が GPR97 を介して好中球の活性酸素産生を抑制的に制御している可能性が示唆された。第二に、霊長類の眼圧コントロールにおけるプロスタノイド受容体 FP の機能を確認した。化合物ランダムスクリーニングの結果、初めて非プロスタノイド骨格の選択的 FP 作動薬 compound B を見出した。正常眼圧サルにおける compound B の眼圧降下作用の強度が、FP 作動活性を指標とした PK-PD 解析からの推定と良く一致することから、霊長類の眼圧コントロールへ FP が強く関わることを示唆された。また compound B は、虹彩沈着作用のような深刻な副作用のない緑内障治療薬のリード化合物となる可能性がある。