

# 論文審査の結果の要旨

氏名 佐 伯 智

本論文の主要部分は I から III であり、以下の内容が記載されている。

I は序論であり、前半においては GPCR (G 蛋白質共役型受容体) の多様性とそれらの生体における役割の重要性について述べている。ヒトゲノム上には嗅覚受容体を除き約 360 の GPCR 存在する。この中で機能が分かっているものは約 210 に過ぎず、残りは機能やリガンドが不明であり (オーファン GPCR と呼ばれる)、その機能解明が重要課題である。後半では、生命現象の理解のための方法論が論じられている。すなわち、フォワードジェネティクスとリバースジェネティクスとに大別される遺伝学的手法および、化合物を用いたケミカルジェネティクスの長短について述べ、本研究においてケミカルジェネティクスの手法を効率的に活用して GPCR の機能解析を行う方法論の開発と GPCR 機能解析を行ったことを述べている。

II は材料と方法である。本研究において用いた多様な研究手法について過不足なく述べられている。

III は結果と考察であり、3 章からなる。

第 1 章では、GPCR アッセイ用の宿主ベクター系の開発について述べている。ここで論文提出者は従来の宿主ベクター系の欠点を補うべく、主に以下の 3 点について開発を行った。

- 1) 従来よく用いられてきた一過的発現系はアッセイ毎に遺伝子導入を行う手間が膨大であり再現性にも問題がある。一方安定的発現系は発現細胞の樹立までに長い時間を要する難点がある。これらを解決するために Namalwa 細胞と oriP 複製起点を用いたエピゾーマル発現系を採用した。
- 2) GPCR を異所的に発現させるとしばしば細胞の増殖速度が低下し、安定な発現と細胞の維持が難しいため、エストロゲン受容体を利用した誘導発現系を構築した。
- 3) GPCR の活性を感度よく検出するため CRE-ルシフェラーゼレポーター系を導入し、Gs に加え Gi と Gq の各 G 蛋白質に共役する GPCR のいずれも同一の系でアッセイ可能とするために、キメラ G 蛋白質を組み込んだ宿主細胞を作製した。

次に開発した系の評価を行っている。その結果、開発した宿主ベクター系はベクター導

入から 2 週間で簡便に大量のポリクローナル発現細胞を取得でき、ハイスループットスクリーニングにおいても十分な安定性を有することが確認された。

第 2 章では、開発した宿主ベクター系を用いて 116 種のオーファン GPCR のリガンドスクリーニングを行い、そのうちのひとつ、GPR97 のリガンドとしてチロキシン (T4) を同定している。甲状腺ホルモンであるチロキシンの受容体としては核内受容体がよく知られているが、それ以外の受容体の存在が示唆されていたものの実体は不明であった。論文提出者の発見した GPR97 が未知であった受容体に相当する可能性が高い。各種チロキシンの効果を調べたところ、T4>T3>rT3 の順にリガンドとしての効果が強かった。これに加え、抗真菌剤 isoconazole も GPR97 作動活性があることがみつかった。さらに、GPR97 はヒト末梢血好中球に選択的に高発現しており、好中球様に分化誘導した HL-60 細胞において、チロキシンが細胞内 cAMP レベルを上昇させ、活性酸素産生レベルを低下させることが明らかとなった。このことから、血中のチロキシンが 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 3 章では生体ホルモンプロスタノイドの受容体のうち FP 受容体の眼圧降下作用に注目し、FP 受容体に作動する化学物質の検索を行っている。大規模ランダム化合物スクリーニングを実施した結果、複数のヒット化合物を取得し、さらに、誘導體展開を行うことにより、非プロスタノイド骨格を持ち活性の高い compound B の取得に成功した。正常眼圧サルを用いて compound B の作用を検討し、確かに眼圧降下作用が認められた。この効果を他の FP 作動性化合物と房水中最大濃度を加味して定量的に比較した結果、薬効順位が合理的に説明できたことから、サルにおいても FP シグナルが眼圧降下作用に主に寄与していることが示された。

以上、本論文は精緻な最適化を繰り返して新規な宿主ベクター系を開発し、それを適用して大規模なスクリーニングを繰り返し、その結果、チロキシンの細胞表面における受容体の同定と機能の推定に成功し、さらに眼圧降下作用のある新規骨格を持つ化合物の発見を行っており、科学的に新規性の高い研究であると認められる。

なお、本論文第 III 部第 1 章は西達也氏、國友博文氏、成田吉泰氏、佐々木克敏氏、三村英樹氏との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (理学) の学位を授与できると認める。