

(論文内容の要旨)

ゲノム情報に基づくオーファン G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 研究により、近年一群の遊離脂肪酸をリガンドとする遊離脂肪酸受容体 (free fatty acid receptor; FFAR) ファミリーが同定されている。FFAR ファミリーのうち、中・長鎖脂肪酸によって活性化される GPR40 受容体 (FFAR1) は、膵臓  $\beta$  細胞に高発現しており、糖刺激によるインスリン分泌を更に促進する生理機能が明らかとなっており、各種代謝疾患との関連が注目されている。GPR40 受容体に関しては、ノックアウトマウスなどを用いた生理、病態機能解析及び特異的リガンド探索等の創薬研究が精力的に行われてきているが、タンパク質発現解析、GPR40 受容体とリガンドとの直接相互作用解析といったタンパク質化学的解析は十分に行われていない。そこで申請者は、GPR40 受容体について特異的受容体抗体の作製を行い GPR40 受容体のタンパク質レベルでの発現解析をまず行った。更に、リガンド受容体直接相互作用検出系 (結合実験) を世界に先駆けて確立し、GPR40 受容体の薬理特性を検討した。

第一章 GPR40 受容体モノクローナル抗体の作製と GPR40 受容体タンパク質発現解析

申請者は、ヒト及びマウス GPR40 受容体細胞外ドメイン (EC2: 62-76 アミノ酸) に対するモノクローナル抗体を作製し検定した。まず N 末端に FLAG タグを付加したヒト GPR40 受容体発現ベクターを作製し、HEK293 細胞に一過性発現させ、細胞膜上の FLAG-GPR40 受容体発現をフローサイトメーター及び免疫細胞染色法により検討した。その結果、抗 FLAG 抗体特異的なシグナルと抗 GPR40 受容体抗体特異的なシグナルが一致することが確認された。次に、FLAG-GPR40 受容体を一過性発現した HEK293 細胞の可溶性膜画分を抗 GPR40 受容体抗体により免疫沈降し、抗 FLAG 抗体を用いて Western blot を行ったところ、GPR40 受容体特異的なバンドが検出された。これらのシグナルはいずれも抗原ペプチドにより消失したことから、作製された抗体は GPR40 受容体タンパク質を検出できる特異的抗体であることが明らかとなった。

次に、申請者は GPR40 受容体 mRNA の発現が報告されている細胞や組織を用い、抗 GPR40 受容体抗体による免疫染色を行った。マウス膵ランゲルハンス島において、抗インスリン抗体や抗グルカゴン抗体と抗 GPR40 受容体抗体の二重染色を行ったところ、GPR40 受容体とインスリン分泌細胞である  $\beta$  細胞との共発現が確認された。また、各種臓器の中で、マウス脾臓での免疫染色から、GPR40 受容体が主に赤脾髄に存在することが確認された。更に、抗 GPR40 受容体抗体を用いたフローサイトメトリー解析より、マウス脾単離細胞の一部の細胞が GPR40 受容体陽性であることが確認された。また、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) の 15% の細胞に GPR40 受容体の発現が認められ、これらには単球のマーカーである CD14 陽性細胞が多数含まれていた。更に、ヒト単球由来の THP-1 細胞では約半数が GPR40 受容体陽性であった。これらの結果から GPR40 受容体を発現している PBMC は単球細胞であることが示唆された。本結果により、GPR40 受容体モノクローナル抗体は GPR40 受容体の発現解析に有用であることが示された。

## 第二章 フローサイトメーターによる GPR40 受容体直接相互作用の解析（結合実験系の確立）

これまで GPR40 受容体は特異的標識プローブを欠き、受容体とリガンドとの直接相互作用を解析する系が無く詳細な薬理学解析が困難である。申請者は、まず GPR40 受容体特異的蛍光プローブを探索し、そのプローブを用いたフローサイトメトリー解析法に基づき、GPR40 受容体とリガンドとの直接相互作用検出系の構築を試みた。まず、大量タンパク質発現系であるバキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて、N 末端に FLAG タグを付加した FLAG-GPR40 受容体タンパク質発現系を構築した。次に、FLAG-GPR40 受容体発現細胞を可溶化し、抗 FLAG 抗体及び protein G magnet beads を用いて免疫沈降を行い、GPR40 受容体タンパク質を bead 上に固定した。GPR40 受容体が beads 上に固定されていることを確認するため、GPR40 受容体-bead 複合体を熱処理し、その上清を抗 FLAG 抗体による Western blot 解析を行った。その結果、GPR40 受容体特異的なバンドが濃縮されていたことから、GPR40 受容体-beads 複合体の形成を確認した。次に、GPR40 受容体特異的な蛍光プローブを探索するために、Doxycycline で GPR40 受容体を誘導発現可能な T-REx GPR40 細胞を用いて、種々の蛍光標識脂肪酸刺激による ERK の活性化を評価したところ、GPR40 受容体を特異的に活性化する化合物 (C1-BODIPY-C12) が明らかとなった。本化合物と GPR40 受容体との相互作用をフローサイトメトリーにより蛍光強度を測定することで評価した。その結果、濃度依存的な結合飽和性 (apparent  $K_d=3.7\mu\text{M}$ ) 及び、時間依存的な結合可逆性を確認した。また、GPR40 受容体タンパクと蛍光プローブとの結合に対する、種々の遊離脂肪酸の結合抑制作用を評価したところ、これまでに報告されている GPR40 受容体に対するセカンドメッセンジャー (細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度) 産生反応 (apparent  $\text{EC}_{50}$  値) とこの結合実験 (apparent  $\text{K}_i$  値) がよく一致することが確認された。

更に、GPR40 受容体を活性化することが報告されている合成化合物について、ERK 活性化能と結合実験結果の相関について検討した。GPR40 受容体を介して ERK を活性化する化合物はいずれも GPR40 受容体結合実験において相互作用を示し、更にそれらの化合物ではいずれも GPR40 受容体を発現しているマウスインスリノーマ細胞株 MIN6 においても細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇反応が観察できた。一方、GPR40 受容体に対して活性化能を示さない化合物は、結合実験においても相互作用が認められず、また MIN6 における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇作用も示さなかった。これらの結果から、GPR40 受容体リガンドの活性化能と結合実験による相互作用は一致することが示された。

以上、申請者は遊離脂肪酸受容体 GPR40 (FFAR1) について、特異的モノクローナル抗体の作製、特性解析と、それを用いた GPR40 受容体タンパク質の発現解析を行った。次に、GPR40 受容体タンパクとリガンドとの直接相互作用解析のための特異的蛍光プローブの探索、更にその蛍光プローブを用いたフローサイトメトリー法による直接相互作用検出 (結合実験) 系を確立した。本研究の成果は、更なる脂肪酸受容体機能解析の進展、構造活性解析、また高効率な特異的化合物探索などに寄与することが期待される。

[ 30～50 行 約 1500 文字にて作成願います。]

ふりがな  
氏名

はら たかふみ  
原 貴史

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、脂肪酸受容体 GPR40(FFAR1)のタンパク質レベルでの発現と、リガンド-受容体直接相互作用について解析を行うことにより、その薬理特性を明らかとした論文である。中・長鎖脂肪酸によって活性化される GPR40 受容体(FFAR1)は、膵臓β細胞に高発現しており、糖刺激によるインスリン分泌を更に促進する生理機能が明らかとなっていることから、各種代謝疾患との関連が注目されている。GPR40 受容体に関しては、ノックアウトマウスなどを用いた生理、病態機能解析及び特異的リガンド探索等の創薬研究が精力的に行われてきているが、タンパク発現解析、GPR40 受容体とリガンドとの直接相互作用解析といったタンパク化学的解析は十分に行われていない。そこで申請者は、GPR40 受容体について特異的受容体抗体の作製を行い GPR40 受容体のタンパク質レベルでの発現解析を行い、更に、リガンド受容体直接相互作用検出系確立し、GPR40 受容体の薬理特性を検討した。

申請者は、ヒト及びマウス GPR40 受容体細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体を作製し、強制発現細胞により、受容体タンパク質の発現をフローサイトメーター、免疫細胞染色法および Western blot により検討した。いずれの検討においても、抗 GPR40 受容体抗体特異的なシグナルを確認し、これらのシグナルはいずれも抗原ペプチドにより消失したことから、作製された抗体は GPR40 受容体タンパク質を検出できる特異的抗体であることが明らかとなった。次に、申請者は GPR40 受容体 mRNA の発現が報告されている細胞や組織を用い、抗 GPR40 受容体抗体による免疫染色を行った。マウス膵ランゲルハンス島、脾臓において GPR40 受容体を検出した。更に、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)においても GPR40 受容体発現が認められ、これらには単球のマーカーである CD14 陽性細胞が多数含まれていた。更に、ヒト単球由来 THP-1 細胞にも GPR40 受容体陽性細胞が確認された。これらの結果から GPR40 受容体を発現している PBMC は単球細胞であることが示唆された。以上より、GPR40 受容体モノクローナル抗体は GPR40 受容体の発現解析に有用であることが示された。

次に、申請者は GPR40 受容体特異的蛍光プローブを探索し、そのプローブを用いたフローサイトメトリー解析法に基づき、GPR40 受容体とリガンドとの直接相互作用検出系の構築を試みた。まず、大量タンパク質発現系であるバキュロウイルス-昆虫細

胞発現系を用いて、N末端に FLAG タグを付加した FLAG-GPR40 受容体タンパク質発現系を構築した。次に、FLAG-GPR40 受容体発現細胞を可溶化し、抗 FLAG 抗体及び protein G magnet beads を用いて免疫沈降を行い、GPR40 受容体タンパク質を bead 上に固定した。GPR40 受容体が beads 上に固定されていることを抗 FLAG 抗体による Western blot 解析により確認した。次に、GPR40 受容体特異的な蛍光プローブを探索するために、GPR40 受容体の誘導発現系細胞を用いて、種々の蛍光標識脂肪酸刺激による ERK 活性化を評価したところ、GPR40 受容体を特異的に活性化する化合物が明らかとなった。本化合物と GPR40 受容体との相互作用をフローサイトメトリーにより評価し、濃度依存的な結合飽和性及び、時間依存的な結合可逆性を確認した。また、種々の遊離脂肪酸について相互作用を評価したところ、これまでに報告されている GPR40 受容体を介する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答とこの結合実験の結果がよく一致することが確認された。更に、GPR40 受容体を活性化することが報告されている合成化合物についても、結合実験結果との相関が確認された。更に GPR40 受容体を発現しているマウスインスリノーマ細胞株 MIN6 においても細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇反応と相互作用の相関が観察できた。以上より、GPR40 受容体リガンドの活性化能と結合実験による相互作用は一致することから、本解析系が GPR40 の薬理的解析を行う上で非常に重要であることが示唆された。

本論文で申請者は、遊離脂肪酸受容体 GPR40 について、タンパク化学的な解析を行いこれまで明らかとなっていなかった、組織におけるタンパク質発現を明らかとすると共に、リガンド受容体直接相互作用の解析系を世界に先駆けて確立し、その薬理特性を解析した。これらの結果は脂肪酸受容体研究の更なる進展に寄与するものであり非常に重要な知見となると考えられる。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。さらに、平成 21 年 1 月 21 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。