

氏 名 (本 籍) 横 山 哲 雄 (千葉県)

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 (論) 第 3 0 5 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 5 年 9 月 1 0 日

学 位 論 文 題 目 **Development of a high-throughput bioassay to screen melatonin receptor agonists using human melatonin receptor expressing CHO cells**

(ヒトメラトニン受容体発現 CHO 細胞を用いたメラトニン受容体アゴニストの検索のためのハイスループットバイオアッセイの開発)

審 査 委 員

主 査 教 授 大 久 保 岩 男

副 査 教 授 木 村 博

副 査 教 授 山 路 昭

論文内容要旨

*整理番号		氏名 (ふりがな)	横山 哲雄
学位論文題目	Development of a high-throughput bioassay to screen melatonin receptor agonists using human melatonin receptor expressing CHO cells (ヒトメラトニン受容体発現 CHO 細胞を用いたメラトニン受容体アゴニストの検索のためのハイスループットバイオアッセイの開発)		
<p>研究の目的</p> <p>本研究はメラトニン受容体サブタイプに対して選択性の高い化合物の検索する方法を確立することを目的とする。最近開発された分析機器である fluorescent imaging plate reader (FLIPR, Molecular Device)は蛍光基質を利用することで細胞内のシグナルを検出し、約2分間で分析を完了する。従って大量の化合物を効率よく検索するのに有用である。しかし利用できるのは細胞内カルシウム濃度を上昇させる受容体に限られる。メラトニン受容体はGiタンパクと共役する受容体であるため、CHO細胞において細胞内カルシウム濃度を上昇しない。従ってメラトニン受容体発現CHO細胞はFLIPRアッセイを行うことが不可能である。最近報告されたGqi5は、GqのC末端5アミノ酸残基がGiに置換されたキメラGタンパクでありGi共役型受容体と相互作用しかつ細胞内カルシウム濃度の上昇させる。そこでこれを用いて、メラトニンに応答し細胞内カルシウム濃度を上昇するCHO細胞の構築を行った。</p> <p>方法</p> <p>ヒトmel-1a、mel-1bメラトニン受容体、Gqαサブユニットはヒト大脳ポリA+RNAまたはゲノムDNAよりPCR法により増幅し、発現ベクターを調整した。各発現ベクターはCHO細胞に導入し、FLIPRアッセイ、ラジオレセプターアッセイに供した。</p> <p>結果</p> <p>1、Gqi5のN末端配列の比較</p> <p>開始コドンの異なる2つのGqi5発現ベクターをmel-1aメラトニン受容体発現CHO細胞に一過的に発現させFLIPRアッセイを行った結果、メラトニンの用量依存的に細胞内カルシウム濃度が増加した。蛍光強度は差を認めず、両者のEC₅₀は10⁻⁸Mでほぼ同等であった。</p> <p>2、FLIPRアッセイの特異性、シグナル強度の検討</p> <p>メラトニン誘導体でFLIPRアッセイを行った結果、各誘導体は2-I-Mel>Mel>NAS>5-MTの順に低濃度で細胞内カルシウムを上昇させた。評価系の特異性をラジオレセプターアッセイと比較した。各アゴニストの相対的な結合親和性はFLIPRアッセイと同様な結果を得た。しかしRRAにより求めたIC₅₀はFLIPRアッセイより求めたEC₅₀よりも約10倍低濃度であった。</p> <p>Gqi5を安定的に発現させたCHO細胞に一過的にmel-1aメラトニン受容体を発現してFLIPRアッセイを行った結果、メラトニン発現細胞に一過的にGi5を発現した場合と同様なEC₅₀を得ることができたが、蛍光強度は弱かった。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、
2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

3、メラトニン受容体 (mel-1a、mel-1b) および Gqi5 の共発現 CHO 細胞による FLIPR アッセイ

メラトニン受容体 (mel-1a、mel-1b) および Gqi5 を安定的に共発現させ、FLIPR アッセイを行った結果、各誘導体のうち Mel および 6OH-Mel において受容体に対する作用は同様に強いのに対し、特に mel-1b では mel-1a より NAS、5-ML に高い作用を認めた。

考察

Gq ファミリーの α サブユニットの N 末端アミノ酸配列は相同性が高く、2つのメチオニンが in frame で存在している。そこでこの N 末端部位の配列がカルシウムシグナルに重要であるか確認するために、各々の開始コドンから翻訳を開始するように発現ベクターを構築した。

各々の発現ベクターによる FLIPR アッセイでは、蛍光強度に差はなく、 EC_{50} もほぼ同等であることから、Gq の N 末端 6 残基のアミノ酸は細胞内カルシウムの上昇に影響を与えないと考えられた。さらに既知のメラトニン誘導体を FLIPR アッセイに供し EC_{50} を求めた結果、ラジオレセプターアッセイと比較した。この結果、各誘導体の受容体活性化能は結合親和性を反映していると考えられたが、 IC_{50} を EC_{50} と比較すると各々10倍づつ高濃度であり、内在的な Gi タンパクの影響であると考えられた。

Gqi5 の安定的な発現細胞に一過的にメラトニン受容体を発現させ FLIPR アッセイに供した結果、メラトニン発現細胞に一過的に Gqi5 を発現した場合と EC_{50} に差はなかったが、蛍光強度は弱かった。メラトニン受容体または Gqi5 の発現量は蛍光強度に影響を与えることが考えられた。

Gqi5 とメラトニン受容体 (mel-1a または mel-1b) を安定的に共発現した CHO 細胞の構築し、FLIPR アッセイに供した。メラトニン誘導体の特異性はラジオレセプターアッセイとほぼ一致し、過去に報告されたデータと矛盾しないことを確認した。これにより FLIPR を利用したメラトニン受容体アゴニストの検索が可能であると考えられた。

結論

メラトニン受容体 (mel-1a、mel-1b) および Gqi5 を共発現した CHO 細胞を構築し、新規のメラトニン受容体アゴニストを検索するアッセイ系を作成した。この評価系は ^{125}I -メラトニンを用いたラジオレセプターアッセイと同様な特異性を有する。従ってこの評価系は大量の化合物を高速に評価できる有用な手段となりうる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	308	氏名	横山哲雄
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>Fluorescent imaging plate reader (FLIPR)は細胞内カルシウム濃度を高感度かつ高速に計測する機器であるが、これを利用できるのは細胞内カルシウム濃度を上昇させる受容体に限られる。一方、メトニン受容体ファミリーは Gi タンパク質と共役する受容体であり、細胞で発現させても細胞内カルシウム濃度を上昇させない。このためこの分析機器を利用できない。本研究では、Gi 共役型受容体と相互作用し Gq のシグナル経路で細胞内カルシウム濃度を上昇させる融合タンパク質とメトニン受容体を共発現した CHO 細胞を構築し、FLIPR Assay を行い、以下のような結果を得ている。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Gq の C 末端 5 残基のアミノ酸が Gi の配列に置換された Gqi5 を構築し、これをメトニン受容体と CHO 細胞に共発現した。その結果、メトニンの投与により用量依存的に細胞内カルシウムを上昇させることを FLIPR Assay で確認した。 2. メトニン関連誘導体の EC₅₀ を測定したところ、RRA による IC₅₀ より感度は低かったが、誘導体に対する特異性は同じであった。 3. メトニン受容体サブタイプの mel-1b と Gqi5 を同様に共発現させた場合にも、FLIPR Assay は有用であった。 <p>以上の結果より Gqi5 を利用した FLIPR Assay がメトニン受容体サブタイプに特異的なアゴニストを検索するための有用な方法であると考えられた。</p> <p>本研究は、メトニン受容体を標的とする医薬品探索の新技术となりうることを示した点において博士(医学)の学位論文として価値のあるものと認められた。</p> <p>なお、学術関連の試問は、平成 15 年 8 月 27 日に行い、合格と認められた。</p>			
(平成 15 年 9 月 1 日)			