

|         |   |        |         |
|---------|---|--------|---------|
| 氏名(本籍)  | よし だ ひろ み (茨城県)   |        |         |
| 学位の種類   | 博 士 (理 学)   |        |         |
| 学位記番号   | 博 乙 第 2358 号  |        |         |
| 学位授与年月日 | 平成 20 年 3 月 25 日  |        |         |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当  |        |         |
| 審査研究科   | 生命環境科学研究科   |        |         |
| 学位論文題目  | <b>Molecular Properties of Endogenous RFamide-related Peptides, RFRP-1 and RFRP-3</b><br>(内因性 RFamide 関連ペプチド RFRP-1 及び RFRP-3 に関する研究) |        |         |
| 主 査     | 筑波大学教授  | 理学博士   | 沼 田 治   |
| 副 査     | 筑波大学教授  | 理学博士   | 林 純 一   |
| 副 査     | 筑波大学教授  | 医学博士   | 千 葉 智 樹 |
| 副 査     | 筑波大学准教授   | 博士(理学) | 中 田 和 人 |

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

G protein-coupled receptor (GPCR) リガンドとして新規ペプチド性リガンドを同定することは、新規の生体制御機構の発見に繋がる可能性が高い。吉田博美氏が所属する研究グループは GPCR の内因性リガンドとして、prolactin-releasing peptide (PrRP) を同定した。PrRP は C 末端が Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (RFamide) 構造であり、この構造を有する生理活性ペプチドは RFamide ペプチドファミリーを形成している。次に、RFamide ファミリーの新規メンバーをヒト遺伝子データベースから探索し、RFamide-related peptide (RFRP) 前駆体蛋白質遺伝子の同定に成功した。本前駆体蛋白質の配列を元に合成した RFRPs の受容体を探索したところ、オーファン GPCR であった OT7T022 受容体と反応することが判明した。従って RFRP 遺伝子産物である RFRPs は OT7T022 受容体を介して生体内で重要な役割を果たしていることが予想された。

RFRP は、遺伝子データベースから発見した遺伝子であり、本遺伝子から生体内で生成する RFRPs の性状については不明であった。そこで吉田氏は、(1) RFRP 遺伝子から RFRPs が生合成されることとその性状を明らかにするためのウシ視床下部からの RFRPs の単離精製とその構造決定、(2) RFRPs が OT7T022 受容体に対して強い生理活性を有することを実証するために結合阻害実験と細胞内 cAMP 産生抑制試験、(3) 既知の RFRPs の一つである neuropeptide FF (NPFF) の受容体が、HLWAR77 及び OT7T022 であると報告されたので、RFRPs と NPFF の受容体に対する反応性を比較して、受容体選択性について検討を行うことなど、3 点の検証を行った。

内因性 RFamide ペプチドの同定に関しては、RFRP 遺伝子の高発現が確認されたウシ視床下部抽出液から複数のクロマトグラフィーで精製を行った。得られた最終精製物を N 末端配列分析と質量分析法で構造決定して、ウシ内因性 RFRP-1 は前駆体 58 位 S から始まり RFamide で終わる 35 アミノ酸残基のペプチドであること、ウシ内因性 RFRP-3 は 104 位 A からはじまり RFamide で終わる 28 アミノ酸残基のペプチドであること、またラットでは内因性 RFRP-1 と RFRP-3 は生体内では脳に多く分布することを明らかにした。

内因性 RFRP-1, RFRP-3 と受容体との相互作用については、結合活性を受容体発現 CHO 細胞膜画分を用

いた競合的結合阻害活性、アゴニスト活性を受容体発現 CHO 細胞内 cAMP 産生抑制活性で評価した。0T7T022 受容体に対する内因性 RFRP-1, RFRP-3, NPF の結合活性を比較すると、RFRP-3 および NPF は 0T7T022 に対して強い結合阻害活性、RFRP-1 は前者より弱い結合阻害活性を示した。しかし、0T7T022 に対するアゴニスト活性は、RFRP-3 及び RFRP-1 が強く、NPF は弱かった。HLWAR77 に対しては、NPF は強い結合阻害活性とアゴニスト活性を示したが、RFRP-1 及び RFRP-3 は弱い結合阻害活性を示し、アゴニスト活性も非常に弱かった。従って、内因性 RFRP-1 及び RFRP-3 は 0T7T022 受容体選択的、NPF は HLWAR77 受容体選択的にアゴニスト作用を発揮することが明らかになった。

次に、RFRP-3 の C 末端ペプチドを調製して、構造活性相関を検討した。RFRP-3 は、C 末端 7 残基の断片ペプチドが内因性ペプチドと同等の活性を保持したことから、C 末端 7 残基部分が受容体の活性化に重要であることが判明した。特に C 末端から 7 番目 P と 5 番目 L を削除したときに活性が大きく減弱した。RFRP-3 の C 末端 4 残基は、NPF と共通の構造であり 2 つの受容体に対する結合に重要である。従って、C 末端 4 残基と隣接する 3 アミノ酸部分が、RFRP-3 の 0T7T022 受容体選択的活性化に重要であることが示唆された。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本学位論文において、吉田氏は遺伝子情報を元に見出された RFRP 前駆体配列から生合成された RFRPs に対応する内因性ペプチドをウシ視床下部抽出物より精製同定することに成功した。これらの RFRPs を用いてはじめて内因性の RFRPs と GPCR との相互作用について基本的な性状を解析した。RFRPs/0T7T022 の生理的役割についてはこれから詳細な検討を要するが、そのために有用となる基礎的な性状のほとんどが本研究により明らかにされた。従って、本学位論文は GPCR と RFRPs の相互作用に関して基礎的な情報を提供する物であり、学問的価値が高いものと判断する。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。