

氏名（本籍）	保田 慎一郎（大分県）
学位の種類	博 士（生物工学）
学位記番号	博 甲 第 6944 号
学位授与年月日	平成26年 3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生命環境科学研究科

学位論文題目 **Functional Characterization of Two Isoforms of GPR39 Gene**
(GPR39 遺伝子の2つのアイソフォームの機能に関する研究)

主査	筑波大学教授	農学博士	深水 昭吉
副査	筑波大学准教授	博士（農学）	臼井 健郎
副査	筑波大学講師	博士（学術）	加香 孝一郎
副査	筑波大学講師	博士（農学）	石田 純治

論 文 の 要 旨

G タンパク共役型受容体（GPCR）スーパーファミリーは、生体における様々な機能を司っており、そのシグナルの制御が各種疾患の治療に繋がる可能性があることから、創薬標的としての研究が盛んに行われている。GPCR の一つである GPR39 は、グレリン受容体ファミリーに属し、発現部位や *Gpr39* ノックアウトマウスの表現型から、栄養吸収や糖・エネルギー代謝などへの関与が示唆されている。GPR39 には、全長型の GPR39-1a と短鎖型の GPR39-1b の2種類のアイソフォームが存在し、それぞれ異なる発現分布を示すことが報告されているが、個々の分子の機能については未解明である。そこで著者は、これら二つの GPR39 アイソフォームに関して、細胞レベルにおける分子機能解析を行った。

GPR39-1a は、GPCR に典型的な7回膜貫通構造を保持している。著者は、GPR39-1a が膜受容体としての機能を有するものと考え、第二章において GPR39-1a の生体内リガンドの探索を行った。GPCR の代表的なシグナル経路である Ca シグナルに着目し、ウシ胎児血清（FBS）をリガンドの探索源として、GPR39-1a 発現細胞株を用いた細胞内 Ca アッセイにて検討した結果、ペプチド抽出処理した FBS サンプルの陽イオン交換分画中に、GPR39-1a 特異的に活性を有する画分を見出した。この画分をマルチモード HPLC で精製し、誘導結合プラズマ質量分析器により解析した結果、主成分は Zn^{2+} イオンであることが判明した。そこで、GPR39-1a 発現細胞に $ZnCl_2$ を添加したところ、濃度依存的に細胞内 Ca 濃度が上昇したことから、GPR39-1a は細胞外の Zn^{2+} イオンをリガンドとする膜受容体としての機能することを明らかとした。

全長型の GPR39-1a の解析結果を受け、第三章では、短鎖型の GPR39-1b も Zn^{2+} 受容体としての機能

を有するのか、細胞内 Ca アッセイにて検証した。その結果、GPR39-1b 発現細胞は ZnCl₂ 刺激に応答せず、Zn²⁺受容体とし機能しないことが判明した。近年、短鎖型受容体の生理機能の一つとして、他の受容体との物理的相互作用により、下流シグナルを修飾することが報告されつつある。そこで著者は、GPR39-1b が GPR39-1a あるいは他の GPCR とヘテロダイマーを形成するとの仮説を立て、生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) を用いて受容体間相互作用の解析を行った。まず、GPR39-1b と GPR39-1a のヘテロダイマー形成について検討した結果、両者のヘテロダイマーは形成されなかった。そのため、他の GPCR との相互作用の可能性を考え、発現部位やアミノ酸配列構造の類似性からニューロテンシン受容体 NTSR1 および GPR109a を候補として解析を行った結果、NTSR1 が GPR39-1b とヘテロダイマーを形成することを見出した。さらに、NTSR1 の下流シグナルとして知られる cAMP 経路に着目し、CRE-luc レポーターアッセイを用いて、両者のヘテロダイマー形成が NTSR1 シグナルに及ぼす影響を検討した結果、GPR39-1b は NTSR1 の cAMP-CRE シグナルを抑制することを明らかとした。

審 査 の 要 旨

現在、生体内にて機能する GPCR は約 1,000 種類存在し、それらの生理的重要性が認識されているものの、リガンド探索を含め、分子機能が解明された GPCR は少数に止まっている。本研究において第二章で見出した知見は、機能未知、リガンド未同定の GPR39-1a に関して、膜受容体としてのシグナル伝達機能を明らかにしたのみならず、金属イオンがリガンドとして作用することを同定した初めての報告であり、このことは、Zn²⁺イオンの有する様々な生理活性と GPR39 機能とが結びつく可能性を示している。第三章においては、短鎖型の GPR39-1b が、主に消化管にて生理作用を有する NTSR1 受容体とダイマー形成することによって、NTSR1 の機能を修飾することを示した。このことは、未だ解明されていない GPR39 遺伝子による消化管制御の分子基盤の理解に大きく寄与することが期待できる。

以上のように、著者は GPR39 遺伝子のコードする 2 つのアイソフォームの分子機能を明らかにしたことに加え、短鎖型の GPCR アイソフォームを介する受容体間ネットワークの生理的意義の解明に大きく貢献する知見を開拓したと判断される。

平成 26 年 1 月 23 日、学位論文審査委員会において、加香副査を除く審査委員全員の出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、(加香副査から預かった質問も含め) 関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。平成 26 年 1 月 27 日、加香副査に論文の審査及び最終試験に関する説明と報告を行い、了承いただいた。

よって、著者は博士 (生物工学) の学位を受けるのに十分な資格を有する者として認める。