

氏名(本籍)	おか じま だい すけ (京 都 府) 岡 篤 大 祐 (京 都 府)			
学位の種類	博 士 (生物科学)			
学位記番号	博 甲 第 5901 号			
学位授与年月日	平成 23 年 7 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 Analysis of Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 2 (BAI2) (脳特異的血管新生阻害因子 (BAI2) の機能解析)			
主 査	筑波大学教授	博士 (医学)	千 葉 智 樹	
副 査	筑波大学教授	理学博士	漆 原 秀 子	
副 査	筑波大学教授	理学博士	中 村 幸 治	
副 査	筑波大学教授	理学博士	林 純 一	

論 文 の 内 容 の 要 旨

Brain-specific angiogenesis inhibitor 2 (BAI2) は脳で特異的に発現している 7 回膜貫通型の G 蛋白質共役型受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) で、その構造的特徴から adhesion-family GPCRs に分類される。BAI2 の生理機能については、これまでに脳虚血モデル動物や神経芽腫細胞株を用いた検討から、VEGF 発現抑制を介した血管新生制御への関与が示唆されている。しかし、BAI2 の生理的リガンド及び G タンパク質依存的なシグナル活性化は未だ報告されておらず、GPCR としての機能や活性化メカニズムは解明されていない。本論文では、BAI2 の活性化メカニズムと生理機能について解析を進め、新規創薬標的分子としての資質を評価することを目的とした。

1) 動物細胞を用いた BAI2 活性化メカニズムの解析

BAI2 と同じ Adhesion-family に分類されるいくつかの GPCR は、GPS (GPCR proteolysis site) 領域と呼ばれる共通の予想切断部位を持ち、N 末端細胞外領域 (ECR) で切断されることが報告されている。本研究では、まずマウス脳組織及び BAI2 発現細胞株を用いた western blot 解析により、全長型 BAI2 (220kDa) と共に複数の ECR 切断型 BAI2 (140kDa, 90kDa, 80kDa) を検出し、BAI2 が ECR の複数箇所 で切断されることを見出した。これらの ECR 切断型 BAI2 は GPS 領域への変異導入により消失すること、80kDa 断片が GPS 領域での ECR 切断により生じる断片の大きさと一致することより、BAI2 が他 Adhesion-family GPCRs と同様に GPS 領域で切断される可能性が示唆された。また切断された ECR 断片と 80kDa 断片は会合していることを免疫沈降により検出した。更に 140kDa 断片は Furin により ECR の一部が切断されて生じることを見出し、その切断部位を同定した。

一方、リガンド結合等により活性化された GPCR は、共役する G 蛋白質を介して下流の転写因子 (NFAT, CRE, SRE など) を活性化することが知られている。またトロンピン受容体 (Protease-activated receptors; PARs) のように、ECR 切断により活性化される GPCR の存在も知られている。本研究では、全長型及び ECR 欠損型 BAI2 発現細胞を用いたレポータージーンアッセイにより各転写因子の活性化状態を検討した結果、GPS 領域まで ECR を欠損させた BAI2 (80kDa 断片) が NFAT シグナル経路を特異的に活性化することを見出した。また併せて NFAT の上流メディエーターである Inositol phosphates 蓄積量の増加、及び G 蛋白

質との共発現によるシグナル活性化の促進を確認した。

以上の結果より、BAI2はGPS領域でのECR切断・乖離により活性化され、下流のNFATシグナル経路を特異的に活性化する可能性を示した。

2) BAI2ノックアウト (KO) マウスを用いた表現型解析

BAI2は脳内の情動に関連する領域（海馬、扁桃体など）のニューロンやアストロサイトで発現していることより、血管新生のみならず高次神経機能にも関与している可能性が考えられる。本研究では、まずBAI2 KOマウスを用いて情動に関連する行動解析（尾懸垂試験、社会的敗北試験）を実施した。両試験系においてBAI2 KOマウスはストレス負荷条件下で野生型マウスよりも高い行動量を示し、抗うつ様の表現型を示すことを見出した。また基礎運動量（Homecage activity 試験）及び学習・記憶能力（モーリス水迷路試験）について検証した結果、BAI2 KOマウスと野生型マウスとの有意差は認められず、上記の行動変化が運動能力や学習・記憶能力の異常によるものではないことを確認した。

一方、抗うつ薬投与や電気痙攣療法等のうつ病治療法により、海馬歯状回における神経細胞新生が亢進することから、うつ病と神経細胞新生との相関が近年注目を集めている。且つBAI2による発現抑制が報告されているVEGFが、神経細胞新生を介した抗うつ作用を有することも報告されている。これらの情報より、BAI2 KOマウスの海馬歯状回における神経細胞新生についてBrdU染色による解析を実施した結果、BAI2 KOマウスでは野生型マウスよりも神経細胞新生が有意に亢進していることを見出した。以上、BAI2が海馬歯状回における神経細胞新生及び情動（うつ）に関与している可能性を示した。

以上の結果より、BAI2はGPS領域で切断を受けることにより活性化され、下流のNFATシグナル経路をGタンパク質依存的に活性化する可能性が考えられた。またBAI2ノックアウトマウスは抗うつ・抗不安様表現型を示したことから、BAI2アンタゴニストが新たな抗うつ薬・抗不安薬となる可能性が考えられた。

審査の結果の要旨

GPCRは細胞膜表面に存在する7回膜貫通型タンパク質であり、細胞外に存在するホルモン、神経伝達物質、脂質等のリガンドと結合し、細胞内の3量体G蛋白質と共役して下流シグナル経路を活性化する。GPCRの大半はそのリガンドと生物機能が未解明なオーファン受容体であり、岡嶋氏はオーファン受容体の中で脳特異的に発現するBAI2に着目して、その活性制御機構と生理的役割を解析した。その結果、BAI2はGPS領域の切断によって活性化されること、そして神経細胞新生および情動に関することなどが初めて示された。これらの研究成果により、BAI2の活性を検出する方法が確立され、そして情動の関わる様々な神経疾患の病態解明に新たな知見が加わったことは特筆に値する。また現在上市されている医薬品の約半数はGPCRを標的としており、GPCRは創薬標的として非常に有望な分子ファミリーである。本研究成果はBAI2を標的とした創薬の可能性を初めて示し、そして具体的に化合物スクリーニング法を提示した点においても価値は高い。以上、本研究成果は、BAI2の基本的な分子機能および生理機能の解明のみならず、今後のBAI2のリガンド探索および創薬開発に大きく貢献するものであり、高く評価される。

平成23年6月1日、学位論文審査委員会において、審査委員全員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、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。

よって、著者は博士（生物科学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。