

氏名	下村 行生		
学位の種類	博 士 (生物科学)		
学位記番号	博 甲 第 7745 号		
学位授与年月日	平成 28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	Discovery and Analyses of Melanin-concentrating hormone and a Novel Brain-gut Peptide, Neuropeptide W as the Specific Ligands for Orphan G protein-coupled Receptors (オーファン受容体特異的リガンド、メラニン凝集ホルモンと新規脳消化管ペプチド、Neuropeptide Wの発見と解析)		
主査	筑波大学准教授	博士 (理学)	桑山 秀一
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	中田 和人
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	中野 賢太郎
副査	筑波大学准教授	博士 (農学)	臼井 健郎

論 文 の 要 旨

本研究は、特異的なリガンドが同定されていない受容体、いわゆるオーファン G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の内因性リガンドを同定し、これら内因性リガンドと受容体の機能解析を分子レベルで進めることにより、基礎生物学と創薬研究の分野における有用な知見を得ることを目的とした。GPCR は、細胞表面で外因性あるいは内因性の刺激を受容し、3 量体 G タンパク質を介して細胞内シグナルへと変換する 7 回膜貫通構造を有する膜タンパク質である。内因性刺激とは生体内で合目的に合成され細胞間シグナル伝達分子として働く、神経伝達物質、ホルモン、オートコイドを含む、多様な生理活性物質による生体内からの刺激を指す。1990 年代の終わりに、ヒトを含む生物の cDNA と全ゲノム塩基配列の解読やバイオインフォマティクスを利用した解析が急速に進展し、既知 GPCR と 1 次構造が類似する多数の遺伝子がゲノムに存在することが明らかとなった。これら遺伝子は 1 次構造の特徴から GPCR をコードすると推定されていたが、受容体分子として機能するか不明であった。本研究において、オーファン GPCR 遺伝子であった SLC-1、GPR7 と GPR8 に注目し、存在が未知であったこれら遺伝子産物に対する内因性リガンドの探索と機能解析を行った。

SLC-1 は、内因性リガンドが既に知られている GPCR の中でソマトスタチン受容体に最も相同性の高い構造を有するオーファン GPCR であり、脳で強い発現を示すことが知られていた。第 1 章では、SLC-1 の内因性リガンド同定とメラニン凝集ホルモン受容体としての機能解析について述べる。本研究ではまず、ラット SLC-1 遺伝子発現 Chinese hamster Ovary (CHO) 細胞に対するアゴニスト作用を指標にして、ラット脳抽出液から活性ペプチドを精製した。次いで、アミノ末端配列解析と質量分析を行い、本アゴニストペプチドがラットメラニン凝集ホルモン (MCH) と同一の構造を有することを明らかにした。MCH 合成ペプチド標品は、ヒト SLC-1 遺伝子とラット SLC-1 遺伝子をそれぞれ発現する CHO 細胞に対して、強い cAMP 蓄積抑制活性を示した。これらの研究結果は、分子実体が不明であった MCH の受容体が SLC-1 であることを明らかにするものであった。本研究成果により、摂食行動やエネルギー代謝、不安及び睡眠を調節する MCH の機能を受容体の観点から分子レベルで解析できるようになること、さらに SLC-1 が医薬品創製に必要なステップの 1 つである MCH 受容体拮抗化合物の評価系の構築に利用されることが期待された。

互いに高い相同性を有する GPR7 と GPR8 は共にオーファン GPCR であり、脳での発現量が高いことが

知られていた。GPR7 と GPR8 は、内因性の物質をリガンドとすることが既に知られていたソマトスタチン受容体と SLC-1 に対して高い相同性を示す。第 2 章では、GPR7 と GPR8 の内因性リガンドとして同定した新規脳消化管ペプチド、neuropeptide W の発見について述べる。本研究ではまず、ヒト GPR8 遺伝子発現 CHO 細胞に対するアゴニスト作用を指標にして、ブタ視床下部抽出液から活性ペプチドを精製した。次に、本アゴニストペプチドの部分アミノ酸配列情報に基づき、本ペプチドの前駆体タンパク質をコードするブタ cDNA を単離した。本 cDNA は、23 残基と 30 残基のアミノ酸長の 2 つの成熟ペプチドをコードした。これらのペプチドと配列が類似する既知のペプチドは存在せず新規ペプチドであることが判明したので、それぞれ neuropeptide W-23 (NPW23) と neuropeptide W-30 (NPW30) と命名した。実際に生体組織において NPW23 と NPW30 の分子型が存在すること、さらに脳と胃に比較的高い量の NPW23 と NPW30 が存在することを ELISA 法により明らかにした。2 つの NPW 合成ペプチド標品、ヒト NPW23 とヒト NPW30 は、ほぼ同じ有効濃度でヒト GPR7 遺伝子とヒト GPR8 遺伝子をそれぞれ発現する CHO 細胞に対して cAMP 蓄積抑制活性を示し、ヒト GPR7 とヒト GPR8 にそれぞれ特異的に結合した。また、NPW23 のラット脳室内投与は、摂食を亢進し、プロラクチン分泌を刺激することを確認した。これらの研究結果は、新たに発見された脳消化管ペプチド、NPW は GPR7 と GPR8 の内因性リガンドであり、摂食とプロラクチン分泌を中枢性に調節する 1 つの因子であることを示唆し、NPW が GPR7 または GPR8 を介して中枢性に作用するという生体調節機構が存在することを初めて示すものであった。

審 査 の 要 旨

本学位論文において下村行生氏は、2 種類のオーファン GPCR の内因性リガンドを明らかにした。MCH 受容体としての SLC-1 の発見は、MCH が発揮する多様な中枢神経機能を SLC-1 陽性の神経細胞を含む細胞間ネットワークの応答としてとらえることを可能にし、MCH の摂食促進作用に端を発した抗肥満 MCH 受容体拮抗薬の創薬研究への応用が期待される。GPR7 と GPR8 の内因性リガンドとしての NPW の発見は、新規脳消化管ペプチドとしての NPW の生物学研究の幕開けとなるものであり、NPW とその受容体の脳での選択的発現は NPW が中枢性に発揮する生理機能を探索する足掛かりとなるものであった。今後、本研究成果に基づいた様々な実験手法による機能解析を通して、NPW の生理機能と病態生理学的な位置づけが明らかとなることが期待される。以上より本論文における研究成果は、基礎生物科学的にも応用的にも非常に価値の高いものであると判断された。

平成 28 年 2 月 2 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）の学位を受けるのに十分な資質を有するものとして認める。