

氏名(本籍)	ほそ や まさ き 細 谷 昌 樹 (静 岡 県)		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	博 乙 第 1690 号		
学位授与年月日	平成 13 年 1 月 31 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	Molecular and Functional Characteristics of Seven-Transmembrane-Domain Receptor APJ (7 回膜貫通型受容体 APJ の分子的・機能的特徴に関する研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	平 林 民 雄
副査	筑波大学教授	理学博士	林 純 一
副査	筑波大学教授	農学博士	田 仲 可 昌
副査	筑波大学助教授	理学博士	沼 田 治

論 文 の 内 容 の 要 旨

多細胞生物における恒常性の維持、発生、行動等の調節機構として、細胞間の情報伝達は極めて重要である。その情報伝達を担っているのは成長因子、ホルモン、神経伝達物質などと呼ばれる分子群である。生体における様々な調節機構は多くの場合、情報伝達分子がその受容体に結合するという単純なステップから開始され、受容体分子を介して細胞内情報伝達、遺伝子転写、代謝、アポトーシス、細胞周期などが制御されている。そのため、受容体の性状解析は、生体調節機構を理解する上では必須の事項である。受容体分子にはいくつかのタイプが存在し、中でも 7 回膜貫通型受容体あるいは G 蛋白質共役型受容体と呼ばれるタイプの受容体は、構造上の特徴を共有する一群の大きなファミリーを形成している。7 回膜貫通型受容体のリガンドは低分子から蛋白質まで多岐にわたっており、生体の調節機構において特に重要な役割を果たしている。近年の遺伝子解析技術の進歩によってゲノムおよび cDNA の配列が大量に解析されるようになり、その情報の中から新規な 7 回膜貫通型受容体をコードすると考えられる配列が得られるようになった。しかしそれらの多くは配列にコードされる一次構造の特徴から受容体であることは明白であるものの、それに作用するリガンドが不明なままである。このためこれらの受容体はオーファン(孤児)受容体と呼ばれている。オーファン受容体に対するリガンドを同定することが出来れば、新たな生体調節機構を明らかにする手がかりが得られると期待されている。

最近の研究において、オーファン受容体の一種である APJ の内因性リガンドはアペリンというペプチドであることが分かった。そこで本研究では、リガンドを同定したことによって初めて解析が可能となった APJ の基本的な性状を詳細に研究した。

まず、ラット型 APJ の cDNA の配列情報をもとに定量的 RT-PCR 系を構築し、APJ mRNA の臓器分布を解析した。APJ は肺に最も多く発現し、その他にも心臓、脂肪、卵巣、長管骨、軟骨にも発現が検出された。また、成体よりも新生児により高い発現を示す傾向にあった。これらの臓器の機能調節および成長・発達過程にアペリンが機能していることが推定された。また、遺伝子構造から予測される長さの異なるアペリンをサイトセンサーによって比較したところ、apelin-36 は持続的、[pGlu] apelin-13 は一過性の反応パターンを示した。しかし、シグナル伝達系について、百日咳毒素および Na^+/H^+ exchanger 阻害剤を用いた検討を行なったが、両者の間に質的な差は検出されなかった。¹²⁵I 標識したアペリンの誘導体を調製し、これを用いた結合試験系を構築して検討したところ、アペリン標識体は APJ に対して高親和性の結合を示し、apelin-36 および [pGlu] apelin-13 はいずれも用量依存的にそ

の結合を阻害した。apelin-36および [pGlu] apelin-13の受容体からの解離速度について、標識体を用いた置換実験によって検討したところ、[pGlu] apelin-13よりも apelin-36の方が解離速度が遅く、その結果としてサイトセンサーアッセイにおける反応パターンの違いが生じることが示唆された。

さらに、本研究ではアペリンがAPJ発現CHO細胞に対して特異的な細胞遊走活性を示すことを明らかにし、アペリンの細胞遊走因子としての機能を示唆した。apelin-36および [pGlu] apelin-13に代表されるような長さの異なるアペリン分子が実際に成体内において存在するかどうかをゲルろ過法によって解析したところ、ウシの初乳中にはこれらのアペリンに相当するサイズの分子種が含まれていることが明らかになった。

内因性のリガンドを同定することにより、APJを介した新たな受容体ーリガンド系の存在を明らかにし、その基本的な性状を解析することができた。APJーアペリンの果たしている生理的役割についてはまだ多くの解決しなければならない課題が含まれるが、本研究は受容体遺伝子情報から出発してその受容体の生理機能を解明した初めての報告である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

生命活動における様々の調節機構は情報伝達分子がその受容体に結合するという単純なステップから開始される。現在は遺伝子情報にもとづいて受容体蛋白質であることが分かっているにもかかわらずそのリガンドが不明であるため、生命活動の調節機構の解析にまで切り込めないで、停止している事例が多い。本研究は、この困難を打開し、候補リガンドを用いてオーファン受容体であるAPJの性状を調べ上げ、生体内において各種の生理活性にAPJが関与している可能性を強く示唆したもので、生体における調節機構の研究における大きな困難を打破した先例として意義あるものである。他のオーファン受容体の研究に拍車がかかることが期待できる。

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。