

|          |  |
|----------|--|
| 氏名       | お お た ひ ろ と<br>太 田 広 人   |
| 学位の種類    | 博士 (農学)  |
| 学位記番号    | 甲第355号   |
| 学位授与年月日  | 平成16年 9月30日  |
| 学位授与の要件  | 学位規則第4条第1項該当   |
| 学位論文題目   | A <i>Bombyx mori</i> Tyramine Receptor: Functional Expression in a Cell Line and Identification of the Agonist-Binding Site<br>(カイコチラミン受容体：培養細胞における機能的発現とアゴニスト結合部位の同定) |
| 学位論文審査委員 | (主査) 尾添嘉久<br>(副査) 持田和男 内海俊彦 中島廣光<br>山本達之   |

## 学位論文の内容の要旨

オクトパミン (OA) 及びチラミン (TA) は、昆虫の中枢神経系に広く存在するフェノール系生体アミンである。OA は、神経伝達物質のみならず神経修飾物質や神経ホルモンとしても機能し、様々な生理現象を調節している。一方 TA は、OA の生合成前駆物質であると長い間考えられてきたが、近年、ショウジョウバエを中心にその生理機能についていくつかの報告がなされ、さらに昆虫 TA 受容体遺伝子がこの 10 年もの間に次々にクローニングされてきたことなどから、それ自身内在性の生理活性アミンとしても認められるようになってきた。いずれの生体アミンも 7 回膜貫通型の受容体に結合し、G タンパク質を介して主にアデニル酸シクラーゼ (AC) の活性を調節 (OA は正に、TA は負に調節) し、細胞内 cAMP の濃度変化を引き起こすことでその生理作用を示すと考えられている。本研究では、カイコ (*Bombyx mori*) TA 受容体の機能的及び薬理学的特性を明らかにし、さらにその受容体のアゴニスト結合部位を同定した。

まず、カイコ 5 齢幼虫頭部から mRNA を抽出し、RT-PCR により生体アミン受容体の一種をコードした cDNA (B96Bom) を単離した。この cDNA を発現用ベクター pcDNA3 にサブクローニングした後、リポフェクション法を用いて HEK-293 細胞にトランスフェクトした。ジェネティシン処理により安定発現細胞のみを選択しリガンド応答を調べた。その結果、4 種

の生体アミン (OA、TA、ドーパミン (DA)、ノルエピネフリン (NE)) による細胞内 cAMP 量の増加は見られなかったが、フォルスコリン (AC の活性化剤) で刺激した細胞内 cAMP 量を OA と TA は最大約 40% 抑制した。TA の最大抑制効果は、OA よりも少なくとも 2 オーダー低い濃度 (1  $\mu$ M) で生じ、1  $\mu$ M の TA による cAMP 抑制効果は、10  $\mu$ M のヨヒンビン (既知の昆虫 TA 受容体のアンタゴニスト) 及びクロルプロマジンにより打ち消された。DA や NE にはこのような cAMP 抑制効果は見られなかった。さらに、B96Bom 受容体を安定的に発現した HEK-293 細胞の膜画分を用いて、OA、TA、及び DA の [ $^3$ H]TA 結合阻害活性を調べた。その結果、TA の IC<sub>50</sub> 値は 5.2 nM となり、OA (IC<sub>50</sub> 値=1.4  $\mu$ M)、DA (IC<sub>50</sub> 値=1.7  $\mu$ M) より約 300 倍も阻害活性が高かった。すでにクローニングされている 3 種の昆虫 (シヨウジョウバエ、バッタ、ミツバチ) TA 受容体は全て cAMP 抑制型であること、さらにそれら 3 種の TA 受容体と B96Bom 受容体のアミノ酸相同性は約 80% と非常に高いことも考え合わせ、B96Bom 受容体はカイコの TA 受容体であると結論付けた。

次に、このカイコ TA 受容体 (BmTA 受容体) の、TA のアミノ基及び *p*-水酸基と相互作用するアミノ酸残基を同定するために、 $\beta_2$ -アドレナリン受容体のアゴニスト結合部位から類推して、いくつかのアミノ酸残基 (Asp134、Ser218、Ser219、Ser220、Ser222) を TA 結合部位として予想し、アラニンに変異させた。これら変異型受容体をおのおの HEK-293 細胞に安定的に発現させ、TA の結合能やフォルスコリン刺激した cAMP 生成の抑制能を調べた。その結果、D134A BmTA 受容体では、 [ $^3$ H]TA の特異的結合及び TA による細胞内 cAMP 量の抑制も見られなかった。このことは、第 3 膜貫通領域 (TM3) に存在する Asp134 は、TA との相互作用及び受容体の活性化に関わる重要な残基の 1 つであることを示唆しており、Asp134 のカルボキシル基は TA のプロトン化されたアミノ基とイオン対を形成すると予想される。S219A BmTA 受容体及び S220A BmTA 受容体の TA の [ $^3$ H]TA 結合阻害活性を野生型と比較したところ同程度であった。S218A BmTA 受容体及び S222A 受容体では、 [ $^3$ H]TA の特異的結合は消失したが、高濃度 (100  $\mu$ M) の TA による cAMP 抑制活性は残存した。しかし、それら 2 つのセリンをアラニンに変異させた受容体では、TA の cAMP 抑制効果も消失した。これらの結果から、TM5 に存在する Ser218 と Ser222 が TA との相互作用のみならず受容体の活性化にも寄与していると考えられ、両セリンの水酸基と TA の *p*-水酸基との間に水素結合が形成されると予想される。

さらに、TA 受容体と OA 受容体のリガンド特異性に関する分子メカニズムについての知見を得るために、BmTA 受容体の 2 つのアミノ酸残基 (Asn111 及び Val451) を OA 受容体に保存されている残基で置換し、その影響を調べた。しかし、N111S BmTA 受容体、V451C BmTA 受容体ともに、OA と TA の cAMP 抑制効果は野生型と同程度であったことから、OA の  $\beta$ -水酸基は、N111S BmTA 受容体の Ser111 と V451C BmTA 受容体の Cys451 と相互作用しないと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、昆虫の生体アミン受容体を単離し、その機能を解明しようとしたものである。哺乳類の生体アミンとしては、カテコールアミンであるアドレナリンやドーパミンがよく知られているが、昆虫などの無脊椎動物ではアドレナリンはほとんど存在せず、その代わりにフェノール性モノアミンであるオクトパミンとチラミンが比較的高濃度で検出される。オクトパミンは、神経伝達物質、神経修飾物質、神経ホルモンとして古くから研究され、受容体を介してセカンドメッセンジャーであるサイクリック AMP (cAMP) の細胞内レベルの上昇を引き起こし、筋調節、エネルギー代謝、ストレス応答、記憶・学習などに関わっていることが知られている。しかし、チラミンはオクトパミンの生合成前駆体であり、そのためにその生理学的な役割についてはあまり研究されることがなかった。本研究では、カイコ (*Bombyx mori*) にチラミン受容体が存在することを明らかにするとともに、その機能解析およびアゴニスト結合部位の同定を行った。

本研究を始める前に、生体アミン受容体をコードしていると推察されるカイコの遺伝子 B96Bom がすでに報告されていたが、機能解析は試みられなかった。そこで本研究では、カイコ 5 齢幼虫頭部 mRNA を使って RT-PCR を行い、得られた B96Bom cDNA を発現ベクター pcDNA3 にクローニングした。これを HEK-293 細胞に導入し、抗生物質でセレクションして、B96Bom タンパク質の安定発現細胞を作った。B96Bom 安定発現細胞に 4 種の生体アミンを反応させて細胞内 cAMP 量を調べたが、cAMP レベルの上昇は見られなかった。しかし、フォルスコリンでアデニル酸シクラーゼを活性化させた状態で生体アミンを反応させたときに、チラミンだけが特異的かつ濃度依存的に cAMP レベルを最大約 40% 低下させることが分かった。オクトパミンも同様な活性を持っていたが、その活性はチラミンと比べると 2 オーダー低かった。また、チラミンによる cAMP 生成抑制活性を阻害するアンタゴニストについて調べたところ、生体アミン受容体のアンタゴニストとして知られているヨヒンビンとクロロプロマジンが阻害活性を持っていることが明らかになった。さらに、B96Bom 安定発現細胞の膜画分に対して [<sup>3</sup>H] チラミンが特異的に結合することが分かったので、この特異的結合に対する生体アミンの影響を調べたところ、チラミンはオクトパミンやドーパミンに比べて 2 オーダー低濃度で阻害した。以上のことから、B96Bom はチラミン受容体をコードしており、この受容体はチラミンを結合し、その情報を細胞内に cAMP の減少として伝えることが明らかになった。

同定したカイコチラミン受容体は 7 回膜貫通構造をとっているが、その受容体の中のチラミン結合部位を同定するために、ヒトのアドレナリン受容体からの情報に基づいて、種々のアミノ酸置換変異受容体を安定発現する HEK-293 細胞を作り、チラミンによる cAMP 生成と [<sup>3</sup>H] チラミン結合を調べた。その結果、第 3 膜貫通領域にある Asp134 はチラミンのプロトン化したアミノ窒素原子との静電相互作用、第 5 膜貫通領域にある Ser218 と Ser222 はチラミンのベンゼン環パラ位の水酸基との水素結合に関わり、チラミンの結合部位は受容体の膜貫通ドメインに囲まれた

内部領域にあることが推察された。 以上のように、B96Bom はオクトパミン受容体ではなく、チラミン受容体をコードする遺伝子であり、この受容体の情報伝達経路は  $G_i$  タンパク質-アデニル酸シクラーゼ経路であることが本研究によって明らかにされた。さらに、昆虫の生体アミン受容体としては初めてアゴニスト結合部位が同定され、チラミン受容体の薬物受容体としての今後の研究の基盤となるデータが得られた。本論文に記載されている研究結果は、昆虫神経科学および生理学の発展に寄与する新知見であり、本論文は博士（農学）の学位論文に値するものであると認められる。