

## 学位論文審査の結果の要旨

|   |  |
|---|--|
| 氏 名   | 陳 曦  |
| 審 査 委 員   | <p style="text-align: center;">主 査 尾 添 嘉 久 ㊞</p> <p style="text-align: center;">副 査 池 田 泉 ㊞</p> <p style="text-align: center;">副 査 小 林 淳 ㊞</p> <p style="text-align: center;">副 査 東 政 明 ㊞</p> <p style="text-align: center;">副 査 川 向 誠 ㊞</p> |
| 題 目   | Cloning and molecular pharmacological characterization of a $\beta$ -adrenergic-like octopamine receptor from the silkworm <i>Bombyx mori</i> (カイコ <i>Bombyx mori</i> の $\beta$ -アドレナリン様オクトパミン受容体のクローニング及び分子薬理学的特性)                          |
| 審査結果の要旨 (2,000字以内)  |  |
| <p>オクトパミン (OA) は、昆虫、線虫などの無脊椎動物の組織において、神経調節物質、神経ホルモン、あるいは神経伝達物質として作用する重要なフェノールアミンである。OA は、脊椎動物におけるアドレナリンやノルアドレナリンに対応すると考えられ、昆虫では産卵、内分泌、飛翔、ストレス応答、記憶・学習など多様な生理作用に関わっている。また、OA 受容体は、クロロジメホルム (CDM) などの制虫剤 (insectstatics) のターゲットとして注目されており、薬理学的研究がなされてきた。カイコからはすでに <math>\alpha</math>-アドレナリン様受容体が単離され、解析されているが、本研究では、カイコ (<i>Bombyx mori</i>) の <math>\beta</math>-アドレナリン様 OA 受容体 (BmOAR2) に注目し、遺伝子のクローニング、機能解析、薬理学的解析、及び OA 結合部位の同定を行った。</p> <p>カイコ 5 令幼虫の神経組織から cDNA を調製し、研究開始当初唯一報告されていたキイロショウジョウバエ <math>\beta</math>-アドレナリン様 OA 受容体 (DmOct <math>\beta</math> R) の塩基配列とカイコゲノム情報を利用して、DmOct <math>\beta</math> 2R のオーソログス遺伝子を単離した。DmOct <math>\beta</math> 3R のオーソログス遺伝子も単離したが、これは OA 受容体の N 末をコードする領域にナンセンスコドンが挿入されており、偽遺伝子と考えられた。DmOct <math>\beta</math> 1R の単離も試みたがゲノム上に発見することができなかった。</p> <p>機能解析を行うために、BmOAR2 遺伝子をほ乳類培養細胞発現用ベクター-pcDNA3 に挿入し、HEK-293 細胞にトランスフェクションして安定発現細胞を数クローン単離した。RT-PCR と免疫染色によって遺伝子発現と細胞膜における局在を確認した後、その細胞に OA を投与して細胞内 cAMP と <math>Ca^{2+}</math> のレベル変化を調べたところ、<math>Ca^{2+}</math> のレベルは変動せず、cAMP レベルの上昇が見られたことから、BmOAR2 は、<math>G_s</math> タンパク質と共役する典型的な 7 回膜貫通 G タンパク質共役型受容体であることが判明した。</p> <p>次に、BmOAR2 が OA に対して選択性を示すかどうか調べるために、<math>[^3H]</math>OA を用いたリガンド結合試験を行った。その結果、チラミン (TA) やドーパミン (DA) も BmOAR2 に結合するが、OA が最も高い親和性を示すことが明らかになった。cAMP 応答については、ラセミ体 (<i>R,S</i>)-OA だけでなく、<i>R</i> 体、<i>S</i> 体についても試験したところ、生体内の本来のアゴニストである <i>R</i> 異性体がラセミ体や <i>S</i> 体より高い活性を示し、TA、DA は弱い活性しか示さないなど、OA 受容体としての特性を示すことが確認された。</p> <p>OA 受容体は制虫剤のターゲットと考えられているため、さらに、合成リガンドのアゴニスト活性とアンタゴニスト活性についても調べた。まず、過去に使用されたことがある制虫剤 CDM の活性代謝物であるデメチルクロロジメホルム (DMCDM) を BmOAR2 発現細胞に投与したところ、DMCDM は、(<i>R</i>)-OA</p> |  |

より 1 オーダー低い濃度で最大 cAMP 生成を惹起し、極めて高いアゴニスト活性を示すことが明らかになった。その他の試験した合成アゴニストでは、ナファゾリンが最も高い活性を示し、クロニジンとトラゾリンは弱い活性を示した。また、これまで代表的アンタゴニストと考えられていたフェントラミンは弱いアゴニスト活性を示すことが分かった。合成リガンドのアンタゴニスト活性を調べたところ、クロプロマジンのみが活性を示した。これらの結果から、BmOAR2 の薬理学的特性は、アゴニスト活性に関しては、過去の分類ではタイプ 2 OA 受容体とされているものと一致したが、アンタゴニスト活性はタイプ 1 OA 受容体と一致した。

最後に、BmOAR2 分子中の OA 結合部位の同定を行うために、脊椎動物のカテコールアミン受容体とカイコのフェノールアミン受容体に保存されているアゴニスト結合に関わるアミノ酸を調査し、BmOAR2 の等価アミノ酸残基を置換した変異体を HEK-293 細胞に安定的に発現させた。これらの変異体の OA 誘起 cAMP 生成能を調べることにより、第 3 膜貫通領域のアスパラギン酸 115、第 5 膜貫通領域のセリン 202、第 6 膜貫通領域のチロシン 300 が OA 結合に大きく関わっていることが示唆された。第 5 膜貫通領域のセリン 206 の変異体は弱い活性を保持していたので、ホモロジーモデルを作製して OA 結合様式を調べたところ、セリン 206 は間接的に OA 結合を変化させることが推察された。このほかに、当初 OA の  $\beta$ -OH と相互作用すると予測されていたチロシン 300 が、OA のフェノール性 OH と水素結合を形成するという興味深い結果が得られた。

本論文に記載されている研究結果は、昆虫分子生物学および分子薬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。