

(別紙様式第7号)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	黄 佳
審 査 委 員	主 査 尾 添 嘉 久 ㊞ 副 査 持 田 和 男 ㊞ 副 査 小 林 淳 ㊞ 副 査 澤 嘉 弘 ㊞ 副 査 東 政 明 ㊞
題 目	Molecular Pharmacological Characterization of <i>Bombyx mori</i> Octopamine and Tyramine Receptors (カイコ <i>Bombyx mori</i> のオクトパミン, チラミン受容体の分子薬理的性質)
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>オクトパミン (OA) は, 無脊椎動物の組織において, 神経伝達物質, 神経調節物質, あるいは神経ホルモンとして作用する重要な生体アミンである. 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相当し, 昆虫では産卵, 内分泌, 飛翔, 記憶・学習など種々の生理作用に関わっている. 一方チラミン (TA) は OA の生合成前駆体であり, その生理作用は注目されなかったが, 近年, このアミンそのものの生理活性が注目されている. 本研究では, カイコ (<i>Bombyx mori</i>) の <math>\alpha</math>-アドレナリン様 OA 受容体 (BmOAR1) に注目し, この受容体の OA 結合部位を同定し, 受容体のシグナル伝達機構を解明することを目的として実験を行った.</p> <p>BmOAR1 は, 細胞外に存在する OA を結合し, シグナル変換を行って細胞内に <math>\text{Ca}^{2+}</math> と cAMP を生成する 7 回膜貫通 G タンパク質共役型受容体である. 先行する脊椎動物生体アミン受容体研究からの情報をもとに, OA 結合に重要であると推察されるアミノ酸を変異させた受容体を HEK-293 細胞に発現させ, それぞれの変異受容体の <math>\text{Ca}^{2+}</math> 応答と cAMP 応答について調べたところ, アスパラギン酸 103 とセリン 198 を変異させたそれぞれの受容体では <math>\text{Ca}^{2+}</math> 応答, cAMP 応答, [<math>^3\text{H}</math>]OA 結合の全ての活性が消失したことから, この二つのアミノ酸は OA 結合に重要であることが分かった. これに対して, チロシン (Y) 412 をフェニルアラニン (F) に変異させた受容体は興味深い応答を示した. つまり, [<math>^3\text{H}</math>]OA の結合は起こるが, 結合量の減少が観察された. また, cAMP 生成は阻害されたが, <math>\text{Ca}^{2+}</math> 生成は野生型 (WT) 受容体と同じであった.</p> <p>このチロシン 412 は, OA の <math>\beta</math> 水酸基と相互作用する位置に存在することから, 違う立体配置の <math>\beta</math> 水酸基をもつ OA 異性体と <math>\beta</math> 水酸基をもたない TA の反応を詳細に調べた. WT と Y412F 変異体への [<math>^3\text{H}</math>]ヨヒンビンの結合を阻害する <i>R</i>-OA と <i>S</i>-OA の活性を調べたところ, WT では <i>R</i> 体が <i>S</i> 体より 12 倍高い活性を示したが, 変異体ではその倍率が 2 倍に低下した. cAMP 生成に関しては, <i>R</i>-OA が <i>S</i>-OA や TA より約 1000 倍高い活性を示した. しかし, <math>\text{Ca}^{2+}</math> 生成に関しては, <i>R</i> と <i>S</i>-OA の活性に差がなく, TA もこれらに匹敵する活性を有していた.</p> <p>以上の結果から, BmOAR1 の OA 結合とシグナル伝達に関する機構が明らかになった. OA の結合は, まずアスパラギン酸 103 と OA のアミノ基との静電的相互作用およびセリン 198 と OA のベンゼン環パラ位の水酸基との水素結合に始まり, この状態 (半活性化) では <math>G_q</math> タンパク質を介してホスホリパーゼ <math>\text{C}\beta</math> を活性化し, <math>\text{Ca}^{2+}</math> レベルの上昇が起こる. さらに半活性化状態は, チロシン 412 水酸基と OA の <math>\beta</math> 水酸基と水素結合形成を可能にし, その結果, <math>G_s</math> タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼが活性化され, <math>\text{Ca}^{2+}</math> だけでなく, cAMP レベルの上昇も惹起する完全活性化状態に至るというものである. つまり, チロシン 412 はシグナル変換スイッチとして働く重要なアミノ酸であることが判明した.</p>	

さらに BmOAR1 の  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル伝達に関して、特異的アゴニストおよびアンタゴニストを同定するために種々の合成化合物を試験した。アゴニストについては、クロニジンが nM オーダーの高活性を示し、cAMP 生成活性が高いデメチルクロロジメホルムは非常に弱い  $\text{Ca}^{2+}$  生成活性を示すことが分かった。アンタゴニストについては、クロプロマジンとヨヒンビンが高い活性を示した。

BmOAR1 に加えて、*B. mori* TA 受容体 BmTAR2 の  $\text{Ca}^{2+}$  応答に関する薬理学的研究も行った。TA 受容体 BmTAR1 は、TA に応答して細胞内 cAMP レベルの低下を引き起こすことが分かっているが、BmTAR2 は  $\text{Ca}^{2+}$  レベルの上昇を誘起することが明らかになった。また、ヨヒンビンがアンタゴニスト活性を有していることも分かった。

本論文に記載されている研究結果は、生物化学および昆虫分子生物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。