

審査の結果の要旨

氏名 水島 和幸

本研究は、ラット中枢神経において部位特異的に発現する遺伝子の同定を試み、その過程において線条体特異的な新規 G protein-coupled receptor (GPCR) 遺伝子を単離し、その構造、および機能解析を行ったものであり、以下の結果を得ている。

- 1、ラット脳の各部位（嗅脳、大脳皮質、小脳、視床・視床下部、線条体、海馬、橋・延髄）より RNA を調整し、96 のプライマーの組み合わせで蛍光 differential display を行った。その結果、発現量の変化する 4 種類の cDNA 断片を同定し、1 種は新規遺伝子に由来するものと考えられた。この遺伝子の全長 cDNA は 385 個のアミノ酸をコードし、ハイドロパチー解析の結果、7 回膜貫通領域を持つことが予想され、線条体特異的に発現する新規 GPCR であると考えられた。この遺伝子は striatum-specific GPCR, *Strg* と命名された。（その後 GPCR 統一命名システムより *Gpr88* と命名された。）
- 2、他の GPCR との比較では 5-hydroxytryptamine 1D receptor、 β 3 adrenergic receptor と相同性が得られた。多くの GPCR は第 3 膜貫通領域において受容体の活性化に関与すると考えられている DRY モチーフを持つが、*Strg/Gpr88* では NRY に置換されていた。さらにジスルフィド結合によって受容体の構造の安定化に関与すると考えられている第 2 および第 4 細胞外ループにシステイン残基が、*Strg/Gpr88* ではいずれのループにおいても存在しなかった。これらの構造的特徴から *Strg/Gpr88* は GPCR の新しいサブタイプである可能性も示唆された。
- 3、ヒト STRG/GPR88 およびマウス *Strg/Gpr88* の全長 cDNA を得てその構造を決定した結果、ヒト STRG/GPR88 およびマウス *Strg/Gpr88* はラット *Strg/Gpr88* とアミノ酸レベルでそれぞれ 95%、98%の高い相同性が示された。

さらに 5'および 3'非翻訳領域においても高い相同性が見られた。それぞれの発現はヒト *STRG/GPR88* のノーザンブロット解析を行った結果、脳において尾状核、被殻に強い発現を認め、さらに延髄に弱い発現を認めた。マウス *Strg/Gpr88* は、全身臓器において脳のみ強い発現を認め、マウス脳 *in situ* hybridization を行った結果、線条体、側坐核、嗅結節さらに延髄の下オリーブ核の神経細胞に発現を認めた。これらの結果より、*Strg/Gpr88* はヒトおよびマウス、ラットにおいて、構造および発現様式が強く保存されていることが示され、線条体の機能である随意運動の調節や情動行動の制御に関与している可能性があると考えられた。

4、ゲノムライブラリーのスクリーニングにてヒトおよびマウス *Strg/Gpr88* 遺伝子の構造を明らかにした結果、ヒトおよびマウス *Strg/Gpr88* 遺伝子は ORF 内にイントロンを認めず、5'非翻訳領域に一つの短いイントロンを持つことが明らかになった。また、それぞれの遺伝子座は FISH 法にて互いに syntenic なヒト 1 番 p21, マウス 3 番 G1 領域にマップされた。

5、得られた遺伝子クローンより、ヒトおよびマウスにおいて転写開始点からそれぞれ上流 5kb、7kb のゲノム塩基配列を決定し、両遺伝子の構造を比較したところ、上流 4kb にわたり、相同性をもつ領域が存在することが明らかになった。この保存されている領域は線条体特異的な遺伝子の発現に関与している可能性が高いと考え、酵母 1 ハイブリッド法を用いて、この領域に結合する因子をマウスおよびヒト脳 cDNA ライブラリーからスクリーニングした。その結果、両方のライブラリーから SEF2 転写因子が得られた。 β galactosidase assay、gel shift assay の結果、SEF2 は、ヒト *STRG/GPR88* 遺伝子プロモーター上の保存領域に存在する 10 個の E-box のうちマウスおよびラットにおいても保存されている 2 つの E-box に機能的に結合することが示された。

以上、本論文は、ヒトおよびマウス、ラットにおいて線条体特異的な発現パターンとその構造が高度に保存された新規 GPCR 遺伝子、*Strg/Gpr88* 遺伝子を新たに同定、単離し、構造およびその転写機構を明らかにした。本研究は線条体機能の解明や創薬、さらには外来性遺伝子の線条体特異的発現の実現に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。