

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 周防諭

本論文は、モデル生物である線虫 *C. elegans* からこれまで未同定であったドーパミン受容体の同定、解析を行ったものである。本研究はドーパミンシグナルの研究を線虫で行う上で必須な基盤を明らかにした研究である。

本論文の内容は、以下のようにまとめられる。

まず、線虫の予測タンパク質のデータベースに対して、ヒトのドーパミン受容体配列を用いて相同性検索を行なった。その上位 100 個のタンパク質のうち、ドーパミンとの結合に重要である、第 5 膜貫通領域のセリン残基が保存されているタンパク質をドーパミン受容体候補とした。選出された F15A8.5、K09G1.4、T14E8.3、C52B11.3、F14D12.6、および T02E9.3 の 6 種類の cDNA をクローニングした。クローニングした cDNA から予測されるアミノ酸配列を既知のドーパミン受容体と比較することで、以下のことを明らかにした。F15A8.5 は哺乳類の D1 様ドーパミン受容体と、K09G1.4 と T14E8.3 は哺乳類の D2 様ドーパミン受容体と比較的高い相同性を持っていた。C52B11.3 は、ショウジョウバエで見ついているドーパミン受容体 DAMB と高い相同性を持っていたが、哺乳類のドーパミン受容体との相同性は高くなかった。F14D12.6 はオクトパミン受容体と高い相同性を持ち、T02E9.3 は一般のアミン受容体とは低い相同性しか持たないことが明らかになった。その中で特に本研究では、F15A8.5 と K09G1.4 について詳しく解析した。

まず、クローニングした F15A8.5 の cDNA を COS-7 細胞に導入して、受容体を発現させ、リガンド結合実験を行なうことによって、内在性リガンドの選択性を調べた。その結果、内在性のアミン神経伝達物質であるドーパミン、セロトニン、ノルアドレナリン、オクトパミン、チラミンはそれぞれ解離定数 $K_i=186, 16200, 3730, 28300, 62100$ nM で結合を示した。このことから、F15A8.5 との親和性はドーパミンが最も高いことが明らかになった。次に、蛍光タンパク質 GFP を用いて線虫個体内における F15A8.5 の発現部位を検討した。F15A8.5 の発現は、線虫の頭部に存在する nerve ring と呼ばれる神経細胞の多く集まる部位や、その他の神経細胞で見られ、F15A8.5 が線虫の神経系で発現していることが明らかになった。さらに、F15A8.5 遺伝子に変異を持つ株が、チロシ

ンヒドロキシラーゼ欠損株である *cat-2* と同じ表現型を示すかを検討したが、F15A8.5 変異株では *cat-2* の表現型は見られないことが明らかになった。

K09G1.4 についても同様にリガンド結合実験を行なった結果、ドーパミン、セロトニン、ノルアドレナリン、オクトパミン、チラミンとの解離定数はそれぞれ 1.11、18.3、194、224、60.4 μM であった。従って、K09G1.4 もドーパミンとの親和性が最も高いことが明らかになった。さらに、細胞内 cAMP に対する影響を調べたところ、K09G1.4 を発現する細胞では forskolin 添加による細胞内 cAMP 濃度の上昇をドーパミンが抑制することが明らかになった。D2 様受容体の特徴である細胞内 cAMP 濃度上昇の抑制を行なうことができたので、K09G1.4 が線虫の D2 様受容体であることが確認できた。また、K09G1.4 の発現部位を F15A8.5 と同様の方法で検討したところ、K09G1.4 も神経細胞で発現していることが明らかになった。ドーパミンニューロンのみで発現していることが既に確認されている *cat-2* と発現部位を比較することにより、ドーパミンニューロンで K09G1.4 が発現していることがわかった。

ドーパミン受容体のシグナル伝達に関する研究は、主に受容体 cDNA を導入した培養細胞を用いて行なわれてきたが、遺伝子導入を行う系では、生体内で受容体がおかれていた環境を反映していない可能性がある。そこで本研究では、神経系の分子機構の研究に適したモデル生物である線虫 *C. elegans* に注目し、そのドーパミン受容体を 2 種類同定した。単純な神経系をもち、遺伝的スクリーニングの可能である線虫のような動物でドーパミン受容体の関わるシグナル伝達を研究することにより、これまで培養細胞や哺乳類を用いて行なわれてきた研究では得られなかった知見を得られる可能性があり、本研究から得られた基礎的なデータはドーパミン研究に十分貢献するものと考えられる。

以上のように、周防諭君の学位申請論文は、ドーパミンシグナルの研究を行う新しい系として線虫 *C. elegans* に注目し、線虫のドーパミン受容体を同定したもので、生体内におけるドーパミンシグナルの研究に貢献するものである。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定した。