

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 川田 剛士

タキキニンとは、哺乳類で腸管収縮などの末梢作用をもち、痛覚伝達にも関わる、脊椎動物の神経ペプチドで、C末端に-Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂という共通アミノ酸配列をもつ。一方、昆虫など無脊椎動物の神経組織からも、昆虫の腸管収縮を誘起し、C末端に-Phe-X-Gly-Y-Arg-NH₂という、類似したアミノ酸配列をもつペプチドが見出されているが、アミノ酸配列と特定の生物活性以外の研究はきわめて乏しい。本論文は、このような無脊椎動物のタキキニン関連ペプチドの機能的、進化的特徴を明らかにすべく行った、ユムシのUru-TK及びその受容体に関する分子生物学的研究をまとめたもので、5章からなっている。

第1章の序論では、サブスタンスPを端緒に見出された脊椎動物のタキキニンと、ゴキブリの腸管収縮活性から同定された無脊椎動物の関連ペプチドに関する、研究開始時までの知見、未解明の問題点について述べられている。ユムシは、環形動物門に近いが独自のユムシ動物門をなす生物で、わが国には *Urechis unitinctus* 1種のみが棲息し、多様化が狭いことや分子進化的位置から対象として興味深い。ユムシからはUru-TKI及びIIの2種類のタキキニン関連ペプチドが同定されている。

第2章では、ユムシのタキキニン関連ペプチド前駆体について解析した。ユムシ神経索からmRNAを抽出し、逆転写後、Uru-TKIをコードする配列に基づき設計したプライマーを用いて3'-RACEを行った。さらに3'-RACEにより得られた配列からプライマーを設計し、5'-RACEも行うことによって、前駆体をコードするcDNAのクローニングに成功した。243アミノ酸からなる前駆体ペプチドには、Uru-TKIに続いて、Uru-TKII並びにこれらと類似した5つのペプチドが、プロセッシングに関わる連続した塩基性アミノ酸を挟み、コードされていた。新規な仮想ペプチドを、Uru-TKIIIからVIIと命名した。ノーザンブロット及びRT-PCRとサザンブロットから、このUru-TK遺伝子は、腸管並びに体壁筋では発現が認められず、神経索で特異的に発現していることが判明した。

第3章では、上記の前駆体の解析から予想された、7つのペプチドについて、神経索抽出物からの検出を試みた。Uru-TKVI以外の6つについて、合成標準ペプチドと同一物の存在が、質量分析によって認められた。これらは、Uru-TKIとほぼ同等の、ゴキブリ腸管収縮活性をもっていた。

第4章では、タキキニン関連ペプチドの受容体について解析した。タキキニン受容体は、多くの脊椎動物からは既に同定され、相同性の高い領域をもつ、Gタンパク質結合型受容

体であることが知られている。タキキニンの結合により、受容体は、ホスホリパーゼCの活性化から細胞質カルシウム濃度上昇などを誘起する。しかし、無脊椎動物からはペプチドと受容体がセットになった解析はこれまでになく、申請者の研究が初めてのものである。脊椎動物で相同性が高い領域の配列に基づくプライマーによって、ユムシ神経索 cDNA を鋳型に PCR を行い、さらに 3'-ならびに 5'-RACE によって哺乳類タキキニン受容体と相同性を持ち、431 アミノ酸からなる、1つの7回膜貫通型受容体候補を見つけた。この候補タンパク質を、アフリカツメガエル卵母細胞への mRNA 注入により発現させた。これに Uru-TKI を反応させたところ、カルシウムイオン濃度上昇による塩素イオン流入の電気的シグナルを検出することができた。このことから、候補タンパク質が Uru-TKI 受容体として働くことが分かった。他の5種類の Uru-TK について調べたところ、同等の反応を引き起こし、哺乳類タキキニンの場合のようなリガンド-受容体間の高い選択性はないことが示唆された。C末端アミノ酸は、脊椎動物では Met-NH₂、無脊椎動物では Arg-NH₂ だが、それに対する選択性は極めて高いことが、置換体による解析から示された。染色体 DNA の部分配列も決定して比較した結果、遺伝子は5つのエクソンと4つのイントロンから構成されており、その位置は哺乳類タキキニン受容体遺伝子のものと一致していた。ペプチド前駆体側の進化的多様性に対し、受容体は共通の祖先遺伝子をもつことが強く示唆された。

第5章では、本研究のまとめと今後の展望が述べられている。

以上、本論文は、不明な点が多かった無脊椎動物ユムシのタキキニン関連ペプチドについて、前駆体ペプチドの分子生物学的解析と、それによって見出された新規関連ペプチドの機能、並びにこれまで未知であったその受容体について明らかにしたものであり、学術上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。