

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 永井 千晶

---

甲殻類では、眼柄内に主要な神経内分泌系である X 器官 - サイナス腺系が存在する。この内分泌系で産生される甲殻類血糖上昇ホルモン (CHH) 族ペプチドは、甲殻類で主要なペプチドホルモンファミリーを形成する神経ペプチドである。このファミリーの分子は、一次構造上高い相同性を示し、甲殻類では、CHH のほかに、脱皮抑制ホルモン (MIH)、卵黄形成抑制ホルモン (VIH)、大顎器官抑制ホルモン (MOIH) が、また、昆虫では、イオン輸送ペプチド (ITP) および ITP-like (ITPL) が知られている。CHH 族ペプチドでは、一個体のなかに、遺伝子重複により多様化したペプチドが複数存在し、それらの生物活性も多様で重複していることが多い。甲殻類十脚目に属するクルマエビ *Marsupenaeus japonicus* の場合、6 種類の CHH 族ペプチド (Pej-SGP-I~III、-V~VII) が CHH 活性および VIH 活性を、Pej-SGP-IV が強い MIH 活性を有し、Pej-SGP-V および -VI は弱い MIH 活性をも示す。また、CHH は血糖上昇活性のほかにも、脂質代謝、脱皮、生殖、ストレス応答など、多様な生体制御を担っていることが知られている。このような CHH 族ペプチドの「構造類似性」と「多機能性」から、各ペプチドの生理機能やそれによる生体制御の実態を理解することが困難であるのが現状である。本論文は、クルマエビを用いて、CHH による血糖上昇機構を明らかにし、CHH 受容体の組織分布や生化学的性質を解析し、さらにその受容体の同定を目指したものである。

序論において以上のような背景を述べた後、第 1 章では、CHH のセカンドメッセンジャーおよび CHH 族ペプチドの標的組織の同定について述べている。クルマエビにおいて、CHH 刺激による標的組織の細胞内 cAMP、cGMP、および IP<sub>3</sub> レベルの変動を調べた結果、セカンドメッセンジャーとして cGMP が同定された。また、クルマエビで MIH として機能する Pej-SGP-IV および Pej-MIH-B も、標的組織の細胞内 cGMP レベルを上昇させた。これらの結果から、クルマエビの CHH 族ペプチドには、その細胞内シグナル伝達に cGMP が関与しているという共通点が見出された。

第 2 章では、CHH 受容体の生化学的解析について述べている。放射性ヨウ素で標識した rCHH (<sup>125</sup>I-rCHH) を用いた *in vitro* での結合実験、およびトレーサー実験を行った結果、<sup>125</sup>I-rCHH は解析したすべての組織の膜画分に対して特異的に結合した。そのスクヤッチャード解析から、<sup>125</sup>I-rCHH とその受容体とは 1 : 1 で結合し、 $K_d = 0.86 \sim 3.6 \times 10^{-9}$  M、 $B_{max} = 138 \sim 915$  fmol/mg protein であることが示された。また、化学架橋実験から、rCHH と特異的に結合する約 34~62 kDa の膜タンパク質の存在が示され、そのうち、約 48 kDa のタンパク質は各組織で共通して認められた。

第 3 章では、肝臓由来の cDNA ライブラリーから発現クローニング法による CHH 受容体の同定を試みている。シブセレクション法では、既知の配列と相同性を示さない、膜

タンパク質をコードするクローンが得られた。そのタンパク質を一過的に発現させた HEK293T 細胞の膜画分に対し、 $^{125}\text{I}$ -rCHH は特異的に結合したが、生体内で Pej-SGP-VII に対する受容体として機能する分子とは断定できなかった。一方、一過的または安定にライブラリーを発現させた細胞を用いた濃縮法では、特定のクローンの濃縮は認められなかった。

第4章では、カイコにおけるオーファン GPCRs (BNGRs) からの CHH 族ペプチド受容体の探索および同定について述べている。鱗翅目昆虫であるカイコ *Bombyx mori* には、ITP および ITPL (ITPs) の 2 種類の CHH 族ペプチドが存在する。近年、ゲノム配列の *in silico* 解析から明らかにされたクラス A および B の GPCRs (BNGRs) 中に ITP や ITPL に対する受容体が存在するかどうかを検討した。Calcium flux assay により、大腸菌発現系で調製した組換え ITP、ITPL (rITPa, rITPL) に対する BNGRs の応答を解析したところ、クラス A に属する BNGR-A2 および-A34 が rITPa に、また、BNGR-A24 が rITPL に応答することを見出した。また、これら 3 つの BNGRs のうち、BNGR-A2 および-A24 はクルマエビの CHH 族ペプチド (Pej-SGP-VII、Pej-SGP-IV) にも応答した。

第5章では、クルマエビにおけるカイコ BNGRs に対する相同分子を探索している。カイコにおける CHH 族ペプチドの受容体として BNGR-A2、-A24、および-A34 を同定したことから、これらの BNGRs に対する相同分子をクルマエビの肝臓、えら、Y 器官、または卵巣由来の cDNA ライブラリーから探索することにより、クルマエビで CHH 族ペプチドの受容体として機能する GPCRs の同定を試みた。その結果、えら由来の cDNA ライブラリーから、BNGR-A24 に対する DNA プロブを用いて、他の種の Frizzled-7 と高い相同性を有するタンパク質をコードする cDNA の部分配列が見出された。しかし、Frizzled-7 は BNGR-A24 とは異なるクラスの GPCR であることから、CHH 族ペプチドの受容体である可能性は低く、未だ受容体の同定には至っていないと考えられる。

本論文では、クルマエビを用いて CHH 族ペプチドのセカンドメッセンジャーとして cGMP を同定し、CHH 族ペプチド受容体の生化学的性状を明らかにした。また、カイコの ITPs 受容体として機能する BNGRs を初めて同定した。また、これらの受容体はクルマエビの CHH 族ペプチドにも応答することを示した。本研究は、単に CHH 族ペプチドによる生体制御の理解に大きく貢献するだけでなく、リガンド - 受容体の共進化の解析に絶好のモデルになる可能性を示したものであり、無脊椎動物の分子内分泌学の進歩に寄与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) の論文として価値あるものと認めた。