

学位論文題名

Study on the Biogenic Amine Receptors in
Barnacle, *Balanus amphitrite*

（タテジマフジツボにおける生体アミンレセプターに関する研究）

学位論文内容の要旨

タテジマフジツボは幼生期から生体に変態する際に岸壁等への付着（接着）を行う動物である。従来、こうした付着生物は汚損生物とされ様々な産業活動に障害をもたらすため、付着の防除に関する研究・開発が行われている。こうした研究の中でセロトニン（5-ヒドロキシトリプタミン；5-HT）やドーパミンといった生体アミンがフジツボ幼生の付着を誘引する効果のあることが報告された。これらの生体アミンは神経伝達物質として知られ動物の様々な行動などを制御している物質である。この生体アミンがフジツボにおいてどのような生理的役割を担っているかを知ることは、付着行動のメカニズムを分子レベルで知るためには必要不可欠なことである。しかしながらフジツボにおいては分子生物学レベルでの研究がほとんどなされていないため、より多くの分子生物学的情報が必要となる。そこで、本研究ではフジツボの生体アミン受容体（レセプター）に関する研究を行った。

ほ乳類では様々なアミンレセプターに対するアゴニスト・アンタゴニストが知られ、それらに対する親和性の違いからアミンレセプターは幾つかのファミリー・サブファミリーに分類されている。しかし、フジツボの付着に対してはこれらのアゴニスト・アンタゴニストがどのように作用するかはあまり検討されていない。そこで、これらの試薬を用いてフジツボの付着に対する影響を系統的に解析した。予想とは異なり、付着誘因活性を示すセロトニン・ドーパミンのアゴニストはいずれも同様の付着誘因活性を示さなかった。しかし、ドーパミン関連試薬の中で1種のアゴニスト（7-OH-DPAT）と1種のアンタゴニスト（SCH-23390）が非常に強い付着阻害活性を示した。これらの付着阻害活性は既に報告されている強力な阻害剤2,5,6-トリプロモ-1-メチルグラミンと同程度のものであった。さらに内在性のアゴニストのヒスタミンはフジツボの付着に対して影響を及ぼさないにも関わらず1種のアゴニスト（Dimaprit）と1種のアンタゴニスト（Chlorpheniramine）がセロトニン・ドーパミンと同様の付着誘因活性を示すことを見いだした。これらの結果からフジツボの体内で付着行動に関係している生体アミンレセプターはほ乳類のレセプターとは機能が相当異なっていることが推測され、レセプタータンパク質の詳細な解析が必要となってきた。

一般に、これまで知られている種々の生体アミンレセプターの構造には幾つかの共通の特徴があり、これらの情報を頼りにフジツボの生体アミンレセプター遺伝子の解析を行った。生体アミンレセプターの多くは7回の細胞膜貫通領域を有し、Gタンパクと結合している膜タンパク質である。この機能的に重要な膜貫通領域には非常に保存性の高い配列が幾つかあり、無脊椎動物でもほ乳類のレセプター遺伝子とも非常に保存された配列があることが知られている。これらの領域に合わせて幾つかのプライマーを合成し、フジツボ遺伝子をテンプレートとしてPCR反応を行った。その結果、膜貫通領域の6番目と7番目の間の遺伝子配列の増幅に成功した。

完全長の遺伝子を得るためにフジツボのゲノム遺伝子ライブラリーを作成し、PCRで得られた部分配列を用いてレセプター遺伝子のスクリーニングを行った。総数 2×10^5 個のプラークをスクリーニングし、最終的に12個の陽性クローンを単離した。これらの陽性クローンは制限酵素の切断パターンやサザンハイブリダイゼーション、PCR等の手法で解析し、幾つかの重複したクローンと誤った選択をしたクローンを除き、No.9、No.15、No.18、No.20の4つのクローンをレセプター遺伝子の候補としてシーケンス解析へ進めた。

シーケンス解析の結果、クローンNo.15は強いハイブリダイゼーションシグナルを示すもののレセプター遺伝子ではないことが判明した。クローンNo.9はGタンパク結合型レセプターの持つ幾つかの特徴である7回の膜貫通領域、N端付近の糖鎖修飾部位、細胞内ループ領域のリン酸化部位、Gタンパク結合モチーフを有しており目的のGタンパク結合型レセプター遺伝子の一つであることが解った。データベースをホモロジーから検索したところ α アドレナリンレセプターに最も近く、セロトニンレセプターとも高い相同性を有することが示された。クローンNo.18もまたクローンNo.9とは異なるGタンパク結合型レセプター遺伝子であることが解った。クローンNo.18のホモロジー検索ではセロトニンレセプター、アドレナリンレセプターが同様に高い相同性を示し、特にセロトニンレセプターの5HT1ファミリーとの相同性が最も高く示された。クローンNo.20も別のGタンパク結合型レセプター遺伝子であることが解ったが、翻訳領域に遺伝子ライブラリー作成時に使用した制限酵素*Bam*HIの切断部位を含んでいたため完全長の遺伝子をこのクローン内には含んでいなかった。約半分長の部分遺伝子ではあるがホモロジー検索からはやはりセロトニン、アドレナリンレセプターとの相同性が示された。

これらの遺伝子が生体アミンレセプター遺伝子であることはここまでの解析の結果、間違いないと推定されるが、それぞれのレセプターの本来のリガンドが何であるかはレセプタータンパク質とリガンドとのアフィニティーを解析する必要があり、今後の研究において、これらの遺伝子を発現させた系を用いた解析を通して決定されることが望まれる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 倉 清 一
副 査 教 授 高 木 信 夫
副 査 教 授 西 則 雄
副 査 教 授 西 村 紳一郎 (理学研究科)

学 位 論 文 題 名

Study on the Biogenic Amine Receptors in Barnacle, *Balanus amphitrite*

(タテジマフジツボにおける生体アミンレセプターに関する研究)

タテジマフジツボは幼生期から生体に変態する際に岸壁等への付着（接着）を行う動物である。従来、こうした付着生物は汚損生物とされ様々な産業活動に障害をもたらすため、付着の防除に関する研究・開発が行われている。こうした研究の中でセロトニン（5-ヒドロキシトリプタミン；5-HT）やドーパミンといった生体アミンがフジツボ幼生の付着を誘引する効果のあることが報告された。この生体アミンがフジツボにおいてどのような生理的役割を担っているかを知ることは、付着行動のメカニズムを分子レベルで知るためには必要不可欠なことである。しかしながらフジツボにおいては分子生物学レベルでの研究がほとんどなされていないため、より多くの分子生物学的情報が必要となる。

申請者はフジツボで生体アミン生理作用に及ぼす影響を調べるため、生体アミン受容体（レセプター）に関する研究を行った。ほ乳類では様々なアミンレセプターに対するアゴニスト・アンタゴニストが知られ、それらに対する親和性の違いからアミンレセプターは幾つかのファミリー・サブファミリーに分類されている。しかし、フジツボの付着に対してはこれらのアゴニスト・アンタゴニストがどのように作用するかはあまり検討されていない。そこで、これらの試薬を用いてフジツボの付着に対する影響を系統的に解析した。予想とは異なり、付着誘因活性を示すセロトニン・ドーパミンのアゴニストはいずれも同様の付着誘因活性を示さなかった。しかし、ドーパミン関連試薬の中で1種のアゴニスト（7-OH-DPAT）と1種のアンタゴニスト（SCH-23390）が非常に強い付着阻害活性を示した。これらの付着阻害活性は既に報告されている強力な阻害剤2,5,6-トリブromo-1-メチルグラミンと同程度のものであった。さらに内在性のアゴニストのヒスタミンはフジツボの付着に対して影響を及ぼさないにも関わらず1種のアゴニスト（Dimaprit）と1種のアンタゴニスト（Chlorpheniramine）がセロトニン・ドーパミン

と同様の付着誘因活性を示すことを見いだした。これらの結果から、フジツボの体内で付着行動に関係している生体アミンレセプターは、ほ乳類のレセプターとは機能が相当異なっていることを見出し、レセプタータンパク質の詳細な解析を行った。

一般に、これまで知られている種々の生体アミンレセプターの構造には幾つかの共通の特徴があり、これらの情報を頼りにフジツボの生体アミンレセプター遺伝子の解析を行った。生体アミンレセプターの多くは7回の細胞膜貫通領域を有し、Gタンパクと結合している膜タンパク質である。この機能的に重要な膜貫通領域には非常に保存性の高い配列が幾つかあり、無脊椎動物でもほ乳類のレセプター遺伝子とも非常に保存された配列があることが知られている。これらの領域に合わせて幾つかのプライマーを合成し、フジツボ遺伝子をテンプレートとしてPCR反応を行った。その結果、膜貫通領域の6番目と7番目の間の遺伝子配列の増幅に成功した。完全長の遺伝子を得るためにフジツボのゲノム遺伝子ライブラリーを作成し、PCRで得られた部分配列を用いてレセプター遺伝子のスクリーニングを行った。総数 2×10^5 個のプラークをスクリーニングし、最終的に12個の陽性クローンを単離した。これらの陽性クローンは制限酵素の切断パターンやサザンハイブリダイゼーション、PCR等の手法で解析し、幾つかの重複したクローンと誤った選択をしたクローンを除き、No.9、No.15、No.18、No.20の4つのクローンをレセプター遺伝子の候補としてシーケンス解析へ進めた。シーケンス解析の結果、クローンNo.15は強いハイブリダイゼーションシグナルを示すもののレセプター遺伝子ではないことを明らかにした。クローンNo.9はGタンパク結合型レセプターの持つ幾つかの特徴である7回の膜貫通領域、N端付近の糖鎖修飾部位、細胞内ループ領域のリン酸化部位、Gタンパク結合モチーフを有しており目的のGタンパク結合型レセプター遺伝子の一つであることが解った。データベースをホモロジーから検索したところ α アドレナリンレセプターに最も近く、セロトニンレセプターとも高い相同性を有することが示された。クローンNo.18もまたクローンNo.9とは異なるGタンパク結合型レセプター遺伝子であることが解った。クローンNo.18のホモロジー検索ではセロトニンレセプター、アドレナリンレセプターが同様に高い相同性を示し、特にセロトニンレセプターの5HT1ファミリーとの相同性が最も高く示された。クローンNo.20も別のGタンパク結合型レセプター遺伝子であることが解ったが、翻訳領域に遺伝子ライブラリー作成時に使用した制限酵素BamHIの切断部位を含んでいなかったため完全長の遺伝子をこのクローン内には含んでいなかった。約半分長の部分遺伝子ではあるがホモロジー検索から、やはりセロトニン、アドレナリンレセプターとの相同性のあることを示した。

これらの遺伝子が生体アミンレセプター遺伝子であることはここまでの解析の結果、間違いないと推定されるが、それぞれのレセプターの本来のリガンドが何であるかはレセプタータンパク質とリガンドとのアフィニティーを解析する必要がある、今後の研究において、これらの遺伝子を発現させた系を用いた解析を通して決定することが望まれる。

この様に、申請者が提出した論文の内容及び研究の将来性・展望が広いことから、審査員一同は、申請者は博士（地球環境科学）の学位を受けるにふさわしい資格を有するものと判定した。