The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Molecular cloning of a novel putative G protein-coupled receptor (GPCR21) which is expressed predominantly in mouse central nervous system
Author(s)	佐伯, 良修
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38910
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	佐伯良修（さえきよしなが）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　11304　号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	**Molecular cloning of a novel putative G protein-coupled receptor (GPCR21) which is expressed predominantly in mouse central nervous system** **（マウス中枢神経系に発現する新しいGタンパク共役受容体遺伝子GPCR21のクローニング）**
論文審査委員	（主査） 教　授　柳原　武彦 （副査） 教　授　塩谷弥兵衛　　教　授　津本　忠治

論文内容の要旨

【目的】

ムスカリニックアセチルコリン受容体やドーパミン受容体に代表されるGタンパク共役受容体は，中枢神経系では$GABA_A$受容体やNMDA受容体に代表されるイオンチャンネル型受容体とならんで神経伝達物質の主要な受容体を構成している。これらはN末端を細胞外にして細胞膜を7回貫通する共通した構造を持っており，膜貫通領域のアミノ酸配列は多くの受容体間で相同性が認められる。この類似性を利用して中枢神経系に発現する新しいGタンパク共役受容体を同定し，その機能・特徴を検索することは，脳におけるシグナル伝達機構さらには脳の高次機能の理解に役立つと考えられる。

【方法ならびに成績】

Gタンパク共役受容体で保存されている第3および第6膜貫通領域のアミノ酸配列に基づいて1組の混合プライマーを作成し，これを用いてマウス脳cDNAを鋳型にPCRを行った。増幅されたcDNA断片はM13ベクターにサブクローニングし，塩基配列を決定した。42クローンはマウスで既知あるいは他の種で報告されているGタンパク共役受容体の遺伝子であった。また2クローン，MBW 5およびMB10は他のGタンパク共役受容体と高い相同性を示したが，同一の配列は報告されておらず，新しい遺伝子と考えられた。これらの全長クローンを得るため，それぞれのクローンについてλgt10で作成したマウス脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。MBW 5からこの配列を持つ全長クローンGPCR 21とこれに類似した塩基配列を持つクローンGPCR 01（1991年に報告されたリガンドのわかっていないラット受容体R334マウス相対物）を得た。一方，MB 10からクローンGPCR 18を得た。これらはそれぞれ330個，334個および395個のアミノ酸残基からなるポリペプチドをコードしており，いずれも20－30アミノ酸からなる疎水性領域が7回繰り返されるGタンパク共役受容体に典型的な構造を持つことが明らかになった。GPCR21とGPCR01はアミノ酸配列で57％の高い相同性を示し，他にMSH受容体，ACTH受容体，カンナビノイド受容体とも高い類似性を示した。一方，GPCR18はイヌRDC 1受容体（リガンド未知）と最も高い相同性（34％）を示し，他にソマトスタチン受容体，アンジオテンシンII受容体，C5aアナフィラトキシン受容体，ブラジキニン受容体，インターロイキン8受容体などのペプチドをリガンドとする受容体と高い相同性が認められた。次に，これらの受容体の組織局在をノーザンブロット，RT-PCR，*in situ*ハイブリダイゼーションで検討した。GPCR21およびGPCR01の発現はほぼ中枢神経系に限られており，GPCR21は内側手綱核にGPCR01は海馬，扁桃体，梨状葉前野，嗅球に強

い発現を認めた。これに対してGPCR18の脳における発現量は微量で，むしろ肝臓および肺で多量に発現していることが明らかになった。さらにGPCR21およびGPCR18のリガンドを同定するために，CHO-K 1細胞に遺伝子導入を行いこれらの受容体を安定に発現する細胞を作成した。この系を用いて種々の生理活性物質で検討したが，細胞内cAMP濃度，IP_3濃度に変化を与えるものは見出せなかった。

【総括】

Gタンパク共役受容体の間で保存されている膜貫通領域に混合プライマーを作成し，マウス脳cDNAを鋳型にPCRを行うことによって，中枢神経系に特異的に発現する新しいGタンパク共役受容体遺伝子GPCR21をその類似物GPCR01とともに単離・同定した。GPCR21およびGPCR01はその高いアミノ酸配列の相同性から同一物質に対する受容体サブタイプであろうと考えられた。現在のところGPCR21のリガンドはわかっていないが，その発現は内側手綱核に限局しており，この受容体の機能をさらに解析することは今なお釈然としない手綱の機能の解明につながるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

近年の分子生物学的技術の進歩により，生理学的あるいは薬理学的に存在が確認されている受容体の多くがクローニングされて来ている。本研究は，脳の高次機能の発現に密接に関与しているがいまだ同定されていない受容体の存在を想定し，分子生物学的手法を駆使して脳特異的に発現する新しい受容体遺伝子を単離・同定すること，さらにその臓器分布および生理学的機能を調べることを目的とした。

現在までにクローニングされているGタンパク共役受容体の遺伝子の間に認められる塩基配列の類似性に注目し，この類似配列を持つ遺伝子をPCR法で選択的に増幅することによって，マウス脳cDNAライブラリーから2種類の新しいGタンパク共役受容体遺伝子GPCR21およびGPCR18をクローニングした。ノーザンブロット法，reverse transcription-PCR法，*in situ* hybridization法による解析の結果，これらの受容体遺伝子のうちGPCR21は中枢神経系に特異的であり，その脳における発現も内側手綱核に限局していることを見い出した。

本研究ではリガンドの同定には至らなかったが，内側手綱核という一つの神経核に限局して発現する新しい受容体遺伝子を同定したことは手綱核の局在機能さらには手綱核におけるシグナル伝達機構の解明に貢献するものであり，学位に値すると考える。