

| | |
|------------|--|
| 氏 名 | RAKHI CHACRABATI |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士（学術） |
| 学位記号番号 | 博理工甲第 1051 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 29 年 3 月 22 日 |
| 学位授与の条件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 |
| 学位論文題目 | A novel role of G protein coupled receptor, family C, group 5, member B(GPRC5B) in the regulation of ghrelin expression and secretion (グレリン発現と分泌における GPRC5B の役割に関する研究) |
| 論文審査委員 | 委員長 准 教 授 坂田 一郎 委 員 教 授 坂井 貴文 委 員 准 教 授 足立 明人 委 員 連携教授 堀口 敏宏 |

論文の内容の要旨

Ghrelin, a ligand for the growth hormone secretagogue receptor (GHSR), is an orexigenic hormone produced in the gastrointestinal tract. Plasma ghrelin rises before meal and dramatically decreases after feeding. The complete regulatory mechanisms of ghrelin signaling still unknown. The present study reveals that G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B (GPRC5B) is an important regulators for ghrelin signaling. In the current study, we found that ghrelin producing cells express high levels of mRNA encoding G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B (GPRC5B). Glutamate, a putative GPRC5B agonist candidate, inhibited acyl-ghrelin secretions in ghrelin cell lines and primary gastric mucosal cells. Ghrelin expression was significantly inhibited by glutamate treatment in ghrelin cell lines. Moreover, D-glutamate did not changed acyl-ghrelin concentrations and mRNA expression of ghrelin. Thereafter, a small interfering RNA (siRNA) targeting the sequence of GPRC5B blocked the inhibitory effects of glutamate in acyl-ghrelin secretion. Moreover, pretreatment with glutamate blocked the effects of the norepinephrine (NE)-induced ghrelin elevation in primary cultured gastric mucosal cells. Next, we investigated the signaling mechanisms of GPRC5B-inhibited ghrelin signaling. Our result showed that GPRC5B-inhibited ghrelin secretion via extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway. It was also observed that glutamate treatment significantly increased mRNA expression levels of cAMP response element-binding protein2 (CREB2) in ghrelin cell lines. After that, we investigated the effects of glutamate on food intake and acyl-ghrelin secretions in mice. We observed that glutamate administration inhibited both food intake and plasma acyl-ghrelin concentrations in mice. Thus, the current study suggests that GPRC5B is one of the important candidates to regulate ghrelin expression and secretion in ghrelin cells.

論文の審査結果の要旨

RAKHI CHACRABATI 氏（申請者）の提出した学位論文について、本論文の審査委員会は平成 29 年 2 月 6 日に理学部 11 番教室において公開で発表会を開催し、詳細な質疑を行って内容を審査した。以下に、審査結果の概要を示す。

グレリンは 1999 年に同定された胃で産生される 28 アミノ酸残基から成るペプチドホルモンであり、摂食調節、エネルギーホメオスタシスそして消化管運動刺激など多岐にわたる生理作用を有する。グレリンは現在までに見つかっている唯一の中鎖脂肪酸修飾ペプチドホルモンという構造学的特徴を有するだけではなく、末梢から分泌される唯一の摂食亢進ホルモンとして注目されている。グレリンは胃の粘膜層に散在性に局在していることから分泌制御機構の研究が難しく、グレリンの細胞生物学は未だ明らかとなっていない点が多い。本論文によって述べられている主要な研究成果は以下の通りである。

第一章では、グレリン産生細胞に発現する遺伝子のマイクロアレイを用いた網羅的解析から得られたグレリン分泌制御因子候補である GPCR のひとつである GPRC5B について、マウス胃での発現とグレリン産生細胞株での発現を検討している。申請者は、RT-PCR 法を用いて、マウス胃及び脾臓と胃由来の 2 つのグレリン産生細胞株（PG-1 及び SG-1）に GPRC5B mRNA が発現していることを示し、マイクロアレイの結果と一致していることを明らかにしている。GPRC5B はグルタミン酸受容体との相同性が高いことから、グルタミン酸が GPRC5B の内因性リガンドとして作用する可能性を想定して、グレリン産生細胞株に L-グルタミン酸刺激を行った。その結果、L-グルタミン酸の刺激により、PG-1 細胞と SG-1 細胞において、濃度依存的に培養液中に放出されるグレリン量が抑制されることを明らかにしている。また、胃粘膜細胞を単離した初代培養系でも同様の結果が得られることを示しており、2 つの細胞株と初代培養系の結果が一致することを記述している。さらに、グルタミン酸刺激によって ghrelin mRNA の発現量は減少するが、グレリン側鎖脂肪酸修飾酵素である ghrelin-o-acyl transferase (GOAT) や prohormone convertase 1 (PC1) の mRNA 発現量は変化しないことを明らかにしている。加えて、光学異性体である D-グルタミン酸を細胞株に処理すると、L-グルタミン酸で見られたグレリン遺伝子発現とグレリン放出は抑制されなかったことから、L-グルタミン酸の特異的な反応であるとしている。

第二章では、グレリン産生細胞株による GPRC5B の loss of function による検討とマウス個体を用いた L-グルタミン酸の効果について記述している。PG-1 細胞株を用いて、siRNA による GPRC5B の発現抑制を行い L-グルタミン酸の効果を検討した結果、GPRC5B ノックダウンが L-グルタミン酸誘導性グレリン分泌の抑制をキャンセルすることを明らかにしており、L-グルタミン酸によるグレリンの発現と放出の抑制は GPRC5B を介した作用であることを証明している。申請者はグレリンの重要な生理作用である摂食調節に及ぼす影響に着目し、マウスに L-グルタミン酸を腹腔内投与し、摂食量と血漿グレリン濃度を検討している。L-グルタミン酸の投与は、血漿グレリン量を濃度依存的に抑制することを明らかにしている。加えて、L-グルタミン酸は摂食量も抑制することを示している。これらの結果から、グルタミン酸－GPRC5B 系は生体内においても機能的であることを論じている。

第三章では、GPRC5B の細胞内シグナル伝達について記述している。PKA インヒビター（H89）、ERK インヒビター（PD98059）そして PI3K インヒビター（wortmannin）でグレリン細胞株を処理し、L-グルタミン酸の刺激を行った結果、PKA インヒビターや PI3K インヒビターでは効果が見られなかったが、ERK インヒビター

で L-グルタミン酸誘導性グレリン放出の抑制が阻害されたことを示している。また、L-グルタミン酸の刺激でリン酸化 ERK が増加することをウェスタンブロット法で明らかにしている。さらに、下流のシグナルについても検討しており、cAMP responsive element binding protein 2 (CREB2) が L-グルタミン酸刺激で増加することを明らかにし、L-グルタミン酸によるグレリン遺伝子発現抑制は最終的に CREB2 の直接的な作用によることを示唆している。加えて、ノルアドレナリン誘導性グレリン分泌の上昇は、グルタミン酸の共投与によって抑制されることを明らかにしている。以上の結果をふまえ、これまでに報告されているグレリン分泌制御因子と GPRC5B による細胞内シグナル伝達経路について論じている。

以上、本論文はグレリン細胞に発現する受容体のひとつである GPRC5B の細胞生物学的機能とマウス個体での生理作用を明らかにしており、グレリンの細胞生理学研究に大きく貢献するものである。また、グルタミン酸が GPRC5B の内因性リガンドのひとつとして機能することを示唆している。なお、上記の内容は査読付き国際学術専門誌に発表されている。これらの成果から、本審査委員会は本学位論文を博士（学術）の学位を授与するに値するものと判断し、合格とした。