

氏名 モハマド シャヒド
Mohammad Shahid

学位の種類 博士(理学)

学位記番号 富生命博甲第52号

学位授与年月日 平成25年9月27日

専攻名 生体情報システム科学専攻

学位授与の要件 富山大学学位規則第3条第3項該当

学位論文題目 Functional compensation among metabotropic receptors
involved in cytosolic Ca^{2+} signaling and satiety control
mechanisms
(満腹制御や細胞質 Ca^{2+} シグナリングに関する代謝型受容体の
機能的補償現象)

論文審査委員

(主査) 准教授 池田 真行
教授 森 寿
教授 川原 茂敬

【学位博士論文内容の要旨】

The peptide cholecystinin (CCK) originally described as a gut hormone secreted from duodenum (intestine) is a ubiquitous neuropeptide involved in a variety of homeostatic and physiological functions. A product of obese (Ob) gene leptin is circulating protein synthesized by the white adipose tissue. Both of these are functioning as signaling messengers involved in regulation of food intake and energy homeostasis, whereas their receptor localization, physiological interaction and functional compensation between receptors / or its receptor subtypes in the hypothalamic satiety centers are not well characterized. In the present study, we examined *fura-2* based intracellular Ca^{2+} imaging in acutely isolated mouse hypothalamic slices to analyze leptin and CCK-mediated signaling in details using gene knockout mice lacking CCK-1 receptors (CCK1R^{-/-}). The CCK receptors are categorized into two subtypes, CCK-1 and -2, both of which share a common phosphatidylinositol signaling pathway to mobilize intracellular Ca^{2+} following receptor stimulations. We focused CCK-mediated Ca^{2+} signaling in parvocellular paraventricular nucleus (PVN) cells, which control satiety and represent highest expression of CCK-1 receptors in the brain. Analysis of mouse hypothalamic slices demonstrated that the general CCK receptor agonist CCK-8s (10 nM) triggered Ca^{2+} transients most significantly in the posterior sub-region of the PVN (PaPo). This 10 nM CCK-8s-induced response was absent in CCK1R^{-/-} slices, showing that the response is mediated by CCK-1 receptors. CCK-8s concentrations higher than 30 nM triggered a Ca^{2+} rise similarly in wild-type and CCK1R^{-/-} slices. The large CCK-8s (100 nM)-induced Ca^{2+} responses in CCK1R^{-/-} slices were blocked by a CCK-2 receptor antagonist (CI-988), whereas those in wild-type slices required a mixture of CI-988 and lorglumide (a CCK-1 receptor antagonist) for complete antagonism. Therefore, CCK-1 and -2 receptors may function synergistically in single PaPo neurons and deletion of CCK-1 receptors may facilitate CCK-2 receptor signaling. This hypothesis was supported by results of real-time RT-PCR, immunofluorescence double labeling and western blotting assays, which indicated CCK-2 receptor over expression in PaPo neurons of CCK1R^{-/-} mice. Furthermore, behavioral studies showed that intraperitoneal injections of lorglumide up-regulated food accesses in wild-type but not in CCK1R^{-/-} mice, whereas CI-988 injections up-regulated food accesses in CCK1R^{-/-} but not in wild-type mice. The compensatory CCK receptor signaling shed light on currently controversial satiety-controlling mechanisms in CCK1R^{-/-} mice. Because of regular food intake activities and body weights are also reported for CCK null mutant mice, functional compensation for molecules underlying CCK-mediated satiety controls may not be limited to the two CCK receptor subtypes, and may also include other receptor signaling molecules such as leptin. So, we further extended our study focused on leptin and CCK signaling in hypothalamic neurons. Our preliminary data based on Ca^{2+} imaging and real time RT-PCR assay indicated that leptin and CCK-1 receptor signaling were

synergistically interacted in PVN neurons as in the case of CCK-1 and -2 receptors. These results suggested receptor-wide as well as subtype-wide compensatory mechanisms in the regulation of satiety via metabotropic receptors.

【論文審査の結果の要旨】

摂食行動における満腹の制御機構の解明は、肥満の治療や予防にとって重要である。視床下部室房核 (PVN) は、脳内における統合的な摂食制御中枢の1つと考えられており、PVNニューロンの生理学的な解析は、満腹制御機構の理解に重要である。摂食後に胃腸管から放出されるコレシストキニンは、満腹シグナルとして重要な働きを担うことが知られ、特に代謝型受容体の1つであるコレシストキニン1型受容体 (CCK1R) を介した情報伝達が、満腹制御に係ることが様々な薬理学実験により示唆されてきた。一方で、CCK1R 遺伝子欠損マウスの表現型は、野生型と有意な差が認められず、正常な体重と摂食行動を示すことが分かっていた。つまり、CCK1R 遺伝子欠損マウスの表現型は、これまで行われてきた薬理的な研究結果と矛盾することが知られていた。Mohammad Shahid による博士研究は、この問題にアプローチするために、CCK1R 遺伝子欠損マウスの PVN ニューロンの機能をカルシウムイメージング法により解析し、ノックアウトマウスでは、2型受容体 (CCK2R) の機能が増強し、失われた機能の補償していることを突き止めた。さらに、リアルタイム PCR 法による遺伝子発現レベルの解析やウエスタンブロッティング法によるタンパク質発現レベルの解析により、CCK2R の機能増強の仕組みを分子レベルで説明した。これらの結果は、*Journal of Biological Chemistry* に筆頭著者として論文発表されており、博士論文としては十分な内容と判断できる。また、博士論文研究公聴会においては、上記の研究内容に加えて、レプチン受容体と CCK1R の機能的な相互作用についての新たな研究の展開についても発表を行い、発表に対する質疑応答も適切に行われた。

以上により、本博士学位論文は合格と判断され、申請者は、博士 (理学) の学位を授与するに十分適すると判断された。