

学位論文題名

マウス ACTH 受容体遺伝子のクローニングとその発現

学位論文内容の要旨

1992年にMountjoyらはヒトのACTH受容体及びMSH受容体をクローニングした。ノーザン解析からACTH受容体のmRNAは副腎にのみ発現し、MSH受容体はmelanocyteのみで発現していることも明らかとなった。さらに、脳に特異的に発現している新しいMSH受容体もクローニングされ、これら受容体の細胞特異発現は、転写制御によるものと思われ非常に興味深い、現在まで、ACTHに反応してステロイド産生を示す副腎由来の細胞株はマウスY-1細胞だけであることから、この細胞株がACTH受容体遺伝子の副腎特異的転写調節機構の研究に適していると考え、マウスACTH受容体遺伝子のクローニングを行うことにした。

方法

1) マウスACTH受容体遺伝子のクローニング

ヒトACTH受容体遺伝子の全コード領域を含むDNA断片を正常ヒトリンパ球ゲノムDNAを鋳型として合成プライマー5'GGGCGCCATGAAGCACATTATCAACTCGT ATG3'(sense)と5'GGAATTCTAAAACCA GGGATCAGCCATTCTAC3'(antisense)間でPCR法にて得た。そのDNA断片をpUC18にサブクローニングし、ランダムプライミングキットを用い³²Pで標識しプローブとし、マウス胸腺リンパ腫由来の細胞株で作成したλdash ファージゲノムDNAライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは5x SSPE, 5x Denhardt's 溶液, 20% formamide, 0.1% SDS, 0.1mg/ml 大腸菌DNA中で42℃一晩行った。最終の洗浄条件は、0.5x SSC, 0.1% SDSで42℃ 60分とした。

2) ゲノムDNAクローンの解析

10⁶個のファージをスクリーニングして、8個の陽性ファージクローンを得た。最も強いシグナルを示したクローンλmCTR8の制限酵素地図を作成し、これをpUC18にサブクローンし、塩基配列の決定をした。

3) ノーザン解析

Y-1細胞からRNAzolを用いて全RNAを抽出、さらにoligo(dT) Latex 粒子にてpoly (A)⁺RNAを選別した。マウスACTH受容体の全コード領域を含むDNA断片をランダムプライミングキットを用い³²Pで標識しプローブとした。20 μgのpoly (A)⁺ RNAを1% 寒天ゲル(2%formaldehyde)で電気泳動し、ナイロンメンブランにトランスファーした。ハイブリダイゼーションは5xSSPE, 5x Denhardt's 溶液, 50%formamide, 0.1% SDS, 0.2mg/ml 大腸菌DNA 中で42℃一晩行い、最終洗浄条件は、0.3x SSC, 0.1% SDSで50℃で行った。

4) ACTH受容体遺伝子のCOS7細胞での一過性発現

NIH3T3細胞のゲノムDNAを鋳型としてλmCTR8のシークエンス解析に基づいて合成したプライマー間で、PCR法にてマウスACTH受容体遺伝子の全コード領域を含むDNA断片を得た。このDNA断片を発現ベクターp c D L-S R α 296のEcoRI部位に組み込んだ(p S R α m A C T H R)。

COS7細胞は、トランスフェクション前日に1プレート0.8x10⁶個に調整し培養。p c D L-S R α 296およびp S R α m A C T H R それぞれ20μg/440 μlに2.5 M CaCl₂ 50μlを加え、2x HBS (pH 7.1) 550μlを混合し室温30分間インキュベート後、このリン酸カルシウムの共沈殿物を培養細胞に加え、37℃ 4時間 培養

後PBSで2回洗浄し通常の培養液に換え培養した。トランスフェクション48時間後、ACTH 10^{-7} Mを添加し、2 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine存在下に、37℃ 60分培養後、培養液中のcAMPをRIAで測定した。

結果と考察

ヒトACTH受容体遺伝子をプローブとして、マウスゲノムDNAライブラリーの 10^6 個のファージをスクリーニングして8個の陽性ファージを得、本実験では最もシグナルの強かったクローン λ mCTR8について解析した。 λ mCTR8は全長約12kbのインサートをもち、ACTH受容体のコード領域とその5'上流約9kbを含んでいた。マウスACTH受容体遺伝子のコード配列はヒトACTH受容体遺伝子と同様イントロンを含まず、296個のアミノ酸をコードしていた。ヒト及びウシACTH受容体では終止コドンの前のコドンが、TGG及びCAGでTrp及びGlnに翻訳されるが、マウスではここがTAGで終止コドンとなっており、1個アミノ酸が少ない構造であった。

マウスACTH受容体はヒト及びウシと同様にN端側細胞外ドメインに2カ所の糖鎖結合コンセンサス配列をもち、第3番目の細胞内ドメインにAキナーゼによりリン酸化を受けるコンセンサス配列を有していた。ヒト及びウシではThr-204がCキナーゼによるリン酸化部位となっているが、マウスでは同部位はAlaとなっていた。しかし第2番目の細胞内ドメイン中にThr-Met-Arg配列があり、CキナーゼによりThr-143がリン酸化される可能性があると考えられた。

マウスACTH受容体は、ヒト、ウシACTH受容体とは、塩基配列でそれぞれ84.6、80.6%、アミノ酸配列でそれぞれ88.9、78.7%の相同性を示した。他のmelanocortin受容体とは39.6～48.4%のアミノ酸配列の相同性を示した。

Y-1細胞でのノーザン解析では、20 μ gのpoly (A)⁺ RNAを用いて約2kbの単一バンドが検出された。

マウスACTH受容体遺伝子をpcDL-SR α 296に組み込んだ発現プラスミドをCOS7細胞に導入し、ACTHに対する応答性を調べたところ、明らかなcAMPの産生増加を認めた。

以上から本遺伝子は副腎細胞においてその発現がみられ、導入細胞でACTHに応答してcAMPの産生増加を示すこと、既報のヒトACTH受容体遺伝子及びウシACTH受容体cDNAと相同性が非常に高いことから、マウスのACTH受容体遺伝子と考えられた。また、今回クローニングした λ mCTR8はコード領域の上流約9kbを含んでおり、転写調節機構の解析に有用と考えられる。

結語

マウスACTH受容体遺伝子をクローニングし、その解析と真核細胞での発現を検討して、以下の結果を得た。

- 1) マウスACTH受容体遺伝子のコード領域はヒトACTH受容体遺伝子と同様にイントロンを含んでいなかった。
- 2) マウスACTH受容体遺伝子は296個のアミノ酸からなり、ヒトおよびウシのACTH受容体より1個のアミノ酸が少ない構造であった。
- 3) マウスACTH受容体にはN端側細胞外ドメインに2カ所の糖鎖結合部位(Asn-12, Asn-17)とAキナーゼ、Cキナーゼによるリン酸化部位各1カ所 (Ser-209, Thr-143) を認めた。
- 4) ヒトおよびウシのACTH受容体のアミノ酸配列と比較して、それぞれ88.9、78.8%と高い相同性を有していた。
- 5) ノーザン解析の結果では、マウスACTH受容体はY-1細胞で約2kbの単一のmRNAを認めた。
- 6) COS7細胞での一過性発現実験では、ACTHに反応してcAMPの増加を認めた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 本 間 研 一

副 査 教 授 葛 巻 暹

学 位 論 文 題 名

マウス ACTH 受容体遺伝子のクローニングとその発現

I. 目的と背景

1992年にMountjoyらはヒトのACTH受容体及びMSH受容体遺伝子をクローニングした。ノーザン解析からACTH受容体のmRNAは副腎にのみ発現し、MSH受容体のmRNAはmelanocyteのみで発現していることも明かとなった。さらに、脳に特異的に発現している新しいMSH受容体もクローニングされ、これら受容体の細胞特異発現は、転写制御によるものと思われ非常に興味深い。現在まで、ACTHに反応してステロイド産生を示す副腎由来の細胞株はマウスY-1細胞だけである。この細胞株がACTH受容体遺伝子の副腎特異的転写調節機構の研究に適していると考え、マウスACTH受容体遺伝子のクローニングを行うことにした。

II. 方法

1) マウスACTH受容体遺伝子のクローニング

ヒトACTH受容体遺伝子の全コード領域を含むDNA断片を、正常ヒトリンパ球ゲノムDNAを鋳型として、既報のヒトACTH受容体遺伝子を基に合成したプライマー間でPCR法にて得た。そのDNA断片をプローブとし、マウス胸腺リンパ腫由来の細胞株で作成した λ dash ファージゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングした。

2) ノーザン解析

マウスACTH受容体の全コード領域を含むDNA断片をプローブとし、Y-1細胞から抽出した20 μ gのpoly (A)⁺ RNAを1% 寒天ゲルで電気泳動し、ナイロンメンブランにトランスファーし、³²Pで標識した上記プローブとハイブリダイゼーションした。

3) ACTH受容体遺伝子のCOS7細胞での一過性発現

マウスACTH受容体遺伝子の全コード領域を含むDNA断片を発現ベクターpcDL-SR α 296に組み込んだ (pSR α mACTHR)。

COS7細胞は、トランスフェクション前日に1 プレート0.8 $\times 10^6$ 個に調整し培養。pcDL-SR α 296およびpSR α mACTHRそれぞれ20 μ gをリン酸カルシウム法にてトランスフェクションした。

トランスフェクション48 時間後、ACTH 10^{-7} M を添加し、37 $^{\circ}$ C 60 分培養後、培養液中のcAMPを測定した。

III. 結果と考察

ヒトACTH受容体遺伝子をプローブとして、マウスゲノムDNAライブラリーの 10^6 個のファージをスクリーニングして8個の陽性ファージを得、本実験では最もシグナルの強か

ったクローン λ mCTR8について解析した。マウスACTH受容体遺伝子のコード配列はヒトACTH受容体遺伝子と同様イントロンを含まず、296個のアミノ酸をコードしていた。ヒト及びウシACTH受容体では終止コドンの前のコドンが、TGG及びCAGでTrp及びGlnに翻訳されるが、マウスではここがTAGで終止コドンとなっており、1個アミノ酸が少ない構造であった。

マウスACTH受容体はヒト及びウシと同様にN端側細胞外ドメインに2カ所の糖鎖結合コンセンサス配列をもち、第3番目の細胞内ループにAキナーゼによりリン酸化を受けるコンセンサス配列を有していた。また第2番目の細胞内ループ中にThr-Met-Arg配列があり、CキナーゼによりThr-143がリン酸化される可能性があると考えられた。

マウスACTH受容体は、ヒト、ウシACTH受容体とは、アミノ酸配列でそれぞれ88.9, 78.7%の相同性を示した。他のmelanocortin受容体とは39.6~48.4%のアミノ酸配列の相同性を示した。

Y-1細胞でのノーザン解析では、約2kbの単一バンドが検出された。

マウスACTH受容体遺伝子をpcDL-SR α 296に組み込んだ発現プラスミドをCOS7細胞に導入し、ACTHに対する応答性を調べたところ、明らかなcAMPの産生増加を認めた。

以上から本遺伝子は副腎細胞においてその発現がみられ、導入細胞でACTHに応答してcAMPの産生増加を示すこと、既報のヒトACTH受容体遺伝子及びウシACTH受容体cDNAと相同性が非常に高いことから、マウスのACTH受容体遺伝子と考えられた。また、今回クローニングした λ mCTR8はコード領域の上流約9kbを含んでおり、転写調節機構の解析に有用と考えられる。

IV. 結語

マウスACTH受容体遺伝子をクローニングし、その解析と真核細胞での発現を検出して、以下の結果を得た。

- 1) マウスACTH受容体遺伝子のコード領域はヒトACTH受容体遺伝子と同様にイントロンを含んでいなかった。
- 2) マウスACTH受容体遺伝子は296個のアミノ酸からなり、ヒトおよびウシのACTH受容体より1個のアミノ酸が少ない構造であった。
- 3) マウスACTH受容体にはN端側細胞外ドメインに2カ所の糖鎖結合部位と第2, 第3細胞内ループにCキナーゼ, Aキナーゼによるリン酸化部位各1カ所を認めた。
- 4) ヒトおよびウシのACTH受容体のアミノ酸配列と比較して、それぞれ88.9, 78.8%と高い相同性を有していた。
- 5) ノーザン解析の結果では、マウスACTH受容体はY-1細胞で約2kbの単一のmRNAを認めた。
- 6) COS7細胞での一過性発現実験では、ACTHに反応してcAMPの増加を認めた。