

学位論文題名

マウス副腎皮質刺激ホルモン受容体遺伝子構造の解析

学位論文内容の要旨

I. 緒言

1992年、ヒト副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 受容体遺伝子が、1995年、マウスACTH受容体遺伝子がクローニングされた。本受容体はGTP結合蛋白と共役する7回膜貫通型の受容体で、両種間で89.9%の高い相同性を有し、翻訳領域にイントロンを含まないこと、副腎に特異的に発現していること、真核細胞での発現実験でACTHに対しcAMPの増加を認めることが明らかにされた。しかし、両種において完全長のcDNAはクローニングされておらず、遺伝子構造も明らかにされていない。今回、マウスACTH受容体遺伝子の副腎特異的転写調節を解明する研究の一環として、RACE(rapid amplification of cDNA ends)法を用いマウスACTH受容体遺伝子の完全長cDNAを得ることを試み、併せて遺伝子構造の解析を行った。

II. 材料と方法

1) 動物とRNAの抽出

マウスは8週齢の雄Std:ddyから副腎、腎、脳を摘出。guanidinium thiocyanate-caesium chloride法を用い、全RNAを抽出し、オリゴdTラテックス粒子にてポリ(A)⁺RNAを選別した。

2) マウスACTH受容体最長cDNAの解析

(1) 5'-RACE法

マウス副腎ポリ(A)⁺RNA 2 μ gを鋳型にマウスACTH受容体翻訳領域に設定したプライマーを用いて、逆転写(RT)を行った。得られたcDNAの3'端にAmpliFINDER anchorをligateし、これを鋳型として、RTで用いたプライマーより180bp上流に設定したプライマーとAmpliFINDER anchorに相補的配列を持つanchor primer間でpolymerase chain reaction(PCR)を行った。得られたPCR産物を5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動後バンドを抽出し、サブクローニングし、dideoxy chain-termination法で塩基配列を決定した。

(2) 3'-RACE法

マウス副腎ポリ(A)⁺RNA 2 μ gを鋳型に17merのアダプター(ADP)を付加したdT17-ADPをプライマーとし、RTを行い、次に合成されたcDNAを鋳型にプライマーADPと翻訳開始コドンATGより300bp下流に設定したプライマー間でPCRを行った。このPCR産物を1.5%アガロースゲル電気泳動後バンドを回収し、サブクローニング後塩基配列を決定した。

3) マウスACTH受容体5'非翻訳エクソンのクローニング

5'-RACE法で得られた最長cDNAの5'端より109bpのDNA断片を³²Pで標識し、NIH3T3細胞より作成したファージゲノムDNAライブラリーをスクリーニングした。陽性ファージクローンを制限酵素地図の作製、サブクローニング、シーケンシングにより解析した。

4) ノーザン解析

マウス副腎、腎、脳より抽出した全RNA、ポリ(A)⁺RNAを1%アガロースゲル (2%ホルム

アルデヒド)で電気泳動し、ナイロンメンブレンにトランスファーした。マウスACTH受容体遺伝子の全翻訳領域を含むDNA断片および5'-RACE法で得られた最長cDNAの5'端より109bpのDNA断片を³²Pで標識し、プローブとして用いた。

5)RT-PCR

マウス副腎全RNAを鋳型にoligo-dT15プライマーを用いてRTを行い、次に5'-RACE法で得られた最長cDNAの5'端に合致するプライマーと翻訳領域の5'端に設定したプライマー間でPCRを行った。このPCR産物を2.5%アガロースゲルで電気泳動した。

III. 結果

1)マウスACTH受容体の最長cDNA

5'-RACE法では、約400bpに幅の広いバンドを認めた。シーケンシングの結果、翻訳開始コドンATGのアデニンを+1とすると、最長のcDNAの5'端は-374であった。また、-265から-209までの57bp配列を含むcDNAと全く欠くcDNAとが存在した。3'-RACE法では、約1kbにバンドを認めた。これらの結果と既報の翻訳領域の塩基配列から、最長のcDNAは5'非翻訳領域374bpと翻訳領域888bpおよび3'非翻訳領域445bpの1707bpであった。

2)マウスACTH受容体遺伝子の構造

5'-RACE法で得られたcDNAの塩基配列と既報のマウスACTH受容体翻訳領域を含むファージクローンλmCTR8の解析から得た翻訳開始コドンATGの上流1.8kbのゲノム塩基配列を比較したところ、cDNAの-95から-1までは翻訳領域に連続して存在し、-208から-96までは翻訳領域を含むエクソンの上流1.5kbに存在したが、-374から-209までの塩基配列は存在しなかった。また、-374から-266までの109bpのDNA断片をプローブとして新たにゲノムDNAライブラリーをスクリーニングし、陽性クローン2個を解析した結果、cDNAの-374から-266までの配列は1個のエクソンとして存在し、その下流6.0kbに-265から-209までの57bp配列が存在した。また、3'-RACE法で得られたcDNAと翻訳開始コドンATGの下流1.4kbのゲノム塩基配列との比較により、3'非翻訳領域は翻訳領域に連続して存在していることが確認され、ポリAシグナルはATG下流1291に存在していた。これらの結果より、本遺伝子は、少なくとも4個のエクソンと3個のイントロンからなることが明らかとなった。

3)ノーザン解析とRT-PCR

マウス副腎では両プローブとも約1.8kbに単一のバンドを認めたが、脳、腎では認めなかった。RT-PCRによる解析では、約400bp近傍に予測される2本のバンド、すなわち-265から-209までの57bp配列を含む426bpと含まない369bpと考えられるバンドを認めた。

IV. 考察

RACE法を用いてマウスACTH受容体の完全長cDNAを得ることを試みた。今回得られた結果から最長のcDNAは1707bpであったが、ノーザン解析からのmRNAは約1.8kbであり、得られたcDNAの5'端が転写開始点であるとは断言し難い。本遺伝子のエクソンを5'側から仮に第1(-374から-266)、第2(-265から-209)、第3(-208から-96)、第4(-96から1333)エクソンとすると、第1、2、3エクソンは5'非翻訳領域をコードしており、RT-PCRの結果と5'-RACE法で得たクローンの塩基配列の比較から副腎では選択的スプライシングにより第2エクソンを含むmRNAと含まないmRNAの2種類存在することが明らかになった。これら5'非翻訳エクソンの存在およびその選択的スプライシングの意義については一部の遺伝子で翻訳効率の調節に関わっていると推測されているが、今後の検討が必要である。

最近、やはり5'-RACE法を用い、ヒトのACTH受容体遺伝子に翻訳領域を含むエクソンの5'上流にイントロンを介して5'非翻訳エクソンが存在するという報告がなされた。このヒトの5'非翻訳エクソンとマウス第1エクソン間に塩基配列上85.7%の高い相同性を認めたが、ヒトではマウスの第2、3エクソンに相当する5'非翻訳エクソンは存在せず、今後ヒトACTH受容体遺伝子構造の詳細な解析が待たれる。

V. 結語

- 1) マウスACTH受容体遺伝子は少なくとも4個のエクソンと3個のイントロンからなる。
- 2) 最も下流に位置する第4エクソンは全翻訳領域、3'非翻訳領域を含んでおり、他の3個のエクソンは5'非翻訳領域を構成していた。
- 3) 副腎においては選択的スプライシングにより5'非翻訳エクソンのうち、第2エクソンを含むmRNAと含まないmRNAの2種類のmRNAが生じる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 柿 沼 光 明

副 査 教 授 本 間 研 一

学 位 論 文 題 名

マウス副腎皮質刺激ホルモン受容体遺伝子構造の解析

1992年、ヒト副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 受容体遺伝子が、1995年、マウスACTH受容体遺伝子がクローニングされた。本受容体はGTP結合蛋白と共役する7回膜貫通型の受容体で、両種間で88.9%の高い相同性を有し、翻訳領域にイントロンを含まないこと、副腎に特異的に発現していること、真核細胞での発現実験でACTHに対しcAMPの増加を認めることが明らかにされた。しかし、両種において完全長のcDNAはクローニングされておらず、遺伝子構造も明らかにされていない。今回、マウスACTH受容体遺伝子の副腎特異的転写調節を解明する研究の一環として、RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法を用いマウスACTH受容体遺伝子の完全長cDNAを得ることを試み、併せて遺伝子構造の解析を行った。

5'-RACE法および3'-RACE法を用いて得られた結果と既報の翻訳領域の塩基配列から、最長のcDNAは5'非翻訳領域374bpと翻訳領域888bpおよび3'非翻訳領域445bpの1707bpであった。この最長cDNAの塩基配列と、既報のマウスACTH受容体遺伝子翻訳領域を含むファージクローン λ mCTR8の解析から得た翻訳開始コドンATGの上流1.8kbのゲノム塩基配列を比較したところ、cDNAの-95から-1までは翻訳領域に連続して存在し、-208から-96までは翻訳領域を含むエクソンの上流1.5kbに存在したが、-374から-209までの塩基配列は存在しなかった。この5'非翻訳領域をクローニングするために、-374から-266までの109bpのDNA断片を 32 Pで標識してプローブとして、NIH3T3細胞より作成したファージゲノムDNAライブラリーをスクリーニングした。陽性ファージクローン9個を得、このうち2クローンを制限酵素地図の作製、サブクローニング、シーケンシングにより解析した。この結果、cDNAの-374から-266までの配列は1個のエクソンとして存在し、その下流6.0kbに-265から-209までの57bp配列が存在した。また、3'-RACE法で得られたcDNAと翻訳開始コドンATGの下流1.4kbのゲノム塩基配列との比較により、3'非翻訳領域は翻訳領域に連続して存在していることが確認され、ポリAシグナルはATG下流1291に存在していた。これらの結果より、本遺伝子は、少なくとも4個のエクソンと3個のイントロンからなることが明らかとなり、上流の3個のエクソンは5'非翻訳領域を構成し、最下流のエクソンは5'非翻訳配列95bp、全翻訳領域、全3'非翻訳領域を含んでいた。また、5'-RACE法で、-265から-209までの57bp配列を含むクローンと含まないクローンとが存在したが、4個のエクソンを仮に5'上流より第1、2、3、4と表しているが、この57bpは第2エクソンに相当することが明かとなり、このことからalternative splicingにより、第2エクソンを含むmRNAと含まないmRNAとが生じることが予想された。

このalternative splicingを確認するために、副腎total RNAを鋳型にoligo-dT17 primerを用いてRTを行った後、第2エクソンを挟むように、第1エクソンと第4エクソンに設定したプライマー間でPCRを行った。このPCR産物を電気泳動したところ、400bp付近に2本のバンドを認め、これらは第2エクソンを含む426bpと含まない369bpと考えられた。

さらに、本遺伝子の副腎での発現をノーザン解析により確認した。マウス副腎、腎、脳より抽出した全RNA、ポリ(A)⁺RNAを用い、マウスACTH受容体遺伝子の全翻訳領域を含むDNA断片および第1エクソンにあたる109bpのDNA断片を³²Pで標識し、プローブとして用いた。マウス副腎では両プローブとも約1.8kbに単一のバンドを認めたが、脳、腎では認めなかった。

本研究ではRACE法を用いてマウスACTH受容体の完全長cDNAを得ることを試みた。今回得られた結果から最長のcDNAは1707bpであったが、ノーザン解析からのmRNAは約1.8kbであり、長さはほぼ一致しているが、転写開始点の決定のためにはさらに、primer extension法やS1ヌクレアーゼプロテクションアッセイ法が必要であると思われる。本遺伝子の第1、2、3エクソンは5'非翻訳領域をコードしており、RT-PCRの結果と5'-RACE法で得たクローンの塩基配列の比較から副腎では選択的スプライシングにより第2エクソンを含むmRNAと含まないmRNAの2種類存在することが明らかになったが、これら5'非翻訳エクソンの存在およびその選択的スプライシングの意義については不明であり、今後の検討が必要である。

ヒトACTH受容体遺伝子の構造は未だ解明されておらず、本研究でマウスACTH受容体遺伝子の構造が明らかになったことは、今後ヒトACTH受容体遺伝子の構造の解明や、本遺伝子の副腎での転写調節機構の解明に役立つと考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。