

学 位 論 文 題 名

Genomic Structure and Expression of the Medaka Fish  
Homolog of the Mammalian Guanylyl Cyclase B

(哺乳類グアニル酸シクラーゼBのメダカホモログ遺伝子の構造と  
発現に関する研究)

学位論文内容の要旨

cGMP を二次伝達物質とする情報伝達系は、光受容における陽イオンチャンネルの開閉や血管平滑筋の弛緩による血圧の低下、腎臓における利尿作用など血圧、体液量調節のほか、骨形成や細胞増殖など広範な生物作用に関与することが知られている。cGMP はグアニル酸シクラーゼによって GTP から合成される環状ヌクレオチドの一種であり、グアニル酸シクラーゼには細胞質に存在する可溶性型と細胞膜に結合し、受容体あるいは受容体と共役した膜結合型のタンパク質としては異なる2種類が知られている。膜結合型酵素には多くの isoform が知られており、現在までに哺乳類では7種類の cDNA が単離・構造決定されている。また、個々の isoform は生体内での発現部位や活性化機構が異なっている。しかし、これらの isoform 中、遺伝子の構造解析が行われたのはまだ一部で、しかも発現調節機構についての知見はほとんどない。本研究では最初に、メダカ(*Oryzias latipes*)から哺乳類グアニル酸シクラーゼ B タイプ (GC-B) の cDNA をクローニングし、成魚の各組織及び各種の発生段階の胚における発現を検討した。次に、この遺伝子を単離し、全生物で初めて GC-B タイプのエクソン・イントロン構造を明らかにした。最後に 5'-上流域に green fluorescence protein (GFP) を融合させたコンストラクトをメダカ胚に顕微注入し、基本的シス領域の解析を行った。

メダカグアニル酸シクラーゼ B (GC-B) cDNA のクローニング及び発現解析：

哺乳類 GC-B は脳、腎臓、肺、副腎、大動脈、消化管など広く組織に分布していることが知られている。そこで最初にメダカ脳から cDNA library を作製し、各種グアニル酸シクラーゼで保存された、ウニ精子膜グアニル酸シクラーゼの触媒領域をプローブとしてスクリーニングを行った。得られたクローンのホモロジー検索から既知の GC-B タイプと非常に相同性の高いクローンを単離することができた。その後 5'-RACE 法により完全長の cDNA を得た。推定されるアミノ酸配列と各種グアニル酸シクラーゼとの分子系統学的解析ではウナギ GC-B と最も相同性が高く、またすべての GC-B で保存されている共通の8アミノ酸残基も保持していた。この遺伝子のメダカ成魚における各組織及び胚発生過程における発現様式を RT-PCR 法とノーザンブロット法で解析した。その結果、発現量には差異が見られるものの、調べたすべての組

織（脳、眼、鰓、心臓、腎臓、消化管、生殖腺など）で発現が見られた。また、胚発生過程では受精後1日胚からその発現が見られ、その後5日胚まで徐々に発現量が増加していることが明らかになった。

#### メダカ GC-B 遺伝子の一次構造の解析：

全生物においてこれまで GC-B 遺伝子の塩基配列については全く報告がなかった。一方、哺乳類では膜結合型グアニル酸シクラーゼの isoform の一種、GC-A 遺伝子の塩基配列が決定されているが、そのサイズは 16 kbp 前後であると報告されている。一般的に、魚類は哺乳類よりイントロンが短いと言われており、中でもメダカの平均ゲノムサイズは 800 Mb とヒトの平均ゲノムサイズの 4 分の 1 であり、メダカ遺伝子の全長はヒトよりも短く、解析しやすいと考えられる。このような利点を生かし、メダカ GC-B cDNA をプローブとしてメダカゲノムライブラリーからゲノム DNA クローンのスクリーニングを行い、メダカ GC-B 遺伝子の全塩基配列を決定した。その結果、この遺伝子は全長約 93 kbp で 22 個のエキソン（1. 6：細胞外領域、7：膜貫通領域、8. 15：kinase-like 領域、16. 22：触媒領域）から構成されており、イントロンの挿入されている位置はナトリウム利尿ペプチド受容体の一種である GC-A とほとんど同じであることが明らかになった。このことから GC-A と GC-B は共通の祖先遺伝子から進化してきたことが推測される。さらにプライマー伸長法により転写開始点を決定したところ、少なくとも転写開始点より上流 500 bp の領域には RNA ポリメラーゼの認識部位である TATA box が存在しなかった。また、転写開始点から約 5 kbp までの上流領域には多数の転写因子結合コンセンサス配列（AP-1、AP-2、Sp-1、GATA など）が存在していた。さらにゲノミックサザン解析によりメダカゲノム中におけるこの遺伝子のコピー数を推定したところ、少なくとも他に関連遺伝子が 1 つ存在する結果が得られた。

#### 5'-上流領域の解析：

転写開始点より上流 5 kbp と green fluorescence protein (GFP) をレポーター遺伝子とする融合遺伝子プラスミドを作製し、これを 1. 2 細胞期のメダカ胚に顕微注入し、GFP 蛍光発光を指標に胚を固定することなく生きたまま、この上流領域がプロモーター活性をもつかどうかを検討した。融合遺伝子を顕微注入した胚は受精後 4 日で約 20% が生存し、このうちの約 29% の胚で GFP 蛍光が観察された。しかし、この蛍光はすべて胚の表面に存在するいくつかの細胞に限られ、脳、鰓、眼など RT-PCR 及びノーザン解析で検出された組織では観察されなかった。これはメダカ GC-B 遺伝子は各組織での発現量が少ないこと、今回用いた 5 kbp 上流域ではこれらの組織での発現には不十分であることによると考えられる。しかしながら、胚の表面に存在する一部の細胞ではあるが GFP 蛍光が見られたことから、5 kbp 上流領域にはプロモーターとして機能する領域が存在しているものと考ええる。

以上の研究結果は魚類のみならず哺乳類におけるグアニル酸シクラーゼ遺伝子の構造解析や、まだ確定されていないグアニル酸シクラーゼ遺伝子の発現を調節している遺伝子上のシス領域や転写因子の解明に役立つものと考えられる。さらにこれまで一般に魚類の遺伝子はすべて哺乳類よりも小さいといわれていたが、本研究で得られ

た極端に大きな遺伝子の存在は今後活発に行われるであろう魚類のゲノム解析において考慮すべき事例となるものとする。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 範 男

副 査 教 授 高 橋 孝 行

副 査 教 授 山 下 正 兼

学 位 論 文 題 名

## Genomic Structure and Expression of the Medaka Fish Homolog of the Mammalian Guanylyl Cyclase B

(哺乳類グアニル酸シクラーゼBのメダカホモログ遺伝子の構造と  
発現に関する研究)

近年、細胞内情報伝達系に関する研究が盛んに行われている。その中で、cGMPを二次伝達物質とする情報伝達系は、ウニ精子活性化ペプチド受容体が膜結合型グアニル酸シクラーゼであることが証明されてからその研究が飛躍的に進展したもので、解明すべき課題の多い情報伝達系である。

cGMPを合成する酵素には細胞質に存在する可溶性型と細胞膜に結合し、受容体あるいは受容体と共役した膜結合型のタンパク質としては異なる2種類が知られている。膜結合型酵素には多くの isoform が知られており、個々の isoform は生体内での発現部位や活性化機構が異なっていると考えられている。これらの isoform の中で、遺伝子の構造解析が行われたのは一部であり、しかも発現調節機構についての研究は皆無である。申請者は、この情報伝達系のうち、血管平滑筋の弛緩による血圧の低下、腎臓における利尿作用など血圧、体液量調節のほか、骨形成や細胞増殖など広範な生物作用に関与することが示唆されている cGMP 情報伝達系の鍵酵素である B 型グアニル酸シクラーゼ (GC-B) の遺伝子構造の解明、その発生過程における発現調節の解明を目的とした研究を行い、多くの重要な知見を得た。

申請者はまず、メダカ脳の RNA を用いて cDNA library を作製し、ウニ精子膜結合型グアニル酸シクラーゼの触媒領域をプローブとしてスクリーニングを行い、グアニル酸シクラーゼに相当する cDNA 断片のクローンを単離し、5'-RACE 法を併用して完全長の cDNA を得た。分子系統学的解析によって得られた cDNA の塩基配列から推定したアミノ酸配列はウナギ GC-B と最も相同性が高く、また哺乳類の GC-B で保存されている 8 アミノ酸残基も保持していたことから、この遺伝子が GC-B であると結論

し、メダカ成魚の各組織及びメダカ胚発生過程における発現様式を RT-PCR 法とノーザンブロット法で解析し、この遺伝子の発現量には差異はあったが、調べたすべての組織（脳、眼、鰓、心臓、腎臓、消化管、生殖腺など）で発現が見られることを明らかにした。さらに、胚発生過程では受精後 1 日胚からその発現が見られ、その後 5 日胚まで徐々に発現量が増加していることも明らかにした。

一方、申請者はメダカの平均ゲノムサイズ（800 Mb）がヒトの平均ゲノムサイズ（4000 Mb）の 4 分の 1 であり、メダカ遺伝子の全長はヒトよりも短く、解析しやすいと考え、メダカ GC-B cDNA をプローブとしてメダカゲノムライブラリーからメダカ GC-B ゲノム DNA クローンを得、その全塩基配列を決定した。その結果、この遺伝子は全長約 93 kbp で 22 個のエキソン（1-6：細胞外領域、7：膜貫通領域、8-15：kinase-like 領域、16-22：触媒領域）から構成されており、イントロンの挿入されている位置はナトリウム利尿ペプチド受容体の一種である哺乳類の GC-A とほとんど同じであることを明らかにした。このことは GC-A と GC-B が共通の祖先遺伝子から進化してきたことを推測させるもので、GC-B の転写調節を解明するためには重要な知見である。さらに、申請者はプライマー伸長法により転写開始点を決定し、転写開始点から約 5 kbp までの上流領域には多数の転写因子結合コンセンサス配列（AP-1、AP-2、Sp-1、GATA など）が存在していることを明らかにした。また、ゲノミックサザン解析を行い、メダカゲノム中には GC-B 遺伝子 1 つと関連遺伝子が 1 つ存在することを明らかにした。

申請者はさらに研究を進め、転写開始点より上流 5 kbp と緑色蛍光タンパク質(GFP) 遺伝子をレポーター遺伝子とする融合遺伝子プラスミドを作製し、これを 1-2 細胞期のメダカ胚に顕微注入し、GFP の発する蛍光を指標にして、この上流領域がプロモーター活性をもつことを明らかにした。

以上の研究結果は魚類のみならず哺乳類におけるグアニル酸シクラーゼ遺伝子の構造解析や、まだ確定されていないグアニル酸シクラーゼ遺伝子の発現を調節している遺伝子上のシス領域や転写因子の解明研究には重要な知見である。また、これまで一般に魚類の遺伝子はすべて哺乳類よりも小さいと考えられていた通説が、本研究で得られた極端に大きな遺伝子の存在によって修正を求められることになり、今後活発に行われるであろう魚類のゲノム解析において考慮すべき重要な事例と考える。

よって申請者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。