

学 位 論 文 題 名

Studies on the Structure and Function of Natriuretic
Peptide Receptors/Guanylyl cyclases and
Orphan Receptor in Medaka Fish

(メダカナトリウム利尿ペプチド受容体型及び
新規グアニル酸シクラーゼの構造と機能に関する研究)

学位論文内容の要旨

cGMP は、直接イオンチャネルの開閉や、神経情報伝達に関与するほか、調節タンパク質遺伝子の発現調節を介して細胞増殖の制御に関与することにより、恒常性維持に重要な役割を果たしている。GTP から cGMP への変換を触媒する酵素、グアニル酸シクラーゼ (GC) は、その構造とリガンドの特性から可溶性型と膜結合型の 2 種類に分けられ、それぞれに複数のアイソフォームが知られている。哺乳類をはじめとする脊椎動物のほか、センチュウやショウジョウバエなどさまざまな生物に多くの GC アイソフォームが存在することが分かってきた。また、これまでにメダカにおける GC 遺伝子の構造解析および GC/cGMP 情報伝達系の機能解析の研究により、可溶性型、膜結合型を含め哺乳類で発現している全てのタイプの GC 遺伝子が存在することが明らかとなった。実験生物としてのメダカ (*Oryzias latipes*) は、ゲノムサイズが 800Mb でヒトの 1/4 と小さい。脊椎動物の様々な研究のためのモデル生物として有用な特色を持つメダカの GC アイソフォーム遺伝子を用いて、種の多様化に伴うゲノム構成変化の解明と、それらの機能を解析する目的で研究を行った。

膜結合型 GC は、膜一回貫通型で細胞膜上の受容体として機能し、細胞外領域にリガンドが結合することにより、細胞内で触媒領域が活性化され cGMP を合成する。脊椎動物では、感覚器官型、エンテロトキシン/グアニリン受容体型 (GC-C)、そしてナトリウム利尿ペプチド (NP) 受容体型 (GC-A 及び GC-B) の 3 種類に大別される。本研究では、まずメダカから NP 受容体 GC-A のホモログ cDNA の全長を含むクローンを 2 種類得て、これらの塩基配列を決定した。予想されるアミノ酸配列をもとに分子系統解析をおこなった結果、2 種類の遺伝子とも GC-A のホモログであることが推測された (OIGC2、OIGC7 と命名)。NP 受容体についてはこれまでに、リガンドや生体内での分布などから GC-A、GC-B に大別されているが、それぞれ 1 種類ずつしか見つかっていなかった。GC-B タイプはメダカから 1 種類 (OIGC1 と命名) が単離されているが、GC-A タイプはメダカでは 2 種類存在することが明らかになった。これら 2 種類の遺伝子の mRNA 転写開始点を Primer Extension 法によって決定し、Northern Blot 法によりこれらの mRNA サイズはそれぞれ 4.7 kb 及び 4.0 kb であることも確認した。

メダカ各組織における発現解析を RNase Protection 法を用いて行った結果、どちらも腎臓に強く発現しており、鰓、生殖巣でも比較的強い発現がみられた。さらに、近交系メダカ(Hd-rR)の BAC ライブラリーからこれら2種類の遺伝子を単離し、塩基配列を決定した(それぞれ 33kbp、44kbp)。その結果、メダカ GC-A のイントロンは極めて長く、その内にいくつかの特徴的な繰り返し配列が存在していること、またメダカの他の遺伝子中のイントロン内にも同一配列が多種類存在していることなどが明らかになった。

また、全生物で既知のいずれのタイプにも属さない新規 GC (OIGC8 と命名) をメダカ精巣に見い出した。この OIGC8 の cDNA 全長は約 5kbp だが、細胞外領域は既知 GC の約半分の大きさであり、予想されるアミノ酸配列も既知のものとは異なる特徴がある。BAC クローンを用いたゲノム構造解析の結果、全長 14.3kbp で 24 個のエキソンから構成されており、ゲノム構造の点でも既知の膜結合型 GC とは異なるものであることがわかった。RNase Protection 法による発現様式解析の結果、腎臓と精巣で多く発現していたが、Northern Blot 法により脳には 3.3kb の短いタイプの mRNA が存在していることが明らかになった。転写開始点を調べた結果、2 つの転写開始点があることが分かり、組織によってそれらを使い分けていることが示唆された。メダカで発見した新規遺伝子の転写・翻訳産物が受容体機能を持つかどうかを検討するため、COS-7 細胞に強制発現させ、酵素活性を測定した。この GC は膜分画に存在し、cGMP 合成能を示すが、メダカ各組織から得た抽出液を反応させても cGMP 合成能を活性化することはなかった。したがって、リガンド不明の orphan receptor と分類した。このことから、メダカ GC においてまだ解明されていない受容体活性化機構、あるいは活性化制御機構が転写、翻訳のレベルで存在することが予想された。

さらに、メダカ NP 受容体型 GC のリガンドを検討する目的で、培養細胞 COS-7 に OIGC1、OIGC2、OIGC7 それぞれのタンパク質を強制発現させ、メダカ組織抽出液による cGMP 合成能の活性化を測定した。その結果、OIGC1 は脳、OIGC2 は心臓、OIGC7 は脳と心臓の抽出液を反応させたときに組織特異的に cGMP の合成が見られた。これらのことはメダカ NP は脳と心臓に多く存在し 3 種類の受容体それぞれに異なるリガンドが存在していることを示唆するものである。また、ラットの NP を作用させた結果、OIGC1 は CNP によって、OIGC2 は ANP によって特異的に活性化されるのに対し、OIGC7 は ANP、BNP、CNP だけではなく、哺乳類 GC-A、GC-B を活性化できない C-ANF によっても活性化され、受容体のリガンド特異性に大きな差があることが明らかになった。以上のことから、メダカでは NP 受容体型 GC を介した情報伝達系の関与する代謝制御の調節機構は他の脊椎動物と異なることが推測された。

また、最近メダカの NP が 5 種類 (BNP と 4 種類の CNP) 同定されたので、これらの受容体と考えられるメダカ GC に対する特異性を探究するために、培養細胞に発現した各種メダカ GC に対する効果を検討した。その結果、メダカ BNP は OIGC2、OIGC7 を活性化したが OIGC1 は活性化しなかった。また 4 種類の CNP は、それぞれ特長が異なり CNP-4 が最も強く OIGC1 を活性化し、CNP-1、CNP-2 もそれに準ずる活性化を示したのに対し、CNP-3 はほとんど OIGC1 を活性化しなかった。興味深いことに CNP では活性化されない GC-A タイプに属する OIGC2、OIGC7 がそれぞれ CNP-3、CNP1 によって活性化された。これらの複雑なリガンド特異性によって制御されるナトリウム利尿ペプチド受容体型グアニル酸シクラーゼの機能は、水生生物であるメダカの多様な環境変化(塩分、浸透圧など)に適応していくために、体液調節や塩分濃度などの

恒常性を保つ仕組みをになっているものと推測される。

最後に、昆虫細胞発現系を用いて GST 融合発現タンパク質として OIGC1,2,7,8 の細胞内及び触媒領域を発現させ、その酵素活性を測定した。また X 線結晶解析のため OIGC1 の触媒領域のみを GST 融合タンパク質として発現させ、その精製法を確立した。

以上の研究結果は、ゲノム構造解析からグアニル酸シクラーゼファミリーの多様化を解析する上での重要な手がかりであり、また、cGMP 情報伝達系による魚類の体液調節、海水環境への適応能における役割の解析に役立つものと考えられる。

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 助教授 清 水 隆

副 査 助教授 田 中 実

副 査 助教授 伊 藤 悦 朗

学 位 論 文 題 名

Studies on the Structure and Function of Natriuretic Peptide Receptors/Guanylyl cyclases and Orphan Receptor in Medaka Fish

(メダカナトリウム利尿ペプチド受容体型及び
新規グアニル酸シクラーゼの構造と機能に関する研究)

GTP から cGMP への変換を触媒する酵素、グアニル酸シクラーゼ (GC) は、その構造とリガンドの特性から可溶性型と膜結合型の 2 種類に分けられ、それぞれに複数のアイソフォームが知られている。これまでにメダカにおける GC 遺伝子の構造解析及び GC/cGMP 情報伝達系の機能解析の研究により、可溶性型、膜結合型を含め哺乳類で発現している全てのタイプの GC 遺伝子が存在することが明らかとなった。メダカ (*Oryzias latipes*) は、ゲノムサイズが 800Mb でヒトの 1/4 と小さい。本学位論文は、脊椎動物のモデル動物として有用な特色をもつメダカの GC アイソフォーム遺伝子を対象にして、種の多様化に伴うゲノム構成変化の解明とそれらの機能解析を目的として、ナトリウム利尿ペプチド受容体型および新規 GC のゲノム構造と発現、またリガンド特異性による活性化機構の解析を行ったものである。

学位論文は 4 章からなり、第 1 章では、メダカにおける GC-A タイプのホモログ cDNA を 2 種類 (*OIGC2*, *OIGC7*) 単離し、メダカ各組織における発現解析を RNase Protection 法を用いて行い、両遺伝子とも腎臓に強く発現しており、鰓、生殖巣にも比較的強い発現していることを明らかにした。さらに、これらの遺伝子のゲノム構造解析の結果、これらの遺伝子のイントロンは哺乳類のホモログ遺伝子に比べて非常に長く、イントロン内に同一配列が多種類存在していることを明らかにし、ゲノムの多様性と進化を議論する上で貴重な知見を得ている。

第 2 章では、哺乳類では発見されていない新規 GC 遺伝子 (*OIGC8*) を単離し、構造解析の結果、その細胞外領域が既知 GC の約半分の大きさであることを明らかにした。また、RNase Protection 法及び Northern blot 法による発現様式解析の結果、*OIGC8* は主に腎臓と精巣では 5kb の転写産物が、脳では 3.3kb の転写産物が認められた。また、転写産物の違いは転写開始点の違いによることを明らかにした。さらに、培養細胞発現系を用いた検討の結果、*OIGC8* は cGMP 合成能を示したが、メダカ各組織から得た抽出液を作用させても活性化することはなかった。従って、*OIGC8* はリガンド不明の orphan receptor と分類した。以上の結果は、メダカ GC 遺伝子は転写、翻訳のレベルで発現制御されていることを示唆している。

第 3 章ではメダカナトリウム利尿ペプチド (BNP と 4 種類の CNP) と COS-7 細胞発現系を用いて、各種メダカ GC のリガンド特異性を検討し、一次構造の比較検討結果より CNP では活性化されない GC-A タイプと思われた *OIGC2*, *OIGC7* がそれぞれ CNP-3, CNP1 によって活性化される知見を得、メダカナトリウム利尿ペプチド受容体は哺乳類とは異なるリガンド特異性を示

すことを明らかにした。これらの複雑なリガンド特異性によって制御されるナトリウム利尿ペプチド受容体型 GC の機能は、水生生物であるメダカの多様な環境変化（塩分、浸透圧など）に適応していくために、体液調節や塩分濃度などの恒常性を保つ仕組みを担うための適応の結果であることを示唆している。

第 4 章では昆虫細胞発現系を用いて GST 融合発現タンパク質として OIGC1,2,7,8 の細胞内及び触媒領域を発現させ、その酵素活性を測定した。また X 線結晶解析のため OIGC1 の触媒領域のみを GST 融合発現タンパク質として発現させ、その精製法を確立した。

以上の一連の研究結果は、グアニル酸シクラーゼファミリーの多様化をゲノムを通して考察する手がかりとなり、また、魚類における体液調節、海水環境への適応能における役割の解析に貢献するものと考えられる。

よって著者は、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。