

学 位 論 文 題 名

Promoter and Functional Analysis of
Medaka Fish (*Oryzias latipes*) Soluble Guanylyl Cyclase

（メダカ可溶性型グアニル酸シクラーゼの転写調節機構および
初期発生における機能解析）

学位論文内容の要旨

細胞内二次伝達物質サイクリック GMP (cGMP) は浸透圧、血圧の調節、神経細胞の発生・分化、感覚器官におけるシグナル変換など多くの生理現象に関与している。cGMP を合成する酵素、グアニル酸シクラーゼ (GC) には膜結合型と可溶性型のタンパク質としては異なる 2 種類がある。そのうち可溶性型酵素 (sGC) は α と β の 2 種のサブユニットのヘテロダイマー形成が酵素活性に必須であり、一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) などの気体分子により活性化される。sGC の生化学的特性の検討や、成体組織における発現解析に関する報告は現在までに多数あるが、その遺伝子構造や、転写・発現調節機構についての知見は皆無であるのが現状である。さらに、初期発生過程における NO/cGMP 情報伝達系の重要性については報告されているものの、生体組織での機能解析に比べて研究が立ち遅れており、その作用部位・機構は不明である。よって、これらの命題を明らかにすることが、sGC が関わる情報伝達系の作用機構およびその活性調節を理解するために急務であると考えられる。

1. メダカ可溶性型グアニル酸シクラーゼの転写調節領域の解析：

申請者の所属する研究室では脊椎動物のモデル生物としてメダカを用いて、グアニル酸シクラーゼ/cGMP 情報伝達系の発現調節機構の解析を目指しており、その研究の一環として脊椎動物を含むすべての生物で初めて本酵素遺伝子のゲノム構造を解析し、二つのサブユニット遺伝子が染色体上で約 1kbp のスペーサーを挟んでタンデムに並ぶことが明らかになっていた。これらサブユニットの共発現が酵素活性に必須なことから sGC の 2 つのサブユニットには協調的な転写調節が必要と考えられていた。申請者は、プライマー伸長法によりそれぞれの遺伝子の転写開始点を決定し、哺乳類培養細胞およびメダカ胚細胞を用いてそれぞれの遺伝子のプロモーター解析を行い、基本転写活性に必須な領域を同定し、両遺伝子が TATA box 非依存的な転写調節を受けていることを明らかにした。また申請者は、2 種類のレポーター遺伝子を用いて同時に異なる 2 種類のレポーター活性が測定可能なアッセイ系を確立し、 α_1 、 β_1 プロモーター間での協調的転写制御機構の存在を示唆する結果を得た。これらの領域は多種間でも高い相同性を持ち共通のシス配列を持つことから、このような機構は種間共通である可能性が示唆される。

2. NO/cGMP 情報伝達系のメダカ初期胚における機能解析：

これまでの NO/cGMP 情報伝達系に関する研究は成体組織を用いた生理作用に関与するものがほとんどであり、動物の初期発生への関与の報告は多少あるものの、その機能・機構に関する知見は皆無であった。申請者は初期発生における NO/cGMP 情報伝達系が関わる機能解析を行う目的で、NO/cGMP 情報伝達系の構成要素である、脳型 NO 合成酵素 (nNOS) および cGMP 依存性プロテインキナーゼ (PKG I、II) をメダカより単離した。さらにメダカ発生過程における関連遺伝子の発現開始時期を RT-PCR により検討した。次に、これら関連遺伝子の初期発生における発現パターンを明らかにするためにホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行なった。sGC の各々のサブユニットは胚全体に発現が拡散しているが、nNOS は体節形成期に尾芽で強い発現が見られ、発生が進むにつれ耳胞、脳室周囲組織にも発現が認められるようになる。また、PKG I は神経管での発現が発生初期から認められ、次第に鰓弓でも発現がみられるようになった。このように、NO/cGMP 情報伝達系が機能するためには、グアニル酸シクラーゼ自身ではなく、そのエフェクター分子が限局することが必要であると考えられる。このように NO/cGMP 情報伝達系関連遺伝子の発現を発生過程で追った報告は、申請者による試みが初めてであり、これらの遺伝子の発生過程における発現様式が明らかになったことで NO/cGMP 情報伝達系の初期発生での機能解析の研究分野において有用な知見をもたらした。

さらに申請者は、NO/cGMP 情報伝達系の初期発生における機能解析を個体レベルで行なうため、アンチセンスオリゴヌクレオチドのメダカ胚への導入による sGC および、その下流因子 PKG I の機能阻害実験を行なった。両者の結果はほぼ同じであり、アンチセンスオリゴ導入胚では後期原腸胚より胚体の左右で死細胞が認められた。また、体節形成の乱れ、中枢神経系、特に眼の形成不全（癒合眼）や耳胞の肥大を引き起こすことが明らかになった。特に、 α_2 アンチセンスオリゴ導入胚では尾芽において細胞死が認められ、同所での nNOS mRNA の発現パターンと一致している。さらに、 β_1 アンチセンスオリゴ導入胚では著しい発生遅滞が引き起こされる事が明らかになった。このように β_1 アンチセンスオリゴ導入胚が他の場合に比べ、より重篤な表現型を引き起こすことは、 β_1 サブユニットが α_1 、 α_2 両サブユニットとダイマーを形成しうるため、 α_1/β_1 および α_2/β_1 両型の活性型酵素の機能を阻害することによると考えられる。逆に PKG I の過剰発現胚では前脳領域が肥大し、小眼となる個体が観察された。この結果は、すでに報告されている PKA の機能阻害および過剰発現実験とはまったく逆の表現型を示した。また、初期発生における PKG の基質候補の一つであった、転写因子 Gli が *in vivo* においても NO/cGMP 情報伝達系によってリン酸化されることが哺乳類培養細胞を用いた実験で明らかになった。Gli は PKA によって活性調節を受けることがすでに報告されており、このような結果は Gli を通じた cAMP シグナルと cGMP シグナルのクロストークが初期発生においては重要であることを示唆している。

以上、申請者は一貫して初期発生における NO/cGMP 情報伝達系の転写調節機構および機能解析を小型魚類メダカを用いて行なってきた。メダカには哺乳類で知られている全てのタイプのグアニル酸シクラーゼが発現しており、体外受精で、しかも胚が透明であることから初期発生の観察が容易で、かつ多くの発生工学的手法を適用することが可能である。このような理由から本研究のようなグアニル酸シクラーゼの個体レベルの機能解析には最適のモデル生物である。本研究は、従来の哺乳類を用いた研

究では解析が困難であった個体レベルでの初期発生における NO/cGMP 情報伝達系の理解に大きな手がかりを与えるものと思われる。また、これらの研究によって明らかになった新たな知見は脊椎動物共通の NO/cGMP 情報伝達系の機能として、今後この分野の研究の発展に大きく貢献するものと確信している。

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

Promoter and Functional Analysis of Medaka Fish (*Oryzias latipes*) Soluble Guanylyl Cyclase

(メダカ可溶性型グアニル酸シクラーゼの転写調節機構および
初期発生における機能解析)

細胞内二次伝達物質である環状 GMP (cGMP) は血管平滑筋の弛緩による血圧の調節、神経細胞の発生・分化、感覚器官におけるシグナル変換など多くの生理的現象において重要な役割を担っている。cGMP 合成酵素の一つ、可溶性型グアニル酸シクラーゼ (sGC) は α と β の 2 種のサブユニットが会合したヘテロダイマーを形成し、ヘテロダイマー中の β サブユニットのヘムに一酸化窒素 (NO) や一酸化炭素 (CO) などの気体分子が結合すると酵素タンパク質に構造変化が起こり、これが酵素活性の促進に必須であると考えられている。近年 sGC の生体における重要性が再認識されてきたが、sGC に関する研究の多くは生化学的手法による酵素活性の検討や成体組織における遺伝子の発現解析に関するものが主であり、sGC の構造と機能の相関や転写・発現調節機構についての知見は乏しく、NO/cGMP 情報伝達系の下流因子群の同定も十分ではなく、初期発生における NO/cGMP 情報伝達系の役割に関する研究も不十分であった。

本学位論文は、ゲノム構造がコンパクトで、胚操作が容易で、しかも胚が透明で、飼育もしやすいなどの利点を備えた小型硬骨魚類メダカを用いて、(1) その基本転写活性部位および染色体上約 1kbp の介在配列を会して並列している 2 つの本酵素サブユニット遺伝子の協調的転写調節機構の存在を明らかにし、(2) 発生段階における発現開始時期・発現部位を明らかにし、アンチセンスオリゴヌクレオチドのメダカ胚への導入によって引き起こされる表現型の変化を検討して、NO/cGMP 情報伝達系の初期発生における役割を考察したものである。

学位論文は 4 章から構成されており、第 1 章、第 2 章では、哺乳類培養細胞およびメダカ胚細胞を用いて 3 種類のメダカ sGC サブユニット遺伝子 (*OIGCS- α_1* , *OIGCS- α_2* , *OIGCS- β_1*) のプロモーター解析を行い、基本転写活性に必須な領域を同定し、これらの遺伝子が TATA box 非依存的な転写調節を受けていることを明らかにした。また、2 種類のレポーター遺伝子を用いて同時に異なる 2 種類のレポーター活性が測定可能なアッセイ系を確立し、同一染色体上でタンデムに並ぶ α_1 、 β_1 サブユニット遺伝子の両プロモーター間での協調的転写制御機構の存在を示唆する結果を得ている。第 3 章、第 4 章では、NO/cGMP 情報伝達系の主たる構成因子である脳型 NO 合成酵素 (nNOS) および cGMP-依存性プロテインキナーゼ (PKG) のメダカホモログをクローニングし、それらの初期発生における発現開始時期、

発現部位を明らかにした。さらに、メダカ胚を用いて sGC、PKG の機能阻害・過剰発現実験を行ない、NO/cGMP 情報伝達系の作用時期・部位について多くの重要な知見を得ている。また、初期発生における PKG の基質候補として、転写因子 Gli が *in vivo* において NO/cGMP 情報伝達系によってリン酸化されることを見出している。Gli はショウジョウバエや他の脊椎動物において PKA によるリン酸化が自身の転写活性を調節することが報告されているが、上記の実験結果より、この調節に PKG も関与していることが示唆され、今後 cGMP が関わる情報伝達系と他のシグナルとのクロストークを考える上で重要な知見となると思われる。

以上、本学位論文は、従来哺乳類を用いた解析では困難であった、脊椎動物における NO/cGMP 情報伝達系の初期発生における機能の解明に資するものである。よって北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。