

Study on the Transcriptional Regulation of the Medaka Fish Intestine-Specific Membrane Guanylyl Cyclase Gene

(メダカ腸管特異的膜結合型グアニル酸シクラーゼ遺伝子の
転写調節に関する研究)

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、消化管における水分塩分代謝、光受容における陽イオンチャンネルの開閉、血管平滑筋の弛緩による血圧低下作用や腎臓における利尿作用など、血圧、体液量調節に代表される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*)の哺乳類グアニル酸シクラーゼ C タイプ(GC-C)遺伝子である *OIGC6* 遺伝子上流領域の転写活性を、哺乳類培養細胞とトランスジェニックメダカを用いて検討し、消化管特異的な転写に必要な領域を特定した。次に、この領域に結合する転写因子をメダカ消化管核抽出液から DNA アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、全生物で初めて *in vivo* において転写調節に必要なシス領域とトランス因子を明らかにした。

OIGC6 遺伝子は哺乳類 GC-C 遺伝子と同じように消化管特異的に発現していることが知られている。そこで、消化管特異的な転写調節機構の解明を目的として、始めに様々な長さの *OIGC6* 遺伝子上流領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだ融合遺伝子を作成し、それらを哺乳類消化管由来細胞株(CACO-2)および腎臓由来細胞株(COS1)に導入し、それぞれのルシフェラーゼ活性を測定することにより転写活性を検討した。結果、上流領域-98bp から-89bp の領域が CACO-2 特異的に転写に重要であることがわかった。また-30bp から-23bp に存在する TATA box 様配列を削除すると転写活性がなくなることから *OIGC6* 遺伝子は TATA 依存的遺伝子と考えられる。さらに、それぞれの融合遺伝子を 1 細胞期のメダカ胚に顕微注入することにより、これら外来遺伝子を持つトランスジェニックメダカを作成した。これらのメダカはモザイク状に外来遺伝子を持つため、wild-type のメダカと交配し F1 を得て、F1 を用いて解析を行

った。*OIGC6* 遺伝子およびルシフェラーゼ遺伝子の発現を、メダカ胚および成体の消化管を用いて RT-PCR と *in situ* hybridization により検討した。結果、*in vivo* における *OIGC6* 遺伝子の消化管特異的な発現には上流領域-98bp で十分であることがわかった。次に、CACO-2 およびメダカ消化管核抽出液を用い、上流領域-108bp から-79bp をプローブとして、なんらかのタンパク質が結合するかを Gel Shift 解析によって検討した。結果、両方の核抽出液中に DNA の配列特異的に結合するタンパク質が存在することがわかった。また、様々な変異を導入したプローブを用いて競合実験を行った結果、配列 AGACCTTTGC がこのタンパク質の結合に重要であることがわかった。UV クロスリンク実験によって、この DNA-タンパク質複合体の大きさは 17 kDa であることがわかった。

結合タンパク質を精製するために、Oligonucleotide trapping method を用いた DNA アフィニティークロマトグラフィーを行った。UV クロスリンク実験から結合タンパク質は 17 kDa 程度であることが予想され、2 回の DNA アフィニティークロマトグラフィーを繰り返すことにより、溶出サンプル内に 17 kDa のタンパク質が多く含まれるようになった。この溶出サンプルを SDS-PAGE によって展開し、17 kDa のバンドを切り出し、それをマスマスペクトロメトリーによって解析したところ、アミノ酸配列 DQMSEIDEAIK を含むことがわかった。EST 配列との相同性検索により、この結合タンパク質はヒト Positive cofactor 4 (PC4) のメダカホモログであることがわかり、OIPC4 と名付けた。ヒト PC4 は基本転写因子や様々な他の cofactor、activator と相互作用することにより転写を活性化し、カゼインカイネース 2 (CKII) によって活性が制御されていることが知られている。OIPC4 遺伝子は RT-PCR 解析によってほとんどのメダカ成体組織に発現にしていることがわかり、ヒト PC4 において、DNA 結合活性と転写活性に必要であると考えられている領域とのアミノ酸レベルでの相同性は 77% であった。また、CKII によってリン酸化されると考えられるヒト PC4 の、セリン残基 7 つの内 6 つが OIPC4 でも保存されていた。大腸菌発現系を用いて GST 融合 OIPC4 組換えタンパク質を発現させ、組換え OIPC4 を精製した。この組換え OIPC4 を用い、上流領域-108bp から-79bp をプローブとして、Gel Shift 解析および UV クロスリンク実験を行ったところ、メダカ消化管核抽出液を用いたと時と同じ結果が得られた。また変異を導入したプローブを用いた競合実験もメダカ消化管核抽出液を用いたと時とほぼ同じ結果が得られた。ヒト PC4 では、配列特異的ではなく DNA に結合すると予想されるという報告があるが、本研究によって OIPC4 は配列特異的に DNA に結合することが示され、このことにより PC4 は何らかの機能によって結合配列を識別しているということが示唆された。これらの結果によって、OIPC4 はシス領域に結合することによって *OIGC6* 遺伝子の転写制御に関わっているということが示された。

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転写制御機構や、まだ詳細な解析がされていない新たなグアニル酸シクラーゼ C タイプの機能の解明に役立つものと考えられる。さらに、これまで PC4 は転写制御に重要であるが、その生体内での生理作用との関わりや機能についてはほとんど知られていなかったが、本研究結果によりグアニル酸遺伝子の転写制御を通して消化管において重要な生理機能に関わっている可能性が示唆された。

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 伊 藤 悦 朗

学 位 論 文 題 名

Study on the Transcriptional Regulation of the Medaka Fish Intestine-Specific Membrane Guanylyl Cyclase Gene

(メダカ腸管特異的膜結合型グアニル酸シクラーゼ遺伝子の
転写調節に関する研究)

近年、細胞内情報伝達系に関する研究は極めて活発に行われている。その中でも、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以後、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。しかし、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、しかも転写発現調節機構に関する研究は皆無に近い。申請者は、cGMP 情報伝達系のうち、消化管における水分、塩分代謝や、消化管上皮細胞の増殖制御など、広範な生物作用に関与することが示唆されている情報伝達系の鍵酵素である C 型グアニル酸シクラーゼ (GC-C) の *in vivo* における消化管特異的な転写調節機構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、メダカの消化管に特異的に発現する OIGC6 遺伝子の様々な長さの上流領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだ融合遺伝子を作成し、それらを哺乳類消化管由来細胞株(CACO-2)および腎臓由来細胞株(COS1)に導入し、それぞれのルシフェラーゼ活性を測定することにより、上流領域-98bp から-89bp の領域が

CACO-2 特異的に転写に重要であることを明らかにした。次に-30bp から-23bp に存在する TATA box 様配列を削除すると転写活性がなくなることから *OIGC6* 遺伝子は TATA 依存的遺伝子であることを明らかにした。また、それぞれの融合遺伝子を 1 細胞期のメダカ胚に顕微注入することにより、これら外来遺伝子を持つトランスジェニックメダカを作成し、wild-type のメダカと交配した F1 を用いて解析を行った。*OIGC6* 遺伝子およびルシフェラーゼ遺伝子の発現をメダカ胚および成体の消化管を用いて、RT-PCR と *in situ* hybridization により検討し、*in vivo* における *OIGC6* 遺伝子の消化管特異的な発現には上流領域-98bp で十分であることを明らかにした。

さらに、申請者は CACO-2 およびメダカ消化管核抽出液を用いて Gel Shift 解析および UV クロスリンク実験を行い、特定したシス領域内の配列 AGACCTTTGC に特異的に結合する 17 kDa のタンパク質の存在を明らかにした。次いで、Oligonucleotide trapping method を用いた DNA アフィニティークロマトグラフィーを行い、17 kDa の結合タンパク質を精製した。それをマスマススペクトロメトリーによって解析したところ、このタンパク質はアミノ酸配列 DQMSEIDEAIK を含み、この結合タンパク質がヒト Positive cofactor 4 (PC4) のメダカホモログであることを明らかにし、OIPC4 と名付けた。

申請者はさらに研究を進め、RT-PCR 解析によって *OIPC4* 遺伝子はほとんどのメダカ成体組織に発現にしていることを明らかにし、ヒト PC4 において DNA 結合活性と転写活性に必要であると考えられている領域とのアミノ酸レベルでの相同性は 77% であることを明らかにした。また CKII によってリン酸化されると考えられるヒト PC4 のセリン残基 7 つの内、6 つが *OIPC4* でも保存されていることを明らかにした。また、大腸菌発現系を用いて組換え *OIPC4* を作成し、この組換え *OIPC4* を用い、Gel Shift 解析および UV クロスリンク実験を行ったところ、メダカ消化管核抽出液を用いたときと同じ結果が得られ、シス領域の配列特異的に結合することを明らかにした。これらの結果によって、*OIPC4* はシス領域に結合することによって *OIGC6* 遺伝子の転写制御に関わっているということが明らかになった。

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転写制御機構や、まだ詳細な解析がされていない新たなグアニル酸シクラーゼ C タイプの機能の解明研究には重要な知見である。さらに、これまで PC4 は転写制御に重要であるが、その生体内での生理作用との関わりや機能についてはほとんど知られていなかったが、本研究結果によりグアニル酸シクラーゼ遺伝子の転写制御を通して消化管において重要な生理機能に関わっている可能性が示唆され、PC4 および転写コファクターの機能解明に役立つものと考えられる。

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。