

氏 名 (本籍)	やま 山	がみ 上	たか 孝	し 司
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医 博 第	9 6 1	号	
学位授与年月日	昭和 6 1 年 9 月 1 0 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学研究科 (博士課程) 生理学系専攻			
学 位 論 文 題 目	ヒト Vasoactive Intestinal Polypeptide 遺伝子の全塩基配列の決定			

(主 査)

論文審査委員 教授 岡 本 宏 教授 立 木 蔚

教授 林 典 夫

論文内容要旨

Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) は、28 アミノ酸から成るペプチドで、脳・腸をはじめとしてはほぼ全ての組織に存在し、各組織ごとに特有の生理作用を発揮している神経伝達様物質である。我々は先にヒト神経芽細胞腫から樹立された培養細胞 (NB-1 細胞) を用いてヒト VIP 前駆体及びその mRNA の構造を初めて明らかにし、VIP 前駆体の中央部に新しいペプチド PHM-27 が存在していることを見出だした。更にヒト神経芽細胞腫培養細胞では VIP 遺伝子の発現が cyclic AMP 及び phorbol esters で誘導されることを明らかにしてきた。

本研究では genome 上での VIP と PHM-27 の関係及び VIP 遺伝子の発現調節機構を明らかにする目的で、ヒト VIP/PHM-27 遺伝子を単離しその調節領域を含めて全塩基配列を決定した。

我々の研究室で作製したヒト VIP/PHM-27 cDNA を [α - 32 P] dCTP でラベルし、これをプローブとしたプラークハイブリダイゼーションにより、ヒト胎児肝臓の遺伝子ライブラリーをスクリーニングした結果、約 5×10^6 個のフェージから 4 個のヒト VIP/PHM-27 遺伝子を含むと思われるフェージクローンが得られた。各クローンから調製した DNA の EcoRI 消化パターンから、4 個中 3 個が同一で他の 1 個は異なるクローンであることが判明し、それぞれ λ HV1、 λ HV2 と名づけた。2 つのクローンには何れも約 12,000 塩基対のインサートが挿入されていた。

次に VIP/PHM-27 cDNA を制限酵素で 3 個の断片にし、それぞれをプローブとして λ HV1、 λ HV2 の EcoRI 消化物のサザンブロットハイブリダイゼーションを行い、各クローンと遺伝子の位置関係を検討した。その結果、 λ HV1 は遺伝子の 5' 側部分、 λ HV2 は 3' 側部分を含み、2 種類のクローンで VIP/PHM-27 遺伝子の全体をカバーしていることが明らかになった。

次に λ HV1、 λ HV2 を制限酵素 SacI、XbaI、SphI 及び EcoRI で消化し、制限酵素地図を作成し EcoRI 断片の配列順序を決定した。また、VIP/PHM-27 cDNA の 5' 末端 17 ヌクレオチドをプローブとしたサザンブロットハイブリダイゼーションにより、2,200 塩基対の EcoRI 断片に第 1 エクソンが存在すると予想されたので、2,200、1,300、1,100、2,100、3,200、5,200 塩基対の各 EcoRI 断片をプラスミドベクター pUC8 にサブクローニングし、プラスミドを増殖させた後インサート部分を切り出し詳細な制限酵素地図を作成した。これを基にして M13 フェージを用いた dideoxy 法により遺伝子の 5' 側領域を含めた約 11,000 塩基の配列を決定した。

その結果 VIP/PHM-27 の構造遺伝子と考えられる部分は 8,800 塩基対で、7 個のエクソンと 6 個のイントロンから構成されており、第 2 エクソンにシグナルペプチド、第 4 エクソンに PHM-27、第 5 エクソンに VIP がコードされ、第 1 エクソンと第 7 エクソンは非翻訳配列のみから成り立っていることが明らかになった。第 1 から第 6 までのエクソンの塩基配列は、すでに我々

の研究室で明らかにしたヒトVIP/ PHM-27 mRNAの塩基配列と完全に対応していたが、第7エクソンでは数個の塩基の置換、欠失、挿入が認められた。これは遺伝子の構造決定が胎児の肝臓を材料にしているのに対し、mRNAの構造は神経芽細胞腫を材料にしていることによる違いか、個人差によるものと考えられる。

各エクソン・イントロンの境界領域の塩基配列を比較してみると、何れの境界においてもスプライシングに関係している共通配列が良く保持されており、特にPHM-27を含むエクソンの境界領域とVIPを含むエクソンの境界領域間では類似性が高かった。VIPとPHM-27はアミノ酸レベルでも核酸レベルでも高い類似性を持っているが、この境界領域も含めて祖先型遺伝子から遺伝子の重複及びその後の“divergence”が起こってきたものと考えられる。

VIP/PHM-27 遺伝子の5'側領域にはcap siteより30塩基、150塩基、770塩基、及び900塩基上流にプロモーター配列であるTATAboxが存在していた。転写シグナルであるTATAboxが複数個存在することは、同一の遺伝子から5'端を異にする複数のVIP/PHM-27 mRNAが転写される可能性を示唆している。実際我々の研究室ではラットの脳において5'端を異にする数種のVIP mRNAが見出されている。

この5'側領域には更に、cyclicAMPで誘導される遺伝子において共通に見られる配列がcap siteより230塩基、660塩基、及び1,100塩基上流に存在していた。これらの部位はcyclicAMPによるVIP/PHM-27 遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

以上、本研究によりヒトVIP/PHM-27 遺伝子の“構造遺伝子”と“調節遺伝子”の実体が初めて分子レベルから明らかにされ、この遺伝子の進化の過程、発現調節を考える上に重要な新知見が得られた。

審 査 結 果 の 要 旨

Vasoactive Intestinal Polypeptide (V I P) は28アミノ酸残基からなるペプチドで脳・腸をはじめとしてほぼ全ての組織に存在し、各組織ごとに特有の生理作用を発揮している神経伝達様物質である。このようにV I Pは生体にとって極めて重要な生理活性ペプチドであるが、その生合成過程及びその調節機構は従来全く不明であった。最近になり著者らはヒト神経芽細胞腫から樹立された培養細胞を用いてヒトV I P前駆体及びそのmRNAの構造をはじめて明らかにしV I P前駆体の中央部に27アミノ酸残基からなる新しいペプチドPHM-27が存在していることを見いだした。さらにヒト神経芽細胞腫培養細胞ではV I P遺伝子の発現が cyclic AMP や phorbol esters で誘導されることを明らかにしてきた。

本論文で著者は genome 上でのV I PとPHM-27の関係及びV I P/PHM-27遺伝子の発現機構を明らかにする目的でヒト胎児肝臓の遺伝子ライブラリーからV I P/PHM-27遺伝子を単離し、その調節領域を含めて全塩基配列を決定した。その結果V I P/PHM-27の構造遺伝子と考えられる部分は8,800塩基対で7個のエクソンと6個のイントロンから構成されており、第2エクソンにシグナルペプチド、第4エクソンにPHM-27、第5エクソンにV I Pがコードされていることが明らかになった。さらに、この構造遺伝子5'側領域には cap site より30塩基、150塩基、770塩基及び900塩基上流にプロモーター配列であるT A T A box が存在し、cap site より230塩基、660塩基及び1,100塩基上流には cyclic AMP 受容体タンパク質の結合部位と考えられる塩基配列が存在していることが見いだされた。

このように本論文でV I P/PHM-27遺伝子の“構造遺伝子”と“調節遺伝子”の実体がはじめて分子レベルから明らかにされ、この遺伝子の進化の過程、発現調節を考える上に重要な新見が得られたので学位授与に価する論文であると認める。