

氏 名 (本籍) にし ざわ みき お
西 澤 幹 雄

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 9 8 0 号

学位授与年月日 昭 和 62 年 9 月 30 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 ラット Vasoactive Intestinal Polypeptide 前駆
体 mRNA : その構造決定と 5' 非翻訳領域の異なる 3 種の前駆体 mRNA の発見

(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、グルカゴン・セクレチン族に属する28アミノ酸残基からなるペプチドであり、1974年にブタ腸管から初めて分離された。その後、VIPは腸管ばかりでなく、中枢および末梢神経系を含めほぼ全身に広く分布している事が明らかにされた。その生理作用は、血管拡張・血圧降下作用の他に、気管支・腸管での平滑筋弛緩作用、腸管からの水分・電解質の分泌刺激など各組織に特有で多彩である事が明らかにされており、神経系では一種の神経伝達物質として機能している脳-腸管ペプチドのひとつであると考えられている。

ラットのVIPの構造やVIP前駆体mRNAの生合成過程については今まで不明であった。そこで本研究では、ラットのVIP前駆体mRNAの構造を決定するとともに、ラットの大脳および小腸におけるVIP前駆体mRNAの生合成過程を明らかにする事を目的として、まず大脳および腸管のVIP前駆体mRNAの検索を行ない、次いでVIP前駆体cDNAをクローニングし、その塩基配列を決定した。即ち、ラットの大脳皮質および小腸・大腸から poly A⁺ RNA を抽出して、ヒトVIPのcDNAを含むプローブを用いてVIP前駆体mRNAをノーザン・ブロット解析したところ、いずれの組織においても約1,700ヌクレオチドのVIP前駆体mRNAが存在している事を確認した。

次に、ラット小腸のVIP前駆体mRNAを濃縮してcDNAをクローニングし、その塩基配列を決定して、ヒトVIP前駆体とアミノ酸配列と塩基配列の両方で比較した。ラットVIP前駆体はmethionineに始まりlysineに終わる170アミノ酸残基から成っていた。アミノ酸残基125-152にはヒトVIPのアミノ酸配列と全く同じ配列が存在し、ラットVIPと考えられた。アミノ酸残基81-107には、N末端のHistidineに始まり、C末端のIsoleucineに終わる27残基からなるアミノ酸配列が存在した。この配列はブタ腸管から分離されたPHI-27 (Peptide having N-terminal Histidine, C-terminal Isoleucine amide and 27 residues) と2個、ヒトPHM-27 (Peptide having N-terminal Histidine, C-terminal Methionine amide and 27 residues) と4個のアミノ酸残基が異なるのみである事から、ペプチドとしては分離されていないが、「ラットPHI-27」に相当すると考えられた。このようにラットVIP前駆体はVIPおよびラットPHI-27を含んでおり、これら2つのペプチド部分が切り出されるためのprocessing部位(N末端の塩基性アミノ酸およびC末端アミド化シグナル)を持っている事も明らかにされた。

ラットおよびヒトVIP前駆体をprocessingを受ける部位で機能的に6個のdomainに分けると、塩基配列のhomologyはいずれのdomainでもほぼ一定であるのに対し、アミノ酸配列の

homology は domain 毎に大きく異なっていた。例えば、VIPのアミノ酸配列は完全に保存されているのに対して、シグナル・ペプチド部分などではhomologyが低く、VIP遺伝子の進化の過程で機能的に重要なVIPのdomainが保存されてきたものと考えられる。

一方、ラットの大脳皮質から得られたVIP前駆体cDNAクローンの5'非翻訳領域を調べた結果、大脳には、小腸で検出されたVIP前駆体mRNA(1c型)のほかに、このものと5'非翻訳領域のみが異なる2種類のVIP前駆体mRNA(1aおよび1b型)が存在している事が明らかにされた。しかし、これら3種類のラットVIP前駆体mRNAは翻訳領域および3'非翻訳領域の塩基配列が同一である事から、同じアミノ酸配列の前駆体蛋白質に翻訳されると考えられた。

ラットの大脳皮質および小腸のゲノムDNAを抽出し、前述の5'非翻訳領域を含むcDNAプローブを用いてサザン・ブロット解析を行なった結果、VIP遺伝子はhaploidあたり1コピー存在し、大脳皮質および小腸のVIP遺伝子の構成には差異がないと推定されたので、ラットVIP前駆体mRNAの3種類の5'非翻訳領域は3個の異なるエクソンに由来すると考えられた。さらに、3種類のラットVIP前駆体mRNAの5'非翻訳領域の塩基配列を、既に明らかにされているヒトVIP遺伝子と比較したところ、小腸で検出された1c型の5'非翻訳領域はそのエクソン1に相当し、その上流には大脳皮質で検出された他の2種類の前駆体mRNA(1aおよび1b型)の5'非翻訳領域とhomologyの高い部分が認められた。この事は、上に述べたラットVIP前駆体mRNAの3種類の5'非翻訳領域が3個の異なるエクソンに由来するという考えを支持する。即ち、ラットのVIP遺伝子ではalternative transcription and RNA splicingを受けて、5'非翻訳領域の異なる3種類のVIP前駆体mRNAが生合成されている可能性が示唆された。

審査結果の要旨

Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) は主として脳・腸管に存在が認められ、各組織に特有な生理作用を示すいわゆる脳腸ホルモンである。VIPの生合成についての研究はこれまでヒト神経芽腫培養細胞で行われてきたが哺乳動物の脳や腸で実際にVIPが生成される過程は不明であった。本研究ではラットの脳と腸管を材料としてVIP前駆体mRNAを分離し、その構造を決定して以下の新知見が示された。

1. ラット大脳及び小腸には1,700ヌクレオチドのVIP前駆体mRNAが存在していた。
2. ラットVIP前駆体cDNAの塩基配列を決定しヒトVIP前駆体の構造と比較した結果、ラットVIP前駆体にはヒトVIPと同一の28アミノ酸残基からなるペプチド構造が認められ、また前駆体の中央部には27アミノ酸残基からなるペプチド (peptide having amino-terminal histidine, carboxyl-terminal isoleucine amide and 27-amino acid residues, PHI-27) が存在していた。このラットPHI-27はヒトPHM-27 (peptide having amino-terminal histidine, carboxyl-terminal methionine amide and 27-amino acid residues) と4個のアミノ酸残基が異なっていた。ラットとヒトVIP前駆体をプロセッシングを受ける部位で機能的に6個のドメインに分けると、アミノ酸配列のホモロジーはドメインごとに異なるもののVIPドメインのアミノ酸配列はラットとヒトで完全に保存されていた。これはVIP遺伝子の進化の過程で生理的に重要なVIPのアミノ酸配列が保存されるようにgenetic codeが選択されてきたことを示している。
3. ラット大脳と小腸のVIP前駆体mRNAの翻訳領域の塩基配列には差は認められなかったが、ラット大脳には5'非翻訳領域が異なる3種のVIP前駆体mRNAが存在した。一方、ラット小腸には5'非翻訳領域が同一な一種類のmRNAしか存在せず、これは3種の大脳mRNAの一種類に相当した。したがってラット大脳ではVIP前駆体mRNAが生成される過程でalternative transcription and RNA splicingが起こっている可能性を示している。

以上、本論文ではラット大脳や小腸でのVIP生合成に関与するmRNAの実体が明らかにされ、VIP生合成前駆体の構造、ラットVIPの構造、ラットPHI-27の構造も明らかにされた。またVIP前駆体mRNAが生成される過程は組織により異なっている可能性も示唆された。これらの新知見はVIPをはじめとする脳腸ホルモンの生化学、生理学、遺伝学上重要な知見と考えられ、本論文は学位論文に値すると考えられる。