

氏 名（本籍） 阿 部 俊 明

学位の種類 博 士 （医 学）

学位記番号 医 第 2625 号

学位授与年月日 平成6年2月23日

学位授与の条件 学位規則第4条第2項該当

最終学歴 昭和59年3月19日
新潟大学医学部医学科卒業

学位論文題目 Characterization of mouse Phosducin gene.
（マウスフォスデューシンの遺伝子構造解析）

（主 査）

論文審査委員 教授 玉 井 信 教授 岡 本 宏

教授 柴 原 茂 樹

論文内容要旨

【緒言】

フォスデューシン (Pd) は網膜視細胞内に大量に存在する可溶性蛋白質で、網膜の G 蛋白質であるトランスデューシンの $\beta\gamma$ サブユニットと相互作用をしながら光情報伝達を制御している。Pd は cAMP 依存性プロテインキナーゼ A によってりん酸化をうけトランスデューシンとの結合性を失う。この蛋白質は網膜内と松果体に発現されると考えられていたが、最近の報告によると Pd は脳にある G 蛋白質抑制蛋白質と同一であることが分かり、網膜内でも光情報交換伝達をトランスデューシンレベルで抑制することが判明した。すなわち同一の Pd 蛋白質がさまざまな G 蛋白質の機能を抑制している。さらに Pd は脳以外の組織にも少量ながら存在することがわかり網膜での機能だけでなくその発現、制御に興味をもたれる。今回、私は Pd の発現、制御機構解明の第一歩としてマウス Pd 遺伝子の構造を明らかにした。

【方法】

遺伝子スクリーニングはラット cDNA ならびに遺伝子の断端をプローブとしてみちいた。ゲルシフトアッセイは、 ^{32}P でラベルした DNA 断片を核抽出液と反応後、8% アクリルアミドゲルにてフリー DNA と特異的結合をしてシフトされた DNA 蛋白質結合物を分離した。in vitro 転写実験は核抽出液と ^{32}P でラベルした UTP を含む核酸ならびに Pd 遺伝子プロモーター領域 DNA との反応で転写された産物を 6% アクリルアミドゲルにて電気泳動後確認した。核分画抽出液は Gorski らの方法を用いて抽出した。

【結果】

Pd 遺伝子は全長が約 15kbp で、全部で 4 つのエクソンが存在した。エクソン・イントロン移行部は GT-AG ルールに従い、りん酸化部位 Arg-Lys-Met-Ser は第 3 ならびに第 4 エクソンに別れていた。マウスのアミノ酸配列は人間、牛、ラットと 88% 以上の非常に高い類似性を示した。mRNA 転写開始部位はアミノ酸翻訳開始部位より 102bp 上流であった。プロモーター領域に典型的な TATA, CCAAT, GC 構造を認めなかったが、in vitro 転写実験ならびにゲルシフトアッセイでこの遺伝子の発現に重要と思われる領域が推測された。この領域には遺伝子が視細胞に特異的発現するのに必要と報告された核酸配列 (PCEI) 領域と共通と思われる核酸配列を認め、in vitro 転写実験でこの領域のあるなしで転写、発現に著明な差を認めた。ゲルシフトアッセイで核抽出液とこの領域との特異的結合が認められ、しかもアレスチン遺伝子の

PCEI 領域とゲルシフトアッセイにおいて競合・阻害反応が認められた。また Pd 遺伝子のプロモーター領域には、ステロイド・サイロイドホルモンリセプターなどが結合する核酸配列と似た核酸配列を持つ部位も認められ、実際網膜の核抽出液とこの領域の特異的な結合が確認された。しかしながらステロイドホルモンリセプターのなかでも最もこの核酸配列に類似していると思われるエストロゲンリセプター結合核酸配列と競合・阻害反応を認めなかった。さらにサザンブロット法においては、2 種以上の Pd 遺伝子が存在することが疑われ、mRNA のシーケンスより mRNA も複数発現していることが疑われた。

【結 論】

Pd は網膜視細胞内に大量に存在するが、今回マウス Pd 遺伝子の構造を明らかにした。そのプロモーターに TATA, CCAAT, GC など典型的な転写制御機構を認めなかったが、同様のことは他の視細胞特異的発現を持つ遺伝子のプロモーターにも報告されている。しかし、*in vitro* の転写実験ではこの遺伝子の発現に重要な役割をしている領域が、遺伝子転写開始部位から約 2kbp 上流に認められた。この領域は遺伝子が視細胞特異的発現に必要と報告された PCEI 領域と同じ核酸配列をもっていた。この核酸配列は遺伝子バンクのコンピューター解析で視細胞に特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域に共通に存在し、ショウジョウバエから、人間にいたるまで様々な種で保存されていることが判明した。また G 蛋白質は遺伝子ファミリーを形成していることが知られているが、この G 蛋白質の働きを抑制する Pd も今回、多数の遺伝子が存在することが疑われ、実際いくつかの Pd の発現が mRNA レベルで確認された。これらの違いは 5' 領域にみられたが、これらのことよりそれぞれ異なる G 蛋白質と相互作用している Pd がそれぞれ違った制御機構で発現されている可能性が考えられた。

審査結果の要旨

本研究は、網膜視細胞における Photo Transduction 光情報伝達に重要な働きをしている phosphducin (P) についての分子生物学的な研究である。P は網膜 G タンパク質である transducin (T) の β , γ サブユニットと相互作用していることが明らかになっており、cAMP 依存性のプロテインキナーゼ A によって磷酸化され、T との結合性を失うことが明らかになっている。その機能は、網膜内における Photo Transduction を T のレベルで抑制することが明らかとなっている。著者は P の発現制御機構を解明するためにマウスにおける P 遺伝子の構造を明らかにした。その結果、マウス P 遺伝子は 15 Kbp で 4 つのエクソンからなり、そのアミノ酸配列は、人、牛、ラットにおいて 88% 以上の類似性を示した。更に、遺伝子技術を駆使し mRNA 転写開始部位及びその構造を明らかにした。また、ステロイドホルモンリセプター結合部類似領域や視細胞に遺伝子を発現するのを抑制している核酸配列領域を確認し、実際、網膜核内蛋白質との結合の確認をしている。更に、P 遺伝子に関して多くの種との共通性についても言及している。また、この遺伝子が複数存在することを DNA と mRNA の両方から推測しており、G タンパク質との相互作用において遺伝子ファミリー的な見知からの discuss も行われている。これら P に関する一連の研究はその結果が膨大なものであり、本物質の遺伝子解析に大きなインパクトを与えた。これらの研究は博士論文として十分価値あるものである。