



Molecular Cloning and Chromosomal assignment of the Human Brain-Type Phosphodiesterase I/Nucleotide Pyrophosphatase Gene (PDNP2)

川越, 宏幸

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1481

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001481>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	かわ 越 宏 幸 (大阪府)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第1007号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成8年3月31日
学位論文題目	Molecular Cloning and Chromosomal assignment of the Human Brain-Type Phosphodiesterase I / Nucleotide Pyrophosphatase Gene (PDNP 2) (ヒト脳型ホスホジエステラーゼI/ヌクレオチドピロホスファターゼ遺伝子 (PDNP 2) のクローニングと遺伝子構造の解析)
審査委員	主査 教授 中 村 肇 教授 伊 東 宏 教授 松 尾 雅 文

論文内容の要旨

I はじめに

ホスホジエステラーゼ I / ヌクレオチドピロホスファターゼは生体内に広く分布する分子量約100～130kDaの膜型酵素であり、細胞外のヌクレオチドリッ酸を加水分解する。本酵素は当初ウシの小腸より精製され、そのアミノ酸配列の一部が報告されているに過ぎなかった。Godingらによりクローニングされたヒトおよびマウス形質細胞の膜表面蛋白質であるPC-Iが、類似の酵素であることが報告されて以来、その多彩な機能が注目されるようになった。PC-Iはその酵素活性部位のほかに幾つかの機能部位を有し、非インスリン依存性糖尿病、多発性神経線維腫症 I 型、およびLowe症候群患者の線維芽細胞でその発現が増加していることが報告されている。また、MadduxらはPC-Iがインスリンレセプターのキナーゼ活性を阻害すると報告している。

我々はこれまでにラット脳型ホスホジエステラーゼ I / ヌクレオチドピロホスファターゼ遺伝子を単離し、ラットPD-I α と命名した。ラットPD-I α は主に中枢神経系に発現し、マウスPC-Iと高い相同性を持つ。また、PC-Iと同様に幾つかの機能部位を持ち、その酵素活性のみならず何らかの細胞性機能を担っているものと思われる。ラットPD-I α はその細胞外領域に細胞接着部位であるRGDペプチド配列を持ち、中枢神経系における細胞接着に関与している可能性がある。また、in situハイブリダイゼーション法による解析の結果より、ラットPD-I α のmRNAは小脳の顆粒細胞層、脈絡叢の上皮細胞、網膜色素上皮細胞に主に認められ、中枢神経系における物質の分泌、輸送に関与している可能性も考えられる。

本研究では、ラットPD-I α のヒトにおける相同分子であるヒト脳型ホスホジエステラーゼ I / ヌクレオチドピロホスファターゼ (ヒトPD-I α) cDNAを単離し、その組織分布を解析した。また、ヒトPD-I α のゲノミックDNAを単離し、その遺伝子構造を明らかにするとともにヒトPD-I α の発現調節領域を解析することを試みた。

II 実験方法と結果

1 ; ヒト脳型ホスホジエステラーゼ I /ヌクレオチドピロホスファターゼ (PD-I α) cDNAのクローニングと塩基配列の決定

ラットPD-I α のヒトでの相同分子を得るためにヒト網膜cDNAライブラリー約20万クローンをラットPD-I α cDNAをプローベとしてスクリーニングした。3つの陽性クローンが得られ、ジデオキシ法にてこれらの塩基配列を決定した。その結果、推定分子量99,034の863アミノ酸をコードする2589塩基長のcDNAが得られ、これをヒトPD-I α (HGMWによる遺伝子シンボル ; PDNP 2) と命名した。

2 ; ヒトPD-I α の一次構造の特徴

ヒトPD-I α は4ヶ所の糖鎖結合部位を持ち、172~219アミノ酸にわたって酵素活性部位が存在していた。また、127~129アミノ酸には細胞接着部位であるRGDペプチド配列が存在し、740~748アミノ酸にはカルシウム結合部位であるEF hand様配列が存在していた。

ヒトPD-I α は9~30アミノ酸にわたる疎水性部位を1ヶ所持っており、この部分で細胞膜を1回貫通しているものと考えられた。

ヒトPD-I α のアミノ酸配列はラットPD-I α のそれと89%の相同性を有しており、酵素活性部位を初めとする機能部位も極めて良く保存されていた。また、ヒトPD-I α のアミノ酸配列は、52個のアミノ酸を欠く以外には腫瘍走化性刺激因子であるオートタキシンのそれと一致しており、両者は同一の遺伝子に由来するスプライスの違う産物であると考えられた。

3 ; ヒトPD-I α mRNAの組織分布

ヒトPD-I α mRNAの種々のヒト組織における発現をノザンプロットで解析した。その結果、ヒトPD-I α mRNAは脳、肺、胎盤、腎臓にも認められた。また、脳の中では特に脳梁にその発現が多かった。

4 ; ヒトPD-I α ゲノミックDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒトPD-I α ゲノミックDNAをクローニングするために、ヒトPD-I α cDNAをプローベとしてヒトゲノミックDNAライブラリーをスクリーニングした。約40万クローンをスクリーニングし、1個の陽性クローンを得た。この陽性クローンについてヒトPD-I α cDNAの5'端をプローベとしてサザンプロット解析を行ない、ヒトPD-I α ゲノミックDNAの5'領域をサブクローニングした。ジデオキシ法にて塩基配列を決定した結果、ヒトPD-I α 遺伝子の5'調節領域はTATA boxやCAAT boxを欠き、4ヶ所の転写因子Sp 1の結合部位を持つことがわかった。また、イントロン2に1ヶ所のオクタマー結合モチーフを認めた。

5 ; ヒトPD-I α 遺伝子の染色体マッピング

ヒトPD-I α 遺伝子の染色体上の部位を決定するため、クローニングしたヒトPD-I α ゲノミックDNAをプローベとしてFISH法を行なった。ヒトPD-I α 遺伝子は染色体8q24.1上にマッピングされた。

III 結論

本研究により、ヒトPD-I α はラットPD-I α と高い相同性を持ち、PD-I α 遺伝子は種を超えて高度に保存されており、ヒトの中枢神経にも発現していることが明らかとなった。また、酵素活性部位以外に細胞接着部位であるRGDペプチド配列も保存されており、PD-I α は細胞外のヌクレオチドリン酸を加水分解する以外に中枢神経系における細胞接着にも関与している可能性が考えられる。また、ヒトPD-I α は腫瘍細胞走化性因子であるオートタキシンと同一の遺伝子産物であり、ヒトPD-I α は

腫瘍細胞走化性因子として、さらには中枢神経系における細胞の遊走因子として機能している可能性も考えられる。

ヒトPD-I α 遺伝子の発現調節領域には4ヶ所の転写因子Sp 1結合部位があり、これらのうちいずれかに結合するSp 1が他の転写調節因子と共同してその発現を調節しているものと考えられる。また、イントロン2に存在するオクタマー結合部位にオクタマー結合蛋白が結合し、エンハンサーとして作用している可能性もある。

今後、ヒトPD-I α についての詳細な解析が行われることにより、腫瘍細胞の転移機構、さらには中枢神経系における細胞の遊走、接着についての新たな知見が得られるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

当教室では、ラット脳型ホスホジエステラーゼI/ヌクレオチドピロホスファターゼ遺伝子を単離し、ラットPD-I α と命名している。ラットPD-I α は主に中枢神経系に発現し、マウスPC-Iと高い相同性を持つとともに、PC-Iと同様に幾つかの機能部位を持つことからその酵素活性のみならず何らかの細胞性機能を担っているものと思われる。ラットPD-I α はその細胞外領域に細胞接着部位であるRGDペプチド配列を持ち、中枢神経系における細胞接着に関与している可能性が考えられ、in situハイブリダイゼーション法による解析からラットPD-I α のmRNAは小脳の顆粒細胞層、脈絡叢の上皮細胞、網膜色素上皮細胞に主に認められ、中枢神経系における物質の分泌、輸送に関与している可能性も考えられている。

本申請者は、ラットPD-I α のヒトにおける相同分子であるヒト脳型ホスホジエステラーゼI/ヌクレオチドピロホスファターゼ(ヒトPD-I α) cDNAを単離し、その組織分布、ヒトPD-I α のゲノミックDNAの構造と発現調節領域の解析を試みている。

ラットPD-I α のヒトでの相同分子を得るためにヒト網膜cDNAライブラリーをラットPD-I α cDNAをプローベとしてスクリーニングし、得られた陽性クローンをジデオキシ法にて塩基配列を決定したところ、分子量99,034の863アミノ酸をコードする2,589塩基長のcDNAが得られ、これをヒトPD-I α 、PDNP 2と命名した。

このヒトPD-I α の一次構造の特徴は、4ヶ所の糖鎖結合部位を持ち、172～219アミノ酸にわたって酵素活性部位が存在し、127～129アミノ酸には細胞接着部位であるRGDペプチド配列、740～748アミノ酸にはカルシウム結合部位であるEF hand様配列が存在している。ヒトPD-I α には9～30アミノ酸にわたる疎水性部位が1ヶ所あり、細胞膜を1回貫通してこの部位で膜に結合しているものと考えられた。また、ヒトPD-I α のアミノ酸配列は、52個のアミノ酸を欠く以外には腫瘍走化性刺激因子であるオートタキシンのそれと一致しており、両者は同一の遺伝子に由来するスプライスの異なる産物であると考えられた。

ヒトPD-I α mRNAの組織分布をノザンブロット解析したところ、ヒトPD-I α mRNAは脳の他、肺、胎盤、腎臓にも認められ、脳では特に脳梁にその発現が多い。

ヒトPD-I α ゲノミックDNAをクローニングするために、ヒトPD-I α cDNAをプローベとしてヒトゲノミックDNAライブラリーをスクリーニングした。ヒトPD-I α ゲノミックDNAの5'領域をクローニングし、ジデオキシ法にて塩基配列を決定したところ、5'調節領域はTATA boxやCAAT boxを欠き、4ヶ所の転写因子Sp 1の結合部位を持つとともに、イントロン2に1か所のオクタマー結合モチーフを認めている。なお、FISH法での解析からヒトPD-I α 遺伝子は染色体8 q23上にマッ

ピングされた。

今後、ヒトPD-I α についての詳細な解析から、腫瘍細胞の転移機構、さらには中枢神経系における細胞の遊走、接着についての新たな知見が得られるものと期待される。

本研究は、ヒト脳型ホスホジエステラーゼI／ヌクレオチドピロホスファターゼ（ヒトPD-I α ）のDNAの構造と発現調節領域について研究したものであり、従来ほとんど明らかにされていなかったその組織分布、ヒトPD-I α のゲノミックDNAの構造と発現調節領域の解析において重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。