



Cloning and Characterization of the 5'-Flanking Region of the Human Prolactin-Releasing Peptide Receptor Gene

岸本，正彦

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2002-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2632

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002632>

※ 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。



【129】

氏名・(本籍) 岸本 正彦(兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士(医学)

学位記番号 博い第1451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14年3月31日

【学位論文題目】

Cloning and Characterization of the 5'-Flanking Region of the Human Prolactin-Releasing Peptide Receptor Gene

(ヒトプロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子 5'上流領域の
クローニング及びその発現調節機構の解析)

審査委員

主査 教授 千原 和夫

教授 春日 雅人 教授 岡村 均

(背景)

プロラクチン(PRL)は乳腺の発達を促進し、乳汁の分泌を刺激するホルモンとして知られているが、その他にも生殖における重要性に加え、水電解質代謝調節作用、免疫賦活作用、細胞増殖、さらには母性行動に対する影響など非常に多岐にわたる作用を有している。また、PRL は抑制性視床下部ホルモンであるドーパミンによって主に調節をうけているが、その一方で、PRL を特異的に放出する因子の存在も予測されていた。1998 年、日沼らは下垂体に存在するオーファン受容体のリガンドであるペプチドを逆葉理学的方法で同定し、またそのペプチドが *in vitro* のみならず *in vivo*においても PRL を特異的に放出させることを明らかにし、PRL-releasing peptide(以下 PrRP)と命名した。私どもは PrRP-受容体(PrRP-R)遺伝子の発現調節機構を解明することにより、PRL の分泌メカニズムをより明白なものにできると考え、その 5'上流配列のクローニングとその機能解析を試みた。

(方法と結果)

(A)ヒト genomic DNA ライブラリーからブラークハイブリダイゼーションにより PrRP-R 遺伝子 5'上流領域のクローニングを行い、翻訳開始点より-4015 塩基までの配列を決定したところ(GenBank accession number; BankIt339799, AF274581)種々の転写因子の結合配列様エレメントを認めた。主なものを以下に示す。activator protein 1 (AP1) (-1878 塩基~, TGATTCA), activator protein 2 (AP2)(-2948 塩基~, GGGTCCCC; -2426 塩基~, GGGAGGCC; -1238 塩基~, CCCCAGGC; -1190 塩基~, CCCCAGCC; -887 塩基~, CCCAGCCC; -772 塩基~, CCCACCGC), glucocorticoid response element (GRE) (-3609 塩基~, AGAACAGT), pituitary homeobox 1 (Ptx1) (-637 塩基~, CAAGCT), Pit-1(-3825 塩基~, TATTCAT; -2922 塩基~, TATCCAT), GC box (-467 塩基~, GGGGGCGGAG)

(B) 様々な長さの 5'上流領域を pGL3 basic vector に組み込みルシフェラーゼ遺伝子と融合させたレポータープラスミドを作成し、下垂体由来の GH3 細胞、非下垂体由来の HepG2, COS7 細胞を用い、一過性強制発現系でそのレポーター活性を検討した。その結果、下垂体由来細胞のみならず、非下垂体由来細胞でも強い活性を認め、-4015 までの 5'上流領域までは、この受容体の下垂体優位な発現を規定している領域が含まれていない可能性も考えられた。一方、翻訳開始点から数えて、-4 9 9 塩基より-4 2 1 塩基の部

分の領域が、いずれの細胞においても共通して重要であることが明らかとなった。

(C) (B)の結果より、その重要性が示唆された、-4 9 9 塩基より-4 2 1 塩基の部分の領域には、GC BOX (-4 6 7 塩基から-4 5 7 塩基) が存在していたため、この GC BOX の役割を検討した。具体的には、-4 9 9 塩基までの 5'上流領域を含むレポータープラスミド PrRP-R-Luc 及び、PrRP-R-Luc の GC BOX 内に 4ヶ所の変異を加えた変異型 PrRP-R-Luc を作成し、そのレポーター活性を検討した。その結果、下垂体由来の GH3 細胞、非下垂体由来の HepG2, COS7 細胞のいずれにおいても変異型 PrRP-R-Luc のレポーター活性は著しく減少した。従って、この GC box が重要であることが明らかとなり、この配列に結合する何らかの GC box 結合転写因子によって、ヒト PrRP-R の発現が調節されていることが示唆された。

(D) 5'RACE 法によるヒト PrRP レセプター cDNA の 5' 端の検討を行った。ヒト下垂体マラソンレディ cDNA を adaptor primer AP1 と遺伝子相補的プライマー GSP1 で PCR、さらに nested adaptor primer AP2 と遺伝子相補的プライマー GSP2 でセカンド PCR を行い、増幅された断片を PT7 blue vector に挿入し、塩基配列を決定した。その結果、翻訳開始点より数えて、-4 2 9 塩基から-3 6 5 塩基にかけて少なくとも 8ヶ所の異なる 5'端の存在することが明らかとなり、複数の転写開始点の存在が示唆された。

(考察)

今回、私どもは PrRP-R 遺伝子の 5'上流領域を初めてクローニングし、その塩基配列を決定した。PrRP-R 遺伝子の 5'上流領域には、典型的な TATA box, CAAT box は認められなかったが、転写開始点の上流近傍において GC box が存在することが判明した。多くのハウスキーピング遺伝子においてみられるように、TATA-less プロモーターにおいて GC box は Sp1 ファミリーをはじめとする GC box 結合転写因子の結合部位として機能し、遺伝子転写において重要な役割を果たしていることが知られている。本研究において、私どもは、PrRP-R 遺伝子発現において重要な領域が翻訳開始点から数えて-4 9 9 塩基より-4 2 1 塩基の部分に存在する事を、deletion analysis、具体的には種々の長さの 5'上流領域を含むレポーター遺伝子を作成し検討することによって明らかにすることができた。さらに先程の GC box が、この領域に存在していることに注目し、PrRP-R 遺伝子発現においてこの GC box

が機能しているのかどうかを検討したところ、変異型 GC box を有するレポータープラスミドを使用した場合のレポーター活性は著しく減少し、PrRP-R 遺伝子においても、GC box が重要な役割を果たしていることを見い出した。一方、これまで、PrRP-R は下垂体に比較的優位に発現していることが明らかにされているが、興味深いことに PrRP-R 遺伝子 5'上流領域には下垂体特異的転写因子である Pit-1 及び Ptx1 の結合配列様エレメントを認めた。しかしながら今回の私どもの検討では、意外にも下垂体由来する細胞にとどまらず非下垂体由来細胞でも強いレポーター活性が認められ、この結果は-1 より-4015 までの様々な長さの PrRP-R 遺伝子 5'上流を含むレポータープラスモドを使用した場合でも同じであった。従って、これらの下垂体特異的転写因子が、少なくとも-4015 までの領域を介して、PrRP-R の下垂体優位な発現を規定していないことが示唆された。

(結語)

PrRP-R 遺伝子の転写活性化には GC box (-467 塩基, GGGGGCGGAG) が非常に重要であることが明らかとなったが、どの様な機序で PrRP-R が下垂体により多く発現しているのか、に関しては今後さらに検討する必要があると考えられた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 1449号	氏名	岸本 正彦
論文題目	Cloning and Characterization of the 5'-Flanking Region of the Human Prolactin-Releasing Peptide Receptor Gene (ヒトプロラクチン放出ペプチド受容体遺伝子 5'上流領域のクローニング及びその発現調節機構の解析)		
審査委員	主査 千原 和夫 副査 春日 雅人 副査 佐野 伸均		
審査終了日	平成 14 年 6 月 24 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

プロラクチン (PRL) は下垂体前葉から分泌される六つのホルモンの内の一つであり、乳腺の発達と乳汁の合成を促進するほか卵巣や精巣に対する作用、腎尿細管における水・電解質の再吸収促進作用、成長ホルモン (GH) に似た物質代謝調節作用、免疫系の賦活作用、母性行動に関与する中枢神経系への作用など多彩な作用を持つ。下垂体ホルモンの発生・分化の過程で共通の祖先を持つ GH とは幾つかの類似点がある。分泌調節機序においても視床下部に刺激ホルモンと抑制ホルモンがともに存在する。GHにはGH放出ホルモン (GHRH) とソマトスタチンが同定され、この二つの視床下部ホルモンが正および負の調節を行い、さらに末梢組織で産生されたインシユリン様成長因子 (IGF) -I が negative feedback 機構により負の調節をする。一方、PRLにはIGF-Iに相当するものではなく、視床下部の刺激ホルモンと抑制ホルモンによって主として調節される。他の下垂体前葉ホルモンと異なって PRL は視床下部によって抑制性に調節されており、視床下部の破壊は他の下垂体ホルモンの分泌低下をもたらすのに PRLのみは分泌が亢進する。視床下部における PRL 分泌抑制の主役がドバミンであることは確立されているが、一方 PRL 放出因子については TSH 放出ホルモン (TRH) 、 vasoactive intestinal peptide(VIP) 、 PHI など様々なペプチドが候補者としてあげられているが未だ議論の余地が残されたままである。1998 年、日沼らは下垂体に存在するオーファン受容体のリガンドであるペプチドを逆薬理学的な方法で同定したところ、そのペプチドが PRL 分泌促進作用を持つことを見出し PRL-releasing peptide (以下 PrRP) と命名した。申請者は PRL 分泌調節機構について以前より研究を続けており、PrRP の PRL 分泌調節における意義を明らかにするため PrRP 受容体 (PrRP-R) に注目し、その遺伝子発現調節機構を PrRP-R の 5' 上流配列のクローニングとその機能解析を行うことにより解明しようと試みた。ヒト genomic DNA ライブラリーから PLAQUE ハイブリダイゼーションにより PrRP-R 遺伝子 5' 上流領域のクローニングを行い、翻訳開始点より 4015 塩基までの配列を決定した。クローニングされた領域には activator protein 1 (API) 、 activator protein 2 (AP2) 、 glucocorticoid response element(GRE) 、 Pituitary

homeobox 1 (Ptx1) 、 Pit 1 の他に GC box が存在することを初めて見出した。このように PrRP-R 遺伝子の 5' 上流領域には、典型的な TATAbox 、 CAATbox は認められなかったが、転写開始点の上流近傍において GCbox が存在することが判明した。そこで申請者は PrRP-R 遺伝子の 5' 上流領域のどの部位が重要であるかを調べる目的で、様々な長さの 5' 上流領域を pGL3 basic vector に組み込みルシフェラーゼ遺伝子と融合させたレポータープラスミドを作成し、下垂体由来の GH3 細胞、非下垂体由来の HepG2 、 COS7 細胞を用い、一過性強制発現系でそのレポーター活性を検討したところ、下垂体由来細胞のみならず、非下垂体由来細胞でも強い活性を認め、～4015までの 5' 上流領域までには、この受容体の下垂体優位な発現を規定している領域が含まれていない可能性がたかいと考えられた。一方、翻訳開始点から数えて、～499 塩基より～421 塩基の部分の領域が、いずれの細胞においても共通して重要なことが明らかとなったが、この領域には、GCbox (～467 塩基から～457 塩基) が存在していた。GCbox は、Spl ファミリーをはじめとする GCbox 結合転写因子の結合部位として機能し、TATA-less プロモーターにおいて、遺伝子転写に重要な役割を果たしていることが知られている。そこで申請者は次にこの GCBOX の役割を検討するため、～499 塩基までの 5' 上流領域を含むレポータープラスミド PrRP-R-Luc 及び、PrRP-R-Luc の GCbox 内に 4ヶ所の変異を加えた変異型 PrRP-R-Luc を作成し、そのレポーター活性を検討したところ、GH3 細胞、HepG2 、 COS7 細胞のいずれにおいても変異型 PrRP-R-Luc のレポーター活性は著しく減少した。この結果よりこの GCbox が PrRP-R 発現には重要であることが明らかとなった。しかし PrRP-R 遺伝子 5' 上流領域には下垂体特異的転写因子である Pit 1 及び ptx1 の結合配列様エレメントを認めたにもかかわらず、下垂体由来する細胞にとどまらず非下垂体由来細胞でも強いレポーター活性が認められたことより、少なくとも～4015までの領域に下垂体特異性を規定するサイトは存在しないことが明らかとなった。また申請者は 5'RACE 法を用いてヒト PrRP-R cDNA の 5' 端の検討を行い翻訳開始点より数えて、～429 塩基から～365 塩基にかけて少なくとも 8ヶ所の異なる 5' 端の

存在することを明らかにした。

以上、本研究は、新規のペプチド Prolactin-releasing hormone の受容体の発現調節機構について、Prolactin-releasing hormone 受容体遺伝子の 5' 上流配列をクローニングしその機能解析を行ったものであるが、従来知られていなかった Prolactin-releasing hormone 受容体遺伝子の 5' 上流配列の構造を初めて明らかにし、その発現調節に関与する因子を特定する上で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。