Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | ヒトヒスタミンH1受容体遺伝子のクローニング |
| Author(s) | 藤本, 勝巳 |
| Citation | 大阪大学, 1994, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/38923 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【17】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 藤本勝巳（ふじもとかつみ） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（医　学） |
| 学位記番号 | 第　11255　号 |
| 学位授与年月日 | 平成6年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>医学研究科生理系専攻 |
| 学位論文名 | **ヒトヒスタミンH1受容体遺伝子のクローニング** |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教　授　倉智　嘉久<br>（副査）<br>教　授　谷口　直之　　教　授　三木　直正 |

## 論文内容の要旨

［目的］

ヒスタミンH1受容体は末梢において即時型アレルギー反応や炎症反応に関与し，受容体刺激により毛細血管の透過性亢進，血管内皮細胞からの内皮依存性弛緩因子（EDRF）の遊離及び平滑筋の収縮を引き起こす。また，中枢においてはヒスタミン神経の伝達を仲介する。本研究はヒトのH1受容体遺伝子をクローニングし，H1受容体の構造と機能，組織分布及び発現節機構について解析することを目的とした。

［方法ならびに成績］

ウシ副腎髄質ヒスタミンH1受容体cDNAを鋳型とし，受容体蛋白質のN末端及びC末端領域の合成オリゴヌクレオチドをプライマーとしたPCR法により受容体翻訳領域のDNA断片（1.5kbp）を合成した。このDNA断片をプローブとしてヒトゲノムライブラリーのスクリーニングを行った。その結果，$5\times10^5$個のライブラリーから一個のポジティブクローンを得た。このクローンは18kbpのインサートを含み，サザンハイブリダイゼーション解析の結果，2.8kbpと3.0kbpの二つのSacI断片にまたがってH1受容体遺伝子が局在することがわかった。シークエンスを行った結果，この二つのSacI断片は2,164bpの5′非翻訳領域，1,461bpのH1受容体翻訳領域，そして2,231bpの3′非翻訳領域を含んでいた。ヒトH1受容体遺伝子は487個のアミノ酸をコードし，他の多くのGTP結合蛋白質共役型受容体と同様に，イントロンをもたず，七箇所の膜貫通領域を含んでいた。5′上流領域には転写調節に関係するホルボールエステル及び糖質コルチコイドの応答配列が認められた。

H1受容体遺伝子をチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞にトランスフェクションし，恒常的に発現させたH1受容体の性質を調べた。CHO細胞には大量の特異的な［$^3$H］メピラミン結合が認められた。［$^3$H］メピラミン結合の解離定数（Kd）は1.4±0.1nM，最大結合量（Bmax）は1.76±0.01pmol／mg蛋白であった。この［$^3$H］メピラミン結合はヒスタミン及び各種H1受容体拮抗薬により濃度依存的に阻害された。ヒトH1受容体に対する各種薬物のKd及びKi値は，以前に報告されているヒト各組織の値とほぼ一致した。また，ヒスタミン刺激により細胞内イノシトールリン酸（IPs）は時間及び濃度依存的に蓄積した。このIPs蓄積は，メピラミンにより濃度依存的に阻害された。これに対し，H2受容体拮抗薬であるファモチジンは［$^3$H］メピラミン結合もヒスタミンによるIPs蓄積も阻害しなかった。

ノザンブロット解析によりヒト各組織におけるH1受容体mRNAの発現を調べた。胎盤，肺，骨格筋，腎臓にお

いてＨ１受容体 mRNA に相当すると考えられる二本のバンド（3.0kb, 3.5kb）が認められた。一方，脳においては 3.5kb のバンドのみ検出された。発現量は胎盤で最も多く，次いで肺に多く，骨格筋，腎臓，脳では少なかった。また，心臓，肝臓，膵臓では検出されなかった。

ルシフェラーゼアッセイを用いてＨ１受容体遺伝子転写活性に及ぼす phorbol 12-myristate 13-acetate（PMA）及びデキサメサゾンの影響について検討した。-2164bp のＨ１受容体遺伝子上流領域においては PMA，デキサメサゾンによりそれぞれ 2.5 倍，2.1倍転写活性が増加した。また，PMA とデキサメサゾンを同時に作用させると 5.5 倍に増加した。この増加の程度は PMA 単独とデキサメサゾン単独の和よりも大きく，二つの薬物による相乗効果と考えられる。次に，PMA 及びデキサメサゾンの作用部位を調べるために，Ｈ１受容体遺伝子上流領域を 5′ 末端側から段階的に欠失させたプラスミドを作製した。Ｈ１受容体遺伝子上流領域を -1,893bp まで短くした場合でも PMA，デキサメサゾンにより転写活性が増大し，相乗効果も認められた。しかし，それ以上 5′ 末端を欠失した場合（-1,126 bp, -863bp, 578bp, -263bp）には，PMA による活性化は認められたものの，デキサメサゾン単独効果及び PMA とデキサメサゾンによる相乗効果はみられなかった。

［総括］

1）ヒトのヒスタミンＨ１受容体遺伝子を単離し，一次構造を明らかにした。

2）CHO 細胞に発現させたＨ１受容体の性質は以前に報告されているヒト組織のＨ１受容体の性質と一致した。

3）ヒトヒスタミンＨ１受容体 mRNA の発現は胎盤で最も高く，その他，肺，骨格筋，腎臓，脳において認められた。

4）PMA とデキサメサゾンは協調的にＨ１受容体遺伝子の転写活性を増大させた。

## 論文審査の結果の要旨

ヒトのヒスタミンＨ１受容体遺伝子を単離し，一次構造を明らかにした。ヒトＨ１受容体は 487 個のアミノ酸（分子量: 55,781）で構成させるＧＴＰ結合蛋白共役型受容体であった。ヒト，ウシ，ラット，モルモットのヒスタミンＨ１受容体のアミノ酸配列の相同性は，全体で 62 %，膜貫通領域で 91 %であり，膜貫通領域及び細胞内領域の膜近傍において相同性が高かった。Ｈ１受容体の第 3 及び第 5 膜貫通領域にはヒスタミンが結合すると考えられる領域が，細胞内領域には種々の蛋白キナーゼのリン酸化可能部位が見いだされた。ＣＨＯ細胞に発現させたヒトＨ１受容体は［$^{3}$H］メピラミン結合及びヒスタミン刺激によるイノシトールリン酸の蓄積においてＨ１受容体の特徴を示した。ヒトのＨ１受容体 mRNA は，脳では 1 種類，末梢組織では 2 種類存在し，胎盤で最も高い発現が認められた。ヒトＨ１受容体遺伝子の 5′ 非翻訳領域には種々の転写活性調節因子結合部位が見いだされた。ホルボールエステル及びデキサメサゾンは相乗的にヒトＨ１受容体遺伝子のプロモーター活性を増加させた。この研究は，ヒトのヒスタミンＨ１受容体遺伝子をクローニングし，Ｈ１受容体の構造と機能，組織分布及びホルボールエステルとデキサメサゾンによる発現調節機構について明らかにした。

以上のことから本論文は学位に価するものと思われる。