

Title	ビタミンDに応答する遺伝子断片の単離およびその標的遺伝子に関する研究
Author(s)	迫田, 健司
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39720
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

氏名	さこ だ けん し 迫 田 健 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 1 2 4 4 9 号
学位授与年月日	平成 8 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学位論文名	ビタミンDに应答する遺伝子断片の単離およびその標的遺伝子に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 西原 力 (副査) 教授 真弓 忠範 教授 前田 正知 教授 溝口 正

論 文 内 容 の 要 旨

ビタミンDのうち、最も強い生理活性を持つ1,25-dihydroxyvitamin D₃ [1,25-(OH)₂D₃]の生理作用は、血中カルシウム濃度の調節、細胞分化の誘導、免疫担当細胞への影響など、多岐に亘っている。このように多様な1,25-(OH)₂D₃の生理作用は主に核内に存在する Vitamin D Receptor (VDR) を介するとされている。VDRはリガンド依存的な転写因子であり、標的遺伝子の近辺に存在するビタミンD应答配列 (VDRE) に、結合補助因子であるレチノイドXレセプター (RXR) とのヘテロ二量体を形成して結合し、標的遺伝子の転写活性を調節すると考えられている。また、VDREはAGGTCAの配列が同一方向に3塩基を挟んで並ぶ Direct Repeat 3 (DR3) 型に基づく配列であることも知られている。しかし、現在までに明らかになった標的遺伝子の数はビタミンDの多岐に亘る生理作用を説明するのに十分であるとは言えない。そこで、本研究においては新規なVDREおよびその近辺の標的遺伝子の単離を目的に、大腸菌によって発現させたVDRとRXRを用いたVDR結合サイトセレクション法によってVDRが結合するラットゲノムDNA断片を単離した。

まず結合補助因子の存在下で、VDRが結合するVDREをラットゲノム中から検索した。ラットゲノムDNA断片に対してVDR/RXRを用いたセレクションサイクルを5回繰り返し、7個のクローンを単離した。各クローンをルシフェラーゼ発現レポータープラスミドに組み込んで、VDREとしての機能を検討した結果、1個のクローン Vitamin D Receptor Binding Fragment 5 (VBF5) に転写活性を負に制御する、非常に報告例の少ない negativeVDRE が存在すると推定された。データベースを用いたホモロジー検索においてはVBF5に既知の配列との相同性は確認できなかった。AGGTCAの配列が4または13塩基を挟んで同一方向に並ぶDR4とDR13配列によって構成される特徴的な配列が存在したため、この領域をVBF5-DRと名付け、VDREとしての機能を調べたところ、VBF5-DRが negativeVDRE として機能することが示された。また、VBF5-DRはVDR/RXRを含む複合体と強く結合することが明らかとなった。すなわち、単離したDNA断片VBF5は生体内でもビタミンDの作用と関係する配列であると考えられた。

次に、VDR単独ではDR3型配列を厳密に認識し結合することを考慮し、ラットゲノムDNA断片に対してVDRのみを用いたVDR結合サイトセレクション法を5回繰り返し、6個のラットゲノムDNA断片を単離した。各クローンのVDREとしての機能を検討したところ、Vitamin D Receptor Binding Fragment 3 (VBF3) にVDREが存在すると考えられた。塩基配列を決定した結果、VBF3も新規なラットゲノムDNA断片であり、AGTTCAの

配列により DR 3 を形成している領域と 26bp の中に AGTTCA に基づく配列が 4 個並ぶ領域が存在した。これらの領域を、DR Region I と DR Region II と名付け、さらに解析したところ、両領域に VDR が結合することが明らかとなり、これらの領域が VDRE と予想された。そこで、これらの領域の VDRE としての機能を検討した結果、DR Region I から DR Region II を含む領域 (DR I-DR II) を組み込んだレポータープラスミドで VBF 3 と同程度の $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ による転写活性化が観察されたが、DR Region I のみでは DR I-DR II に比べると弱く、DR Region II のみでは観察されなかった。この結果から、二つの配列や近辺の配列が協調的に働く可能性が予想され、VDR のみを用いたサイトセレクション法によって単離した VBF 3 も生理的に意義を持つゲノム DNA 断片であると推察された。

本研究の VDR 結合ゲノム DNA 断片の単離の最終目的は、新規なビタミン D 応答遺伝子の単離である。先に示した VBF 5 のような negative VDRE の報告は非常に少なく、ビタミン D の発現を抑制する遺伝子の解析は、ビタミン D の生理作用機構で最も情報の少ない部分である。そこで、VBF 5 近辺のゲノム DNA 断片を得るため、VBF 5 をプローブとしてラットゲノムライブラリーをスクリーニングし、VBF 5 を含むゲノムクローン $\lambda 1$ を単離した。 $\lambda 1$ の一部をプローブとしてラット腎臓の mRNA に対するノザンプロット解析を行ったところバンドが観察されたので、ラット腎臓 cDNA ライブラリーについてスクリーニングした結果、1 個のポジティブクローンが得られた。しかし、このクローンの塩基配列のみでは十分に情報を得ることができなかつたため、このクローンをプローブとしてさらに同じ cDNA ライブラリーのスクリーニングを試み、約 1.7kb の長さを持つクローン $\lambda c3$ を得た。 $\lambda c3$ の塩基配列を決定した結果、約 0.6kb が $\lambda 1$ の中に分かれて存在し、これらの領域がエクソンとして機能していると考えられた。また、VBF 5 はこの遺伝子のイントロンに存在していることも明らかとなった。塩基配列よりアミノ酸配列を予測したところ、 $\lambda c3$ は 563 アミノ酸と終始コドンコードしている cDNA クローンであると推定され、データベースを用いたホモロジー検索では高い相同性を持つ配列は見つからず、VBF 5 近辺遺伝子は新規な遺伝子であると考えられた。この VBF 5 近辺遺伝子の脳、心臓、腎臓、肺、精巣での発現をノザンプロット解析で観察した結果、心臓においては約 2 kb 付近に、精巣では約 10kb 付近に強いバンドが観察された。また、脳においても約 2 kb 付近にバンドが観察された。そこで、 $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ に対する応答を観察するため、GH₃細胞の RNA に対するノザンプロット解析を行った。その結果、三つのバンドが観察され、それぞれのバンドの強さを比較すると、約 10kb のバンドのシグナルが $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ の添加によって減少し、VBF 5 近辺遺伝子は新規なビタミン D 応答遺伝子であると考えられた。

今後、これらの遺伝子についてその遺伝子産物を含めて詳細に解析すると共に、本研究と同様の方法でさらに別の新規なビタミン D 応答 DNA 断片の単離とその関連遺伝子の解析を行うことにより、ビタミン D の多様な生理作用の分子レベルでの理解に対して貴重な知見を提供できると期待される。

論文審査の結果の要旨

迫田君はビタミン D の生理作用機構について分子生物学的検討を加えた。まず、サイトセレクション法のビタミン D 応答遺伝子断片 (VDRE) 単離への適用性を確認したのち、これを用いて 2 種類の新規な VDRE 断片を単離することに成功した。これらの断片の塩基配列や機能解析から、一方は 2 つの領域が協調的に機能して近辺遺伝子の転写を positive に調節している可能性を示すとともに、他方は negative VDRE を含み、その近辺遺伝子はラットで臓器により分子量の異なる産物を発現し、そのうちの 1 つの発現は培養細胞系で活性型ビタミン D により抑制されることを示した。

これらの成果はビタミン D の多様な生理作用の分子レベルでの理解に対して貴重な知見と方法論を提供したものであり、学術的にも高く評価され、博士 (薬学) の学位請求論文として、十分価値あるものと認められる。