



Title	Structure and expression of the mouse oxytocin receptor gene
Author(s)	久保田, 康愛
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40279
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	久保田 康 愛
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13261 号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Structure and expression of the mouse oxytocin receptor gene (マウスオキシトシンレセプター遺伝子の構造と発現)
論文審査委員	(主査) 教授 村田 雄二
	(副査) 教授 網野 信行 教授 谷口 直之

論文内容の要旨

【目的】

分娩に際して、子宮筋のオキシトシン感受性が急激に増加することは、種差をこえて認められる。また、オキシトシンは、子宮筋のみでなく、中枢神経系・乳腺・卵巣・子宮内膜にも存在し、様々な生理作用を持つことが知られている。これらの生理作用を解析するうえで、時期あるいは臓器特異的なオキシトシン受容体(OTR)の発現調節機構の検討とモデル動物の作成を目的として、マウスオキシトシン受容体(mOTR)遺伝子をクローニングした。

【方法】

1. マウスゲノムライブラリーからの OTR 遺伝子のスクリーニング

ヒトオキシトシン受容体(hOTR) cDNAの, Sau 3 AI断片(-67~+987)をプローブとして、ヒト胎盤およびマウス脾臓より抽出した高分子DNAを用いて、サザンブロットを行い、各々単一のシグナルであることを確認した。このプローブを用いて、129SVマウス由来のゲノムライブラリーを、ブランクハイブリダイゼーション法でスクリーニングし、 1×10^6 pfuより、1個の陽性クローンを得た。得られたファージクローンの制限酵素地図を作成するとともに、プラスミドにサブクローニングし、塩基配列をdideoxy法で決定した。

2. RACE法による mOTRcDNA 5' 末端, 3' 末端の同定

hOTRcDNAとの比較より、陽性クローンのHind III断片に、mOTRcDNAの翻訳領域の306コドンが含まれていることがわかった。これをもとに、マウス分娩時子宮由来のmRNAを用いて、RACE法(Rapid Amplification of cDNA Ends法)で、mOTRcDNA 5'末端, 3'末端の同定を行った。

3. プライマー・エクステンションによる転写開始点の決定

合成プライマー(PE-1, -433~-416)を作成し、マウス分娩時子宮由来のmRNAを用いて、プライマー・エクステンションを行ない、転写開始点を決定した。

4. マウス妊娠子宮における OTRmRNA 発現の変化

陽性クローンのHind III断片をプローブとして、マウス妊娠子宮のノザンブロットを行ない、妊娠中のOTRmRNA発現の変化を調べた。

【成績】

1. mOTR 遺伝子の単離と構造

サザンブロットの結果より、mOTR 遺伝子は、マウスゲノム内に1コピー存在することが示された。得られた塩基配列より予想されたアミノ酸配列は、388個のアミノ酸より構成される7回膜貫通型蛋白で、hOTR と91%の類似性を有していた。mOTR 遺伝子は、ヒトと同様に、4個のエクソンと3個のイントロンから構成され、エクソン1.2は非翻訳領域に相当し、エクソン3.4は翻訳領域に含まれていた。エクソン3.4間のスプライシング部位は、hOTR と同様に翻訳領域のコドン307に存在した。また、転写開始点は、メチオニンコドンより、-527bp と-531bp 上流に存在した。

2. 妊娠時子宮筋における OTRmRNA 発現の変化

妊娠時子宮筋における OTRmRNA 発現は、妊娠16日齢より増加し、分娩当日に急激な増加をみとめた。

3. 転写調節領域の解析

転写開始点より上流約1.6kbに含まれる、既知の転写因子の結合部位配列を解析した。その結果、明らかな TATA 様配列は認められなかったが、エストロゲン反応エレメント ERE や炎症性サイトカインに関連した NFIL-6, NFkB 結合部位が存在した。すでに報告されている、ヒト・ラット・ウシの OTR 遺伝子上流と70%以上の類似性を持つ塩基配列が、上流約1.5kb に90bp にわたって存在した。

【総括】

マウスオキシトシン受容体遺伝子を、129SV マウス由来ゲノムライブラリーよりクローニングした。マウスオキシトシン受容体遺伝子は、4個のエクソンと3個のイントロンから構成され、389個のアミノ酸をコードしていた。アミノ酸配列は、ヒトと91%の類似性を有していた。また、ヒトと同様に、マウス妊娠子宮でも、分娩直前に mRNA 発現量の急激な増加がみられた。さらに、転写調節領域において、種差をこえた類似性をもつ塩基配列がみとめられた。このクローンをを用いた転写調節機構の検討や、ノックアウトマウスの作成は、オキシトシン生理作用を解析する上で、有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

分娩に際して、子宮筋のオキシトシン受容体が急激に増加することは、種差をこえて認められる。時期あるいは臓器特異的なオキシトシン受容体 (OTR) の発現調節機構の検討と、モデル動物の作成を目的として、マウスオキシトシン受容体 (mOTR) 遺伝子をクローニングし、発現量の変化を妊娠子宮で解析し、以下の結果を得た。

1. mOTR 遺伝子の単離と構造

サザンブロットの結果より、mOTR 遺伝子は、マウスゲノム内に1コピー存在することが示された。得られた塩基配列より予想されたアミノ酸配列は、388個のアミノ酸より構成される7回膜貫通型蛋白で、hOTR と91%の類似性を有していた。mOTR 遺伝子は、ヒトと同様に、4個のエクソンと3個のイントロンから構成され、エクソン1・2は非翻訳領域に相当し、エクソン3・4に翻訳領域は含まれていた。エクソン3・4間のスプライシング部位は、hOTR と同様に翻訳領域のコドン307に存在した。また、転写開始点は、メチオニンコドンより、-527bp と-531bp 上流に存在した。

2. 妊娠時子宮筋における OTRmRNA 発現の変化

妊娠時子宮筋における OTRmRNA 発現は、妊娠16日齢より増加し、ヒトと同様に、分娩当日に急激な増加をみとめた。

3. 転写調節領域の解析

転写開始点より上流約1.6kbに含まれる、既知の転写因子の結合部位配列を解析した。その結果、明らかな TATA 様配列は認められなかったが、エストロゲン反応エレメント ERE や炎症性サイトカインに関連した NFIL-6, NFkB 結合部位が存在した。すでに報告されている、ヒト・ラット・ウシの OTR 遺伝子上流と70%以上の類似性を持つ塩基配列が、上流約1.5kb に90bp にわたって存在した。

以上のことより、このクローンをを用いた転写調節機構の検討や、ノックアウトマウスの作成は、オキシトシンの生理作用を解析する上で、有用であると考えられる。よって、本論文は学位の授与に値すると思われる。