

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Analysis of a novel G protein-coupled receptor gene expressed specifically in striatum
-Identification, cloning, structural and functional analysis-

和訳 線条体特異的な新規 G protein-coupled receptor 遺伝子の研究
—同定、単離、構造および機能解析—

指導教官 榊 佳之教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月 入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 水島和幸

中枢神経系は部位特異的に機能分化した多様な神経細胞によって構成されている。この機能分化の分子基盤は部位特異的に発現する遺伝子群にあると考えられる。このため、脳の部位特異的に発現する遺伝子を同定することは、神経発生、分化の分子機構や各部位の分化形質、特異的生理機能を分子レベルで理解する上で有効な手段になると思われる。

特異的発現パターンを示す遺伝子の同定手段としては様々な方法論があるが、ディファレンシャルディスプレイ(Differential Display: DD)法には様々な挙動を示す転写物を同時に視覚化することができ、さらにPCR法を用いることで少量のサンプル、発現量の少ない転写物を比較することができるという利点がある。そこで本研究では、まず蛍光DD(Fluorescent Differential Display: FDD)

法を用いてラットの脳の部位の違いにおいて発現量が特異的に変化する新規遺伝子の同定を試みた。

ラット脳より、嗅脳、大脳皮質、小脳、視床・視床下部、線条体、海馬、橋・延髄を分離、RNA を調整し、FDD を行った。96 のプライマーの組み合わせで FDD を行った結果、部位特異的に発現するバンド 6 本を見出し、それぞれをゲルから切り出してクローニングを行った。これらの塩基配列を決定し重複を除いたところ、発現量の変化する 4 種類の cDNA 断片をクローニングすることができた。このうち 3 種類は既知の遺伝子に由来するものであった。それらは小脳に多く発現する *Zic* 遺伝子、GABA-A レセプターデルタサブユニット遺伝子、嗅脳に多く発現する *S100D* 遺伝子で、いずれもこれまでに報告された発現部位と合致していた。残りの 1 種は、線条体に特異的な発現を示し、ホモロジー検索の結果、EST も含めて既知の配列と合致せず、新規遺伝子に由来するものと考えられた。この cDNA 断片をプローブにラット脳の各部位に対してノーザンブロットを行ったところ、線条体特異的に約 4.2Kb のバンドが得られた。さらにラット脳 *in situ* hybridization によっても線条体特異的な発現が確認された為、この線条体特異的に発現する新規遺伝子について詳細に解析を行うこととした。

まず、この遺伝子の全長 cDNA を単離するためにラット線条体 cDNA を用いた RACE とラット線条体 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、10 個のクローンが得られ、うち 1 つのクローンに全長 cDNA が含まれていた。これは 1155 塩基の open reading frame (ORF) をもち、385 個のアミノ酸をコードしていた。ハイドロパチー解析の結果、7 回膜貫通領域を持つことが予想され、さらに第 3 膜貫通領域において既知の G protein-coupled receptor (GPCR) とホモロジーを持つことから、線条体特異的に発現する新規 GPCR であると考えられた。我々はこれを striatum-specific GPCR, *Strg* と命名した(その後 GPCR 統一命名システムより *Gpr88* と命名された)。他の GPCR との比較ではアミノ酸レベルにおいて 5-hydroxytryptamine 1D receptor と膜貫通領域において 27% の、全体において 18% の相同性が見られ、さらに β 3 adrenergic receptor と膜貫通領域において 21% の、全体において 18% の相同性が得られた。多くの GPCR は第 3 膜貫通領域において受容体の活性化に関与すると考えられている DRY モチーフを持つが、*Strg/Gpr88* では NRY に置換されていた。さらにアミンレセプターでは第 2 および第 4 細胞外ループにシステイン残基をも

ち、ジスルフィド結合によって受容体の構造の安定化に関与すると考えられているが、Strg/Gpr88 ではいずれのループにおいてもシステイン残基は存在しなかった。これらの構造的特徴から Strg/Gpr88 は GPCR の新しいサブタイプである可能性も示唆された。

さらに、ラット Strg/Gpr88 のヒトおよびマウスのホモログを得るため、ラット Strg/Gpr88 の塩基配列をもとにプライマーを作成し、マウス脳 RNA およびヒト尾状核 RNA から RT-PCR を行った。この結果、予想された長さの cDNA 断片が得られ、塩基配列上それらがラット Strg/Gpr88 のホモログであることを確認した。さらに RACE 法にて全長 cDNA を得てその構造を決定した結果、ヒト STRG/GPR88 およびマウス Strg/Gpr88 はラット Strg/Gpr88 とアミノ酸レベルでそれぞれ 95%、98%の高い相同性が見られた。さらに 5'非翻訳領域においても 83%の高い相同性が見られ、構造上強く保存されていることが示された。

ヒト STRG/GPR88 のノーザンブロット解析を行った結果、脳以外の末梢臓器ではこの遺伝子は明らかな発現は認められず、脳においては尾状核、被殻に強い発現を認め、さらに延髄に弱い発現を認めた。マウス Strg/Gpr88 の発現はノーザンブロットの結果、全身臓器において脳のみ強い発現を認めた。さらにマウス脳において詳細な発現分布を検討するために、*in situ* hybridization を行った。その結果、線条体、側坐核、嗅結節さらに下オリブ核の神経細胞に発現を認めた。また、マウスの発生段階においては胎生 16 日齢において線条体に発現を認めた。マウスの下オリブ核に発現していることから、ヒト延髄におけるヒト STRG/GPR88 の発現は下オリブ核での発現を反映している可能性が示唆された。これらの結果より、Strg/Gpr88 はヒトおよびマウス、ラットにおいて、構造および発現様式が強く保存されていることが示され、線条体の機能に強く関与している可能性が示唆された。線条体は随意運動の調節、情動行動を制御すると考えられており、さらに下オリブ核も行動の調節に関与すると考えられていることから、Strg/Gpr88 は行動の調節に関与している可能性が示唆された。

次に、ヒトおよびマウス Strg/Gpr88 遺伝子の構造を明らかにするために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、ヒトおよびマウス Strg/Gpr88 遺伝子は ORF 内にイントロンを認めず、5'非翻訳領域に約 400bp の一つの短いイントロンを持つことが明らかになった。イントロンの長さはそれぞれ異なるものの、この構造は他の GPCR においても多く見られる構造で

あった。また、それぞれの遺伝子座は FISH 法にて互いに syntenic なヒト 1p21, マウス 3G1 領域にマップされた。

マウスの遺伝子構造の知見に基づいてターゲティングベクターを構築し、ノックアウトマウスの作製を現在進行中である。また、得られた遺伝子クローンより、ヒトおよびマウスにおいて転写開始点からそれぞれ上流 5kb、7kb のゲノム塩基配列を決定し、両遺伝子の構造を比較したところ、翻訳開始点から約 1kb において 70%以上の高い相同性が保たれていた。さらに上流 4kb にわたり、60%の相同性をもつ領域が 3 箇所存在することも明らかになった。ヒトとマウスにおいて高度に保存されている領域は線条体特異的な遺伝子の発現に関与している可能性が高いと考え、この領域を *GFP* 遺伝子および *lacZ* 遺伝子上流に組み込んだ融合遺伝子を持つトランスジェニックマウスを作成した。現在、得られたマウスの解析を進めている。その一方で酵母 1 ハイブリッド法を用いて、この領域に結合する因子をマウスおよびヒト脳 cDNA ライブラリーからスクリーニングした。その結果、両方のライブラリーから basic helix-loop-helix ドメインを持つ SEF2 転写因子が得られた。SEF2 は脳に強く発現がみられ、E-box に結合して転写を活性化することが知られている。ヒト *STRG/GPR88* 遺伝子プロモーター上の高保存領域には E-box が 10 個存在している。酵母 1 ハイブリッドアッセイを用いて様々なプロモーター変異体を検討した結果、10 個の E-box のうちマウスおよびラットにおいても保存されている 2 つの E-box に SEF2 が機能的に結合することが示された。今後、トランスジェニックマウスの解析結果と併せて、これらの E-box および SEF2 転写因子が線条体における *Strg/Gpr88* の転写制御に果たす役割を検討する予定である。

本研究では、ヒトおよびマウス、ラットにおいて線条体特異的な発現パターンとその構造が高度に保存された GPCR である *Strg/Gpr88* 遺伝子を新たに同定、単離し、その発現分布、構造およびプロモーター解析を行った。近年、いくつかのオーファンレセプターに対する新たなリガンドの発見が報告され、その生理機能に対する新たな知見が得られているが、本研究において単離された新規 GPCR においても、現在作製中のノックアウトマウスの解析やリガンド探索により、線条体機能の解明や創薬への寄与が期待される。また本遺伝子のプロモーターによって、従来不可能であった外来性遺伝子の線条体特異的発現が実現し、線条体の生理機能や病態を研究する新たな手段が開発される可能性も高いと思われる。