

# 論 文 概 要

## ○論文題目

Preproendothelin-2: gene structure, expression, evolution, production, function, and regulation

(エンドセリン 2 前駆体の遺伝子の構造、発現、進化、産生、機能および制御に関する研究)

## ○紹介教員：

人間総合科学研究科 生命システム医学専攻  
松崎一葉 教授

(所 属) (国立大学法人) 筑波大学

(国立研究開発法人) 産業技術総合研究所

(一般財団法人) 総合科学研究機構

(氏 名) 齊田 要

**目的：** エンドセリン (ET) は血管収縮活性を持つ強力な生理活性ペプチドで、筑波大学により哺乳類で発見され (Nature1988)、3 種類のファミリーペプチド (ET1, ET2, ET3) の存在が推定された (PNAS1989)。その一つエンドセリン 2 (ET2) ペプチドはアミノ酸配列が遺伝子断片の解析から推定され、化学合成されたが、その詳細は長らく不明であった。そこで ET2 の発現や産生や機能や制御を解明するために、ET2 前駆体の遺伝子の全長を単離してその構造解析や発現解析や機能推定や制御解析を行った。

**対象と方法：** マウスの染色体 DNA のフェージライブラリーから、ET2 のマウス遺伝子の全長 DNA を含むフェージを、ET2 の cDNA をプローブにして単離した。そのマウス DNA の全塩基配列を決定して、cDNA の全塩基配列と比較することにより、マウス ET2 の前駆体の遺伝子の全長の構造を明らかにした。塩基配列をアミノ酸配列に翻訳することにより、ET2 の前駆体タンパク質のアミノ酸配列を明らかにした。また ET2 前駆体遺伝子に特異的なプライマー配列を設計・合成して RT-PCR 法にて ET2 前駆体遺伝子の発現組織の解析を行った。さらに ET2 前駆体遺伝子の発現調節機能を解明するには ET2 前駆体遺伝子発現細胞株の同定が必要で、種々の細胞株を培養してその遺伝子発現を RT-PCR 法にて探索して ET2 前駆体遺伝子の高発現細胞株を同定した。さらに ET2 前駆体遺伝子の上流域をレポーター遺伝子に連結し高発現細胞株に導入して ET2 前駆体遺伝子のプロモーターを解析した。

**結果：** マウス染色体フェージライブラリーから 2 種類の重なり合う遺伝子が単離され、それらを繋ぐことによりマウス ET2 前駆体遺伝子とその上流域の全構造 (10kb) が明らかになった。ET2 前駆体タンパク質は 175 個のアミノ酸からなり、中間体ペプチドを経てアミノ酸 21 個の成熟型 (=生理活性を有する) ET2 が生成される構造であった。遺伝子のエクソン-イントロン構造の解析より、ET2 の前駆体タンパク質は 6 kb の遺伝子領域に渡る 5 個のエクソン領域に分割して存在していた。前駆体タンパク質には ET2 と類似ペプチド領域が存在したが、それらはエクソン 2 とエクソン 3 に分断されて存在していた。ヒト ET1 の前駆体の遺伝子と比較すると、成熟ペプチドを中心に相同性が見られた。ACHN 腎癌細胞に ET2 前駆体の cDNA を導入すると ET2 が高産生された。このペプチド産生は、cDNA の 3' 非翻訳領域 (AU が豊富な配列) を欠損すると増大した。RT-PCR 法で ET2 前駆体遺伝子の発現解析をすると胎仔の後期において高発現が見出された。ET2 前駆体の遺伝子発現はマウス胎仔や成体の腸管で見出された。胎仔よりも成体の腸において発現が 10 倍高かった。さらに ET2 発現細胞株を探索した所、PC12 細胞において ET2 の高発現が見出された。そ

の PC12 細胞に ET2 前駆体遺伝子上流域をレポーター遺伝子と共に導入するとレポーター遺伝子の高発現が観察された。

**考察：** ET2 前駆体タンパク質には ET2 と類似ペプチド領域がエクソン 2 とエクソン 3 に分断されて存在していた事より、共通の原始エクソンからエクソン重複が起こって ET2 前駆体遺伝子が生成したと推定された。ヒト ET1 の前駆体の遺伝子と比較すると、成熟ペプチドを中心に相同性が見られた事より、二つの ET 前駆体遺伝子は進化的に近く、共通祖先遺伝子から遺伝子重複によって生成されたと推定された。ET2 の cDNA を導入した ACHN 腎癌細胞は ET2 を産生したが、cDNA の 3' 非翻訳領域 (AU が豊富な配列) を欠損すると産生増大した事からこの配列は mRNA の寿命を短くする (不安定化させる) と推定された。ET2 前駆体の遺伝子発現はマウス胎仔や成体の腸管で見出され、胎仔よりも成体の腸において発現が 10 倍高いことから腸の成長や機能に関与していると推定された。遺伝子発現は後期胎仔で増大した事より、胎仔のこの成長時期で重要な機能を発揮していると推定された。レポーター遺伝子解析から ET2 前駆体遺伝子上流域 1 kb に ET2 前駆体遺伝子発現の調節領域が存在することが推定された。主論文 (筆頭著者) 3 報の結果を元に、ET2 の機能をさらに解析した。関連論文 1) 消化管の各部位における発現を定量すると大腸において最大発現が見出された。ET2 の免疫組織染色によりペプチドの生産は腸管粘膜の上皮細胞の基底膜、神経線維や腺や免疫関連細胞等で見出された。DSS で誘導した大腸炎では ET2 の発現が上昇していて、免疫系に関与していると推定された。関連論文 2) マウス皮膚の上皮細胞の紫外線照射で短波長の UVC が ET2 の発現を上昇させることが見出され、皮膚の構造と機能の維持や保護や黒色化に関与すると推定された。関連論文 3) マウスの培養皮膚細胞において細胞分化は細胞外 Ca<sup>2+</sup>によって誘導されるが、ET2 の発現誘導が細胞分化に関連することが見出された。ROCK 阻害剤が ET2 の発現上昇や形態変化や CE 産生や TG 1 発現を阻止した。ET2 の発現は皮膚分化のマーカーになると推定された。

**結論：** ET2 前駆体のマウス遺伝子を単離して解析することにより、前駆体遺伝子の全構造、進化、産生、組織特異的発現、発現制御領域等をマウスにおいて解明し、さらに機能を推定した。これらの成果を用いて次は、遺伝子欠損マウスの作成や発現調節機構の詳細な解析が可能になるので、ET2 機能のさらに詳細な解明に貢献できると思われた。本研究はマウスを用いた研究ではあるが、ヒト ET2 の遺伝子構造や機能推定に直接的間接的に貢献できると思われる。この研究を元にしてヒト ET2 遺伝子が原因で起こるヒト疾患の診断や病因解明や治療に関する医学に貢献できると思われた。