

学 位 論 文 要 旨

氏 名	パッタナポン・タッター
題 目	ブタの核内受容体クラス1遺伝子の構造解析と発現解析 (Structure and Expression Analysis of Nuclear Receptor Class1 Genes in <i>Sus scrofa</i>)

核内受容体はリガンド依存性の転写制御因子で、発育や分化、繁殖、代謝、免疫などに関わる遺伝子の発現を制御していることが知られている。家畜、特にブタにおいては核内受容体についての研究が少ないため、ブタの核内受容体である *CAR*, *PXR*, *LXR α* および *ROR γ* について、遺伝子のクローニングと cDNA のシーケンスなどを行った。すなわち、PEDE データベース (Pig EST Data Explorer) からヒトの遺伝子配列を用いて *CAR*, *PXR*, *LXR α* および *ROR γ* の全長 cDNA クローンを検索し、それらの cDNA クローンのシーケンスを行い、他の動物種と比較するとともに、各遺伝子のゲノム構造を推定した。

Pregnane X 受容体 (*PXR*; *NR1I2*) と constitutive androstane 受容体 (*CAR*; *NR1I3*) は、内在性ホルモンや外因性化学物質の代謝に関わる酵素をコードしている重要ないくつかの遺伝子の発現を制御している。ブタの *CAR* の mRNA は 1407bp で、5'-UTR が 216bp、3'-UTR が 144bp、コーディング領域が 1047bp で 348 個のアミノ酸をコードしている。ブタの *PXR* の mRNA は全長 2567bp で、272bp の 5'-UTR と 1266bp のコーディング領域、1028bp の 3'-UTR を含み、421 個のアミノ酸をコードしていた。RT-PCR による分析の結果、ブタの *CAR* と *PXR* の mRNA はどちらも肝臓、小腸および腎臓で発現していた。

liver X 受容体 α (*LXR α* ; *NR1H3*) はコレステロールや脂肪酸、グルコースを代謝するいくつかの重要な遺伝子の転写制御因子である。われわれはブタ *LXR α* の 3 つの転写変異体をクローニングし、塩基配列を決定した。ブタ *LXR α -1* と *LXR α -2* は 447 アミノ酸をコードしている同一のコーディング領域を含むが、5'-UTR が異なり、*LXR α -1* の 5'-UTR は 145bp であり、*LXR α -2* の 5'-UTR は 178bp であった。ブタ *LXR α -3* はインフレーム TGA ストップコドンを含む不完全な転写産物であった。RT-PCR の結果、ブタ *LXR α -1* は肝臓、腎臓、小腸、心臓、骨格筋、胸腺、脾臓、大脳で発現していたが、*LXR α -2* は胸腺と脾臓でのみ発現していた。

レチノイン酸関連オーファン受容体 γ (*ROR γ* ; *NR1F3*) は T 細胞やリンパ節の分化に関連していると考えられている。われわれは 4 つのブタ *ROR γ* の転写変異体をクローニングし塩基配列を決定した。4 つの転写変異体ともに 5'-UTR は全く異なっていたが、コーディング領域と 3'-UTR は似通いが認められた。ブタ *ROR γ -1* は *ROR γ -2* と比較してコーディング領域に 63bp の追加的な配列があり、D ドメインの N 末端側に 21 個のアミノ酸の追加が認められた。ブタ *ROR γ -3* と *ROR γ -4* は機能的な DNA 結合領域やリガンド結合領域を欠いていた。ブタ *ROR γ -1* の mRNA は肝臓、腎臓、小腸、心臓、骨格筋、胸腺、脾臓、大脳で発現していたが、*ROR γ -2* は胸腺と脾臓でのみ発現していた。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Pattanapong Thadtha
題 目	Structure and Expression Analysis of Nuclear Receptor Class1 Genes in <i>Sus scrofa</i> (ブタの核内受容体クラス1遺伝子の構造解析と発現解析)

Nuclear receptors are ligand-inducible transcription factors that have been known to regulate the expression of genes involved in growth and development, reproduction, metabolism, and immunity. Because studies of nuclear receptors in farm animals, especially in swine, are very few, our objective was to identify and sequence complimentary DNAs encoding nuclear receptors *CAR*, *PXR*, *LXR α* , and *ROR γ* in swine. We searched the PEDE database (Pig EST Data Explorer) in order to identify cDNA clones encoding nuclear receptors *CAR*, *PXR*, *LXR α* and *ROR γ* in porcine genome using human sequences as queries. In present study, we report the sequence data of full-length cDNA clones encoding nuclear receptors *CAR*, *PXR*, *LXR α* , and *ROR γ* in swine.

The pregnane X receptor (*PXR*; *NR1I2*) and the constitutive androstane receptor (*CAR*; *NR1I3*) regulate the expression of several important genes that encode enzymes responsible for the metabolism of endogenous hormones and exogenous substances. The porcine *CAR* gene has a 1407 bp mRNA, which contains a 216 bp 5'-untranslated region (UTR), a 144 bp 3'-UTR, and a 1047 bp coding region that encodes 348 amino acids. The porcine *PXR* is composed of 2567 bp that contains a 273 bp 5'-UTR, a 1266 bp putative coding region encoding 421 amino acids, and a 1028 bp 3'-UTR. The mRNA expression of both porcine *CAR* and *PXR* was detected in liver, small intestine, and kidney by using reverse-transcription (RT)-PCR.

The liver X receptor alpha (*LXR α* ; *NR1H3*) functions as a transcriptional regulator of several important genes involved in the metabolism of cholesterol, fatty acids, and glucose. Three porcine *LXR α* transcripts were identified and sequenced. The porcine *LXR α -1* and *LXR α -2* contain identical coding regions encoding 447 amino acids, but differ in 5'-UTR (145bp in *LXR α -1* and 178bp in *LXR α -2*). The porcine *LXR α -3* transcript represents an incomplete transcript that has an in-frame TGA stop codon. By using RT-PCR, the expression of the porcine *LXR α -1* transcript was detected in the liver, kidney, small intestine, heart, muscle, thymus, spleen, and brain, whereas the porcine *LXR α -2* transcript was expressed in the thymus and spleen.

The retinoic acid related orphan receptor gamma (*ROR γ* ; *NR1F3*) has been proposed to involve in the T cell and lymph node development. Four porcine *ROR γ* transcripts, designated porcine *ROR γ -1*, *ROR γ -2*, *ROR γ -3*, and *ROR γ -4* were identified and sequenced. All four transcripts differ in the non-coding 5'-UTRs, but similar in coding regions and 3'-UTRs. The porcine *ROR γ -1* transcript has an additional 63 base in the open reading frame (518 amino acids). This 63-base insertion encodes additional 21 amino acid residues in N-terminal of the D domain when compared to porcine *ROR γ -2* (497 amino acids). The transcript variants 3 and 4 encode porcine *ROR γ* isoforms lacking functional DBD and/or LBD. The mRNA expression of the porcine *ROR γ -1* transcript was detected in the liver, kidney, small intestine, heart, muscle, thymus, spleen, and brain, whereas the porcine *ROR γ -2* transcript was expressed in the thymus and spleen.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	Pattanapong Thadtha
審査委員	主査 佐賀大学 教授 和田康彦
	副査 佐賀大学 准教授 小林 真
	副査 鹿児島大学 教授 前田芳實
	副査 佐賀大学 教授 尾野喜孝
	副査 鹿児島大学 教授 岡本 新
審査協力者	
題 目	ブタの核内受容体クラス1遺伝子の構造解析と発現解析 (Structure and Expression Analysis of Nuclear Receptor Class1 Genes in <i>Sus scrofa</i>)
<p>核内受容体はリガンド依存性の転写制御因子で、発育や分化、繁殖、代謝、免疫などに関わる遺伝子の発現を制御していることが知られている。家畜、特にブタにおいては核内受容体についての研究が少ないため、ブタの核内受容体である <i>CAR</i>, <i>PXR</i>, <i>LXRα</i> および <i>RORγ</i> について、遺伝子のクローニングと cDNA のシーケンスなどを行った。すなわち、PEDE データベース (Pig EST Data Explorer) からヒトの遺伝子配列を用いて <i>CAR</i>, <i>PXR</i>, <i>LXRα</i> および <i>RORγ</i> の全長 cDNA クロームを検索し、それらの cDNA クロームのシーケンスを行い、他の動物種と比較するとともに、各遺伝子のゲノム構造を推定した。</p> <p>Pregnane X 受容体 (<i>PXR</i>; <i>NR1I2</i>) と constitutive androstane 受容体 (<i>CAR</i>; <i>NR1I3</i>) は、内在性ホルモンや外因性化学物質の代謝に関わる酵素をコードしている重要ないくつかの遺伝子の発現を制御している。ブタの <i>CAR</i> の mRNA は 1407bp で、5' -UTR が 216bp、3' -UTR が 144bp、コーディング領域が 1047bp で 348 個のアミノ酸をコードしていた。ブタの <i>PXR</i> の mRNA は全長 2567bp で、272bp の 5' -UTR と 1266bp のコーディング領域、1028bp の 3' -UTR を含み、421 個のアミノ酸をコードしていた。RT-PCR による分析の結果、ブタの <i>CAR</i> と <i>PXR</i> の</p>	

mRNA はどちらも肝臓、小腸および腎臓で発現していることを明らかにした。

Liver X 受容体 α ($LXR\alpha$; $NR1H3$) はコレステロールや脂肪酸、グルコースを代謝するいくつかの重要な遺伝子の転写制御因子である。そこで、ブタ $LXR\alpha$ の 3 つの転写変異体をクローニングし、塩基配列を決定した。ブタ $LXR\alpha-1$ と $LXR\alpha-2$ は 447 アミノ酸をコードしている同一のコーディング領域を含むが、5'-UTR が異なり、 $LXR\alpha-1$ の 5'-UTR は 145bp であり、 $LXR\alpha-2$ の 5'-UTR は 178bp であった。ブタ $LXR\alpha-3$ はインフレーム TGA ストップコドンを含む不完全な転写産物であった。RT-PCR の結果、ブタ $LXR\alpha-1$ は肝臓、腎臓、小腸、心臓、骨格筋、胸腺、脾臓、大脳で発現していたが、 $LXR\alpha-2$ は胸腺と脾臓でのみ発現していることを明らかにした。

レチノイン酸関連オーファン受容体 γ ($ROR\gamma$; $NR1F3$) は T 細胞やリンパ節の分化に関連していると考えられている。そこで、4 つのブタ $ROR\gamma$ の転写変異体をクローニングし塩基配列を決定した。4 つの転写変異体ともに 5'-UTR は全く異なっていたが、コーディング領域と 3'-UTR はホモロジーが認められた。ブタ $ROR\gamma-1$ は $ROR\gamma-2$ と比較してコーディング領域に 63bp の追加的な配列があり、D ドメインの N 末端側に 21 個のアミノ酸の追加が認められた。ブタ $ROR\gamma-3$ と $ROR\gamma-4$ は機能的な DNA 結合領域やリガンド結合領域を欠いていた。ブタ $ROR\gamma-1$ の mRNA は肝臓、腎臓、小腸、心臓、骨格筋、胸腺、脾臓、大脳で発現していたが、 $ROR\gamma-2$ は胸腺と脾臓でのみ発現していることを明らかにした。

以上より本論文はブタの PXR , CAR , $LXR\alpha$ および $ROR\gamma$ について cDNA クローニングを行いそれらの転写産物の塩基配列を決定するとともに、それらの遺伝子のゲノム構造を推定したものである。さらに、 $LXR\alpha$ および $ROR\gamma$ では mRNA に複数のバリエーションが存在し、RT-PCR により $LXR\alpha$ と $ROR\gamma$ について胸腺と脾臓でのみ特異的に発現している転写産物が存在することを明らかにした。

これらの成果は家畜の核内受容体のクラス 1 遺伝子についての基礎的な知見を提供するとともに、家畜の生体内でのホルモンやビタミンの生理作用を分子生物学的に解明する端緒となるものであり、動物遺伝育種学上の貢献は大きいと思われる。従って、博士（農学）の学位論文として十分に価値があるものと判定した。

最終試験結果の要旨

学位申請者 氏名	Pattanapong Thadtha		
審査委員	主査	佐賀大学 教授	和田康彦
	副査	佐賀大学 准教授	小林 真
	副査	鹿児島大学 教授	前田芳實
	副査	佐賀大学 教授	尾野喜孝
	副査	鹿児島大学 教授	岡本 新
審査協力者			
実施年月日	平成20年 1月 23日		
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。)			<input checked="" type="radio"/> 口答・筆答
<p>主査及び副査は、平成20年 1月23日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>			

学位申請者	
氏名	Pattanapong Thadtha

[質問 1] 近年、miRNA と mRNA の非翻訳領域との相互作用について話題になっているが、今回調べた遺伝子については何か検討しているのか？

[回答 1] データベースで検索したが、非翻訳領域上には miRNA の結合領域は存在していなかった。

[質問 2] $LXR\alpha-1$ と $LXR\alpha-2$ や $ROR\gamma-1$ と $ROR\gamma-2$ のようなバリエーション間で塩基配列の違いが小さいが、そのような違いで機能に変化があると考えられるのか。

[回答 2] マウスやヒトの核内受容体ではわずかな違いで機能に変化が生じることが報告されている。たとえばヒトの $ROR\gamma$ と $ROR\gamma t$ は $LXR\alpha-1$ と $LXR\alpha-2$ と同じように翻訳領域が同じで 3' 側の非翻訳領域のみに違いがあるが、 $ROR\gamma$ は多くの組織で発現しているのに対して $ROR\gamma t$ は胸腺で発現し、T 細胞の成熟化に必須の因子であることが知られている。

[質問 3] $LXR\alpha-3$ と $ROR\gamma-3$ のサイズが小さいがライブラリ作成上の問題ではないのか。

[回答 3] PEDE はオリゴキャプ法を用いて全長 mRNA のみをトラップしてライブラリ化しているが、これらの mRNA には途中にストップコドンが挿入されているので本来の核内受容体の機能は果たしていないと考えられる。ただ、RNA として転写制御などに関わっている可能性があるため、これらのバリエーションの発現についても今後詳細に検討したい。

[質問 4] PXR と CAR は代謝に関連しているとのことだが、腎臓で発現しているのは何故か。

[回答 4] ヒトやマウスでも PXR と CAR は腎臓で発現していることが示されている。腎臓ではリガンドとなるような物質の排泄に関係している可能性があるが詳細は不明である。

[質問 5] PXR や CAR は phenobarbital をリガンドとするようだが、phenobarbital は脳に作用する物質である。これらの遺伝子は脳でも発現しているのか。

[回答 5] ヒトやマウスでは脳では全く発現していない。PXR や CAR は phenobarbital の生理作用に関わる受容体ではなく、phenobarbital の代謝や排泄に関わる受容体なので、脳では発現していないのではないかと考えられる。

[質問6] PXR や CAR はステロイドホルモン類もリガンドとするようだが、これらの遺伝子は生殖腺においては発現していないのか。

[回答6] ヒトやマウスでは生殖腺では全く発現していない。PXR や CAR はステロイドホルモンの生理作用に関わる受容体ではなく、ステロイドホルモンの代謝や排泄に関わる受容体なので、生殖腺では発現していないのではないかと考えられる。

[質問7] *LXR α -1* は多くの臓器で発現しているが、脳でも発現している。*LXR α -1* はコレステロールや胆汁酸の代謝に関与しているとのことだが、脳で発現しているのは何故か。

[回答7] 脳でもコレステロール類の代謝に関係していると考えられる。ヒトでは *LXR α -1* はアルツハイマー病などと関連があるのではないかと疑われている。

[質問8] *ROR γ -1* の D 領域は *ROR γ -2* や他の動物種の D 領域とホモロジーが低い、ブタの *ROR γ -1* には何か特異的な機能があるのか。

[回答8] ブタの *ROR γ -2* はヒトやマウスの *ROR γ* のホモログであると考えられるが、今のところ PEDE 中ではヒトやマウスの *ROR γ* に相当するクローンは見つかっていない。*ROR γ -1* はそれらとは D 領域が大きく異なっており、また、*ROR γ -1* と *ROR γ -2* は他の領域ではアミノ酸レベルでの相同性は高いが、塩基配列ではわずかではあるが塩基置換が認められ、これらはゲノム上の別の領域に存在する異なる遺伝子である可能性がある。

[質問9] *ROR γ* は免疫と関わりが深いようだが、*ROR γ -1* は多くの臓器で発現している。心臓でも発現しているが、何か免疫と関係があるのか。

[回答9] *ROR γ* はヒトでは心臓では発現していないが、マウスではわずかに発現している。*ROR γ* は T 細胞分化やリンパ節分化に関与していることが知られているが、それら以外の組織でも発現していることから、*ROR γ* は他にも生理機能を持っているのではないかと疑われる。