

氏 名	北 徹 きた おおる
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	医 博 第 527 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Purification and Characterization of the Messenger RNA Coding for Bovine Corticotropin- β -Lipotropin Precursor (牛コルチコトロピン- β -リポトロピン前駆体の鋳型となるメッ センジャー RNA の精製とその特徴)
論文調査委員	(主 査) 教 授 井 村 裕 夫 教 授 沼 正 作 教 授 河 合 忠 一

論 文 内 容 の 要 旨

下垂体ホルモンであるコルチコトロピン (ACTH), β リポトロピン (β LPH) は, それぞれ39,91個のアミノ酸から構成され, しかもそれぞれが数種の生物活性を有するペプチドを含んでいる事が知られている。著者等は牛下垂体 mRNA を無細胞蛋白合成系で翻訳させる事により, ACTH, β LPH は分子量41000 (性質の異なるゲル電気泳動を用いると35000であるが) から成る共通前駆体から生成される事を明らかにした。しかし ACTH, β LPH 分子量は合計しても14600であり, 前駆体の残りの部分が如何なる生物学的意味を持つのか全く不明である。一方血中, あるいは下垂体の ACTH, β LPH, β LPH 由来の β エンドルフィンなどはグルココルチコイドにより減少するが, 著者等は無細胞蛋白合成系を用い, この現象が ACTH, β LPH mRNA の減少の結果である事を明らかにし, 更にこの調節がグルココルチコイド受容体を介して ACTH, β LPH 遺伝子の転写段階で行なわれている事を示唆する結果を得た。しかしその詳細な分子機構はなお多くの点が不明である。従って ACTH- β LPH 前駆体一次構造の決定, 並びに ACTH, β LPH 遺伝子発現の調節機構の研究は興味ある重要な問題であるが, 著者はこの問題を追求するため純粋な ACTH- β LPH mRNAを得る事を試みその純化に成功し諸性質を明らかにした。

材料は牛下垂体中後葉を用い下記の方法で mRNA の精製を行なった。下垂体から中後葉を分離ホモジネートし, 遠心分画で膜結合ポリゾーム画分を得る。この画分をデタージェント処理した後フェノール抽出する事により得られた RNA を oligodT セルロース, poly U セファロースにかけ, poly A-RNA を集める。次に5-25%蔗糖密度勾配により RNA の大きさの差を利用して分画を行ない2回目の蔗糖密度勾配で 17S 付近に単一のピークを示す RNA を最終 mRNA 標品とした。各段階の精製度は無細胞蛋白合成系を用いて ACTH- β LPH mRNA 活性を測定する事により決定したが, 420頭の牛下垂体から出発し最終標品は154倍精製され, 収率は1.8%であった。最終 mRNA 標品がほぼ純粋である事は次に述べる種々の結果より明らかとなった。即ち精製 mRNA を無細胞蛋白合成系で翻訳し SDS ゲル電気泳動により解析すると翻訳生成物は単一のバンドを示し, しかも ACTH, β LPH に共通の前駆体分子

量 41000 から成るポリペプチドである事が確認された。次に本 mRNA に対する cDNA を逆転写酵素で合成し、cDNA と mRNA とのハイブリッド形成の速度論的解析結果から純度96%以上である事が明らかとなった。又 ACTH- β LPH mRNA は、ホルムアミド入りポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一のバンドを示し、既知の分子量のマーカを用いた結果その分子量は約 450000 で約 1360 個のヌクレオチドを含む事が明らかとなった。更に ^3H ラベル poly U のハイブリッド形成により、本 mRNA は約 68 個の poly A を含む事が示された。従って ACTH- β LPH mRNA は ACTH, β LPH 前駆体を十分に含む大きさであり、更にアミノ酸をコードしない約 200-300 個のヌクレオチドを有している事が明らかとなった。

本 mRNA の精製は数種の活性ペプチドを含むホルモンの mRNA としては初めての例である。

論文審査の結果の要旨

著者は牛下垂体中後葉からコルチコトロピン (ACTH), β リポロン (β LPH) の共通前駆体の鋳型となるメッセンジャー RNA (mRNA) を精製し均一化した。この mRNA の均一性は、その翻訳生成物の解析、mRNA のホルムアミド入りポリアクリルアミドゲル電気泳動による解析、更に mRNA とその cDNA とのハイブリッド形成の速度論的解析結果から立証された。精製方法としては、膜結合ポリゾーム由来の RNA の単離、オリゴ dT セルロース、ポリ U セファロースによるアフィニティークロマトグラフィー、そして蔗糖密度勾配法を用いた。精製された mRNA は約 45 万の分子量で、それは約 1360 個のヌクレオチドに相当し、ポリアデニル酸は平均 68 個のヌクレオチドであった。この mRNA の大きさは、ACTH- β LPH 前駆体の鋳型としては十分である。

上述の mRNA 精製は数種の活性ペプチドを含むホルモンの mRNA として最初の成功例であり、今後生化学、内分泌学の発展に寄与するところが極めて多い。

したがって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。