

メラノコルチン受容体のクローニングおよび
薬理的性質

下 東 義 正

目 次

第1章	メラノコルチン受容体のクローニングおよび薬理的性質	1
第1節	メラノコルチン受容体のクローニング	1
第2節	MCR受容体のクローニング	1
第3節	MCRの組織分布	10
第4節	薬理	17
実験材料および実験方法		19
第2章	MCR-3の薬理的性質	
第1節	薬理	19
第2節	MCR-1およびMCR-1の比較検討	19
第3節	MCR-1およびMCR-3の比較検討	20
第4節	MCR-3に属する配位子	24
第5節	薬理	26
実験材料および実験方法		28
第3章	MCR-3の細胞内情報伝達	
第1節	薬理	29
第2節	細胞内cAMPおよびIP ₃ の相互関係	29
第3節	薬理	33
実験材料および実験方法		34
第4章		36
第5章		37
引用文献		38

下東 義正

目 次

	頁
緒言	1
第1章 メラノコルチン受容体遺伝子のクローニングおよび組織分布	
序	5
第1節 メラノコルチン受容体(MCR)のクローニング	5
第2節 MCR遺伝子のクロモソーム局在	7
第3節 MCRの組織分布	10
第4節 考察	12
実験材料および実験方法	14
第2章 MCR-3, -4, -5の薬理学的性質	
序	18
第1節 MCR-3およびMCR-1の比較検討	19
第2節 MCR-4およびMCR-3の比較検討	20
第3節 MCR-5に関する検討	24
第4節 考察	26
実験材料および実験方法	28
第3章 MCR-3の細胞内情報伝達	
序	29
第1節 細胞内cAMPおよびIPsの相互関係	29
第2節 考察	33
実験材料および実験方法	34
結論	36
謝辞	37
引用文献	38

緒 言

下垂体ペプチドホルモンの前駆体である pro-opiomelanocortin(POMC)は翻訳後メラノコルチンと総称される種々の重要な活性型ホルモン、即ち α -、 β -、および γ -melanocyte stimulating hormone (MSH)および adrenocorticotrophic hormone(ACTH)等に変換される。Mainsら⁽¹⁾が ACTH(1-39) および β -endorphin に共通の前駆ペプチドが存在することを指摘し、その2年後、corticotropin- β -endorphin のcDNAの塩基配列が Nakanishi ら⁽²⁾により決定され、その遺伝子構造および生合成過程が明らかにされてきた。Nakanishi らはPOMCの前駆ペプチドには2個の塩基性アミノ酸により分断されたいくつかの繰り返し配列が存在し、その塩基性アミノ酸、即ち lysine と arginine が切断部位であること、さらに塩基配列解析の結果、当時存在が知られていなかった3番目のMSH、即ち γ -MSHの存在を指摘した。

POMC遺伝子から生成するペプチドとして、 α -MSH、ACTH、corticotropin-like intermediate-lobe peptide (CLIP)、 γ -lipotropin(γ -LPH)、 β -endorphin、 β -MSH、methionine-enkephalin、 γ -MSHおよび joining peptide(JP)が知られており(Fig. 1)、前駆体よりのペプチドの変換生成は細胞特異的であり、通常カルボキシ末端のアミド化を伴う⁽³⁾。またメラノコルチンは構造上の特徴としてペプチド鎖の中心に7つの共通する heptapeptide [Met-Glu(Gly)-His-Phe-Arg-Trp-Gly (Asp)]を有する(Fig. 2)。

POMCペプチドならびにPOMC mRNAが下垂体以外の多くのヒト組織、例えば副腎、睪丸、脾、腎、卵巣、肺、甲状腺、肝、脾、小腸および結腸に存在することが報告され⁽⁴⁻⁶⁾、さらに強力かつ安定な α -MSH誘導体である Nle⁴,D-Phe⁷- α -MSH (NDP-MSH)の結合部位が上記の組織において認められ⁽⁷⁾、特異的な受容体の存在およびメラノコルチンがバラクリンとして作用することが示唆されている。

メラノコルチンの生理作用として、melanocyte および adrenal cortex に作用し、各々色素沈着(α -MSH、 β -MSH、 β -LPHおよびACTHの作用)および糖質コルチコイド遊離、aldosterone合成(ACTHの作用)を促すことが知られている。また中枢神経系への作用としては、行動、学習および記憶^(8,9)、心血管系の中枢制御⁽¹⁰⁾、鎮痛⁽¹¹⁾、他のホルモンの遊離調節⁽¹²⁻¹⁶⁾および解熱⁽¹⁷⁻¹⁹⁾に関与することが示唆されている。さらに免疫調節作用⁽²⁰⁻²³⁾、神経細胞成長への寄与^(24,25)、insulin および glucagon 分泌

の調節⁽²⁶⁾、雄の性行動への関与^(27,28)も推定されている。また興味深い例としては胎児の発育および分娩にメラノコルチンが関与し、胎盤でのメラノコルチンの存在、また母体の α -MSH量が妊娠後期に著明に増加するという報告も認められる^(29,31)。

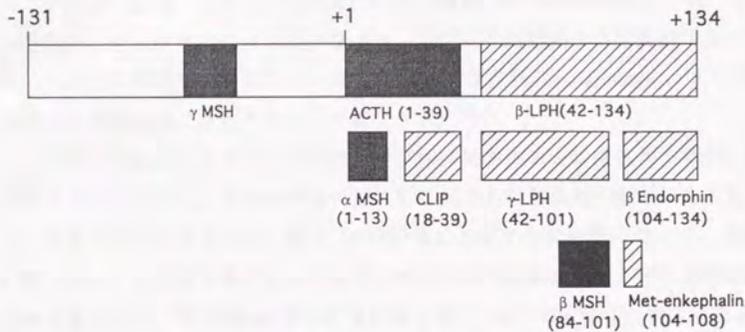


Fig. 1. Schematic representation of the structure of ACTH- β -LPH precursor. Amino acid residues are numbered in the direction from amino terminus to carboxyl terminus, beginning with the first residue of ACTH, and the residues on the amino-terminal side of ACTH are indicated by negative numbers. The locations of known component peptides are shown by closed or shaded bars; the amino acid numbers are given in parentheses.

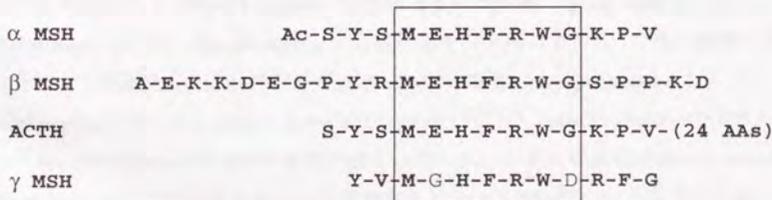


Fig. 2. Amino acid sequences of the melanocortin peptides. Standard *single-letter abbreviations* are used to denote the amino acids. The core heptapeptide amino acid are *highlighted*.

さらには妊娠後期において胎児の副腎の反応性が α -MSH優位からACTH優位なものに転換することが報告されている^(32,33)。

一方メラノコルチン受容体の構造として、リガンド刺激により細胞内cAMPが増加することからG蛋白質に共役し、細胞膜を7回貫通する構造を有すると考えられていたが、最近、これらの受容体の中の2種類、即ち α -MSHおよびACTHに対する受容体の遺伝子クローニングがなされ、予想通り細胞膜を7回貫通するG蛋白質に共役する構造を有すること、さらに α -MSH受容体はmelanomaに、またACTH受容体は副腎皮質に存在することが報告された^(34,35)。

ホルモン受容体のクローニングは、受容体作働薬あるいは拮抗薬の探索に有用であるばかりでなく、その受容体が関与する疾患の病態生理の解明にも貴重な情報を提供すると考えられる。例えばG蛋白質に共役する受容体において、現在までに知られている遺伝子異常による疾患は先天性腎性尿崩症⁽³⁶⁾および色素性網膜炎⁽³⁷⁾のみであったが、最近ACTH不応答症患者においてACTH受容体の第2膜貫通領域においてアミノ酸の変異(serine⁷⁴がisoleucine⁷⁴に変異)が存在することが証明された⁽³⁸⁾。また、マウス α -MSH受容体遺伝子のマッピングにより、この受容体の突然変異は受容体の機能的多様性を引き出し、その結果表現型の多様性(体色の変化)を導き出すことも報告された⁽³⁹⁾。

現在までに多くのG蛋白質に共役する受容体がクローニングされ、組織学および薬理的検討により多くの重要な知見が得られてきた。このタイプの受容体はリガンド刺激によりadenyl cyclaseの活性化あるいは抑制、cyclic GMP phosphodiesteraseの活性化、phospholipasesの活性化等を引き起こす⁽⁴⁰⁻⁴²⁾。これら酵素の活性化により細胞内cyclic AMPおよびcyclic GMPの増加、phosphoinositol 4,5-bisphosphate(PIP₂)のinositol 1,4,5-trisphosphate(IP₃)と1,2-diacyl glycerol(DG)への加水分解、phosphatidylcholineの分解が起き、さらに、これらの変化はprotein kinases(PKAおよびPKC)の活性化あるいは細胞内カルシウム([Ca²⁺]_i)の上昇を引き起こす。一方、メラノコルチン受容体の情報伝達に関する研究は不十分であり、情報伝達にはcAMP以外にCa²⁺とIP₃が関わっているとの報告も見受けられる^(24,43-47)。さらにメラノコルチン受容体に関しても、その受容体遺伝子のクローニングおよび薬理的検討により、さらに多くの情報が得られることが期待されている。

以上、概説したように、メラノコルチンあるいはその受容体は広く生体に存在し、数多くの生理現象に関わっているが、その作用の多様性を詳細に理解する上

で受容体ファミリー遺伝子のクローニングは非常に有益な情報を提供すると考えられる。

今回実施した一連の研究においては、 α -MSHおよびACTHに代表されるメラノコルチンに対する受容体群のなかで、新規のメラノコルチン受容体のクローニングを目的とした。その結果、中枢あるいは骨格筋に特異的に発現しているメラノコルチン受容体(MCR-3, -4, -5)のクローニングに成功した。また、これらの受容体の薬理学的特徴を α -MSHおよびACTH受容体と比較検討することにより、受容体のリガンド認識の特徴を見いだすことができた。さらに、MCR-3において複数の細胞内情報伝達系が機能し、特にcAMPがIP₃産生を調節していることを明らかにした。

以下の各章において、その内容について論述する。

第1章 メラノコルチン受容体遺伝子のクローニング および組織分布

序

受容体研究を実施する際に単離細胞あるいは組織を用いた場合、数種の受容体蛋白質が発現していることが普通であり、実験成績の解釈を複雑にしていた。この点を解決し、受容体の細胞内情報伝達を含めた薬理学的性質を詳細に検討する手段の一つとして、クローン化した単一の受容体蛋白質を、内因性の当該受容体の発現していない真核細胞に強制発現させる方法が広く用いられている。この方法により、多くの受容体について、細胞内情報伝達およびリガンドの結合様式等に関する非常に貴重な情報が得られている。

既に述べたようにメラノコルチンは多様な生理作用に関与しているが、その受容体に関する情報として、G蛋白質に共役する構造を持つことが推定されていたが、その詳細は不明であった。一方、G蛋白質共役受容体ファミリー遺伝子には第3および第6細胞膜貫通領域に相同性の高い塩基配列部分が存在することが知られ⁽⁴⁸⁾、そのホモロジーによりファミリー蛋白質の遺伝子がクローニング可能であることが報告されている。

本章ではメラノコルチン受容体のホモロジーに基づくクローニングを試み、新規のメラノコルチン受容体(MCR)の遺伝子をクローニングした成績、さらにその特徴的な組織分布をノーザンプロット解析により検討した成績について述べる。

第1節 メラノコルチン受容体(MCR)遺伝子のクローニング

Fig. 3に示したプロトコールに従ってメラノコルチン受容体遺伝子のクローニングを実施した。使用したプライマーは5'-CTGTGC/TGC/TC/GATC/TG CHTG/TGA C/TC/AGC/GTAC、3'-AT/GGA/TAGA/TAGGGCAGCCAGCAGAIG/CG/AT/CGAAであり、U937細胞(ヒトリンパ球由来)から調製したmRNAをreverse transcriptaseによりcDNAとし、これを鋳型としてpolymerase chain reaction(PCR)法により同様の構

Primer A ; For MCR-1,3 Cloning

5' Primer : Third Transmembrane Domain
CTGTGC/TGC/TC/GATC/TGCIITG/TGAC/TC/AGC/GTAC
27mer
3' Primer : Sixth Transmembrane Domain
AT/GGA/TAGA/TAGGGCAGCCAGCAGAIG/CG/AT/CGAA
29mer

Primer B; For MCR-2,4,5 Cloning

5' Primer : Second Intracytoplasmic Loop
TACGCA/GCTG/CCGCTACCACAGCATC : 24mer
3' Primer : Seventh Transmembrane Domain
GAAG/AGCA/GTAT/GATGAA/GG/TGGGTCA/GAT : 24mer

U937 (human lymphoma cell line) cDNA

Primer A

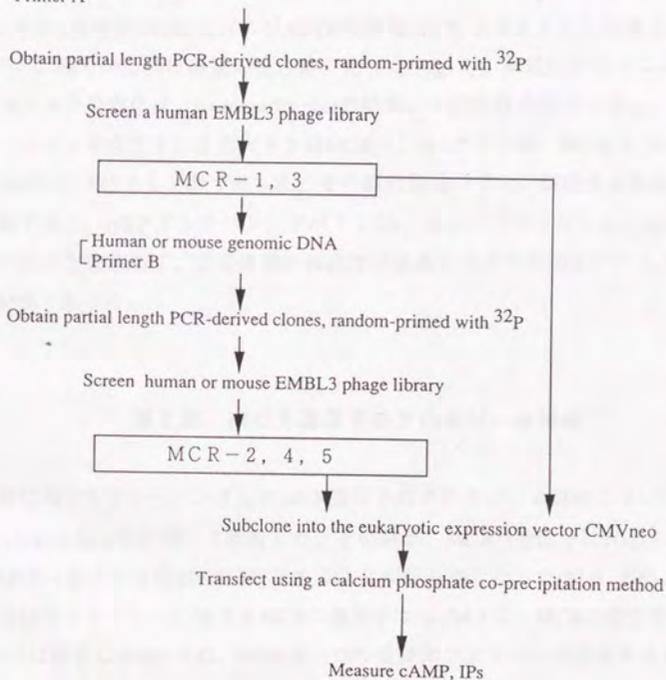


Fig. 3. Protocol for the cloning of novel melanocortin receptors.

造を有し、新規の受容体群に属すると考えられる2種類の遺伝子断片を得た。この断片をrandom prime法により³²Pで標識し、EMBL 3ファージにクローニングされたヒト遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることにより、2種類の遺伝子の全長を得た(ヒトMCR-1およびMCR-3)。さらにこの2種類の遺伝子に特徴的に保存されている領域(第2細胞質ループおよび第7膜貫通部分)からPCRに用いるプライマーとしてdegenerated oligonucleotide(5'-TACGCA/GCTG/CCGCTACCACAGCATC、3'-GAAG/AGCA/GTAT/GATGAA/GG/TGGGTCA/GAT)を設計し、ヒトあるいはマウス遺伝子DNAを鋳型としてPCRを実施した。その結果、新たに3種類の遺伝子断片を得た。この遺伝子断片もrandom prime法により標識し、ヒトあるいはマウス遺伝子ライブラリーをスクリーニングし、3種類の遺伝子の全長を得た(ヒトMCR-2およびMCR-4、マウスMCR-5)。これら5種類の遺伝子中の2種類は α -MSH受容体(MCR-1)およびACTH受容体(MCR-2)であることが最近明らかにされ^{34,35)}、残りの3種は新規の受容体であった(Fig. 4)。新規にクローニングしたメラノコルチン受容体は、hydropathy plotの結果、7回膜貫通構造を有し、翻訳領域にイントロンを含まず、また大きさはMCR-3:361アミノ酸、MCR-4:333アミノ酸、MCR-5:325アミノ酸であった。その翻訳領域のアミノ酸組成を既知の受容体と比較すると、 α 2アドレナリン、ドパミン2A、およびアデノシンA1, A2受容体との相関性が比較的高く、受容体間の相関性は塩基レベルで約60%、アミノ酸レベルで約45%であった。

第2節 MCR遺伝子のクロモソーム局在

前節においてクローニングしたMCR遺伝子のクロモソーム局在について、*in situ* hybridization法を用いて検討した。その結果、MCR-3遺伝子は20q13.2-q13.3に、またMCR-4遺伝子は18q21.3に局在することが明らかとなった(Figs. 5,6)。さらに、同じ受容体ファミリーに属するMCR-1遺伝子は16q24.3に、MCR-2遺伝子は18p11.2に局在し(Figs. 7,8)、MCRは一つの受容体ファミリーを形成するが、その遺伝子は異なった部位に局在していた。

	1				50
MCR1	M AVQGSQRRL
MCR2M
MCR3	MSIQKKYLEG	DFVFPVSSSS	FLRTLLEPQL	GSALLTAMNA	SCCL . PSVQ
MCR4	M VNSTRHGMMT SLHLWNRSSY
MCR5	MNS SSTL...TVL
	51				100
MCR1	GSLNSTPTAI	PQLGLAANQT	GARCLEVSIS	DGLFLSLGLV	SLVENALVVA
MCR2	KHIINSYENI	NNTARNNSD	...CPRVLP	EEIFFTISIV	GVLENILVLL
MCR3	PTLNGSEHL	QAPFFSNQSS	SAFCEQVFIK	PEIFLSLGLV	SLENILVL
MCR4	RLHSNASES	.LGKGYSDGG	.C.YEQLFVS	BEVFTLVGI	SLENILVIV
MCR5	NLTLNASEDG	ILGSNVKNKS	LA.CEEMGIA	VEVFTLVGLV	SLENILVIG
	101				150
MCR1	TIAKNRNLS	PMYCFICCLA	LSDLLVSGTN	VLETAVILL	EAGALVARAA
MCR2	AVFNKKNLQA	PMYFFICLSA	ISDMLGSLYK	IENILILR	NMGYLKPRGS
MCR3	AVVRNGLNS	PMYFFLCSLA	VADMLVSVSN	ALETIMIAIV	HSDYLTPEQ
MCR4	AIKNRNLS	PMYFFICLSA	VADMLVSVSN	GSETIIITLL	NSTD.TDAQS
MCR5	AIVKKNLNS	PMYFVVGSLA	VADMLVSMNS	AWETVTIYLL	NNKHLVIADT
	151				200
MCR1	VLQQLDNVID	VITCSSMLSS	LCPLGAIADV	RYISIFYALR	YHSIVTLPPRA
MCR2	FETTADDIID	SLFVLSLLGS	IFSLSVIAAD	RYITIFHALR	YHSIVTMRRT
MCR3	FIQHMDNIFD	SMICISLVAS	ICNLIAIADV	RYVTIFYALR	YHSIMTVRKA
MCR4	FTVNIDNVID	SVICSSLLAS	ICSLLSIAVD	RYPTIFYALR	YHNIMTVKRV
MCR5	FVRHIDNVFD	SMICISVVAS	MCSLLIAVD	RYITIFYALR	YHHIMTARRS
	201				250
MCR1	RQAVAAIWA	SVVFSTLFIA	YYDHVAVLLC	LVVFFLAMLV	LMAVLYVHML
MCR2	VVVLTVIWF	CTGTGITMVI	FSHHVPTVIT	FTSLFPLMLV	FILCLYVHMF
MCR3	LTLIVAIWVC	CGVCGVVFIV	YSESKMIVC	LITMFFAMML	LMGTLYVHMF
MCR4	GIIISCIWAA	CTVSGILFII	YDSSAVIIC	LITMFFTMLA	LMASLYVHMF
MCR5	GVIACIWF	CISCGIVFII	YVESKYVIIC	LISMFFTMLF	FMVSLYHMF
	251				300
MCR1	ARACQHAQGI	ARLHKRQR.P	VHQGFGLKGA	VTLTILLGIF	FLCWGFFPLH
MCR2	LLARSHTRKI	STLPRAN...MKGA	ITLTILLGVF	IFCWAPFFVLH
MCR3	LFARLHVKRI	AALPPADGVA	PQQHSCMKGA	VTITILLGVF	IFCWAPFFLH
MCR4	LMARLHIKRI	AVLPRGTGAI	.RQGANMKGA	ITLTILLGVF	VVCWAPFFLH
MCR5	LLARNHVKRI	AASPRYNSV	.RQRTSMKGA	ITLTMLLGVF	IVCWSPFFLH
	301				350
MCR1	LTLIVLCPHEH	PTCGCIFKNF	NLFLALIICN	AIIDPLIYAF	HSQELRRTLK
MCR2	VLLMTFCPSN	PYCACYMSLF	QVNGMLIMCN	AVIDPFIYAF	RSPELRDAFK
MCR3	LVLIICTPTN	PYCICYTAHF	NTYLVLIMCN	SVIDPLIYAF	RSLELRNTFR
MCR4	LIFYISCPQN	PYCVCFMSHF	NLYLILIMCN	SIIDPLIYAL	RSQELRKTFFK
MCR5	LILMISCPQN	YVCSCFMSYF	NMYLILIMCN	SVIDPLIYAL	RSQEMRRTFFK
	351				368
MCR1	EVLTCWSW...
MCR2	KMIFCSRWY.
MCR3	EILCGCNGMN	LG.....
MCR4	EIIICCYPLGG	LCDLSSRY
MCR5	EIVCCHGFR	PCRLGGY

Fig.4. Deduced amino acid sequences of the novel melanocortin receptors. The putative transmembrane domains are denoted by *overbars* and *Roman numerals*. The third intracytoplasmic loop is denoted by *3i*.

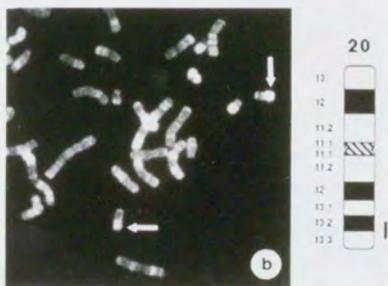


Fig. 5. Regional mapping of the melanocortin-3 gene to 20(q13.2-q13.3) by the fluorescent *in situ* hybridization technique. Hybridization signals were detected with fluorescein isothiocyanate on propidium iodide-stained R-banded chromosomes.



Fig. 6. Regional mapping of the melanocortin-4 gene to 18(q21.3) by the fluorescent *in situ* hybridization technique. Hybridization signals were detected with fluorescein isothiocyanate on propidium iodide-stained R-banded chromosomes.

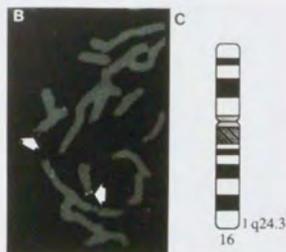


Fig. 7. Regional mapping of the melanocortin-1 gene to 16(q24.3) by the fluorescent *in situ* hybridization technique. Hybridization signals were detected with fluorescein isothiocyanate on propidium iodide-stained R-banded chromosomes.

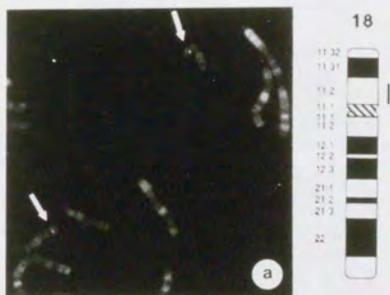


Fig. 8. Regional mapping of the melanocortin-2 gene to 18(p11.2) by the fluorescent *in situ* hybridization technique. Hybridization signals were detected with fluorescein isothiocyanate on propidium iodide-stained R-banded chromosomes.

第3節 MCRの組織分布

α -MSHあるいはACTHの作用は、それぞれMCR-1およびMCR-2を介して発現すると考えられるが、メラノコルチンの中枢作用等に関与する受容体の詳細は不明であった。そこで、第1節において獲得した新規のMCRのこれらの作用への関与を詳細に検討するため、受容体発現組織をノーザンプロット解析により検討した。

MCR-1がmelanoma細胞に、MCR-2が副腎皮質に発現していたのに対しMCR-3は胎盤および脳に発現していたがmelanomaあるいは副腎皮質での発現は認められなかった(Fig. 9)。さらに、*in situ* hybridizationにより、MCR-3はラット脳の視床、視床下部、海馬および大脳皮質に存在することが明らかとなった(Fig. 10)。

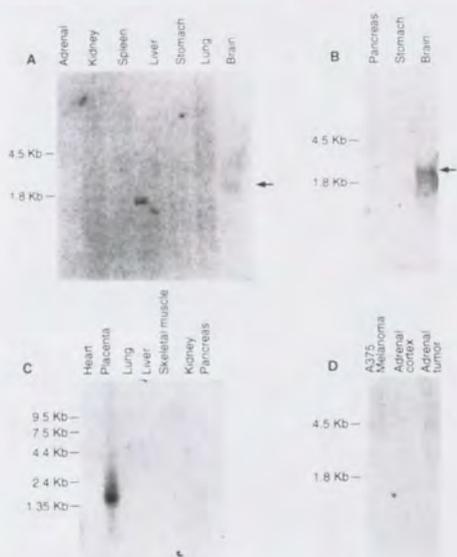


Fig. 9. Tissue distribution of the MCR-3 as evidenced by Northern blotting with RNA extracted from various tissues. In the blots represented in panels A (canine) and B (rat), 5 μ g of poly(A)⁺ RNA from the tissues listed were used. Panels C and D represent blots obtained with human RNA. Lanes in panel C contain 2 μ g of poly(A)⁺ RNA, and lanes in panel D contain 35 μ g of total RNA. The arrows point to positive hybridization signals obtained with the MCR-3 probe in canine and rat brain.

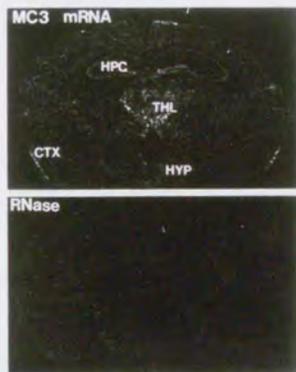
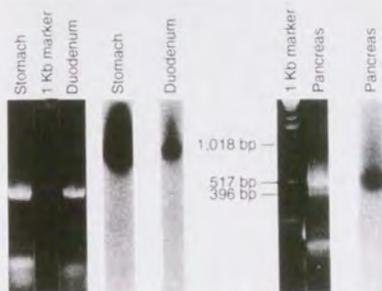


Fig. 10. Dark-field autoradiogram showing *in situ* hybridization of an MCR-3 riboprobe in the thalamus (THL), hypothalamus (HYP), hippocampus (HPC), and cortex (CTX) as compared to an adjacent section that was treated with RNase A prior to hybridization. Within the hippocampus the pyramidal cells and the dentate gyrus are prominently labeled. Wide-spread labeling was noted in the hypothalamus and more prominently in several regions of the thalamus. There was a clear lamination of labeling in the more superficial layers of the cortex.

またノーザンプロットは発現量の少ないmRNAについては検出感度が低いため、PCRとサザンプロットを組み合わせることで消化管での発現を検討したところ、胃、十二指腸および脾に発現が認められた(Fig. 11)。

Fig. 11. Expression of the MCR-3 gene in the human stomach, human duodenum, and rat pancreas as demonstrated by PCR followed by Southern blotting. Ethidium bromide-stained gels of the DNA generated by PCR are presented with adjacent Southern blots of the same gels obtained with a random-primed MCR-3 probe.



一方、MCR-4はMCR-3と同様にmelanomaおよび副腎での発現は認められず、主に脳に発現していたが(Fig. 12)、MCR-3とは異なり胎盤での発現は認められなかった。



Fig. 12. Tissue distribution of the MCR-4 as evidenced by Northern blotting with RNA extracted from various tissues. The blot in panel A represents 5 μ g of canine poly(A)⁺ RNA and in panel B, 35 μ g of human total RNA from the tissues listed.

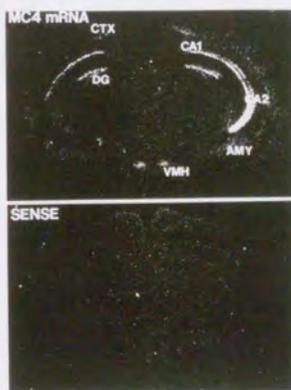


Fig. 13. Dark-field autoradiogram showing *in situ* hybridization of an MCR-4 riboprobe to mouse brain. MCR-4 mRNA can be visualized in CA1 and CA2 of the hippocampus, but is absent in CA3 and CA4. MCR-4 mRNA is also present in dentate gyrus (DG), cortex (CTX), ventral medial hypothalamus (VMH), and amygdala (AMY). Hybridization with a sense strand control cRNA (lower panel) produced no specific signal.

また *in situ* hybridization により MCR-4 はラット脳 C A 1 および C A 2 領域に強く発現していることが明らかになった (Fig. 13)。

MCR-5 は骨格筋、脾、肺に発現が認められた (Fig. 14)。

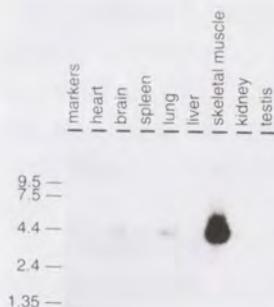


Fig. 14. Rat/mouse multiple tissue Northern blot analysis demonstrating the pattern of organ expression of MCR-5 mRNA. Each lane represents 2 μ g of poly(A)⁺ RNA.

第 4 節 考察

7 回細胞膜を貫通する構造を有する G 蛋白質共役受容体ファミリー遺伝子には第 3 および第 6 細胞膜貫通領域に比較的相同性の高い塩基配列部分が存在することが知られ、この部分の塩基配列から設計したプライマーを用いて、PCR 技術を用いてファミリー蛋白質の遺伝子をクローニングする方法をホモロジークローニング法という。この方法の特徴は cDNA ブローブがなくとも塩基配列だけでプライマーを設計可能であり、また蛋白質の一部分の相同性だけでもスクリーニングが可能なこと、さらに一度目的の PCR 産物が得られれば、ストレンジェンシーを下げることなくライブラリーをスクリーニングできることである。

本法により新規のメラノコルチン受容体 (MCR) のクローニングに成功し、そのアミノ酸配列の検討により、MCR は 7 回細胞膜を貫通する G 蛋白質共役型受容体で

あることが確認された。またMCRはG蛋白質共役型レセプターの中で独立したサブファミリーを形成していた。

MCRの構造上の特徴は、他のG蛋白質共役型レセプターに共通して存在する⁽⁴⁹⁾第4、第5膜貫通領域のプロリン(αヘリックス構造を屈曲させ、リガンドの結合ポケットを構成するのに寄与すると考えられている)、および第1あるいは第2細胞外ループのシステイン(ループ間のジスルフィド架橋を形成し、リガンド結合に寄与する)を欠くことであった。さらに第2細胞外ループには疎水性アミノ酸が多く、あたかも第2細胞外ループがないといってもよい構造をしていた。従って、MCRは他のG蛋白質共役型受容体とは異なった3次元構造をとると推定された。

MCRの組織分布をノーザンブロットで検討したところ、MCR-3およびMCR-4は脳で特異的に発現しているという特徴を認めた。このことは従来報告されていた行動あるいは学習に対するメラノコルチンの作用^(8,9)が中枢における特異的な受容体を介して発現していることを示唆する。さらに*in situ hybridization*の結果、MCR-3とMCR-4の脳での局在が異なっていることが明らかとなった。MCR-3は大脳皮質等において発現していることよりメラノコルチンの行動に対する作用を担っており、一方、MCR-4はCA1およびCA2領域での発現が強いのでメラノコルチンの学習あるいは記憶に対する作用に寄与していると考えられた。

MCR-3に関してはヒト以外にラットから遺伝子がクローニングされ、 γ -MSHへの反応性の高さ⁽⁵⁰⁾、あるいはcore heptapeptideを認識する⁽⁵¹⁾と報告されており、今回得られた成績を支持するものと考えられた。MCR-3に関する他の特徴は胎盤における発現であった。メラノコルチンの胎盤での存在については一致した見解は得られていなかったが^(29,30)、母体の血中 α -MSH量が妊娠後期に上昇すること⁽³¹⁾、 α -MSH優位であった胎児の副腎の反応性が分娩前にACTH優位へ変化すること^(32,33)が知られており、これらの変化に対するMCR-3の関与についての検討が今後必要であろう。

MCR-5に関しては、MCR-3あるいはMCR-4と異なり脳での発現がほとんど認められず、末梢組織、特に骨格筋での発現が強かった。これまでにメラノコルチンと骨格筋の関連については、 β -endorphinあるいはACTHに対する受容体の存在が糖尿病マウスの骨格筋において推定されており⁽⁵²⁾、また傷害を受けた筋における神経の再生にメラノコルチン誘導体が有効であること⁽⁵³⁾が報告されている。MCR-5に

については本研究以外にもラット⁽⁵⁴⁾、ヒト⁽⁵⁵⁾(最初MCR-2として報告されたが、後に著者によってMCR-5に訂正されている)、マウス⁽⁵⁶⁾から同時期にクローニングされており、末梢組織に広く分布することが指摘されている^(54,56)。特にLabbeら⁽⁵⁶⁾はマウスにおいて筋および皮膚での高発現を報告しており、今回の研究成績を併せ考えるとMCR-5はメラノコルチンの末梢における幅広い作用に関与していることが示唆された。

一方、受容体遺伝子のクロモソーム局在を検討した結果、4種類のヒトMCR遺伝子は異なった局在を示した。この現象は受容体サブタイプを持ち、7回膜貫通構造を有する他の受容体遺伝子についても認められている(α_2 , β_1 , β_2 -アドレナリン受容体、m1-5-ムスカリン性アセチルコリン受容体、D1, D2, D4-ドパミン受容体)⁽⁵⁷⁾。一方、同じクロモソームに局在する例として、走化性因子の受容体(C5a受容体, N-formyl peptide受容体, N-formyl peptide受容体に構造が類似する"orphan"受容体)はいずれもクロモソーム19に局在し⁽⁵⁸⁾、またluteinizing hormoneおよびfollicle-stimulating hormone受容体はクロモソーム2p21に局在する⁽⁵⁹⁾。またGenome DatabaseによるとMCR-3遺伝子が局在する20q13.2-q13.3に局在する遺伝子は報告されておらず、MCR-4遺伝子が局在する18q2にはproto-oncogene *bcl-2*⁽⁶⁰⁾およびplasminogen activator inhibitor type II⁽⁶¹⁾の遺伝子が局在していた。

以上述べたように、メラノコルチン受容体ファミリーの中で新規の受容体であるMCR-3、MCR-4およびMCR-5の遺伝子のクローニングに成功し、特にMCR-3はbrain-gut receptorの一種と考えられ、MCR-4とともに脳における発現が強いので、この2種類の受容体は従来より報告されていたメラノコルチンの中枢作用、例えば行動、学習、記憶の保持に関与する受容体である可能性が高いと考えられた。

実験材料および実験方法

1. cDNA調製法

U937細胞(ヒトリンパ腫由来)からacid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform法⁽⁶²⁾によりtotal RNAを抽出し、avian myeloblastoma virus reverse transcriptaseによりcDNAを得た。

2. oligonucleotide合成法

各種oligonucleotideはApplied Biosystems 380B DNA synthesizerを用いて合成した。

3. PCR法

PCR(Perkin Elmer Cetus 480)の条件は次の通りである: denaturation、94℃、1.5分、annealing、45℃、2分、extension、72℃、4分。まず最初の実験においてはU937細胞から調製したcDNAを鋳型とし、プライマーはLibertら⁽⁴⁵⁾の報告したG蛋白質共役受容体に保存されている領域から設計した(5'-CTGTGC/TGC/TC/GATC/TGCIITG/TGAC/TC/AGC/GTAC、3'-AT/GGA/TAGA/TAGGGCAGCCAGCAGAIG/C G/AT/CGAA)。反応は30 cycle行い、反応生成物はphenol/chloroform 1:1(vol/vol)で処理し、EtOH沈殿し、1% NuSieve/1% Seaplaque gel(FMC)で電気泳動を行った。この結果、2個のDNA断片が得られ、これをプローブとして下記の方法で遺伝子ライブラリーをスクリーニングし、2種類の遺伝子の全長を得た。次いでこの2種類の遺伝子に特徴的に保存されている領域(第2細胞質ループおよび第7膜貫通部分)からPCRに用いるプライマーとしてdegenerated oligonucleotide(5'-TACGCA/GCTG/CCGCTACCACAGCATC、3'-GAAG/AGCA/GTAT/GATGAA/GG/TGGGTCA/GAT)を設計し、ヒトあるいはマウス遺伝子DNAを鋳型としてPCRを実施した。目的とするDNAはゲルから切り出した後、M13シークエンス用ベクターに直接サブクローニングした。

4. DNAのシークエンス法

DNAの塩基配列はSequenase version 2(United States Biochemical)をもちいてdideoxynucleotide法により決定した。

5. 遺伝子のクローニング法

PCR法により採取した遺伝子断片を³²Pでrandom primeし、ヒトEMBL3ファージライブラリー(Clontech)をスクリーニングした。ハイブリダイゼーション条件は、6×SSC(0.9M NaCl、90mM sodium citrate、pH 7.0)、5×Denhardt's solution(0.1% Ficoll、0.1% polyvinylpyrrolidone、0.1% bovine serum albumin)、0.1M HEPES、pH 7.0、100mg/ml salmon sperm DNA、10mg/ml dextran sulfate、55℃であり、洗浄条件は、6×SSC、4×SSC、2×SSC、50℃であった。ファージDNAはplate lysate法⁽⁶³⁾に

より調製し、サザンプロットにより制限酵素地図を作成した。受容体遺伝子の翻訳領域はM13にサブクローニングし、塩基配列をdideoxynucleotide法により決定した。

6. クロモソーム局在の検討法

Pinkelら⁽⁶⁴⁾、Lichterら⁽⁶⁵⁾、Lemieuxら⁽⁶⁶⁾の方法に準じて蛍光標識(FITC)*in situ*ハイブリダイズ法によりクロモソーム局在の検討をミシガン大学Genome Centerの協力のもと実施した。EMBL 3ファージの目的とする遺伝子を含むクローンよりDNAを調製し、Bionick kit(Life Technologies Inc.)を用いてピオチン化した。中期染色体は正常女性の末梢血リンパ球からスライドガラス上に調製した。プローブの標識、アニーリング、ハイブリダイズおよび洗浄は既法^(64,65)に従い行い、スライドガラス1枚当たり330ngのピオチン化DNAを使用した。検出はヤギ抗ピオチンおよび蛍光標識抗ヤギIgG(Vector)を用いて行い、propidium iodide(PI)でcounterstainを施した。PPD11 anti-fade solutionでマウント後、FITCおよびPIを同時に確認可能なZeissフィルターを用い、蛍光顕微鏡(Zeiss Axioskop)でKodak ASA 400フィルムに撮影した。

7. ノーザンプロット法

細胞あるいは組織からのtotal RNAの抽出は、acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform法⁽⁶²⁾に従って行った。Poly(A)⁺RNA(mRNA)は、oligo(dT)-cellulose chromatographyを用いるPoly(A) Quick mRNA isolation kit(Stratagene)、あるいは直接、組織よりFast Track kit(Invitrogen)を用いて調製した。また市販のmultiple tissue Northern blot(Clontech)も使用した。RNAは変性条件下でアガロースゲル電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、常法に準じて50% formamide、5×SSPE(0.75M NaCl、0.05M NaH₂PO₄、5mM Na₂EDTA、pH 7.4)、10×Denhart's solution、100mg/ml salmon sperm DNA、2% SDSの条件下、³²Pでラベルしたプローブで18時間ハイブリダイズし、X線フィルム(XAR-5)に24-72時間感光した。

8. PCR/サザンプロット法

上記の方法で調製したRNAをRNase-free DNase I(Boehringer Mannheim)で25℃、1時間処理し、reverse transcriptaseによりcDNAを得た。ヒト胃および十二指腸粘膜より得られたcDNAを鋳型とし、MCR-3遺伝子の5'-あるいは3'-非翻訳領域特異的

な oligonucleotide をプライマーとして PCR を行った。ラット臍 cDNA を鋳型に用いた場合は、上記の第 2 細胞質ループおよび第 7 細胞膜貫通領域に保存されている領域を認識する oligonucleotide をプライマーとして使用した。PCR による生成物は 1% Nusieve、1% Seaplaque ゲルで電気泳動し ethidium bromide で染色後写真撮影した。これを常法⁶⁷⁾によりニトロセルロース膜に転写し、MCR-3 の翻訳領域をプローブとしてハイブリダイズし (65°C)、0.1× SSC、65°C まで洗浄した。その後 X 線フィルム (XAR-5) に 3-6 時間、-80°C で感光した。

9. *In situ* ハイブリダイズ法

雄性マウスより採取した脳の凍結切片 (15mm) を Slee cryostat を用いて polylysine をコートしたスライドガラスに作製し、-80°C で保存した。組織切片を緩衝ホルマリンで固定し (室温、60分)、2× SSC で 3 回洗浄後、proteinase K (1mg/ml in 100mM Tris, 50mM EDTA, pH 8.0) にて 37°C、10分処理した。蒸留水で洗浄後、0.1M triethanolamine、acetic anhydride (400:1, v/v)、pH 8.0 で 10分処理し、アルコール脱水後、風乾した。Proteinase 処理前に RNase A (200mg/ml) 処理を施したものを対照として用いた。MCR-3 の 461 塩基フラグメントから cRNA プローブを作製し (³⁵S-UTP/³⁵S-CTP で標識)、55°C で一晩ハイブリダイズした (75% formamide, 10% dextran sulfate, 3× SSC, 50mM Na₂HPO₄, pH 7.4, 1× Denhardt's, 0.1mg/ml yeast tRNA, 10mM dithiothreitol)。2× SSC で洗浄後、切片を RNase (200mg/ml) 処理し、0.1× SSC、68°C まで洗浄した後、X 線フィルムに 10 日間感光した。

第2章 MCR-3, -4, -5の薬理的性質の検討

序

前章で明らかとなったように、MCR-3~5は中枢、消化管あるいは末梢組織に発現していた。本章では新規受容体群であるMCR-3~5のリガンド認識の特異性を明らかにするため、各々のMCRをL細胞あるいはHepa細胞に発現させ、ACTHおよび α -MSHに代表されるメラノコルチン刺激に対する反応性をcAMP増加を指標に比較検討した。本章で用いたメラノコルチンおよび置換体のアミノ酸配列をFig. 15に示した。

	Amino Acid Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15							
(A)																							
α MSH		A	C	S	Y	S	M	E	H	F	R	W	G	K	P	V							
β MSH		A	E	K	K	D	E	G	P	Y	R	M	E	H	F	R	W	G	S	P	P	K	D
ACTH		S	Y	S	M	E	H	F	R	W	G	K	P	V	(24 AAs)								
γ MSH		Y	V	M	G	H	F	R	W	D	R	F	G										
ACTH 1-10		S	Y	S	M	E	H	F	R	W	G												
ACTH 4-10					M	E	H	F	R	W	G												
ACTH 1-13		S	Y	S	M	E	H	F	R	W	G	K	P	V									
(B)																							
ACTH 4-13					M	E	H	F	R	W	G	K	P	V									
Pro ¹² γ MSH		Y	V	M	G	H	F	R	W	D	R	P	G										
[Phe ² , Pro ¹²] γ MSH		F	V	M	G	H	F	R	W	D	R	P	G										
[Thr ² , Pro ¹²] γ MSH		T	V	M	G	H	F	R	W	D	R	P	G										

Fig. 15. Amino acid sequence of the melanocortins and commercially available truncated peptides (A) and truncated or substituted peptides synthesized for our experiments (B). The core heptapeptide sequence of the melanocortins is enclosed in the box. The peptide sequences are provided with single-letter amino acid notations. For the purposes of these studies, the amino acids are numbered on the basis of the structure of ACTH.

第1節 MCR-3およびMCR-1の比較検討

L細胞に発現させたMCR-3のリガンド刺激に対する反応性はMCR-1^(14,35)のそれと大きく異なっていた。両受容体とも α -MSHおよびACTHに対して同等の反応性を示したが、 β -および γ -MSHに対する反応性に相違点が認められた。MCR-3は、これら2種のペプチドに対してACTHあるいは α -MSH刺激の場合と同等の反応性を示したが、MCR-1においては反応性の低下が認められた(Fig. 16)。さらに両受容体の反応性の差はACTHの部分構造ペプチドであるACTH 1-10およびACTH 4-10刺激においても認められ、MCR-3においてはこれらのリガンド刺激により最大反応を惹起できたが、MCR-1においては部分構造ペプチドに対する反応性は低下していた(Fig. 17)。一方、両受容体とも他のメラノコルチン(Met-enkephalin, β -endorphin)刺激に対しては反応しなかった(data not shown)。

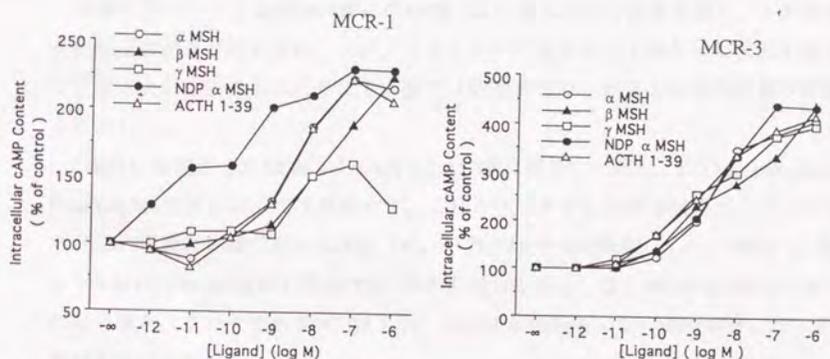


Fig. 16. Generation of cAMP in L cells transfected with the α -MSH receptor (MCR-1) and the novel melanocortin receptor (MCR-3) in response to α -MSH, β -MSH, γ -MSH, ACTH(1-39), and [Nle⁴,D-Phe⁷] α -MSH. Each point represents the average of duplicate samples from three different experiments. Standard errors were less than 10% for each point on this figure.

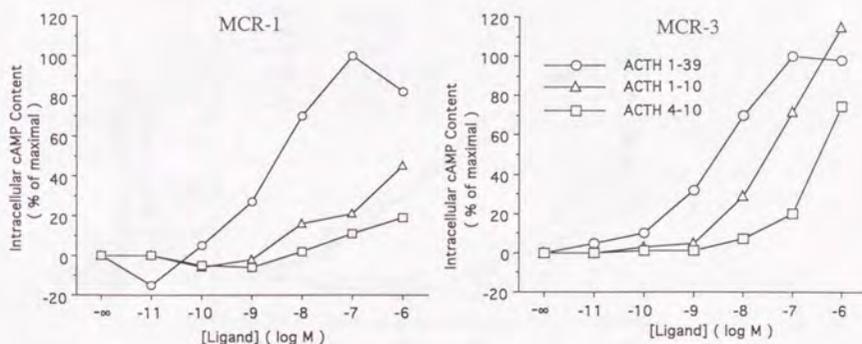


Fig. 17. Generation of cAMP in L cells transfected with the α -MSH (MCR-1) and the novel melanocortin receptor (MCR-3) in response to ACTH (1-10) and ACTH (4-10). For ease of comparison, the data are presented as percentage of the maximal response to ACTH (1-39). Each point represents the average of duplicate samples from three different experiments. Standard errors were less than 10% for each point in this figure.

第2節 MCR-4およびMCR-3の比較検討

前章で述べたようにMCR-4およびMCR-3は中枢における発現が強く、それらの存在部位に相違が認められ、メラノコルチンの作用において異なった役割を演じていることが示唆された。そこで本節では両受容体のリガンド認識の詳細を検討した。

L細胞に発現させたMCR-4は α -MSHとACTHに同等に反応し、またMet-enkephalin, β -endorphin刺激に対しては反応せず、これらペプチドに対する反応性についてはMCR-3の成績と同様であった(Fig. 18)。一方、MCR-4の特徴として、MCR-1と異なり β -MSHが α -MSHおよびACTHと同等の効力を示し、またMCR-3と異なりACTHの部分構造ペプチドであるACTH 1-10、ACTH 4-10あるいは γ -MSH刺激に対する応答が不十分であった。

既に述べたようにMCR-3においては α -MSHおよび γ -MSHに対する反応性は同等であり、MCR-4においては γ -MSHの作用は弱く、さらに β -MSH、 α -MSHおよびACTHが最大反応を示したことから、これら3種のペプチドと γ -MSHのアミノ酸配列の差に着目し、 γ -MSHのPhe¹²をPro¹²に置換したペプチド([Pro] γ -MSH)および

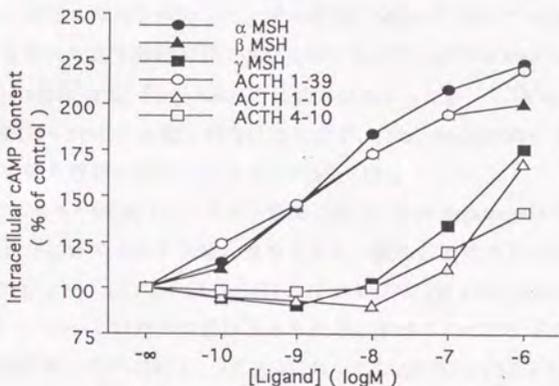


Fig. 18. Generation of cAMP in L cells transfected with the melanocortin-4 receptor(MCR-4). Responses to α -, β -, and γ -MSH, ACTH(1-39)(n=5 to 8 separate experiments), and the truncated peptides ACTH(1-10) and ACTH(4-10)(n=3 separate experiments) were measured. Each point represents the average of the total number of experiments obtained with each agonist. Standard errors were less than 12% for each point.

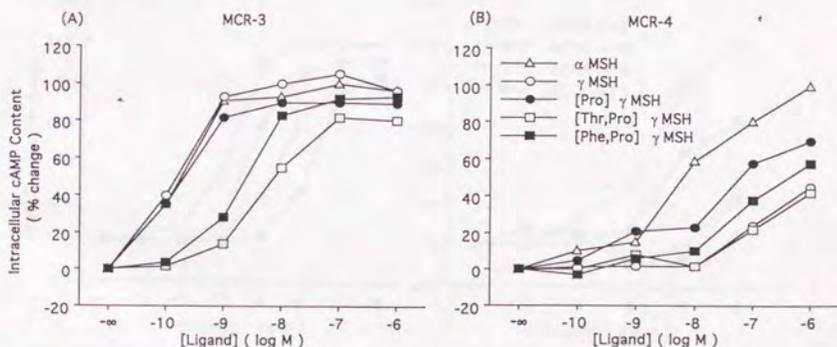


Fig. 19. Measurement of intracellular cAMP content after stimulation of MCR-3(A) and MCR-4(B) with the naturally occurring melanocortins α - and γ -MSH and the synthetic peptides Pro γ -MSH, [Thr, Pro] γ -MSH, and [Phe, Pro] γ -MSH. Each point represents the average of 3 to 7 separate experiments. Standard errors were less than 10% for each point. Percent change in intracellular cAMP was calculated with the response of 10^{-8} M α -MSH as 100% for MCR-3 and 10^{-6} M α -MSH as 100% for MCR-4.

Tyr²をThr²あるいはPhe²に置換したペプチド([Thr, Pro]γ-MSH, [Phe, Pro]γ-MSH)の両受容体における作用を検討した。その結果、MCR-3においては[Pro]γ-MSH刺激によっても最大反応を惹起可能であったが、Tyr²をThr²あるいはPhe²に置換した[Thr, Pro]γ-MSH, [Phe, Pro]γ-MSHでは効力は低下した。一方MCR-4において、[Pro]γ-MSHはγ-MSHに比較し効力は増したが、[Thr, Pro]γ-MSH、[Phe, Pro]γ-MSHでは、この効力増加が認められなかった(Fig. 19)。

さらにMCR-4とMCR-3のリガンド認識の差を、core heptapeptideおよびそのアミノ末端ならびにカルボキシ末端に連なるアミノ酸の必要性の点から明らかにするため、ACTH 1-13, ACTH 4-13, ACTH 1-10およびACTH 4-10の効果について検討した。MCR-3においては効力の差はあるものの、すべてのペプチドにより最大反応を惹起可能であったのに対し、MCR-4においてはACTH 1-10およびACTH 4-10の効力は10⁻⁶Mにおいても最大反応の約30%に過ぎなかった(Fig. 20)。

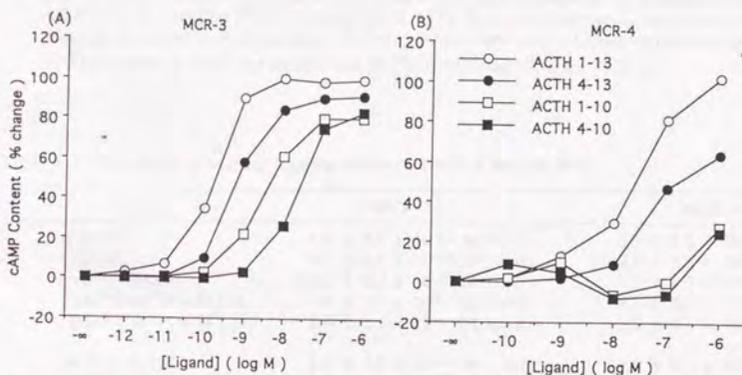


Fig. 20. Measurement of intracellular cAMP content after stimulation of MCR-3 (A) and MCR-4 (B) with ACTH(1-13), ACTH(4-13), ACTH(1-10) and ACTH(4-10). Each point represents the average of 3 to 4 separate experiments. Standard errors were less than 10% for each point. Percent change in intracellular cAMP was calculated with the response of 10⁻⁸M α-MSH as 100% for MCR-3 and 10⁻⁶M α-MSH as 100% for MCR-4.

またアミノ末端のserineにおけるアセチル基の関与について検討したところ、MCR-3ではACTH 1-13(non-acetylated α -MSH)と α -MSHは同等の効力であったがMCR-4では α -MSHの効力が優っていた(Fig. 21)。

以上、本節で得られたMCR-3およびMCR-4における種々のリガンドの EC_{50} をTable 1に示した。

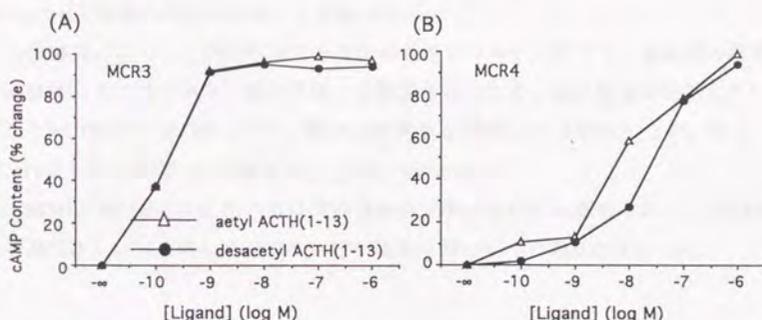


Fig. 21. Effect of an acetylated amino-terminal serine on the generation of intracellular cAMP by ACTH (1-13) acting on MCR-3 (A) and MCR-4 (B). Each point represents the average of 4 separate experiments. Percent change in intracellular cAMP was calculated with the response of 10^{-8} M α -MSH as 100% for MCR-3 and 10^{-6} M α -MSH as 100% for MCR-4.

Table 1. EC_{50} values of various ligands acting on MCR-3 and MCR-4

Ligand	MCR-3	MCR-4
α -MSH	$1.6 \pm 0.9 \times 10^{-10}$ M (n=5)	$5.6 \pm 6.8 \times 10^{-9}$ M (n=7)
γ -MSH	$1.7 \pm 0.7 \times 10^{-10}$ M (n=4)	$9.0 \pm 6.1 \times 10^{-8}$ M (n=6)
Pro ¹² γ -MSH	$2.7 \pm 0.3 \times 10^{-10}$ M (n=3)	$1.5 \pm 1.3 \times 10^{-8}$ M (n=7)
[Thr ² ,Pro ¹²] γ -MSH	$3.8 \pm 1.0 \times 10^{-9}$ M (n=4)	$8.3 \pm 7.9 \times 10^{-8}$ M (n=4)
[Phe ² ,Pro ¹²] γ -MSH	$2.4 \pm 0.5 \times 10^{-8}$ M (n=5)	$5.0 \pm 2.7 \times 10^{-8}$ M (n=3)
ACTH (1-13)	$1.8 \pm 1.3 \times 10^{-10}$ M (n=4)	$1.9 \pm 0.6 \times 10^{-8}$ M (n=4)
ACTH (4-13)	$4.8 \pm 1.3 \times 10^{-10}$ M (n=4)	$3.3 \pm 0.6 \times 10^{-8}$ M (n=3)
ACTH (1-10)	$2.6 \pm 0.5 \times 10^{-9}$ M (n=4)	$2.0 \pm 1.0 \times 10^{-7}$ M (n=3)
ACTH (4-10)	$2.3 \pm 0.6 \times 10^{-8}$ M (n=3)	$3.3 \pm 1.5 \times 10^{-7}$ M (n=3)
Desacetyl ACTH (1-13)	$1.8 \pm 1.3 \times 10^{-10}$ M (n=4)	$1.9 \pm 0.6 \times 10^{-8}$ M (n=4)

Data are expressed as mean \pm S.D.

第3節 MCR-5に関する検討

MCR-3およびMCR-4において α -MSHならびにACTHは同等の反応性を示したが、MCR-5においては α -MSHがACTHに比較して強い効力を示した(Fig. 22)。 α -MSHのアミノ末端のserineはアセチル化されているがACTHにおいて同アミノ酸はアセチル化されておらず、この差をMCR-5が認識している可能性が考えられたため、ACTH 1-13(non-acetylated α -MSH)に対する反応性を検討した。その結果ACTH 1-13は α -MSHと同等の反応性を示した(Fig. 23)。

一方MCR-5はマウス型受容体であるためメラノコルチンのアミノ酸配列の種差が α -MSHとACTHの効力の差の要因とも推定されたため、既に構造の判明しているラットACTH(ヒトACTHとアミノ酸が2個異なる)刺激につき検討したが、ヒトACTHのそれと同等の反応性であった(data not shown)。

α -MSHとACTHの反応性の差は受容体結合試験においても認められ、 α -MSHおよびACTH 1-13に比較してACTH 1-39の効果は弱いものであった(Fig. 24)。

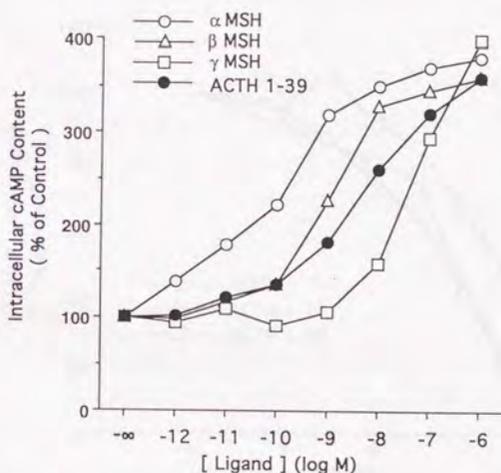


Fig. 22. Generation of cAMP in L cells transfected with the melanocortin-5 receptor(MCR-5). Responses to α -, β -, and γ -MSH, and ACTH(1-39) are depicted. Each point represents the average of the three separate experiments. Standard errors were less than 10% for each point.

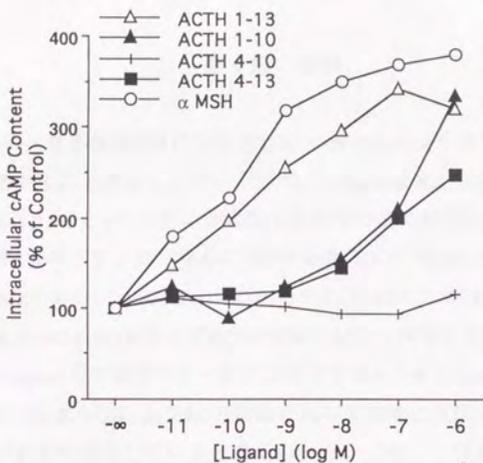


Fig. 23. Comparison of the cAMP response produced by L cells transfected with the melanocortin-5 receptor(MCR-5) to α -MSH and the truncated peptides ACTH(4-10), ACTH(1-10), ACTH(4-13), and ACTH(1-13). Each point represents the average of the three separate experiments. Standard errors were less than 10% for each point.

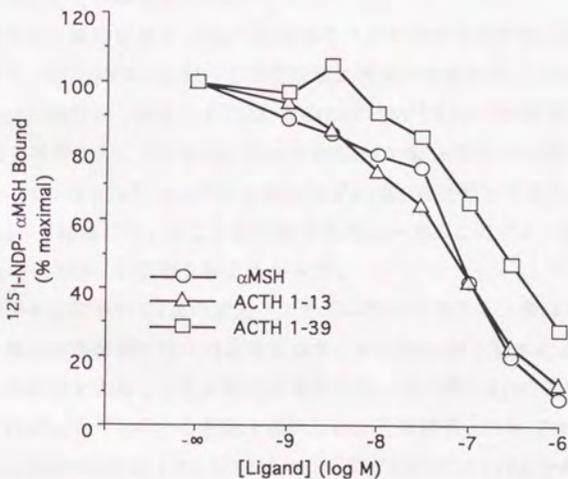


Fig. 24. Inhibition by α -MSH, ACTH(1-13) and ACTH(1-39) of [125 I]NDP-MSH binding to L cells transfected with the melanocortin-5 receptor(MCR-5). Binding is depicted as a percentage of total specific binding. Non-specific binding was less than 10% of total binding.

第4節 考察

メラノコルチン受容体はG蛋白質を介しadenylate cyclaseの活性化により細胞内cAMPを増加させることが知られていた^{14,43}。このcAMP産生を指標にして新規受容体であるMCR-3とMCR-4のリガンド認識の差異を中心に検討した。メラノコルチンは γ -MSHを除きペプチド鎖の中心に7個の共通ペプチド(core heptapeptide: Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly[=ACTH 4-10])を有する(γ -MSHではGly⁵, Asp¹⁰)。

MCR-1とMCR-3は α -MSHおよびACTH刺激に対して同等に反応し、MCR-1に関する成績はChhajlaniらの報告¹³と一致するものであったがMountjoyらの報告¹⁴とは異なっていた。MCR-3は α , β , γ -MSH刺激に対して同等に反応するので、おそらく7個の共通ペプチドを認識していると考えられた。このことはACTHの部分構造ペプチドであるACTH 1-10およびACTH 4-10刺激によってもMCR-3で最大反応を惹起可能であったことから支持された。これに対し、MCR-4では γ -MSHに比較して α -MSHおよび β -MSHの効力は強く、またACTH 1-10あるいはACTH 4-10の効力は弱かった。従ってMCR-4においては7個の共通ペプチドの外側のアミノ酸が活性発現に重要であることが推察された。

それらのアミノ酸のなかで、Pro¹²を有するペプチドの効力が強く発現したため、特にこのアミノ酸がMCR-4における活性発現に重要な役割を演じている可能性が考えられた。この仮説を検証するため、 γ -MSHのPhe¹²をPro¹²に置換した[Pro] γ -MSHの効果を検討した。その結果、[Pro] γ -MSHは α -MSH等と中心部分の共通ペプチドが異なっている(Gly⁵, Asp¹⁰)にも拘わらず γ -MSHに比較してその効力は増大し、MCR-4がPro¹²を認識していることが示唆された。一方、このアミノ酸置換はMCR-3における活性には影響を与えなかった。

メラノコルチンにおいて7個の共通ペプチド以外の共通アミノ酸はTyr²である。このアミノ酸の受容体活性化への寄与につき、[Pro] γ -MSHを基本化合物として新たなアミノ酸置換を実施し、その効力を検討した。その際、Tyrの芳香環と水酸基に着目し、Phe²およびThr²への変換を選択した。その結果、[Thr, Pro] γ -MSHおよび[Phe, Pro] γ -MSHはMCR-3およびMCR-4の両受容体において[Pro] γ -MSHより効力が弱く、またこの両者の間では[Phe, Pro] γ -MSHの方が強かった。従って、Tyr²はMCR-3およびMCR-4の両受容体において活性発現に重要なアミノ酸であり、おそらくその疎水性あるいは置換基としてのかさ高さが活性発現に寄与していると考え

えられた。

これらの点はACTHの部分構造ペプチドを使用した成績からも支持された。即ち、MCR-4においてACTH 1-13は最大活性を示し、Pro¹²を有するACTH 4-13も効力こそ弱いものの反応するが、Pro¹²を持たないACTH 1-10およびACTH 4-10は僅かな応答を示すに過ぎなかった。一方、これらの4種類のペプチドの効力はMCR-3においては、ACTH 1-13>ACTH 4-13>ACTH 1-10>ACTH 4-10の順であり、MCR-3におけるTyr²の重要性が窺われた。さらにMCR-3においては、 α -MSH、 γ -MSHおよび[Pro] γ -MSHはカルボキシ末端のアミノ酸配列が異なっているが同等の効力を示し、またACTH 1-13に比較してACTH 1-10の効力が弱いことから、ACTH 4-10に連なるカルボキシ末端も最大活性を発現するために必要であるが、そのアミノ酸の種類は問わないことが示唆された。

一方、MCR-5においては α -MSHがACTHに比較して強い効力を示したことより、ACTH 1-39のカルボキシ末端部分のアミノ酸が抑制的に作用している可能性が考えられた。またACTH 4-10に対しては殆ど反応しないので、メラノコルチンのcore heptapeptide以外のカルボキシ末端およびアミノ末端のアミノ酸の重要性はMCR-4におけるそれよりも高いと考えられた。

メラノコルチンのアミノ末端のserineのアセチル化がACTH受容体(MCR-2)でのメラノコルチンの活性発現に重要との指摘がなされていた⁽⁶⁾。そこでACTH 1-13 (non-acetylated α -MSH)と α -MSHの効力を比較検討した結果、MCR-3およびMCR-5では両ペプチドに対して同等の反応性を示したが、MCR-4では α -MSHの作用が優っていた。従ってMCR-4においてはMCR-2と同様にアミノ末端のserineのアセチル基の存在が最大効力発現に必要であることが示唆された。

以上、MCR-3はACTH 4-10で示される7個の共通ペプチド(core heptapeptide)を主に認識し、MCR-4では、それに加えてTyr²およびPro¹²が結合に寄与すると考えられ、さらにMCR-2と同様にアミノ末端のアセチル基が重要であった。またMCR-5ではACTH 4-10が全く反応しないことより、7個の共通ペプチドはspacerとして機能し、活性発現にはカルボキシ末端およびアミノ末端に連なるアミノ酸が寄与すると考えられた。これらの受容体のリガンド認識の特徴は、目的とする受容体特異的な作働薬あるいは拮抗薬設計に貴重な情報を提供すると考えられた。

実験材料および実験方法

1. 細胞培養法

Hepa cell (ラット肝癌細胞由来)あるいはL cell (マウス線維芽細胞由来)は10% fetal calf serum(FCS)、100 units/ml penicillin、100 mg/ml streptomycin、1mM sodium pyruvateを含むDulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)培地に懸濁し、維持継代した。

2. 受容体遺伝子の導入法

クローニングした遺伝子の翻訳領域はPCR法を用いて増幅後、neomycin耐性遺伝子を持つ真核細胞の発現ベクターであるCMVneo⁽⁶⁹⁾にサブクローニングし、CsCl₂法⁽⁶⁷⁾によりプラスミドDNAを調製した。このDNAの塩基配列を再確認した後、リン酸カルシウム法⁽⁷⁰⁾によりHepa cellあるいはL cellに導入し、その48時間後からgeneticin(1mg/ml)により遺伝子導入細胞を選別した。単一のクローンを選択後、受容体mRNAを多く発現しているクローンをノーザンプロットにより選択した。

3. 細胞内cAMP測定法

受容体発現細胞(Hepa cellあるいはL cell)を上記のDMEM培地に1mg/ml geneticinを添加した培地に 1.5×10^5 cells/mlの濃度に懸濁し、12穴培養プレート(CORNING)に2ml/wellで播種し、37℃、5% CO₂-95% airの条件下で2日間培養しconfluentになったものを使用した。細胞を10mM HEPES(pH 7.4)、2mM glutamine、0.22% NaHCO₃、0.1% BSAを含むEarle's Balanced Salt Slution(EBSS)で洗浄し、0.1mM isobutyl methylxanthineを含むEBSSを添加し、さらに各種リガンドを加え37℃、1時間反応させた。氷冷した100% EtOHを添加することにより反応を停止後、細胞をscrapeし、遠心上清中のcAMPをキット(Amersham)を用いて定量した。

4. 各種メラノコルチンペプチドの合成

実験に使用したペプチドはPeninsula Laboratoriesより購入したが、市販されていない置換メラノコルチンペプチド(Pro¹² γ -MSH, [Phe², Pro¹²] γ -MSH, [Thr², Pro¹²] γ -MSH)およびACTH 4-13はアミノ酸合成装置(Applied Biosystems Model 431)を用いてミシガン大学Protein and Carbohydrate Structure Facilityにて合成した。

第3章 MCR-3の細胞内情報伝達

序

受容体のリガンド刺激後、複数の細胞内情報伝達経路が機能する例が報告されている。前章までACTHおよびMSHのリガンド認識につきcAMP産生を指標に検討してきたが、メラノコルチンの作用にも複数の細胞内情報伝達機構、即ちinositol trisphosphate(IPs)と細胞内カルシウムの動員⁽⁴⁴⁾、細胞外カルシウムの関与⁽⁴⁵⁾、リン酸エステル⁽⁴⁷⁾あるいはエイコサノイド⁽⁷¹⁾が関わっていることが報告されていた。

受容体刺激と細胞内情報伝達とのカップリングの詳細を検討するに際し、クローニングしたメラノコルチン受容体を細胞に発現させた系は、初代培養あるいは継代培養した細胞を用いる系に比較して、単一の受容体に的を絞った検討が可能となるため有用と考えられる。そこで、MCR-3発現細胞を用いてリガンド刺激後のIPs産生について検討すると共に、cAMPおよびIPsの相互関係について検討し、この受容体において複数の情報伝達系が機能していること、さらにそれらが密接にcross talkしていることを見出したので以下に述べる。

第1節 細胞内cAMPおよびIPsの相互関係

MCR-3をHepa細胞に安定発現させ、ACTHおよび α -MSH刺激によるcAMP量およびIPs量に及ぼす効果を検討した。ACTHおよび α -MSHは濃度依存的にcAMPを増加させ、その効力は両者の間で同程度であり EC_{50} は約 10^{-11} Mであった。同じ細胞において、ACTHおよび α -MSHは 10^{-11} M以下の濃度ではIPsを増加させたが、 10^{-11} Mより高濃度では減少させ、濃度反応曲線は二相性であった(Fig. 25)。この現象はHepa細胞以外にL細胞およびChinese hamster ovary(CHO)細胞にMCR-3を発現させた場合にも認められた(data not shown)。

この現象の機構を明らかにするため、cAMPとIPsが相互に影響している可能性について検討した。MCR-3発現細胞をforskolinあるいはdibutyryl cAMPで処置することにより細胞内cAMPを増加させると α -MSH(10^{-11} M)刺激によるIPs応答は抑制され

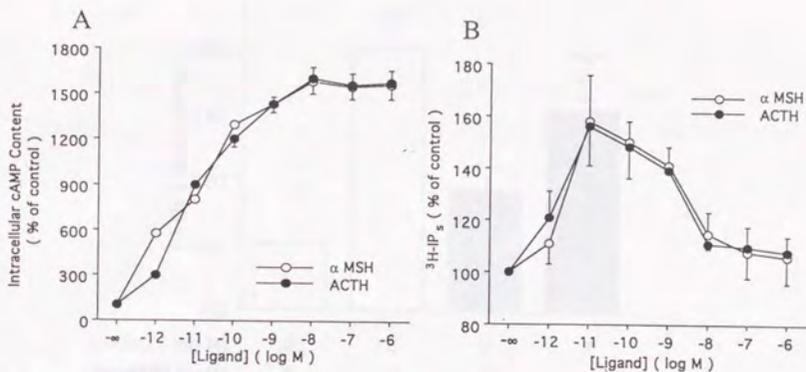


Fig. 25. Increase in intracellular cAMP content (A) and total [^3H]IP production (B) in Hepa cells transfected with the MCR-3 and prelabeled with *myo*-[2- ^3H]inositol upon stimulation with ACTH(1-39) and α -MSH. Each point represents the average of three experiments with S.E.

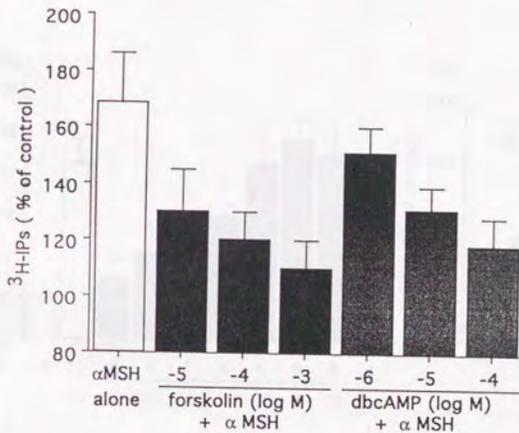


Fig. 26. Effect of forskolin and dibutyryl cAMP on α -MSH(10^{-11}M) stimulated [^3H]IP production in transfected Hepa cells. Each point represents the average of three experiments with S.E.

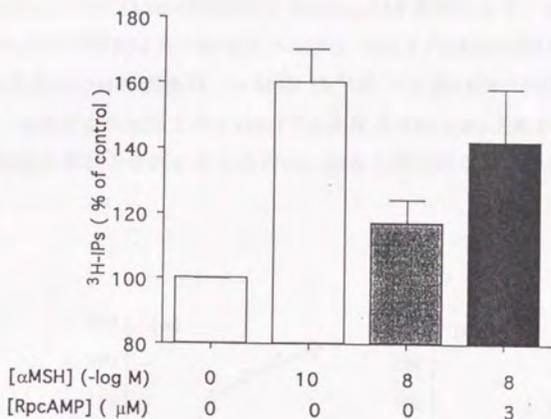


Fig. 27. Effect of pretreatment of transfected Hepa cells with the cAMP antagonist (Rp)-cAMP on α -MSH stimulated [3 H]IP production.

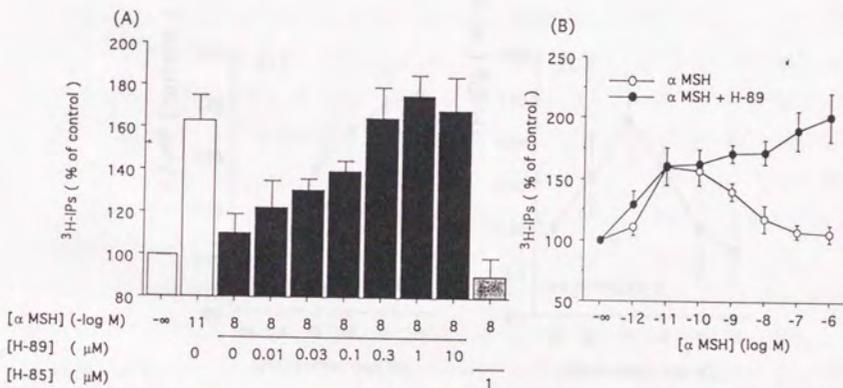


Fig. 28. A, effect of pretreatment of transfected Hepa cells with the protein kinase A inhibitor H-89 or its inactive analogue H-85 on α -MSH stimulated total [3 H]IP production. B, dose-response curves for total [3 H]IP production in transfected Hepa cells stimulated with α -MSH with (\bullet) and without (\circ) pretreatment with H-89. Each point represents the average of three experiments with S.E.

(Fig. 26)、さらにcAMPの拮抗剤であるRpcAMP処理により、 α -MSH(10^{-8} M)刺激によるIPs応答の抑制は若干解除された(Fig. 27)。またcAMP依存性protein kinase A (PKA)阻害剤のH-89処置は、 α -MSH 10^{-8} MによるIPs産生の抑制を濃度依存的に回復し、さらに 10^{-11} M以上の α -MSHでも濃度依存的なIPs上昇が認められた(Fig. 28)。またH-89と同様の骨格を有するがPKA阻害作用を持たないH-85は影響を与えなかった。

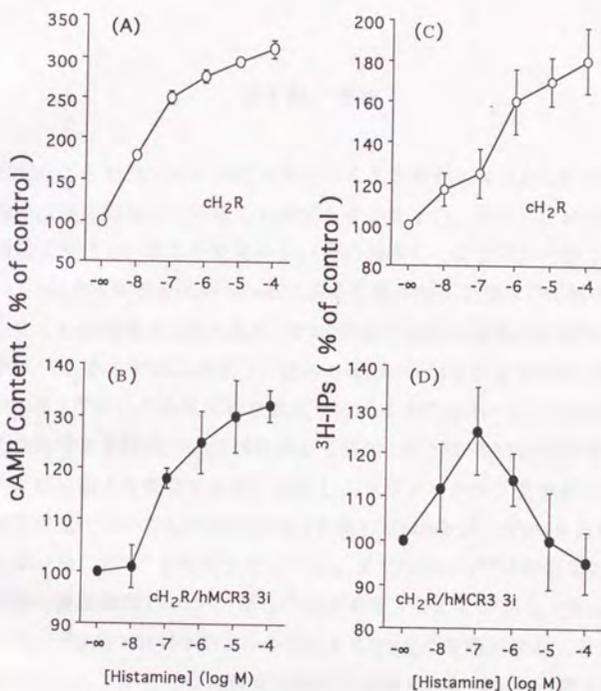


Fig. 29. Dose-response curves for histamine stimulated changes in cAMP content and [^3H]IP production in Hepa cells transfected with wild-type canine histamine H_2 receptor(cH_2R)(A and C) or the chimeric receptor($\text{cH}_2\text{R}/\text{hMCR3 3i}$)(B and D).

G蛋白質共役受容体の細胞内情報伝達に主要な役割を演じているのは第3細胞質ループと考えられ⁷²⁾、この領域においてcAMPがIPsの応答を調節している可能性が考えられた。そこでMCR-3の該当部分を既に細胞内情報伝達系としてcAMPおよびIPsの関与が明らかに⁷³⁾されているイヌヒスタミンH₂受容体の相当部分に組み込むことによりキメラ受容体を作製し、ヒスタミン刺激によるIPs上昇について検討した。その結果、ヒスタミンH₂受容体ではcAMPおよびIPsともヒスタミンの濃度依存的に増加したのに対し、キメラ受容体においてはMCR-3と同様に、IPsの二相性の反応が認められた(Fig. 29)。

第2節 考察

今回の研究によりMCR-3においてメラノコルチン刺激によりcAMPおよびIPsが細胞内情報の伝達に寄与していることが明らかとなった。さらに、IPs産生はcAMP量により調節を受けていることを見出し、その機序として受容体の第3細胞質ループにおけるcAMP依存性protein kinaseによる受容体のリン酸化が示唆された。

クローン化した受容体がcAMPおよびIPsの両者を細胞内情報伝達物質としている例はヒスタミンH₂あるいはムスカリン(m1-4)等のG蛋白質共役受容体で認められている現象である⁽⁷³⁻⁸⁰⁾が、その生理的意義については不明であった。この現象はクローン化した受容体を異種細胞に強制発現して使用しているため正常状態とは異なっていることが一因とも推察される。しかし、メラノコルチン受容体に関しては培養副腎皮質細胞においてACTHがMCR-2を介してcAMPおよびIPsを細胞内情報伝達物質としていること^(81,82)が報告されている。またFaresseら⁽⁸³⁾は今回用いたリガンド濃度と同様の濃度範囲でIPsが二相性の反応を示すことを報告し、Woodcock⁽⁸⁴⁾は副腎においてACTHがアンジオテンシンIIによるIPs産生を抑制することを報告しており、今回クローニングした受容体発現細胞で認められた現象と一致する成績であった。さらにMCR-3において認められたこの現象はMCR-4においても発現することを確認しており(unpublished data)、G蛋白質共役受容体の中でもメラノコルチン受容体の特徴的な性質であることが強く示唆された。

本章で明らかにしたIPs産生の二相性はPKAを介した受容体蛋白質のリン酸化により発現すると考えられたが、リン酸化される正確な部位は不明である。MCR-3

においてキメラ受容体を用いた検討より、IPs産生に関与するのは第三細胞質ループと考えられたが、同部位に"consensus phosphorylation site"⁽⁸⁴⁾は確認できなかった。また受容体リン酸化後のIPs産生抑制機序に関しては、受容体自身のリン酸化によりIPs応答に選択的な脱感作が起こること⁽⁸⁵⁾、あるいは受容体以外のある種の蛋白質のリン酸化がIPs産生に影響を与えること⁽⁸⁶⁾が報告されており、このような一連の反応の結果、IPs産生が抑制的に調節されている可能性が考えられた。今後、リン酸化部位の特定を含めた詳細な検討に取り組む必要がある。

実験材料および実験方法

1. 細胞内cAMP測定

第2章に記載した方法により実施した。

2. 細胞内IPs測定

Berridgeら⁽⁸⁷⁾の方法に準じて実施した。受容体発現細胞をconfluentになるまで培養し、^[3H]myo-inositolを含有するEBSSで30分間細胞を処理し、さらに10mM LiClにて15分間処理した。その後、細胞をEBSSで洗浄し、各濃度のリガンドを添加し反応させた。MeOH添加により反応を停止し、chloroform抽出した上清をWaters Accel plus QMA SEP-PAK カラム(Waters Chromatography, Millipore Corporation)で分離し、溶出液の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

3. キメラ受容体の作成

イヌヒスタミンH₂受容体(H₂R)の第3細胞質ループをヒトMCR-3の同部分に置換したキメラ受容体(H₂/3iMCR-3)は、第5および第6細胞膜貫通部分のDNAへ変異を導入するcassette mutationにより作製した。まず6種類のPCR用プライマーを用い、3種類のDNA断片、1) H₂Rの翻訳開始部位(ATG)から第5細胞膜貫通部分終了部位まで、2) MCR-3の第3細胞質ループ部分、3) H₂Rの第6細胞膜貫通部分開始部位から翻訳終了部位まで、を作製した。これらを適宜制限酵素で処理し、続いてligationを行い、最後に発現ベクターであるCMVneoに組み込み、シークエンスを確認した後Hepa細胞に発現させた。

4. 化合物および細胞の処理法

(Rp)-adenosine 3',5'-monophosphorothioate(Rp-cAMP, RBI)、cAMP依存性protein kinase(PKA)阻害剤のN-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide(H-89, Calbiochem)、H-85(Seikagaku America)はリガンド刺激の30分前に添加した。Forskolinおよびdibutyryl cAMPはリガンドと同時に添加した。

結 論

本研究では α -MSHおよびACTHに代表されるメラノコルチンの生理作用を解析する材料として、新規のメラノコルチン受容体のクローニングを試み、また薬理学的検討を実施し、以下の点を明らかにした。

1. α -MSHおよびACTHに代表されるメラノコルチンに対する新規の受容体群 (MCR-3~5) をヒトおよびマウス遺伝子ライブラリーからクローニングすることに成功した。
2. ノーザンプロット解析により、MCR-3は消化管および脳に、MCR-4は脳に、MCR-5は骨格筋に発現していることを明らかにした。
3. MCR-3~5の受容体はG蛋白質に共役する7回膜貫通構造を有し、各種メラノコルチンの刺激により細胞内cAMPを増加させること、さらに各受容体間のリガンド認識の差を明らかにした。
4. MCR-3の細胞内情報伝達物質はcAMPおよびIPsであることを明らかにし、cAMPはIPs上昇に対して抑制的に作用することを見いだした。

以上の成績は、今回初めてクローニングに成功した新規のメラノコルチン受容体 (MCR-3、MCR-4およびMCR-5) が、従来知られていたメラノコルチンの作用である色素沈着あるいは副腎皮質刺激などの作用の他に、中枢での役割あるいは骨格筋での役割といった多様な生理作用を有することを説明するのに有用な情報を与えると考えられる。また薬理学的検討により得られたリガンド認識の特徴は、各受容体に特異的な作働薬あるいは拮抗薬作製、さらには褐色細胞腫におけるメラノコルチン受容体を介した薬剤のデリバリーシステム構築等に有益な情報となると考えられる。

謝 辞

本論文に対し、御教示ならびに御校閲を賜りました東京大学薬学部教授、齋藤洋博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究に関し、御指導と御鞭撻を賜りましたミシガン大学医学部教授、Tadataka Yamada博士に深く感謝いたします。

本研究を実施するにあたり、直接の御教示と御指導を賜りましたミシガン大学医学部、Ira Gantz博士に深く感謝いたします。

本研究に対し、御協力と御助言をいただいた順天堂大学医学部講師、三輪洋人博士、群馬大学生体機能研究所講師、菅田芳孝博士、東京大学医学部、田城孝雄氏に深く感謝いたします。

本研究に対し、御教示を賜りました東京大学薬学部助教授、松木則夫博士、同・助手、西山信好博士に謹んで感謝いたします。

留学および発表の機会を与えてくださった第一製薬株式会社副社長、安孫子擁史博士、同・山田雄三常務取締役、同・(旧)探索第三研究所、奥田順三所長（現DRL専務）、同・創業第三研究所長、鈴木範夫博士に深く感謝いたします。

本研究に対し、御鞭撻を賜りました第一製薬株式会社・創業基盤研究所副所長、後藤義明博士、同・研究企画推進部、磯田純郎博士に謹んで感謝いたします。

本研究を実施するにあたり、終始御支援、御激励をいただきました第一製薬株式会社(旧)探索第三研究所の皆様から感謝いたします。

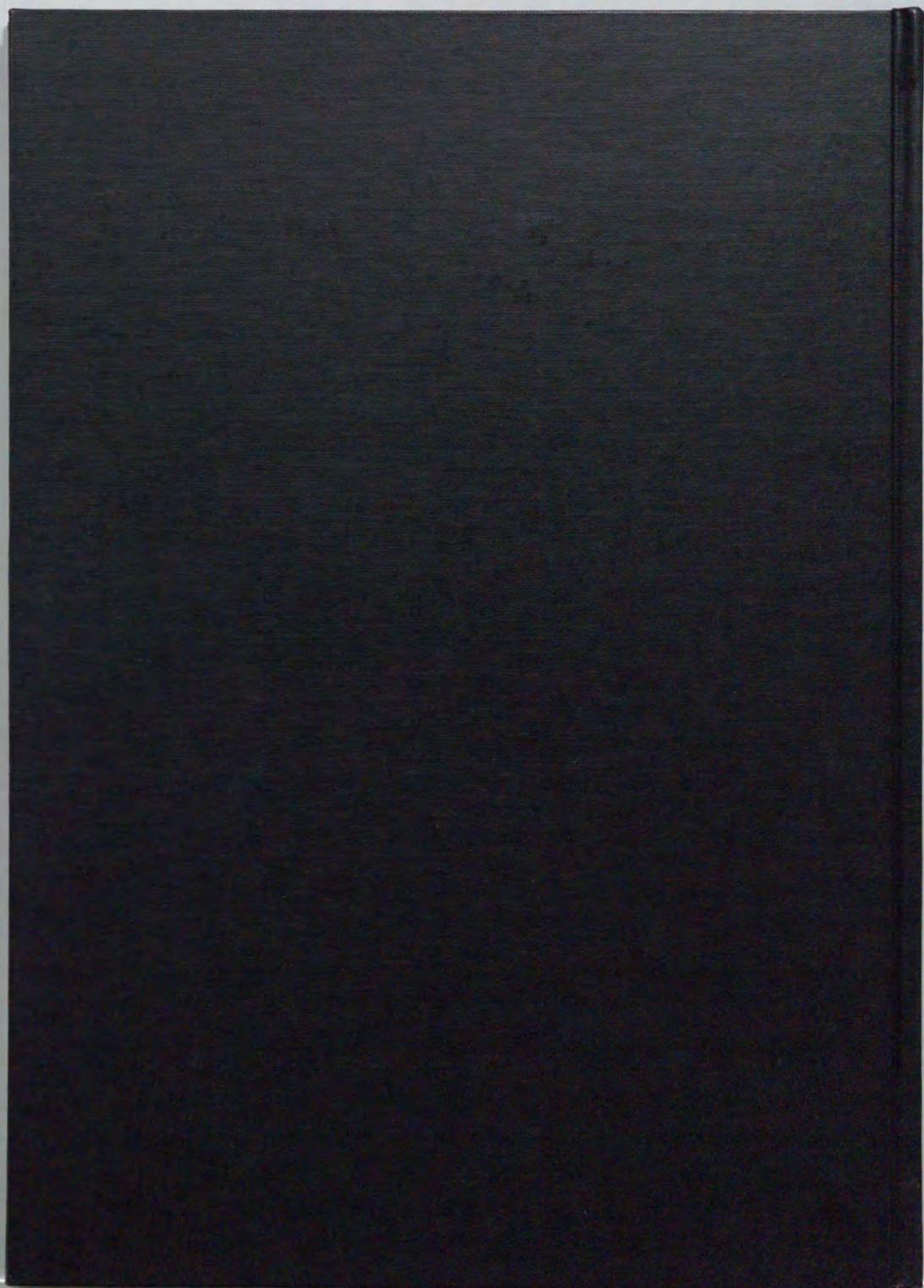
引用文献

1. Mains, R.E., Eipper, B.A. and Ling, N. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3014-3018
2. Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. and Numa, S. (1979) *Nature*, **278**, 423-427
3. Eipper, B.A., Glembofski, C.C. and Mains, R.E. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 7292-7298
4. DeBold, C.R., Meneffe, J.K., Nicholson, W.E. and Orth, D.N. (1988) *Mol. Endocrinol.*, **2**, 862-870
5. Orwoll, E.S. and Kendall, J.W. (1980) *Endocrinology*, **107**, 438-442
6. Sanchez-Franco, F., Patel, Y.C. and Reichlin, S. (1981) *Endocrinology*, **108**, 2235-2238
7. Tatro, J.B. and Reichlin, S. (1987) *Endocrinology*, **121**, 1900-1907
8. De Wied, D. and Croiset, G (1991) *Exp. Pathol*, **15**, 167-199
9. De Wied, D. and Jolles, J. (1982) *Physiol. Rev.*, **62**, 976-1059
10. Gruber, K.A. and Callahan M.F. (1989) *Am. J. Physiol.*, **257**, R681-R694
11. Walker, J.M., Akil, H. and Watson, S.J. (1980) *Science*, **210**, 1247-1249
12. Khorram, O., De Castro, J.C.B. and McCann, S.M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 8004-8008
13. Ellerkmann, E., Nagy, G.M. and Frawley, L.S. (1992) *Endocrinology*, **130**, 133-138
14. Gispen, W.H., Zwiers, H., Wiegant, V.M., Schotman, P. and Wilson, J.E. (1979) *Adv. Exp. Biol. Med.*, **116**, 199-224
15. Versteeg, D.H.G., De Crom, M.P.G. and Mulder, A.H. (1986) *Life Sci.*, **38**, 835-840
16. Florijin, W.J. and Versteeg, D.H.G. (1989) *Brain Res.*, **494**, 247-254
17. Murphy, M.T., Richards, D.B. and Lipton, J.M. (1983) *Science*, **221**, 192-193
18. Villar, M., Perassi, N. and Celis, M.E. (1991) *Peptides*, **12**, 1441-1443
19. Rothwell, N.J., Hardwick, A., LeGeuvre, R.A., Crosby, S.R. and White, A. (1991) *Brain Res.*, **541**, 89-92
20. Hiltz, M.E., Catania, A. and Lipton, J.M. (1991) *Peptides*, **12**, 767-771
21. Hiltz, M.E. and Lipton, J.M. (1989) *FASEB J.*, **3**, 2282-2284
22. Eberle, A. and Schwyzer, R. (1976) *Clin. Endocrinol.*, **5**, Suppl., 41s-48s
23. Cannon, J.G., Tatro, J.B., Reichlin, S. and Dinarello, C.A. (1986) *J. Immunol.*, **137**, 2232-2236
24. Verhaagen, J., Edwards, P.M., Jennekens, F.G.I. and Gispen, W.H. (1987) *Peptides*, **8**, 581-584

25. Gispen, W.H. (1990) Trends in Pharm. Sci., **11**, 221-222
26. Knudtson, J. (1986) Horm. Metabol. Res., **18**, 579-583
27. Ebling, F.J., Ebling, E., Randall, V. and Skinner, J. (1975) J. Endocrinol., **66**, 407-412
28. Boitani, C., Mather, J.P. and Bardin, C.W. (1986) Endocrinology, **118**, 1513-1518
29. Krieger, D.T. (1982) Biol. Reprod., **26**, 55-71
30. Wilson, J.F. (1982) Clin. Endocrinol., **17**, 233-242
31. Clark, D., Thody, A.J., Shuster, S. and Bowers, H. (1978) Nature, **273**, 163-164
32. Silman, R.E., Chard, T., Lowry, P.J., Smith, I. and Young, I.M. (1976) Nature, **260**, 716-718
33. Challis, J.R.G. and Torosis, J.D. (1977) Nature, **269**, 818-819
34. Mountjoy, K.G., Robbins, L.S., Mortrud, M.T. and Cone, R.D. (1992) Science, **257**, 1248-1251
35. Chhajlani, V. and Wikberg, J.E.S. (1992) FEBS Lett., **309**, 417-420
36. Rosenthal, W., Seibold, A., Antaramian, A., Lonergan, M., Arthus, M-F., Hendy, G.N., Birnbaumer, M. and Bichet, D.G. (1992) Nature, **359**, 233-235
37. Dryja, T.P., McGee, T.L. and Hahn, L.B. (1990) N. Eng. J. Med., **323**, 1302-1307
38. Clark, A.J.L., McLoughlin, L. and Grossman, A. (1993) Lancet, **341**, 461-462
39. Robbins, L.S., Nadeau, J.H., Johnson, K.R., Kelly, M.A., Roselli-Rehfuss, L., Baack, E., Mountjoy, K.G. and Cone, R.D. (1993) Cell, **72**, 827-834
40. Birnbaumer, L., Abramowitz, J. and Brown, A.M. (1990) Biochim. Biophys. Acta, **1031**, 163-224
41. Simon, M.I., Strathmann, M.P. and Gautam, N. (1991) Science, **252**, 802-808
42. Nishizuka, Y. (1992) Science, **258**, 607-614
43. Kojima, I., Kojima, K. and Rasmussen, H. (1985) J. Biol. Chem., **260**, 4248-4256
44. Farese, R.V., Rosic, N., Babischkin, J., Farese, M.G., Foster, R. and Davis, J.S. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun., **135**, 742-748
45. Woodcock, E.A. (1989) Mol. Cell. Endocrinol., **63**, 247-253
46. Buffey, J., Thody, A.J., Bleehen, S.S. and Mac Neil, S. (1992) J. Endocrinol., **133**, 333-340
47. Degani, H., DeJordy, J.O. and Salmon, Y. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 1506-1510
48. Libert, F., Parmentier, M., Lefort, A., Dinsart, C., Van Sande, J., Maehaut, C., Simons, M-J., Dumont, J.E. and Vassart, G. (1989) Science, **244**, 569-572
49. Probst, W.C., Snyder, L.A., Schuster, D.I., Brosius, J. and Sealfon, S.C. (1992) DNA Cell Biol., **1**, 1-20

50. Roselli-Rehffuss, L., Mountjoy, K.G., Robbins, L.S., Mortrud, M.T., Low, M.J., Tatro, J.B., Entwistle, M.L., Simerly, R.B. and Cone, R.D. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8856-8860
51. Sahm, U.G., Qarawi, M.A., Olivier, G.W.J., Ahmed, A.R.H., Branch, S.K., Moss, S.H. and Pouton, C.W. (1994) *FEBS Lett.*, **350**, 29-32
52. Hughes, S. and Smith, M.E. (1993) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **680**, 542-544
53. Koning, P., Verhaagen, J., Slood, W., Jennekens, F.G.I. and Gispen, W.H. (1989) *Muscle and Nerve*, **12**, 353-359
54. Griffon, N., Mignon, V., Facchinetti, P., Diaz, J., Schwarts, J.-C. and Sokoloff, P. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 1007-1014
55. Chhajlani, V., Muceniece, R. and Wikberg, J.E.S. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 866-873
56. Labbe, O., Desarnaud, F., Eggerickx, D., Vassart, G. and Parmentier, M. (1994) *Biochemistry*, **33**, 4543-4549
57. Human Gene Mapping 11 London Conference. (1991) *Cytogenet. Cell Genet.*, **58**, 1-2200
58. Bao, L., Gerard, N.P., Eddy, R.L., Shows, T.B. and Gerard, C. (1992) *Genomics*, **13**, 437-440
59. Rousseau-Merck, M.F., Atger, M., Loosfelt, H. and Berger, R. (1993) *Genomics*, **15**, 222-224
60. Tsujimoto, Y. and Croce, C.M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 5214-5218
61. Samia, J.A., Alexander, S.J., Horton, K.W., Auron, P.E., Byers, M.G., Shows, T.B. and Webb, A.C. (1990) *Genomics*, **6**, 159-167
62. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159
63. Tsonis, P.A. and Manes, T. (1988) *Biotechniques*, **6**, 950-951
64. Pinker, D., Straume, T. and Gray, J.W. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2934-2938
65. Lichter, P., Tang, C.-J.C., Call, K., Hermanson, G., Evans, G.A., Housman, D. and Ward, D.C. (1990) *Science*, **247**, 64-69
66. Lemieux, N., Dutrillaux, B. and Viegas-Pequignot, E. (1992) *Cytogenet. Cell Genet.*, **59**, 311-312
67. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
68. Garren, L.D. (1986) *Vitam. Horm.*, **26**, 119-141
70. Chen, C.A. and Okayama, H. (1988) *Biotechniques*, **6**, 632-638
71. Ilan, A.B., Savion, N. and Naveh, N. (1992) *Prostaglandins*, **43**, 31-44

72. Lefkowitz, R.J. and Caron, M.G. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 4993-4996
73. DelValle, J., Wang, L., Gantz, I., Schaffer, M. and Yamada, T. (1992) *Am. J. Physiol.*, **263**, G967-G972
74. Peralta, E.G., Ashkenazi, A., Winslow, J.W., Ramachandran J. and Capon, D.J. (1988) *Nature*, **334**, 434-437
75. Cotecchia, S., Kobilka, B.K., Daniel, K.W., Nolan, R.D., Lapetina, E.Y., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. and Regan, J.W. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 63-69
76. Gudermann, T., Birnbaumer, M. and Birnbaumer, L. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 4479-4488
77. Van Sande, J., Raspe, E., Perret, J., Lejeune, C., Maenhaut, C., Vassart, G. and Dumont, J.E. (1990) *Mol. Cell. Endocrinol.*, **74**, R1-R6
78. Chabre, O., Conklin, B.R., Lin, H.Y., Lodish, H.F., Wilson, E., Ives, H.E., Catanzariti, L., Hemmings, B.A. and Bourne, H.R. (1992) *Mol. Endocrinol.*, **6**, 551-555
79. Nakajima, Y., Tsuchida, K., Negishi, M., Ito, S. and Nakanishi, S. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 2437-2442
80. Jelinek, L.J., Lok, S., Rosenberg, G.B., Smith, R.A., Grant, F.J., Biggs, S., Bensch, P.A., Kuijper, J.L., Sheppard, P.O., Sprecher, C.A., O'Hara, P.J., Foster, D., Walker, K.M., Chem, L.H.J., McKernan, P.A. and Kindsvogel, W. (1993) *Science*, **259**, 1641-1616
81. Woodcock, E.A. (1989) *Mol. Cell. Endocrinol.*, **63**, 247-253
82. Buffey, J., Thody, A.J., Bleeche, S.S. and Mac Neil, S. (1992) *J. Endocrinol.*, **133**, 333-340
83. Farese, R.V., Rosic, N., Babischkin, J., Farese, M.B., Foster, R. and Davis, J.S. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 743-748
84. Knelly, P.J. and Krebs, E.G. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 15555-15558
85. Hausdorff, W.P., Caron, M.G. and Lefkowitz, R.J. (1990) *FASEB J.*, **4**, 2881-2889
86. Rhee, S.G., Lee, C.-W. and Jhon, D.-Y. (1993) *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, **28**, 57-64
87. Berridge, M.J., Dawson, R.M.C., Downes, C.P., Heslop, J.P. and Irvine, R.F. (1983) *Biochem. J.*, **212**, 473-482

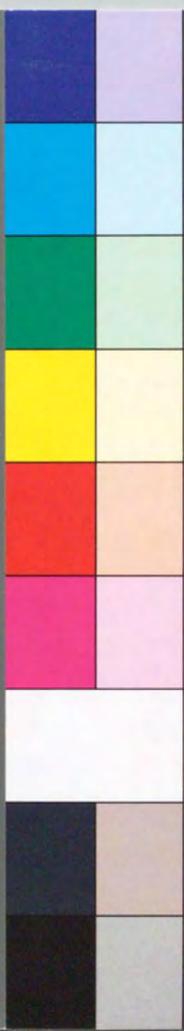


inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

