学位論文題名

心臓における GTP 結合蛋白質 β サブユニットの
各アイソフォームの特異的な発現と局在

学位論文内容の要旨

【背景および目的】

GTP結合蛋白質(G蛋白質)は $\alpha\beta\gamma$ 三量体構造からなる膜蛋白質で、細胞膜受容体とエフェクターの間において情報の変換増幅因子として存在する。

従来より各種のエフェクターが α サブユニットにより活性化されることが知られているが、最近になり、 $\beta\gamma$ サブユニットによるエフェクターの活性化の例として、アデニルサイクラーゼ、心臓のKチャンネル、ホスホリパーゼA2、ホスホリパーゼC β 2、受容体キナーゼなどが報告されている。

現在までに4種類の β サブユニットがクローニングされているが、各アイソフォームの機能的な違いについてはほとんど知られていない。しかし、最近の下垂体培養細胞を用いた実験から、 β サブユニットの種類が受容体とエフェクターの連関の特異性を決める可能性が示された。

本研究の目的は、心臓におけるG蛋白質 β サブユニット各アイソフォームの発現をmRNAおよび蛋白質レベルで検討し、脳、網膜における各アイソフォームの発現と比較する事により、心臓における情報伝達系の特異性を明らかにすることにある。

【方法】

1. cDNAおよび抗 β サブユニット抗体

β サブユニットcDNAはそれぞれ、 β 1はウシの網膜、 β 2はヒトの副腎、 β 3はヒトの網膜、 β 4はマウスの脳よりクローニングされたものである。

抗 β サブユニットポリクローナル抗体(β -636, β -637, β -638)は、ヒト β サブユニットの β 1, β 2, β 3各アイソフォーム間で最も相同性が低い26~39番のアミノ酸配列に相当する合成ペプチドLAP-636 (ADATLSQITNNIDP), LAP-637 (GDSTLTQITAGLDP), LAP-638 (ADVTLAELVSGLEV)をウサギに接種し得られたものである。

2. 実験材料

雄性 Wistar Kyoto ラット (WKY: 10週齢、体重 約265g) を使用した。ラットをジエチルエーテルにて麻酔した後、心臓および脳を摘出し、液体窒素にて凍結し-80℃に保存した。また雌乳牛より網膜を得、同様に凍結保存した。各組織ホモジェネートを105,000×gで遠心し、得た上清を細胞質分画、ペレットを粗膜標本とした。蛋白質の定量にはローリー法を使用した。total RNAは各臓器よりAGPC (acid guanidium thiocyanate phenol chloroform) 法にて抽出した。

3. DNAプローブの作製

β 1, β 3, β 4のcDNAは、pCDM8プラスミドベクターをEcoRIで消化しそれぞれ1381bp, 1050bp, 1135bpのフラグメントとして得た。各cDNAフラグメントは低融点アガロースゲルにて泳動分離した後、フェノール/クロロホルム抽出にて精製した。 β 2のcDNAは岡山-BergクローニングベクターをSacII, SmaIで消化し、1169bpのcDNAフラグメントを得、同様に抽出精製した。それぞれのcDNAフラグメントはランダムプライム法にて α ³²P-dCTP存在下に標識した後、SephadexG50にて未反応の α ³²P-dCTPを

除去してプローブを精製した。

4. ノザンプロット解析

各組織のtotal RNA 30 μ gをホルムアルデヒドゲルにて泳動分離後、ノザンプロットにて解析した。50 μ Ciの標識プローブをハイブリダイズさせた後、X線フィルムに露光した。検出されたmRNAのサイズは同時に泳動したRNAマーカーより求めた。

5. ウェスタンプロット解析

各組織の細胞質および粗膜標本をそれぞれ50 μ gをSDS-PAGEにて分離した後、ウェスタンプロット法を施行した。各アイソフォームに特異的な一次抗体を反応させた後、¹²⁵I-プロテインAを反応させ、X線フィルムに露光した。検出したバンドのサイズは、同時に泳動した分子量マーカーより求めた。また、細胞質分画における β サブユニットの存在形態を調べるために、カットオフ分子量が10万のCentricon100にて心室の細胞質分画を遠心分離し、濃縮液と濾過液を得、それぞれの分画についてウェスタンプロットを施行した。

6. 発現mRNA量および蛋白質の定量

FUJIXバイオ・イメージングアナライザー-BAS2000を使用し、検出したバンドの放射線量を定量した。放射線量の単位A.U. (arbitrary unit) は任意であり同一フィルター上のバンドの比較にのみ用いた。各臓器間の β サブユニットの蛋白質発現量の比較は膜と細胞質の放射線量の和を用い、蛋白1 μ gあたりの放射線量(A.U./ μ g)を比較した。また各臓器における β サブユニットの膜分画および細胞質分画への分布を比較した。

7. 統計処理

データはmean $\pm$ S.D.で表示し、各群間のデータの比較はF testおよびunpaired t testを用いて行った。p<0.05をもって有意差とした。

【結果】

1. ノザンプロット解析

いずれの臓器においても β 1, β 2, β 3のmRNAのサイズはそれぞれ3.3kb, 1.6kb, 1.7kbであった。ただし、ウシの網膜の β 1は2.9kbであった。 β 1, β 2では明らかに脳で発現が強かったが、 β 3は心室での発現が強く、対照的であった。(β 1 ; 脳 886 $\pm$ 196 A.U., 心室 194 $\pm$ 43 A.U., p<0.01. β 2 ; 脳 476 $\pm$ 38 A.U., 心室 241 $\pm$ 28 A.U., p<0.01. β 3 ; 脳 53 $\pm$ 28 A.U., 心室 143 $\pm$ 36 A.U., p<0.01. n=5) また心房、大動脈も加え比較したところ、 β 1, β 2の発現は網膜、脳で強く、他の臓器に明らかな差は認めなかった。 β 3の発現は心室で一番強く、次に心房で発現が強かった(n=3)。 β 4では洗いの条件をハイストリンジェンシーにしたもかかわらず多数のバンドが出現し、mRNAの同定が困難であった。

2. ウェスタンプロット解析

β -636 (β 1), β -638 (β 3) で36kDa, β -637 (β 2) で35kDaのバンドが検出された。 β 1, β 2は脳での発現が心室よりも強かったが、 β 3の発現は心室の方が脳よりも強かった。(β 1 ; 脳 22.6 $\pm$ 2.86 A.U./ μ g, 心室 5.0 $\pm$ 1.08 A.U./ μ g. β 2 ; 脳 33.7 $\pm$ 0.88 A.U./ μ g, 心室 9.6 $\pm$ 0.54 A.U./ μ g. β 3 ; 脳 6.1 $\pm$ 0.59 A.U./ μ g, 心室 9.8 $\pm$ 1.45 A.U./ μ g, n=3)

脳では β 1, β 2は膜での発現量が多かったが、 β 3は細胞質に多かった。心室では β 1, β 2, β 3のすべてが細胞質により多く発現していた。(β サブユニットの膜における発現比. 脳 ; β 1 77 $\pm$ 3.6%, β 2 81 $\pm$ 0.5%, β 3 27 $\pm$ 10.8%. 心室 ; β 1 12 $\pm$ 3.7%, β 2 34 $\pm$ 1.0%, β 3 12 $\pm$ 6.0%).

Centricon100を用いた結果から、心室の細胞質の β 1, β 3サブユニットは分子量10万以上の複合体を形成している可能性がある。

【考按】

生体内に存在する β γ サブユニットは生理的条件下では分離することはなく、単離したサブユニットは β γ 二量体としてのみ研究されている。4種類の β サブユニットはそれぞれ340個のアミノ酸からなり、各サブユニット間の相同性は約80%と極めて高い。

一方、7種類の γ サブユニットは75個のアミノ酸からなるが相同性は40%と低く、さらにC末端のプレニル基がアイソフォームにより異なるなど、 β サブユニットと比べ多様性が強く、 $\beta\gamma$ サブユニット二量体としての機能を決定しているのは γ サブユニットであると考えられてきた。

しかし最近になり、各 β サブユニットのアンチセンスオリゴヌクレオチドをラットの下垂体培養細胞 (GH3) に用い特定の β サブユニットの発現を抑制する実験から、 β サブユニットのアイソフォームが受容体とエフェクター (カルシウムチャンネル) の連関の特異性を決めている可能性が示された: ムスカリン受容体を刺激しカルシウムチャンネルを抑制するためには $\beta 3$ が必要であり、ソマトスタチン受容体を刺激しカルシウムチャンネルを抑制するためには $\beta 1$ が必要であった。この結果は、 β サブユニットアイソフォームの発現の違いにより、各臓器・組織に特異的な膜情報伝達系のバランスが形成されている可能性を示している。

ノザンプロット解析から心臓における $\beta 3$ mRNAの発現が脳と比較し極めて強く特異的であることが示された。ウエスタンプロットによる検討でも同様に心臓での $\beta 1$ 、 $\beta 2$ の発現量が少なく、 $\beta 3$ の発現量が多い事が示された。網膜の桿状体細胞に $\beta 1$ が特異的に存在することがわかっているが、一般的に各 β サブユニットは多くの臓器で普遍的に存在すると考えられており、心臓に特異的な β サブユニットの発現形式が認められたことは興味深い。

心臓においては、すべての β サブユニットが細胞質により多く存在することを明らかにした。アイソフォーム間でもその分布は異なり $\beta 2$ は膜にも同程度存在したが、 $\beta 1$ 、 $\beta 3$ は細胞質での発現が強かった。現在までに、細胞質における三量体G蛋白質の占める役割に関する研究は少ない。腎細胞で $G_{i\alpha 3}$ がゴルジに存在し蛋白の輸送に関わる可能性が報告され、Fung等は牛の網膜の円錐体細胞に $\beta 3$ が特異的に発現し、かつそのほとんどが細胞質に存在することを報告したが、細胞質でのその生理的な役割については明らかになっていない。網膜の桿状体細胞に特異的な $\beta 1$ が $\beta\gamma$ 二量体としてフォスフェーシオンというリン蛋白質と結合して細胞質に存在しているのと同様に、 $\beta 3$ もフォスフェーシオン様蛋白質と結合した形で存在すると報告されている。心筋の細胞質に存在する β サブユニットについては、セントリコンを用いた実験から、分子量10万以上の複合体を形成していることが推測される。 $\alpha\beta\gamma$ 三量体でも分子量8~9万であり、三量体または $\beta\gamma$ 二量体単独で存在している可能性は少なく、他の蛋白質に結合しているか、あるいは膜構造に結合しているものと思われる。網膜と同様に、 $\beta\gamma$ 二量体として存在し、フォスフェーシオン様蛋白質と結合している可能性もあり、今後、免疫沈降法を用いた結合蛋白質の同定が必要とされる。三量体G蛋白質は膜を介する情報伝達だけではなく、低分子量G蛋白と同様に細胞の分化、増殖に密接に関与していると考えられており、細胞質における局在が細胞内での生理作用を解明する糸口となるかもしれない。

【結語】

1. ラットの心臓における $\beta 3$ サブユニットのmRNAレベルの発現は、脳と比較して、有意に強く、蛋白レベルにおいても同様であった。
2. 心臓における β サブユニット ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) の発現はすべて細胞膜分画よりも細胞質分画に多量に分布していた。
3. 心臓の細胞質分画における β サブユニットは分子量10万より大きな複合体として存在することが推定された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 北 畠 顕
副査 教授 小 山 富 康
副査 教授 安 田 慶 秀

学位論文題名

心臓における GTP 結合蛋白質 β サブユニットの 各アイソフォームの特異的な発現と局在

【背景および目的】

$\alpha\beta\gamma$ 三量体G蛋白質は、細胞膜受容体とエフェクターの間であって情報の変換増幅因子として存在する。 $\beta\gamma$ 二量体によりエフェクターが活性化される例が多数報告されているが、 β サブユニットと比べ γ サブユニットは多様性が強く、 $\beta\gamma$ 二量体としての機能を決定しているのは γ サブユニットであると考えられてきた。しかし最近の実験から、 β サブユニットの種類が受容体とエフェクターの連関の特異性を決める可能性が示された。この結果は、 β サブユニットアイソフォームの発現の違いにより、各臓器・組織に特異的な膜情報伝達系のバランスが形成されている可能性を示している。

本研究の目的は、心臓におけるG蛋白質 β サブユニット各アイソフォームの発現を mRNA および蛋白質レベルで検討し、脳、網膜における各アイソフォームの発現と比較する事により、心臓における情報伝達系の特異性を明らかにすることにある。

【方法】

対象は雄性 Wistar Kyoto ラット 10 週齢の心臓および脳、ウシ網膜である。各組織ホモジェネートを 105,000×g で遠心し、得た上清を細胞質分画、ペレットを粗膜標本とした。蛋白質の定量にはローリー法を使用した。total RNA は各臓器より AGPC (acid guanidium thiocyanate phenol chloroform) 法にて抽出した。 β サブユニット cDNA はそれぞれ、 $\beta 1$ はウシ網膜、 $\beta 2$ はヒト副腎、 $\beta 3$ はヒト網膜、 $\beta 4$ はマウス脳よりクローニングされたものである。抗 β サブユニット抗体 (β -636、 β -637、 β -638) は、ヒト β サブユニットの $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 各アイソフォーム間で最も相同性が低い 26~39 番のアミノ酸配列に相当する合成ペプチドをウサギに接種し得られたものを使用した。各 β サブユニットの mRNA 発現量はノザンプロット法にて、蛋白レベルの発現量はウエスタンプロット法にて比較した。また、カットオフ分子量が 10 万の Centricon 100 にて心室の細胞質分画を遠心分離し、ウエスタンプロットを施行した。また、FUJIX バイオイメージングアナライザー BAS2000 を使用し、検出したバンドの放射線量を定量比較した。データは mean $\pm$ S.D. で表示し、各群間のデータの比較は F test および unpaired t test を用いて行った。p < 0.05 をもって有意差とした。

【結果】

1. ノザンプロット解析

$\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ の mRNA のサイズはそれぞれ 3.3kb、1.6kb、1.7kb であった。ウシの網膜の $\beta 1$ は 2.9kb であった。 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ では明らかに脳で発現が強かったが、 $\beta 3$ は心室での発現が強く、対照的であった。($\beta 1$; 脳 886 $\pm$ 196 A.U., 心室 194 $\pm$ 43 A.U., p < 0.01. $\beta 2$; 脳 476 $\pm$ 38 A.U., 心室 241 $\pm$ 28 A.U., p < 0.01. $\beta 3$; 脳 53 $\pm$ 28 A.U., 心室 143 $\pm$ 36 A.U., p < 0.01. n = 5) また心房、大動脈も加え比較したところ、

$\beta 1$ 、 $\beta 2$ の発現は網膜、脳で強く、他の臓器に明らかな差は認めなかった。 $\beta 3$ の発現は心室で一番強く、次に心房で発現が強かった ($n=3$)。 $\beta 4$ では多数のバンドが出現し、mRNAの同定が困難であった。

2. ウェスタンブロット解析

β -636 ($\beta 1$)、 β -638 ($\beta 3$) で36kDa、 β -637 ($\beta 2$) で35kDaのバンドが検出された。 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ は脳での発現が心室よりも強かったが、 $\beta 3$ の発現は心室の方が脳よりも強かった。($\beta 1$; 脳 22.6 ± 2.86 A.U./ μ g, 心室 5.0 ± 1.08 A.U./ μ g. $\beta 2$; 脳 33.7 ± 0.88 A.U./ μ g, 心室 9.6 ± 0.54 A.U./ μ g. $\beta 3$; 脳 6.1 ± 0.59 A.U./ μ g, 心室 9.8 ± 1.45 A.U./ μ g, $n=3$) 脳では $\beta 1$ 、 $\beta 2$ は膜での発現量が多かったが、 $\beta 3$ は細胞質に多かった。心室では $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ のすべてが細胞質により多く発現していた。(β サブユニットの膜における発現比。脳 ; $\beta 1$ $77 \pm 3.6\%$ 、 $\beta 2$ $81 \pm 0.5\%$ 、 $\beta 3$ $27 \pm 10.8\%$ 。心室 ; $\beta 1$ $12 \pm 3.7\%$ 、 $\beta 2$ $34 \pm 1.0\%$ 、 $\beta 3$ $12 \pm 6.0\%$)。

Centricon100を用いた結果から、心室の細胞質の $\beta 1$ 、 $\beta 3$ サブユニットは濃縮液に存在し、分子量10万以上の複合体を形成している可能性をしめした。

【考案】

ノザンブロット、ウェスタンブロット解析より、脳と比較し心臓での $\beta 1$ 、 $\beta 2$ の発現量が少なく、 $\beta 3$ の発現量が多い事が示された。一般的に各 β サブユニットは多くの臓器で普遍的に存在すると考えられており、心臓に特異的な β サブユニットの発現形式が認められたことは興味深い。

心臓においては、すべての β サブユニット (特に $\beta 1$ 、 $\beta 3$) が細胞質により多く存在することを明らかにした。細胞質に α サブユニットが存在することは知られているが、細胞質でのその生理的な役割についてはほとんど不明である。

心筋の細胞質に存在する β サブユニットについては、セントリコンを用いた実験から、分子量10万以上の複合体を形成していることが推測される。 $\alpha\beta\gamma$ 三量体でも分子量8-9万であり、三量体または $\beta\gamma$ 二量体単独で存在している可能性は少なく、他の蛋白質に結合しているか、あるいは膜構造に結合しているものと思われ、今後、免疫沈降法を用いた結合蛋白質の同定が必要とされる。 $\beta\gamma$ サブユニットの細胞質における局在の検討が $\beta\gamma$ サブユニットの新たな生理作用を解明する糸口となるかもしれない。

【結語】

1. ラットの心臓における $\beta 3$ サブユニットのmRNAレベルの発現は、脳と比較して、有意に強く、蛋白レベルにおいても同様であった。

2. 心臓における β サブユニット ($\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$) の発現はすべて細胞膜分画よりも細胞質分画に多量に分布していた。

3. 心臓の細胞質分画における β サブユニットは分子量10万より大きな複合体として存在することが推定された。

口頭発表の審査会において、小山教授より β サブユニットの機能について、安田教授より対象臓器選択の妥当性について質問されたが、これらに対し、申請者は概ね妥当な回答を行った。その後行われた小山、安田両審査教授との試問においても、概ね妥当な回答がなされた。

本研究は、心臓におけるG蛋白質 β サブユニットアイソフォームの特異的な発現と局在を明らかにし、臓器に特異的な細胞膜情報伝達系の可能性を示唆したものであり、有意義な研究と考えられ、学位授与に値する。