

学 位 論 文 題 名

ヒト染色体におけるステロールキャリアプロテイン
2 遺伝子の位置と COS-7 細胞での発現について

学位論文内容の要旨

I 研究目的

ステロールキャリアプロテイン2（SCP2）は、分離されたミトコンドリアなどの細胞器官に対する影響やシトソール抽出物におけるその活性分析などの結果から、ステロイドホルモン産生細胞において、コレステロールのミトコンドリアへの移動を促進すると考えられている。そしてこの蛋白質の欠損あるいは機能不全が、Zellweger Syndrome や Niemann-Pick Syndrome などの重篤な障害を引き起こすことも知られており、この蛋白質の働きを明らかにすることは生殖内分泌学上、また臨床的にも重要であると考えられる。

本研究は、ラット SCP2 cDNA をプローブとして、ヒト SCP2 cDNA をクローニングし、その塩基配列とアミノ酸組成の検討、それを用いたノーザンおよびサザンブロット分析、またその遺伝子の染色体上の位置解析、そしてアフリカ緑ザル腎細胞（COS-7）を用いた発現実験から、SCP2 の機能的活性をみることを目的とした。

II 研究材料および方法

1. ヒト SCP2 cDNA のクローニング

ヒト SCP2 cDNA は、ヒト肝由来 λ gt11 cDNA ライブラリー（Clontech）から、ラット肝 SCP2 cDNA の一部をプローブとしクローニングした。得られた cDNA の塩基配列を dideoxy chain termination 法により決定した。

2. ノーザンブロット分析

正常ヒト肝由来ポリ（A）⁺ RNA と、標識ヒト SCP2 cDNA を用いてノーザンブロット分析を施行した。

3. サザンブロット分析

ヒトおよびラット染色体 DNA を、EcoR1, BamH1, Hind III, Pst1, Bgl II で消化した後、標識ヒトあるいはラット SCP2 cDNA を用いてサザンブロット分析を施行した。

4. ヒト染色体における SCP2 遺伝子の位置解析

57種のヒト×ハムスター体細胞ハイブリッドパネルより得られた染色体 DNA を、ひと SCP2 cDNA 3' 非翻訳領域由来の272bpDNA 断片を増幅すべくプライマーを合成し、Polymerase Chain Reaction (PCR) を用いて分析した。

5. ヒト SCP2 の発現

ヒト SCP2 cDNA を組み込んだ発現ベクター pCMV-5 を、単独あるいはウシコレステロール側鎖切断酵素系 cDNA を含む pCD ベクターとともに、DNA リン酸カルシウム共沈澱法により COS-7 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞の培養液を回収するとともに、これらの細胞を集めて溶解し、ウエスタンブロット分析を施行した。

6. プレグネノロンとプロゲステロンの測定

回収した培養液中のプレグネノロンおよびプロゲステロンを RIA にて定量した。

III 研究結果

1. ヒト SCP2 cDNA のクローニングの結果について

1229塩基対よりなる cDNA はラット SCP2 cDNA と89%のホモロジーを持ち、143アミノ酸よりなるポリペプチドをコードしていた。そのポリペプチドのアミノ酸組成は、ヒト、ウシ、ラット肝より精製された SCP2 のアミノ酸組成と非常によく似ていた。

2. ノーザンブロット分析の結果について

ヒト肝には1.8Kb と3.2Kb の、2つの異なるサイズの SCP2 mRNA の存在が示唆された。

3. サザンブロット分析の結果について

ヒト染色体 DNA と SCP2 cDNA によるサザンブロットでは、5種類の制限酵素による消化後のそれぞれに数個の DNA 断片を認め、そのパターンはラットのものと非常によく似ていた。

4. ヒト染色体における SCP2 遺伝子の位置について

57種のヒト×ハムスター体細胞ハイブリッド染色体 DNA の PCR による分析により、ヒト SCP2 cDNA 由来の272bpDNA 断片が細胞遺伝学的にヒトNo.1 染色体を含むとされるハイブリッドにおいて増幅され、ヒト SCP2 遺伝子がヒトNo.1 染色体上に位置することが強く示唆された。

5. ヒト SCP2 の COS-7 細胞における発現について

ウエスタンブロット解析において、ヒト SCP2 cDNA をトランスフェクションした COS-7 細胞では、コントロールに比べ13.2KDa のポリペプチドの増加と、他では認められない15.3,

・ KDa ポリペプチドの出現を認めた。

6. ヒト SCP2 cDNA をトランスフェクションされた COS-7 細胞のプロゲスチン産生能について

SCP2 cDNA 単独のトランスフェクションによって得られた培養液中には、測定できる程 ($>0.1\text{ng/dish}$) のプロゲスチン産生を認めなかった。しかしこれをコレステロール側鎖切断酵素系 cDNA とコトランスフェクションすると、コントロールに比べプロゲスチンとして約2.5倍の著名な増加が認められた。

IV 考 察

クローニングしたヒト SCP2 cDNA のアミノ末端20残基リーダーシーケンスの存在は、COS-7 細胞におけるトランスフェクションで、SCP2 成熟蛋白質である13.2KDa 分子の増加だけではなく、15.3KDa 分子の存在を認めたことと合わせ、ヒト SCP2 成熟蛋白質が15.3KDa の前駆体蛋白質から合成されることを示唆している。またこのアミノ酸配列より成熟 SCP2 分子は、そのカルボキシル末端に Ala-Lys-Leu の peroxisome targeting sequence を持っていることが確認され、これは SCP2 がペルオキシソームに存在するとするこれまでの報告と矛盾しない。

ノーザンブロット解析にてヒト SCP2 には1.8Kb と3.2Kb の mRNA の存在が認められたが、ウエスタンブロット分析において抗ラット SCP2 血清に反応する58KDa 蛋白質は3.2Kb の mRNA にコードされる蛋白質として適切な大きさを持っており、この3.2Kb mRNA が SCPx と呼ばれる SCP2 関連蛋白質の mRNA であることが推測された。

ヒトNo.1 染色体は大きな染色体であるが、SCP2 と構造的もしくは機能的な関係を持つ遺伝子の存在はこれまでにほとんど報告されていない。しかし今回の研究成績には示されていないが、1 p の転座 [46, XX, t (1 ; 2) (p21 ; q37)] を用いた分析でも、ヒト SCP2 遺伝子は No.1 染色体 p21→pter に位置することが確認された。

SCP2 はコレステロールのミトコンドリアへの移動を促進するか、あるいはミトコンドリア内でコレステロール側鎖切断酵素系へアクセスする過程を促進し、ステロイドホルモン合成を増加させる可能性が考えられているが、SCP2 cDNA を COS 細胞にトランスフェクションすることで、細胞内における SCP2 レベルの上昇がステロイドホルモン産生を促進させることが本研究においてはじめて証明された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 本 教 授

副 査 教 授 石 橋 教 授

副 査 教 授 西 教 授

ステロールキャリアプロテイン2 (SCP₂) は、ステロイドホルモン産生細胞において、コレステロールのミトコンドリアへの移動を促進すると考えられている。この蛋白質の欠損あるいは機能不全が、Zellweger Syndrome や Niemann-Pick Syndrome などの重篤な障害を引き起こすことも知られており、この蛋白質の働きを明らかにすることは生殖内分泌学上、きわめて重要であると考えられる。

本研究は、ラット SCP₂ cDNA をプローブとしてヒト SCP₂ cDNA をクローニングし、その塩基配列とアミノ酸組成の検討、それを用いたノーザンおよびサザンブロット分析、またその遺伝子の染色体上の位置解析、そしてアフリカ緑ザル腎細胞(COS-7)を用いた発現実験から、SCP₂ の機能的活性をみることを目的とした。ヒト SCP₂ cDNA のクローニングの結果、ヒト肝由来 λ gt11cDNA ライブラリーより得られた1.2Kbp および1.3Kbp の SCP₂ cDNA は5'末端の長さを異にするのみで全く同一の塩基配列を持っていた。従ってこれらは同一の cDNA に由来するクローンと考えられた。電気浮動上1.3Kbp と推定されたクローンは、1,229塩基対よりなり、その84番目塩基対より開始し515番目塩基対で終了する1つのオープンリーディングフレームを含んでいた。コードされるポリペプチドは、143アミノ酸よりなり、ラット SCP₂ とのホモロジーは89%であった。また、この cDNA 塩基配列より推定される成熟 SCP₂ 分子のアミノ酸組成は、ヒト・ウシ・ラット肝より精製された SCP₂ のアミノ酸組成と非常によく似ており、アルギニン・ヒスチジン・チロシン残基を含まない点でも一致していた。ヒト肝ポリ(A)⁺ RNA の、SCP₂ cDNA によるノーザンブロット分析法により、1.8Kb と3.2Kb の2つの異なるサイズの mRNA の存在することが判明した。ヒト染色体 DNA と SCP₂ cDNA を用いたサザンブロット分析では、5種類の制限酵素による消化後のそれぞれに数個の DNA 断片が認められ、そのパターンはラットにおけるサザンブロット分析の結果とよく類似していた。ヒト×ゲッ歯動物の体細胞ハイブリッドパネルを用いた分析では、53ハイブリッドのうち細胞遺伝学的にヒト No. 1 染色体を含むとされているすべて(10種)のハイブリッドにおいて、電気泳動された PCR 合成産物中にヒト SCP₂ cDNA 3' 非翻訳領域の塩基配列と一致した272bpDNA 断片を認めた。しかし逆にヒト No. 1 染色体を含まないとされる42種のハイブリットではこの272

bpDNA 断片は陰性であった。またヒトNo.1 およびX染色体を含む細胞系 (MR8.2) の PCR による分析では272bpDNA 断片陽性を示し、ヒトX染色体断片のみを含む細胞系 (Y751 B・micro21 D・X3000-11) では272bpDNA 断片は陰性であった。これらのことによりヒト SCP₂ 遺伝子はヒトNo.1 染色体上に位置することが強く示唆された。pCMV-5 SCP₂ correct orientation (pCMVSCP₂) を COS-7 細胞にトランスフェクションし、その細胞を溶解して得られた蛋白質によるウエスタンブロット分析では、pCMV-5 のみあるいは pCMV-5 SCP₂ reverse orientation (pCMVSCP₂R) の場合に比べて13.2KDa のポリペプチドの増加と15.3 KDa ポリペプチドの出現が認められた。またすべての lane において抗ラット SCP₂ 血清と反応する同レベルの30K および58KDa の蛋白質を認めた。次に、COS-7 細胞形質転換によるステロイド合成能の変化をみるために、SCP₂ cDNA を単独、あるいはチトクローム p450scc・ADX cDNAs とともにコ・トランスフェクションした COS-7 細胞の、培養液中のプレグネノロンおよびプロゲステロンを測定した。トランスフェクションを受けていない COS-7 細胞の培養液、および SCP₂ cDNA 単独トランスフェクションによって得られた培養液中には、測定できる程 ($>0.1\text{ng/dish}$) のプロゲステロン産生を認めなかった。しかし、チトクローム p450scc と ADX cDNA を含む pCD ベクターのトランスフェクションでは、測定し得る十分な量のプロゲステロン産生が認められた。これらの cDNA とともに pCMVSCP₂ をコ・トランスフェクションすると、プロゲステロンとして2.5倍の著名な増加が認められたが、pCMVSCP₂R とのコ・トランスフェクションでは有意な増加は認められなかった。

以上の結果をまとめると、①ステロールキャリアプロテイン2 は動物種を越えた高い保存性を持つことがはじめて示された。②ヒト肝はステロールキャリアプロテイン2 に対し2 種の異なるサイズの mRNA を持ち、1.8Kb の mRNA は13.2KDa の成熟ポリペプチドとそのリーダースーケンスを、3.2Kb の mRNA は58KDa のポリペプチドをコードすることが推測された。③ヒトステロールキャリアプロテイン2 遺伝子はヒトNo.1 染色体に位置することがはじめて示唆された。④ステロールキャリアプロテイン2 は COS-7 細胞において単独ではステロイド合成に変化を与えなかったが、コレステロール側鎖切断酵素およびアドレノドキシンの存在下ではその合成を著名に増加させた。⑤ヒトステロールキャリアプロテイン2 は15.3KDa の前駆体蛋白質として合成された後、13.2KDa の成熟蛋白質となること、またそのターゲットがペルオキシソームであることが推測された。

口頭発表に際し、石橋教授から pregnenolone だけではなく progesterone も増加したことの理由、COS-7 細胞の 3β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性の有無、pregnenolone を増加させる為のフラビン蛋白の必要性などについて、また、葛巻教授からは、プロゲステロン以外

のステロイド産生に対する検討についての質問があった。

さらに、西 教授からは、ウエスタンブロットの抗体の種類とクロスリアクションについて、PCR に用いたプローブをノーザンブロットに用いても、3.2KbmRNA が出現するかについて、それに関連しては58KDaSCP_x がヒトNo.1 染色体上に位置することを見ている可能性について、ウエスタンブロットにて前駆体蛋白質と成熟蛋白質の両方が出現しているが、SCP₂ 蛋白質のプロセッシングについて、などの質問があった。

申請者はこれらの質問に対して概ね適切に解答しえたとは判断された。またその後、副査の石橋教授、西 教授から個別に審査をうけ合格の判定を下された。

以上、本研究はヒトステロールキャリアプロテイン2 遺伝子の染色体上の位置とプロゲスチン産生における関与の過程をはじめて明確にしえた分子内分泌学的研究であり、博士（医学）の授与に値するものと判断された。