

学位論文題名

Rab 蛋白質 S2 および S10 の遺伝子クローニング

学位論文内容の要旨

生体は、増殖因子をはじめとする伝達物質およびそのレセプター、あるいは細胞表面の接着分子等を介して細胞間でシグナルをやりとりすることにより恒常性を維持し、また種々の刺激に対して適切な反応を引き起こしている。これらの機構が正常に働くためには、生合成された蛋白質が正しく細胞内を輸送されて、分泌されたり細胞表面に分布したりすることが必要である。また、細胞表面からのシグナルは、レセプターおよびリガンドのエンドサイトーシスによってその強さが制御されている。このような蛋白質の細胞内輸送は、一つのオルガネラから出芽した小胞が標的のオルガネラと融合する、いわゆる小胞輸送によって成し遂げられている。Rab ファミリー蛋白質は、これらの小胞輸送を制御する低分子量 G 蛋白質で、これまでに 30 種類以上報告されており低分子量 G 蛋白質の中でも一番大きなサブファミリーを作る。個々の Rab 蛋白質はそれぞれ特定の細胞内オルガネラの膜に局在し、その場での小胞輸送を制御していると考えられている。小胞輸送の経路の多くがすべての細胞に共通であることと合致して、Rab 蛋白質の多くはすべての組織・細胞で発現しているが、一部の Rab 蛋白質は組織特異的に発現し、その細胞に特異的な輸送経路を制御している。本研究では、新しい Rab 蛋白質 S2 と、以前にヒトでクローン化されていた S10 のマウスホモログの cDNA クローニングおよび遺伝子クローニング、ならびにそれらの遺伝子発現の組織特異性について検討した。

Rab ファミリーを含む低分子量 G 蛋白質で良く保存されている G-3 領域および G-4 領域のアミノ酸配列に相当する混合プライマーを用いて RT-PCR することにより、cDNA フラグメントを増幅し塩基配列を決定した。この結果ヒト T 細胞株 Jurkat の mRNA から、新しい低分子量 G 蛋白質 S2 の cDNA フラグメントを得た。この PCR フラグメントをプローブにして Jurkat 細胞の cDNA ライブラリーをスクリーニングしたが、陽性クローンが得られなかったため、まず S2 の遺伝子をゲノムライブラリーから得ることを考え、マウス NIH3T3 細胞から DNA を抽出し、IDash ベクターに遺伝子ライブラリーを作製した。

このライブラリーから 2 個の S2 遺伝子クローンを得て、S2 の PCR フラグメントとハイブリダイズする 2kb の Sall-PstI フラグメントを単離した。次にこの Sall-PstI フラグメントをプローブにしてマウス脾臓の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、S2 の cDNA をクローン化した。この cDNA には、229 アミノ酸の蛋白質をコードするオープンリーディングフレームが存在した。この S2 蛋白質のアミノ酸配列は Rab ファミリー蛋白質とホモロジーが高く、最も近いのは S10 蛋白質で 55% のホモロジーがあった。

S10 は、本研究と同じ RT-PCR の方法で、ヒトの cDNA がクローン化されている Rab 蛋白質である。マウス S2 がヒト S10 と高いホモロジーを示したので、比較のためにマウス

S10 の cDNA を脳の cDNA ライブラリーからクローン化した。得られた cDNA は 984bp にわたり、237 個のアミノ酸をコードするオープンリーディングフレームが存在した。蛋白質コード領域でのヒト S10 とマウス S10 の塩基配列のホモロジーは 92%であったが、蛋白質レベルでは 4 個のアミノ酸置換しか認められず、98%のホモロジーがあった。

マウスの S2 と S10 蛋白質は、低分子量 G 蛋白質で良く保存された GTP 結合領域で約 71%のホモロジーがあるが、S2 や S10 と他の Rab 蛋白質とのホモロジーは同じ領域で 29%から 52%しかない。データベース上で S2 や S10 とホモロジーが高い配列を検索すると、線虫 (*C. elegans*) とホヤ (*C. intestinalis*) のゲノムプロジェクトから相同性の高い配列が登録されていた。これらのアミノ酸配列を比較すると、エフェクタードメイン (G-2 領域) が完全に保存されているほか、G-3 領域の下流にも他の Rab 蛋白質には見られないアミノ酸配列の保存が認められた。これらの領域は、Rab 蛋白質がエフェクター蛋白質や活性調節蛋白質と相互作用する領域と考えられているので、S2 と S10 は共通のあるいは非常に類似したエフェクター蛋白質・活性調節蛋白質と相互作用していると考えられる。また、これらの蛋白質に共通して特徴的なアミノ酸配列の挿入が認められた。これらのことから S2 および S10 蛋白質は、線虫およびホヤのホモログを含めて、Rab ファミリーの中でも 1 つの新しいサブグループを作ると考えられた。S2 や S10 さらにその他の Rab 蛋白質の配列から分子進化の系統樹を作ると、線虫やホヤのホモログを含めて S2 と S10 が一つの枝の中に含まれることから、これらが 1 つのサブグループを作るという考えが支持された。

次に、作製したマウス NIH3T3 細胞のゲノムライブラリーから S2 と S10 の遺伝子をクローン化し、遺伝子構造を解析した。その結果、S2 および S10 の遺伝子は、非翻訳領域の長さには違いがあるが共に 2 つのエクソンによってコードされていて、エクソン・イントロンの境界も全く一致していた。rab ファミリーの遺伝子の中では、これまでに rab1A、rab3A、rab11B 遺伝子の遺伝子構造が明らかにされているが、それぞれの構造は全く異なっていることから、rab ファミリー全体の遺伝子の進化はかなり古くから分岐していたと考えられている。S2 と S10 の遺伝子構造が全く一致していたということは、S2 遺伝子と S10 遺伝子は、比較的新しい時期に共通の祖先遺伝子から分岐したことを示唆している。

最後に、S2 および S10 の遺伝子発現の組織特異性についてマウスの組織 RNA を用いたノーザンブロッティングにより検討した。この結果、S2 遺伝子はすべての組織で発現しているのに対し、S10 遺伝子は脳に特異的に強い発現が認められた。卵巣にも弱い発現が認められたが、その他の組織では発現が検出されなかった。このことは、S2 蛋白質がすべての細胞に共通の輸送経路を制御しているのに対し、S10 蛋白質は神経系に特異的な輸送経路を制御している可能性を示唆している。

以上のように本研究では、Rab ファミリーに属する新しい低分子量 G 蛋白質 S2 の cDNA クローニング、S10 のマウスホモログのクローニング、さらにマウスの S2 および S10 の遺伝子構造の解析とその発現の組織特異性の検討を行った。その結果、S2 と S10 が Rab の中でも一つの新しいサブグループを作ることが明らかとなった。このサブグループは、線虫やホヤを含む下等動物から保存されており、動物の生体維持に重要な遺伝子であると考えられる。動物の進化とともに、このサブグループの中に、2 つの組織特異性の異なる遺伝子が出来上がったと考えられるが、今後、これらの蛋白質が実際に細胞内のどの輸送経路を制御しているのか解析を進めなければならないと考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 柿 沼 光 明

副 査 教 授 上 出 利 光

副 査 教 授 生 田 和 良

学 位 論 文 題 名

Rab 蛋白質 S2 および S10 の遺伝子クローニング

蛋白質の細胞内輸送は、一つのオルガネラから出芽した小胞が標的のオルガネラと融合する、いわゆる小胞輸送によって成し遂げられている。Rab ファミリー蛋白質は、これらの小胞輸送を制御する低分子量 G 蛋白質で、これまでに 30 種類以上報告されており低分子量 G 蛋白質の中でも一番大きなサブファミリーを作る。個々の Rab 蛋白質はそれぞれ特定の細胞内オルガネラの膜に局在し、その場での小胞輸送を制御していると考えられている。Rab 蛋白質の多くはすべての組織・細胞で発現しているが、一部の Rab 蛋白質は組織特異的に発現し、その細胞に特異的な輸送経路を制御している。本研究では、新しいマウスの Rab 蛋白質 S2 と、以前にヒトでクローン化されていた S10 のマウスホモログの cDNA およびゲノム遺伝子構造、ならびにそれらの遺伝子発現の組織特異性について検討した。

低分子量 G 蛋白質で良く保存されている領域のアミノ酸配列に相当する混合プライマーを用いて RT-PCR することにより、ヒト T 細胞株 Jurkat の mRNA から、新しい低分子量 G 蛋白質 S2 の cDNA フラグメントを得た。これをプローブにしてマウス脾臓の cDNA ライブラリーから全長に近い cDNA をクローン化し、またマウスのゲノムライブラリーから S2 遺伝子をクローン化した。

S10 は本研究と同じ方法でヒトの cDNA がクローン化された Rab 蛋白質であるが、マウスの cDNA を脳のライブラリーから、また遺伝子をゲノムライブラリーからクローン化した。ヒト S10 とマウス S10 のホモロジーは、蛋白質レベルで 98%であった。

マウスの S2 と S10 蛋白質は GTP 結合領域で約 71%のホモロジーがあるが、これらと他の Rab 蛋白質とのホモロジーは同じ領域で 29%から 52%しかない。データベース上で類似の配列を検索すると、線虫とホヤのゲノムプロジェクトから相同性の高い配列が登録されていた。S2、S10 とこれらのアミノ酸配列を比較すると、エフェクタードメイン (G-2 領域) が完全に保存されているほか、G-3 領域の下流にも他の Rab 蛋白質には見られないアミノ酸配列の保存が認められ

た。これらの領域は、Rab 蛋白質がエフェクター蛋白質や活性調節蛋白質と相互作用する領域と考えられているので、S2 と S10 は共通のあるいは非常に類似したエフェクター蛋白質・活性調節蛋白質と相互作用していると考えられる。これらのことから S2 および S10 蛋白質は、Rab ファミリーの中でも 1 つの新しいサブグループを作ると考えられた。

S2 と S10 の遺伝子構造を解析した結果、これらは共に 2 つのエクソンによってコードされていて、エクソン・イントロンの境界も全く一致していることがわかった。これまで報告されている rab ファミリー遺伝子の遺伝子構造は全く異なっていたことから、rab ファミリー全体の遺伝子の進化はかなり古くから分岐していたと考えられているが、S2 と S10 遺伝子は構造が全く一致していたので、これらは比較的新しい時期に共通の祖先遺伝子から分岐したと考えられる。

最後に、S2 および S10 の遺伝子発現の組織特異性について検討した。S2 遺伝子はすべての組織で発現しているのに対し、S10 遺伝子は脳に特異的に強い発現が認められた。このことは、S2 蛋白質がすべての細胞に共通の輸送経路を制御しているのに対し、S10 蛋白質は神経系に特異的な輸送経路を制御している可能性を示唆している。

公開発表の場で、副査の上出教授から、S2 の mRNA の長さに違いがある理由、S10 の発現はマウスの月齢・性サイクルなどで違いがあるか、S10 は脳でどのような働きをしていると考えるか、生田教授からは混合プライマーを用いて Rab グループの低分子量 G 蛋白質が多くクローニングされた理由、はじめはヒトの T リンパ球細胞株 Jurkat の cDNA から研究を開始してマウスに変更した動機、ヒトにおける S10 の組織分布はどうか、主査からは Rab3A や S10 意外にも、組織特異的な発現を示す Rab 蛋白質があるのかどうか、等の質問があったが、申請者は概ね適切な解答をした。

この論文は、新しい遺伝子を独自にクローン化してその構造と発現を解析している点で高く評価され、今後、蛋白質レベルで細胞内のどの輸送経路を制御しているのか解析することにより、細胞内の輸送機構がさらに明らかになると期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。