

学 位 論 文 題 名

A novel A-kinase anchoring protein which
interacts with heterotrimeric G protein
G alpha 13 in human heart.

(三量体 G 蛋白質 G α 13 と相互作用するヒト心臓の
新しい A-kinase anchoring protein の研究)

学位論文内容の要旨

1990 年代にクローニングされた三量体 G 蛋白質 α サブユニットの G α 13 は、ヒトのほぼ全組織中にその mRNA が発現している。G α 13 の機能としてトロンボキサン A2 やトロンビン受容体と関連することによる凝固系への関与、Na⁺-H⁺アンチポーター活性の制御、線維芽細胞に対する高率な transformation 活性、JNK/SAPK の活性化、ブラジキニンによる電位依存性 Ca²⁺チャンネルの抑制への関与などが報告されてきたが、直接に制御する遺伝子は 1998 年まで一つも報告されていなかった。

Yeast two-hybrid 法にて、G α 13 と共役する蛋白質をヒト胎児腎臓ライブラリーからクローニングした。共役相手は 1990 年代に入ってから発見された新しい蛋白質 A-kinase anchoring proteins (AKAPs) のひとつで、ウサギからクローニングされた A-kinase anchoring protein 120 (AKAP120) cDNA と高い相同性のある cDNA であった。この cDNA には約 600 塩基で、AKAPs ファミリーに保存されている PKA 調節サブユニットへの結合領域を認めたが、塩基配列検討の結果、停止コドン認めなかったため、ある cDNA の断片と考えられた。成人ヒト各種臓器 (心臓、全脳、肺、肝臓、腎臓、胎盤、骨格筋、脾臓) mRNA を用いたノーザンブロッティングでは、心臓において約 650 塩基に強いシングルバンドが認められた。ヒト心臓フェージライブラリーからポリ A を含むほぼ全長と思われる独立したクローンを 5 個単離したが、いずれも DNA シークエンシングにて停止コドン認めず、ポリ A 以外はヒト腎臓胎児 cDNA からクローニングした cDNA と同一の塩基配列を示した。更にカルボキシル末側の DNA 配列を検索する目的で、3'-Rapid Amplification of cDNA Ends

(3'-RACE) 法を導入したが、新たなカルボキシル末側 DNA 配列も認めなかった。Expressed Sequence Tag (EST) プロジェクトにて、ヒト甲状腺癌ライブラリーから酷似した停止コドンを持つ cDNA が登録されたが、同 cDNA を入手してシーケンスしたところ、停止コドンは認めなかった。複数の臓器から、同一 cDNA がクローニングされていること、哺乳細胞の AKAP120 と高い相同性があること、AKAP の保存された領域を持つことから、この cDNA がジャンク DNA である可能性は低いと考えられた。

この cDNA が蛋白質として発現しうるか否かを検討する第一歩として、様々な遺伝子発現調節について検討した。停止コドンを認めない機序のひとつとして、ある種の翻訳調節がおきている可能性があった。この cDNA のカルボキシル末側には、アデニンに富む配列が認められたため、翻訳過程に slippage 現象が起きている可能性が推測され、それが翻訳の再コード化機構の一つである ribosomal frameshifting を惹起しているかもしれないという仮説を立てた。この仮説を検索するために、相同組み換えを利用して塩基配列の変異を検出できる方法として、酵母を用いて stop codon assay を導入した。その結果、約 23% の確率で翻訳の再コード化が起こり、新たに停止コドンが出現し翻訳が停止した。これより、この cDNA の発現過程において、mRNA レベルよりはむしろ ribosomal frameshifting による翻訳停止コドンの出現する可能性が高いと考えられた。しかしその部位に再現性が低いこと、また確率から、複数の独立した cDNA のすべてに停止コドンが認められない機序が ribosomal frameshifting だけであるとは考えにくかった。そのため、今回クローニングされた cDNA が、再現性を持って複数個発現するためには、更なる未知の機序があるかと推測された。更に、この新しい AKAP と $G\alpha 13$ の相互作用は酵母内で証明されたものであり、哺乳細胞を用いた実験は施行していない。しかしこの AKAP は、直接的な共役相手が殆ど判明していない $G\alpha 13$ のヒト心臓における効果器である可能性があり、 $G\alpha 13$ の機能を解明するものとして興味深い。また、この 2 者間の新たな相互作用は、心臓における情報伝達系の中で $G\alpha 13$ と A-kinase という今までに報告されていない新たな細胞内情報伝達系のクロストークである可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 北 畠 顕
副 査 教 授 川 口 秀 明
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

A novel A-kinase anchoring protein which interacts with heterotrimeric G protein G alpha 13 in human heart.

(三量体G蛋白質 G α 13と相互作用するヒト心臓の
新しい A-kinase anchoring protein の研究)

細胞内情報伝達系のなかで重要な分子スイッチとして機能している三量体G蛋白質 α サブユニットの中でもっとも新しく発見されたG α 13は、そのmRNAはほぼ全身に発現しているがその効果器は最近まで不明であった。本研究は当初、ヒトにおけるその効果器を検索し、心臓における新たな細胞内情報伝達系を解明する目的で行われた。Yeast two-hybrid法にて得られた共役相手はA-kinase anchoring proteins 120と高い相同性のあるcDNAで、ヒトノーザンブロットイングでは、心臓においてのみ約650塩基に強い発現が認められたが、停止コドンは認めなかった。ヒト心臓ライブラリー再スクリーニングでは、約650塩基相当のポリAを含む複数のクローンを得たが停止コドンはなく、3'-RACE法でも同様であった。本研究途中に遺伝子バンクに停止コドンのない同様のクローンが登録されたため、<このcDNAが全長を含み、転写・翻訳過程でのフレームシフトが起こり翻訳停止コドンが出現する>、という仮説を立てて、酵母を用いたstop codon assayを導入した。その結果、この遺伝子はmRNAレベルよりはむしろribosomal frameshiftingが起こることにより翻訳が停止する可能性が示されたが、それだけでは説明つかない部分もあり未知なる機序の関与も推察された。現在までのところ、停止コドンを認めない遺伝子がribosomal frameshiftingによって翻訳停止するという報告はなく、この新しい遺伝子の蛋白質レベルでの発現確認が出来れば、新しい発現調節を報告するきわめて興味ある研究となる。また、AKAPとG α 13の相互作用は酵母において認められたものであるが、ヒトと酵母の情報伝達には共通点も多いことから、ヒト心臓における情報伝達系の中でG α 13とA-kinaseという今までに報告されていない新たな細胞内情報伝達系のクロストークである可能性がある。

審査にあたって、主査北畠教授より、心臓における他のAKAPの報告、ライブラリースクリーニングにおける全長cDNAクローニング効率、AKAPファミリー遺伝子のノックアウトモデルの可能性、今後の臨床医学を踏まえた実験計画について質問があった。

副査川口教授からは G α 13 と AKAP の相互作用の証明は十分か、臨床病態における今回のクローンの予測される働き、心臓において今回のクローンが特殊な発現形態を示した必然性と必要性、結果の更に踏み込んだ検証法の具体的方法について質問があった。

副査守内教授は後日の口頭試問にてヒトノーザンブロッティングの結果への疑問、停止コドンのない遺伝子が蛋白に翻訳される可能性の有無、stop codon assay で得られた停止コドンが出現するクローンは mRNA の何%にあたるか、今回のクローンのような報告の有無、について質問があった。申請者はこれらに対しておおむね適切な回答を行った。

審査員一同は本研究を新しい発現形態を持つ可能性のある心臓の遺伝子として、その意義の解明に迫った研究として高く評価し、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。