The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Molecular cloning and characterization of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in Drosophila melanogaster
Author(s)	吉川, 真悟
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38153
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	吉川真悟（よしかわしんご）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　10628　号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Molecular cloning and characterizaion of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in *Drosophila melanogaster* **（ショウジョウバエ　イノシトール1，4，5-三燐酸受容体遺伝子の単離と解析）**
論文審査委員	（主査） 教　授　遠山　正彌 （副査） 教　授　津本　忠治　　教　授　三木　直正

論文内容の要旨

（目　的）

イノシトール1，4，5－三燐酸（IP_3）はホルモンや神経伝達物質などの刺激により細胞内に放出され，選択的にその受容体に結合して，細胞内カルシウム（Ca^{2+}）貯蔵庫からCa^{2+}を放出する。IP_3受容体はIP_3依存性Ca^{2+}放出を司る分子であり，IP_3結合部位を有しそれ自身四量体を形成しCa^{2+}チャネルを形成する。IP_3受容体は既にマウス小脳より精製され，その一次構造は従来知られた電位依存性Ca^{2+}チャネルとは全く異なっている。本研究では，種々の遺伝学的，発生工学的技法が適応できるショウジョウバエよりIP_3受容体遺伝子を単離し，構造決定及び機能発現実験を行い，組織局在，遺伝子座を決定することにより，IP_3受容体の機能を明らかにすることを目的とする。

（方法ならびに成績）

IP_3受容体の遺伝子は，膜貫通領域での相同性が保存されているという仮定のもとに，マウスIP_3受容体cDNA　の膜貫通領域に相当する断片をプローブとし，ショウジョウバエ頭部cDNAライブラリーを弱いhybridizationの条件でスクリーニングし，得られたクローンを用いて，同じライブラリーより高いhybridizationの条件でスクリーニングし，全長をカバーするcDNA群を得た。これらのcDNAを用いて唾腺染色体のin situ hybridizationを行い遺伝子座を決定したところ，この遺伝子は第3染色体の83A5－9にマップされた。cDNAの全塩基配列を決定し，これよりショウジョウバエIP_3受容体が2833アミノ酸からなる分子量319kDの蛋白質であることが推定された。

ショウジョウバエIP_3受容体は，マウスIP_3受容体と全体にわたってアミノ酸レベルで57％の相同性を持ち，中でもIP_3結合能を持つN末端650アミノ酸の領域において性質の類似したアミノ酸を含めると83％の相同性が認められた。またhydrophobicity解析により，マウスIP_3受容体と同様少なくとも6つの膜貫通配列（M1－M6）がC末端側に存在するが，この付近のアミノ酸配列もよく保存しており，特にM5，M6はそれぞれ87，95％の相同性があり，また筋小胞体に存在するリアノジン受容体のM3，M4とも高い相同性を示す。しかし前記二領域の中間部の調節領域ではマウスIP_3受容体と大きな差異が見られ，マウスIP_3受容体で存在するcAMP依存性のリン酸化部位を持たない。

ショウジョウバエIP_3受容体のN末端側の領域が実際にIP_3結合活性を持つかどうか調べるために，膜貫通領域を欠如したN末端より2295アミノ酸をコードするcDNAをベータアクチンプロモーターの下流に連結した発現用プラスミドを調製して，NG108-15（neuroblatoma x glioma）細胞に導入して発現させた。ウエスタンブロット解析の

結果，可溶性画分での蛋白質の発現が検出された。この画分を用いてIP_3結合実験を行ったところマウスIP_3受容体と同様な結合活性が見られた（K_d値；マウス約20nM，ショウジョウバエ約30nM)。

ショウジョウバエIP_3受容体のmRNAの各組織，発生段階における発現の分布を調べるためにノーザンブロット法を行った。約10kbに相当するバンドが検出され，成虫において頭部及び胸腹部で強いシグナルが見られた。特に足，触角，剛毛を含んだappendage画分で最も強いシグナルが検出された。この結果は，ショウジョウバエの各組織，発生段階の膜画分を用いたIP_3結合実験とよく一致した。即ちIP_3結合能は成虫で最も高く，特にappendage 画分で最も高い結合能を持つ。ニクバエを用いた同様の実験より，この高い結合能が足，触角共に同等に由来することが明かとなった。また頭部において，複眼形成不全突然変異体（*eyes absent*）と比較したところ，IP_3結合能が半減しており，複眼におけるIP_3結合活性の存在が示唆された。

（総　　括）

本研究ではIP_3産生以降の分子機構に注目し，IP_3依存性Ca^{2+}放出の中心的分子であるIP_3受容体のショウジョウバエ相同分子cDNAの単離と構造解析を行い以下のような結果を得た。(1)ショウジョウバエとマウスのIP_3受容体の一次構造の比較により，IP_3結合部位，Ca^{2+}チャネル領域における共通性と調節領域における差異を見いだした。(2)IP_3結合部位に相当するcDNAを培養細胞に導入して，マウスIP_3受容体と同様な結合様式を持つことを示した。(3)mRNAの発現，細胞膜画分を用いたIP_3結合実験により，視覚，嗅覚，筋肉系におけるIP_3受容体の重要な役割を示唆した。以上の結果はIP_3受容体が無脊椎動物から脊椎動物に至る進化の過程で非常によく保存されていて，IP_3／Ca^{2+}情報伝達系の細胞における普遍的な重要性を示唆している。

論文審査の結果の要旨

本研究は，ショウジョウバエのIP_3受容体のcDNAクローニングと一次構造の決定を行い，ショウジョウバエとマウスのIP_3受容体の一次構造の比較により，IP_3結合部位，Ca^{2+}チャネル領域における共通性と調節領域における差異を見いだし，IP_3結合部位に相当するcDNAを培養細胞に導入して，マウスIP_3受容体と同様な結合様式を持つことを示し，mRNAの発現，細胞膜画分を用いたIP_3結合実験により，視覚，嗅覚，筋肉系におけるIP_3受容体の重要な役割を示唆した。

Ca^{2+}は中枢神経のみならず末梢神経においても重要な働きを担っていることが知られている。本研究はショウジョウバエにおいても細胞内膜系リガンド作動性Ca^{2+}チャネルであるIP_3受容体が種を越えて非常によく保存された形で存在し，しかも視覚系，嗅覚系のみならず筋肉系においても細胞内膜系のCa^{2+}制御系の普遍的分子として細胞の生理機能発現の上で重要な働きをしていることを示唆している。また，ショウジョウバエは遺伝学の蓄積が豊富であり，遺伝子導入による変異体の作製も可能であるので，今後IP_3／Ca^{2+}情報伝達系が分子生物学的に解析されることが期待されるので，学位論文に値するものと評価される。