

Title	Molecular cloning and characterization of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in <i>Drosophila melanogaster</i>
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、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 6 2 8 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 <i>Drosophila melanogaster</i> (ショウジョウバエ イノシトール 1, 4, 5 -三リン酸受容体遺伝子の 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 -三リン酸 (IP₃) 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 (Ca²⁺) 貯蔵庫から Ca²⁺ を放出する。IP₃ 受容体は IP₃ 依存性 Ca²⁺ 放出を司る分子であり、IP₃ 結合部位を有しそれ自身四量体を形成し Ca²⁺ チャネルを形成する。IP₃ 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 Ca²⁺ 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 IP₃ 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、IP₃ 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)

IP₃ 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 IP₃ 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 83A 5 - 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 IP₃ 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 IP₃ 受容体は、マウス IP₃ 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 IP₃ 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 IP₃ 受容体と同様少なくとも 6 つの膜貫通配列 (M 1 - M 6) 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 M 5, M 6 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 M 3, M 4 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 IP₃ 受容体と大きな差異が見られ、マウス IP₃ 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 IP₃ 受容体の N 末端側の領域が実際に IP₃ 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 (neuroblastoma x glioma) 細胞に導入して発現させた。ウェ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らかとなった。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、 $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ 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 $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ 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。