



| | |
|--------------|---|
| Title | 蛋白質の構造と機能に関する遺伝学的研究 |
| Author(s) | 桜田, 一洋 |
| Citation | 大阪大学, 1993, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/38635 |
| 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 桜 田 一 洋

博士の専攻分野の名称 博 士 (理 学)

学 位 記 番 号 第 1 0 9 4 6 号

学位授与年月日 平成 5 年 10 月 4 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 名 蛋白質の構造と機能に関する遺伝学的研究

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 小川 英行

(副査) 教 授 倉光 成紀 教 授 谷口 維紹

論 文 内 容 の 要 旨

第1部

NMDA受容体は中枢神経系において学習や神経細胞死に重要な役割を担っている。本研究では、まずわれわれはNMDA受容体分子が基本となるNMDAR1サブユニットとこれを活性化するNMDAR2A-NMDAR2Dの4種類のサブユニットから構成されることを見いだした。4種類のNMDAR2サブユニットcDNAはPCR法を用いて見いだし、ラット脳のcDNAライブラリーから単離した。得られたcDNAはNMDAR1とは15%のホモロジーしか有していなかったが、サブユニット間には50%程度のホモロジーが見いだされた。4つのサブユニットはすべて4つの膜貫通領域と、そのN末端側とC末端側に大きな親水性領域を有している。アフリカツメガエル卵母細胞の系を用いてNMDAR2A, NMDAR2Cを発現させると、単独では活性を持ったチャンネルを形成しないが、NMDAR1と組み合わせることで、その電流を数十倍増強した。このようなNMDAR2サブユニットによるNMDAR1の活性化は、NMDAR1の薬理学的性質にも多様の修飾を行うことが見いだされた。さらにin situハイブリダイゼイションを用いてNMDAR2サブユニットの発現領域の解析を行うと共に発現している領域は観察されるものの基本的には互いに相補的な領域での発現が観察された。このような、薬理学的及び発現領域の多様性はNMDA受容体の広範囲で多様な役割の基盤となっているものと考えられる。

一方、NMDA受容体は他のグルタミン酸受容体とは異なり、 Ca^{2+} の高い透過性を有し、 Mg^{2+} , Zn^{2+} , MK-801などの選択性的なカチオン性のチャンネルブロッカーにより阻害を受ける。私は、アフリカツメガエル卵母細胞の系で部位特異的に変異を導入したNMDA受容体を発現させ、 Ca^{2+} の透過性やチャンネルブロッカーの結合を決定する領域の解析を行った。18種類の変異（单アミノ酸置換）はNMDAR1の第2膜貫通領域に導入し、NMDAR2Aと共に発現させてその性質の変化を観察した。これらの異変のうち、第2膜貫通領域のアスパラギンをグルタミンやアルギニンに置換すると、 Ca^{2+} の透過性と Mg^{2+} , MK-801に対する感受性が大きく変化した。これらの、結果に基づき、私はチャンネル孔の中心部で形成されるアスパラギンの環が Ca^{2+} の透過性とチャンネルブロッカーの結合に重要な役割を果たしていると結論した。

第2部

ノイラミニダーゼはシアル酸が糖鎖末端に α 配位ケトシド結合したシアロ糖複合体のシアル酸残基を加水分解するエキソ型グリコシダーゼである。私は非病原性微生物である放線菌 *Micromonospora viridifaciens* のノイラミニダーゼ遺伝子を *Streptomyces lividans* の系で発色基質 2'-(4-methylumbelliferyl) α -D-N-acetylneurameric acid を用いることで発現クローニングすることに成功した。クローン化した遺伝子の塩基配列から1941bp からなるORFを同定し、さらにアミノ酸配列の解析から Ser-X-Asp-X-Gly-X-Thr-Trp からなる Asp Box が5回繰り返して存在することを見いだした。

クローン化した遺伝子は *Streptomyces lividans* で極めて効率的に分泌生産された。この高発現を利用して、C末を欠失させた酵素蛋白質(52K, 41K)と完全な酵素蛋白質(68K)を生産し高純度の精製を行った後、in vitro で酵素の性質の解析を行った。その結果、全蛋白質の4/7にあたる N 末41Kd の領域がノイラミニダーゼ活性を発現させるのに必要かつ十分であることが見いだされた。この C 末欠失体の結果は、41Kd の領域には5つの Asp Box が存在し、また他の微生物由来のノイラミニダーゼとも相同性を有していることと良く対応している。

Acetylpolyamine amyldohydrolase (APH) はアセチルポリアミンを加水分解しポリアミンを生成する酵素である。私は *Mycoplana bullata* から N 末アミノ酸配列の情報に基づきオリゴヌクレオチドプローブを合成し、遺伝子のクローニングを行った。クローン化した遺伝子は塩基配列を決定した後、trc プロモーターの下流につなぎこむことで大腸菌の菌体内に大量に生産することに成功した。得られた酵素を精製して、その性質を解析したところ APH は蛋白質1分子内に1個の亜鉛を持つことが見いだされた。私はこの亜鉛の役割を明かにするためアポ酵素の作製を試み、最終的に安定な精製アポ酵素を得ることができた。このアポ酵素を用いてコバルト置換 APH を作製し、その酵素の反応 pH 依存性を亜鉛型の酵素と比較した。その結果亜鉛が触媒反応で中心的な役割を果たしていることがみいだされた。金属置換による性質の変化はカルボキシペプチダーゼで報告されているものとよく似ている。二つの酵素のアミノ酸配列を比較することで APH の活性中心で働いていると考えられるアミノ酸を見いだすこともできた。

*rab11*蛋白質は細胞内での膜(物質)輸送に重要な役割を果たしている一群の蛋白質 *rab family* と高い相同性を有している。私は膜輸送の盛んな組織であるラットの肝臓から *rab11A* のクローニングを行った。得られた cDNA を用いてノーザンハイブリダイゼイションによりその発現領域の解析を行ったところ肝臓以外に脳や精巣で高い発現が観察された。一方、脳では予想されるバンド以外に分子量の大きなもう一つのバンドが検出されたことから、この mRNA に対応する cDNA のクローン化を試みた。その結果、ラット脳のサイズ分画を行った cDNA ライブラリーから *rab11A* と高い相同性を有しているが alternative splicing による産物ではなく別の遺伝子にコードされている cDNA を単離することができた。これを私は *rab11B* と命名した。*rab11B* は *rab11A* と塩基配列上では 74% の相同性を持ち、アミノ酸配列上は 89% の相同性を有している。アミノ酸置換は C 末に限極していることから、*rab11A*, *rab11B* は脳に於て共通の制御蛋白質と作用している可能性を示唆するとともに、細胞内での極在領域が異なっている可能性を強く示している。

論文審査の結果の要旨

本論文では、脳の長期増強現象の成立に深く関与する N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の実体と多様性を、遺伝子のクローニングと薬理学的解析法を駆使して初めて明らかにした。また NMDA 受容体のカルシウム透過性とマグネシウム阻害を決定する部位、ならびに作用機構を部位特異的遺伝子変異導入法によって初めて明らかにした。以上は博士(理学)の学位論文として十分価値のあるものと認める。