



Title	ヒトのイノシトール1,4,5-三リン酸受容体cDNAクローニングと基本的解析
Author(s)	山田, 憲彦
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38905
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	山田 憲彦
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11267 号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科病理系専攻
学位論文名	ヒトのイノシトール1,4,5-三リン酸受容体cDNAクローニングと 基本的解析
論文審査委員	(主査) 教授 本田 武司 (副査) 教授 遠山 正彌 教授 三木 直正

論文内容の要旨

〔目的〕 イノシトールリン脂質代謝亢進とそれに伴う細胞内 Ca^{2+} の変動は、ホルモンや神経伝達物質、細胞増殖因子などの情報を細胞内に伝達する普遍的なセカンドメッセンジャー系の一つである。イノシトール1,4,5-三リン酸(以下IP3)とIP3を結合して内膜系の Ca^{2+} ストアから Ca^{2+} を放出するIP3レセプター(以下IP3R)は、この系を構成する中心的な分子である。この系は、ヒトの多様な生理現象に関与すると考えられ、いくつかの疾患の病態生理とも深く関与している事が推測されてきた。従ってヒトのIP3Rの構造と機能を明らかにする事は非常に有用であると考え、cDNAのクローニングに着手し、いくつかの検討を加えた。

〔方法ならびに成績〕 IP3Rは小脳のプルキンエ細胞に多量に存在するが、mRNAの抽出に適した新鮮なヒトの小脳組織入手する事が困難な為、クローニングには新鮮な状態で入手しやすい子宮平滑筋を用いた。以前の検討からマウスの子宮にはIP3RのmRNAが比較的多く存在する事が示されており、ヒト子宮においてもIP3Rが存在し、クローニングが可能である事が予想された。子宮筋腫症の切除標本から正常平滑筋組織を採取し、その膜画分で抗マウスIP3Rモノクローナル抗体を利用したウェスタンプロット解析を行ったところIP3Rと考えられる分子量約230kDaの陽性バンドを認めた。そこで次にmRNAを抽出して、cDNAの形質発現ライブラリーを作製し、上記の抗体による免疫学的スクリーニング、マウスIP3RcDNAと新たに単離されたヒトのcDNAクローニングをプローブとしたプラクハイブリダイゼイションによりさらに候補クローニングを収集した。各クローニングの両鎖より全塩基配列(9076ヌクレオチド)を決定し、この中に8088ヌクレオチドのopen reading frameの存在を確認した。推定されるアミノ酸配列は2695残基で、マウス及びラットの1型IP3Rと99%のアミノ酸が一致し、各種の機能ドメインの構造も種を越えてよく保存されていた。IP3結合領域は、マウスではN末端650アミノ酸に存在する事が知られているが、ヒトの相当する領域のアミノ酸配列はマウスのものと2アミノ酸が異なるのみで非常に類似していた。さらにこの部位を含むクローニングを発現させたIP3結合実験の結果から、ヒトでも同部位にIP3結合領域が存在する事が示唆された。C末端の膜貫通領域も種を越えて保存され、共通のトポロジーを有している事が示唆され、さらにリアノジンレセプターとも一部ホモロジーを示した。cAMP依存性蛋白質リン酸化酵素(PKA)によるリン酸化部位はヒトでも厳密に保存され、PKAシグナルとイノシトールリン脂質- Ca^{2+} シグナル系とのクロストークが示唆された。またマウス及びラットの神経系で特異的に発現されるスプライシングセグメント(SII)は、子宮やヒト白血病細胞由来のHL-60細胞のクローニングからは見出せず、さらにこのSIIセグメントが欠失する事により出来るATP結合の共通配列も種を越え

て保存されている事が判明した。これは、IP3R が神経系と非神経系で ATP によって異なった機能調節を受ける可能性を示唆している。

さらに、ヒトの細胞や組織の IP3R を予備的に検討した。HL-60 細胞をレチノイン酸や DMSO で好中球系の細胞に成熟・分化させると、IP3R の mRNA 量が増加した。未分化の骨髄系の細胞は分化に伴って脱颗粒能等の機能を獲得するが、この結果からこの為にはイノシールリン脂質-Ca²⁺ シグナル系が重要である事が示唆された。また抗マウス IP3R モノクローナル抗体を利用して、ヒトの脊髄小脳変性症 (Holmes 型及び OPCA) の小脳の免疫組織学的検討を行った。この変性症においてはプルキンエ細胞の抗体に対する反応性が変化していた。

in situ ハイブリダイゼーション法による染色体マッピングの結果、ヒトの IP3R 遺伝子座 (*Insp3rl*) は第 3 染色体の短腕 p25-26 の位置である事が示された。

〔総括〕 ヒトの IP3R の一次構造を決定しその特徴を明らかにした。IP3R は、種を越えてよく保存され、ヒトの生理学・病理学の研究において重要である事が示唆された。

論文審査の結果の要旨

イノシトールリン脂質代謝亢進とそれに伴う細胞内 Ca²⁺ の変動は、ヒトを含む広範囲の生物種において普遍的に存在する重要なセカンドメッセンジャー系である。イノシトール 1,4,5-三リン酸受容体は、イノシトールリン脂質代謝と細胞内 Ca²⁺ の変動の直接の接点に位置し、同時に多様な情報伝達系シグナルのクロストークの場をも形成する極めて重要な分子である。本研究は、そのイノシトール 1,4,5-三リン酸受容体の構造・機能及び染色体上の位置をヒトにおいて明らかにし、その発現調節を検討したものである。さらに近年、イノシトールリン脂質/Ca²⁺ シグナル系の異常がヒトの病態生理と深く関与している疾患である事が明らかにされつつある。従って本研究は、ヒトの生理・病理の解明にとって価値ある論文として認め、学位に値するものと思われる。