OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	新規ABC輸送体TAPLの構造と発現
Author(s)	山口, 陽子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42274
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【8】

氏名	山口陽子
博士の専攻分野の名称	博士（薬学）
学位記番号	第 16155 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	新規ABC輸送体TAPLの構造と発現
論文審査委員	（主査） 教授 前田 正知 （副査） 教授 山元 弘　教授 馬場 明道　教授 山口 明人

論文内容の要旨

細胞は細胞膜により外界と隔てられており、膜を介して物質の輸送を行っている。輸送体はそれぞれの細胞に必要な物質を外界から吸収し、さらには体内からの異物を排出するといった選択的な物質の輸送を行っている。

ABC輸送体は細菌から高等真核生物にまで広く分布し、多糖・ペプチドあるいはタンパク等、様々な物質の輸送を担っている。共通して高度に保存されたATP結合部位（ATP Binding Cassette）を持つことからこの名が付けられているが、個々のABC輸送体が果たす役割は実に多様である。最もよく知られているMDR（multidrug resistance）は多剤排出タンパクとして働くため薬剤治療の大きな問題となっている。またCFTR（cystic fibrosis transmembrane conductance regulator）やALDP（adrenoleuko dystrophy protein）の欠損は、それぞれ嚢胞性線維症、副腎白質ジストロフィーという重篤な病気を引き起こすなど、この輸送体のファミリーに属するタンパクは医学的な問題としても注目されているものが多い。しかしながら存在するABC輸送体遺伝子の推定数を考慮すると、ごくわずかなものが知られているに過ぎない。従って新規ABC輸送体を探索し、その働きを追求することは、現在までにわからなかった病気の原因、もしくは生体内の働きを解明する手がかりとなるはずである。

本研究に於いて、新規ABC輸送体のcDNAクローニングを目指し、ATP結合部位に対応するdegenerate primerを設計し、ラット腸管総RNAを用いてRT-PCRを行った結果、TAP1、TAP2（transporter associated with antigen processing）に類似した約700アミノ酸残基からなるhalf-typeの新規ABC輸送体TAPL（TAP-Like）を見い出した。TAP1、TAP2はhalf-typeのABC輸送体であり、小胞体膜上に存在し抗原ペプチドを小胞体（ER）内腔に輸送する働きを担っている。現在までに小胞体膜上に存在し、ペプチドを輸送するABC輸送体は真核生物ではTAP1、TAP2しか知られておらず、TAPLが新たなペプチド輸送経路として働く可能性が考えられる。本研究ではこのタンパクについて機能を解明するための第一歩として、構造、及び発現についての特性を明らかにする目的で検討を加えた。

TAPLはTAP1、TAP2と比較して約40%の、保存的置換を含めると約60%のアミノ酸残基が一致していた。また、TAPLにもTAP1、TAP2に於いて基質認識に関わる領域のアミノ酸残基が保存されており、脂質輸送に関わる他のhalf-type ABC輸送体の基質認識部位の配列とは異なっていた。このことから、TAPLの輸送基質はペプチドである可能性が高いと考えられた。次に、ヒト、マウスに於けるオーソログをクローニングした結果、TAPLはTAP1、TAP2に比べ種間での保存性が非常に高く、ヒトと齧歯類の間でも95%のアミノ酸残基が一致していた。

ABC輸送体ファミリーの中では、そのメンバーが哺乳類以外にも広く存在するsubfamilyBに分類することができた。また、線虫にもTAPLに類似した遺伝子が存在し、TAPLが進化の段階でTAP1、TAP2より分岐してから、進化速度の遅い祖先的な遺伝子である可能性が示唆された。

TAPLの機能を推定する上で、臓器や細胞に於ける局在を調べること、最も近縁なタンパクであるTAP1、TAP2と比較することは重要な手がかりとなる。TAP1、TAP2は抗原提示能のある細胞全てに普遍的に発現すると考えられているが、臓器での発現強度について明確にした報告はない。そこで、TAPL、TAP1、TAP2それぞれについて特異的なprimerを合成して半定量的RT-PCRを行い、ラット（4週齢オス）の各臓器におけるmRNAの発現を比較・検討した。その結果、それぞれのmRNAは調べた臓器の全てに於いて発現していたが、TAPLは特に脳や精巣での発現が強く、TAP1及びTAP2は胸腺での発現が顕著であり、それぞれの発現パターンは異なっていた。

次に、ヒトTAPLのIFN－γによる誘導性について調べた。TAP1、TAP2、そして免疫プロテアソームのサブユニットであるLMP2、LMP7、MECL1など、細胞性免疫に関与するタンパクのいくつかはIFN－γによって誘導されることがわかっている。TAPLも同様の誘導を受けるか否か、ヒト子宮頸癌細胞由来HeLa細胞を培養し、IFN－γ添加後、時間を追って半定量的RT-PCRを行うことにより検討した。その結果、TAP1、TAP2では添加後12時間前後までの間にmRNA量が増加したのに対し、TAPLでは顕著な変化は見られなかった。このことから、TAPLの発現制御はTAP1及びTAP2とは異なっていると考えられた。

またラットTAPLのカルボキシ末端側のアミノ酸配列が異なるスプライシング・アイソフォームが少なくとも4種存在することを見い出した。それぞれのmRNAの発現をRT-PCRによって調べた結果、これらアイソフォームが調べた4種の臓器（脳・胸腺・腸管・精巣）に於いていずれも発現していることが示された。TAP2では同じくカルボキシ末端側が異なるアイソフォームが存在し、その基質特異性が変化するという報告がある。また、SUR2にもカルボキシ末端側のスプライシングによってできるアイソフォームSUR2A及びSUR2Bが存在し、ATP結合能の変化のために活性に差が生じると言われている。以上のことから、カルボキシ末端側の違いによるアイソフォームは、TAPLの機能やその活性調節に多様性を与えている可能性が考えられる。

これまで、小胞体に於ける抗原ペプチド輸送体としてTAP1、TAP2が知られていたが、本研究に於けるTAPLという第三のTAPファミリーの発見により、細胞は未だ解析されていないペプチド輸送の形態を有していることが考えられた。

TAPLの発見は、細胞がより複雑で精巧な輸送を行う為に多様なペプチド輸送タンパクを発現している可能性を示唆するものであり、発現量の多い脳や精巣といった臓器でどのような機能を担っているのか、またアイソフォームの機能やアイソフォーム同士の会合があるのか、今後、この輸送体の基質や輸送方向を解明することで、高分子蛋白の活性部位を利用したペプチド製剤や蛋白の品質管理に関連した薬学研究に応用出来るのではないかと期待される。

論文審査の結果の要旨

ABC（ATP binding cassette）輸送体は疾病の原因となったり薬物輸送に関係することからも明らかなように、高等生物の恒常性維持やさまざまな機能調節に重要な役割を果たしている一群のポンプATPaseである。しかし、これまでごく限られた数のものしか解析されていなかった。本研究では新たなABC輸送体を探索し、その働きを解明するとともに病態の理解に役立てようという視点で研究を進めている。その結果、新規の輸送体TAPLを発見し、さらにTAPLの一次構造と臓器の発現パターンについて検討を加えた。

TAPLは抗原提示に関わるペプチド輸送体TAP（transporter associated with antigen processing）と相同性が高く、TAP-Like即ちTAPLと命名したが、TAP1やTAP2と比べ種間（ヒト、ラット、マウス）での保存性も著しく高いという特徴があった。また線虫にも類似輸送体が存在しており、TAPL遺伝子は細胞性免疫のシステムが派生する以前から存在する、祖先的遺伝子であると結論した。TAPLの転写がインターフェロン－γによって誘導されないという事実は、遺伝子発現の調節機構もTAP1やTAP2とは異なっていることを示唆している。さらに本研究では、TAPLが脳や精巣に発現が強く、またカルボキシ末端側に複数のアイソフォームがmRNAのスプライシ

ングの違いによって生じることも明らかにした。

以上の知見は、細胞が多様なペプチド輸送体を発現し、より複雑で精巧な輸送を行っている可能性を示唆するものである。本研究は、新たなペプチド輸送経路の解明やそれが持つ基本的な生理機能解明に向けた重要な糸口を見い出した先駆的な研究として、博士（薬学）の学位を授与するに値すると判断した。