

Title	Cloning of a bovine orphan transporter and its short splicing variant
Author(s)	坂田, 和子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42568
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【4】

氏名	坂田和子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第16011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 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Cloning of a bovine orphan transporter and its short splicing variant. (ウシ網膜より単離したオーファン トランスポーターbv7-3及びそのスプライシングバリエントbv7-3sの解析)
論文審査委員	(主査) 教授 遠山 正彌 (副査) 教授 高井 義美 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

【目的】

トランスポーターは、特異的な基質を膜の内外に輸送する細胞の膜蛋白質である。中枢神経系において、トランスポーターはシナプス間隙に放出された神経伝達物質を取り込み、情報伝達を終結させる。また、シナプス間隙へ基質を放出したり、シナプス小包へ伝達物質を取り込むことなどにより神経情報伝達に深く関わっている。1990年にGABA トランスポーターがクローニングされて以来、様々なトランスポーターがクローニングされてきた。中でもGABA トランスポーターを含む Na^+/Cl^- 依存性のトランスポーターファミリーは、セロトニントランスポーターやドーパミントランスポーター等が含まれ、その単離と解析によって情報伝達機構の解明が進んできた。我々は、さらなる情報伝達機構の解明を目的に、ウシ網膜のcDNAライブラリーから新規の Na^+/Cl^- 依存性のトランスポーターの単離と解析を試みた。

【方法ならびに成績】

Na^+/Cl^- 依存性のトランスポーターの間では細胞膜第一貫通部位から第二貫通部位にかけて共通のアミノ配列がある。そこでその配列に相当するオリゴヌクレオチドを作製し、これをプローブとしてウシ網膜のcDNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、729のアミノ酸からなるオーファントランスポーターの全長bv7-3を単離した。これはラットトランスポーターのv7-3-2のウシのホモログであり、v7-3-2の基質は未だ同定されていない。v7-3はGABA トランスポーターやセロトニントランスポーター等のトランスポーターと相同性が高く、細胞膜12回貫通型の Na^+/Cl^- 依存性トランスポーターと考えられる。しかし、bv7-3は比較的大きな第4細胞外ループを有し、そこにN-linked glycosylation サイトが2つあるなど、その構造が従来知られている。

Na^+/Cl^- 依存性のトランスポーターとやや異なることから、NTT4やrB21などのメンバーとともに新しいファミリーを形成すると考えられる。さらに我々はアミノ酸265個の同一蛋白をコードするbv7-3sを単離した。これは、N末端の252個のアミノ酸がbv7-3と共通するバリエントであった。bv7-3とbv7-3sに共通な領域をプローブとしてサザン解析を行った結果、異なる4種類の制限酵素で部分ダイジェストしたウシゲノムDNAでおのおの単一のバンドを認めたことから、bv7-3とbv7-3sは同じゲノムDNAから転写されたスプライシングバリエントであることが示された。次にこれらの遺伝子の発現をノザン解析及びRT-PCRにて検討した。その結果、bv7-3のmRNAは網膜、大脳、小脳等の神経系に発現し、肝臓には発現していなかった。bv7-3sのmRNAはbv7-3のmRNAの発現パターン

ンに一致して発現し、発現量は bv7-3 に比べて微量であった。さらに、これらの遺伝子にコードされるタンパク細胞内局在を培養細胞強制発現系の免疫細胞化学にて検討した。その結果、bv7-3 は細胞膜に局在し、一方 bv7-3s は ER からゴルジにかけての分布パターンにて発現しており、細胞膜の分布のパターンはとらず、bv7-3 とは明らかに分布が異なることがわかった。

【総括】

我々はウシ網膜よりラットオーファントランスポーター v7-3-2 のホモログと考えられる bv7-3、および、N末端が共通の短いスプライシングバリエントである bv7-3s を単離した。Na⁺/Cl⁻依存性トランスポーターは12回膜貫通構造を有しているが、bv7-3s のように4回膜貫通構造を有するスプライシングバリエントの報告は初めてである。いずれのバリエントの mRNA も実際に網膜、大脳、小脳等の神経系で発現し、発現パターンは一致していた。また、培養細胞強制発現系において bv7-3 が細胞膜に発現しているのに対し bv7-3s は細胞の内膜系に発現しており、細胞内外への基質輸送活性は持たないことが示唆される。これらのことから短いスプライシングバリエント bv7-3s の役割として、1) bv7-3s がスプライスされることによって bv7-3 の mRNA の発現量を調節している、2) bv7-3 の細胞膜への移行を阻害してトランスポーターとしての輸送能力を調節している、3) 他の蛋白と協力して何らかの機能を持っていること等が考えられるが、現在のところこのトランスポーターの基質が決まっておらず、詳細は不明である。この bv7-3 の基質を同定すること、およびこの短いスプライシングバリエントの bv7-3s により bv7-3 の基質輸送機能がどのように調節されるか検討することが今後の課題として残されている。

論文審査の結果の要旨

中枢神経系におけるトランスポーターは、シナプス間隙に放出された神経伝達物質を取り込み、情報伝達を終結させ情報伝達に深く関わっている。本研究では、ウシ網膜 cDNA ライブラリーより Na⁺/Cl⁻依存性のトランスポーターファミリーに属するオーファントランスポーター bv7-3 を単離し、そのスプライシングバリエントである bv7-3s の存在を見いだしている。Na⁺/Cl⁻依存性トランスポーターは12回膜貫通構造を有しているが、bv7-3s のように4回膜貫通構造を有するスプライシングバリエントの報告は初めてで興味深い。いずれのバリエントの mRNA も実際に網膜、大脳、小脳等の神経系で発現することを明らかにし、また、培養細胞強制発現系において bv7-3 が細胞膜に局在するのに対し、短いバリエントの bv7-3s は細胞の内膜系に局在することをつきとめている。これらの研究成果は、短いタイプのスプライシングバリエントによってトランスポーターの基質輸送活性が調節されるという新たな神経情報伝達調節機構の可能性を示唆するものであり、学位に値するものと考えられる。