



Title	Molecular cloning and characterization of Kremen, a novel kringle-containing transmembrane protein
Author(s)	中村, 隆弘
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42594
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	なかむらたかひろ
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16034 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 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Molecular cloning and characterization of Kremen, a novel kringle-containing transmembrane protein. (新規膜貫通型クリンゲル分子 Kremen の分子クローニングならびに発現解析)
論文審査委員	(主査) 教授 中村 敏一
	(副査) 教授 高井 義美 教授 谷口 直之

論文内容の要旨

【目的】

クリングルドメインは3つのジスルフィド結合をもつ特徴的ドメインとして最初、血液凝固因子である prothrombin において同定されたが、これまでにクリングルドメインをもつ蛋白質が多数同定されている。Prothrombin、factor XII、tissue plasminogen activator (tPA)、urokinase-type plasminogen activator (uPA)、plasminogen などは血液凝固・線溶に関するセリンプロテアーゼとして機能する。これらのセリンプロテアーゼは血液凝固・線溶機能を介して創傷治癒に関与する他、uPA は細胞外マトリックスの融解を介した血管新生や癌の浸潤に関与し、また plasminogen や tPA は神経の生存や軸索伸長を促進する活性を有している。一方、hepatocyte growth factor (HGF) や HGF-like protein はチロシンキナーゼ型レセプターのリガンドとして細胞の増殖・運動促進、形態形成誘導活性などにより器官形成や再生を担っている。さらに、クリングルドメインを有する分子には細胞外にクリングルドメインを有するレセプター型チロシンキナーゼである、Ror やアフリカツメガエル MuSK/agrin receptor などが含まれ、これらは神経細胞の移動、極性の決定、軸索伸長といった高次神経機能の調節に関与する。このようにクリングルドメインを有する分子の機能は多岐に及ぶものの、いずれも生命維持や高次神経機能において極めて重要な生物活性を有している。したがってクリングルドメインを有する新規遺伝子をクローニングすることは重要な生命現象の分子機構の解明につながることが期待された。そこで細胞間相互作用に関与する新規分子を同定する目的で、クリングルドメインを有する分子を高効率でクローニングする新しい方法、Kringle-SAGE 法を確立するとともに、Kringle-SAGE 法を用いてクローニングした新規クリングル分子 (Kremen) の発現と機能解析を行った。

【方法ならびに成績】

クリングルドメイン内には各クリングルドメイン間で非常によく保存されたコンセンサス配列 (NY/FCRNP ならびに PWCY/FT) が 2箇所存在する一方、これらコンセンサス配列間に存在する 5 個あるいは 6 個のアミノ酸から成る配列は各クリングル分子に極めて特異的であり、この固有配列から、いずれのクリングル分子に由来する配列か、あるいは未知のクリングル分子であるかを判断することが可能であることを見出した。そこで両コンセンサス配列に基づいてプライマーをデザインし、RT-PCR 法と SAGE (serial analysis of gene expression) 法を組み合わせることでクリングルドメイン配列を高効率にクローニングする戦略を考案し、これを Kringle-SAGE 法 (PCR

によって得られる短鎖断片の連結とその塩基配列決定)と命名した。そこで実際にマウス脳 cDNA を用いて Kringle-SAGE 法を行ったところ、数種類の新規クリングル分子に対する cDNA 断片が得られ、これに基づき新規クリングル分子 (Kremen) のクローニングに成功した。

本新規クリングル分子 cDNA 配列から、本分子は473個のアミノ酸からなる I 型の膜貫通型蛋白質であり、細胞外領域にはN末端側から順にクリングルドメイン、WSC ドメイン、CUB ドメインを各一個ずつ有し、64個のアミノ酸からなる細胞内領域をもつことが明らかとなった。CUB ドメインは最初、補体成分 C1r/C1s、ウニの EGF ホモログ Uegf、BMP-1 に共通に見られる構造として同定され、このドメインを有する分子の多くは胚発生に関わることが知られている。一方、細胞内領域は既知の蛋白質あるいはドメインと特に保存された構造や相同性のある配列は認められない。クリングルドメインをもつ膜貫通型分子としては Ror や MuSK/agrin receptor のように細胞質領域にチロシンキナーゼドメインをもつものが知られていたが、本クリングル分子はこれらとも異なる新しいタイプのクリングル分子である。次に胎生 9 及び10日目のマウス胚における mRNA の局在を調べたところ、眼胞、耳胞、鼻腔などの将来の感覚器になる領域に発現が認められ、その染色像から顔面構造が顕著になることから、Kremen (Kringle-coding gene marking the eye and the nose) と命名した。さらに、Kremen mRNA はこれらの領域に加え肢芽の apical ectodermal ridge (AER)、鰓弓、myotome にも特異的な発現が認められた。また、Kremen mRNA の発現はマウス胚発生の進行とともに上昇した。一方、成体マウスにおける Kremen の発現を解析したところ、Kremen mRNA は心臓、骨格筋において極めて高い発現が認められた。これらの結果は Kremen が筋細胞や神経系細胞の発生分化・成熟に関与することを示唆していた。そこで *in vitro* の筋分化系として広く用いられるマウス筋芽細胞 C 2 C 12 細胞の筋分化過程における Kremen の発現を解析したところ、細胞の分化の進行とともに Kremen mRNA の発現が上昇することが明らかとなった。さらに Kremen mRNA は神経系細胞に高頻度に発現される一方、グリア系細胞には発現が認められないことに加え、神経分化の良いモデルであるマウス神経芽腫細胞 NIE-115 細胞においても、神経分化の進行とともに Kremen mRNA の発現が著しく上昇することが明らかになった。

【総括】

クリングル分子の特異的かつ高効率クローニング法、Kringle-SAGE 法を用いて、クリングルドメインを有する新規レセプター様分子 Kremen をクローニングした。Kremen は I 型の膜貫通型蛋白質であるとともに、その細胞外領域には蛋白質間相互作用を担うクリングルドメインに加え、WSC ドメインならびに CUB ドメインなど特徴的構造を有することから、分泌蛋白質のレセプターとして、あるいは細胞間の直接相互作用を介して細胞内にシグナルを伝えると予想される。一方、これまでに知られているクリングルドメインを有するレセプター型蛋白質はいずれも筋、神経系に発現が認められ、実際に高次神経機能の調節や神経-筋肉のコネクションに重要な役割を担うことが知られている。Kremen も筋、神経共に発現が認められ、さらに神経、筋細胞の分化進行に応じて発現が上昇することから、神経ならびに筋肉の分化や組織化、神経-筋肉のコネクションに関与することが予想される。最後に、今回確立した Kringle-SAGE 法に基づき、Kremen に加え数種の新規クリングル分子が同定されており、Kringle-SAGE 法は新規のクリングル分子の構造と機能解明に極めて有効であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

クリングルドメインを有する分子は器官形成や再生、恒常性維持、高次神経機能の調節といった、いずれも重要な生物活性を有している。したがって、新しいクリングル分子の発見は器官形成、再生あるいは高次神経機能の調節機構の新たな解明につながると考えられる。申請者は新規のクリングル蛋白質をクローニングする目的で、クリングル分子の特異的かつ高効率クローニング法である Kringle-SAGE 法を独自に考案し、実際に Kringle-SAGE 法を利用してクリングルドメインを有する新規レセプター様分子 Kremen のクローニングに成功した。Kremen はマウス胚において、眼胞、耳胞、鼻腔などの感覚器ならびに myotome に、一方、成体マウスにおいては心臓、骨格筋において高い発現が認められ、さらに *in vitro* の筋分化系、ならびに神経分化のモデル系を用いて Kremen の発現を解析し

たところ、筋細胞ならびに神経細胞の分化とともに Kremen の発現が上昇することを明らかにした。これらの結果から Kremen は神経ならびに筋肉の分化や組織化、高次神経機能の調節や神経-筋肉のコネクションに重要な役割を担うことが予想された。本研究は学位申請者によって初めてなされた研究であるが、とりわけ本研究においてクリンギル分子の特異的かつ高効率クローニング法である Kringle-SAGE 法が独自に確立されるとともに、実際に新規クリンギル分子のクローニングにより有効性が初めて実証された点は極めてオリジナリティーの高い研究成果である。

以上より中村隆弘氏の論文は博士の学位授与に値するものである。