

氏名(本籍)	道川祐市(東京都)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第1,202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5条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	Biochemical studies on a mitochondrial stress-70 protein in mouse (マウスミトコンドリアストレス-70タンパク質に関する生化学的研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	新井勇治
副査	筑波大学教授	農学博士	日下部 功
副査	筑波大学教授	農学博士	近宗千城
副査	筑波大学助教授	農学博士	星野貴行

## 論 文 の 要 旨

キメラマウスは細胞系譜、組織器官形成機構等を解明するために非常に有効な実験系を提供する。キメラマウスを用いて研究を行うためには、由来細胞系統を識別するマーカーが必要である。細胞識別マーカーとしてマウス C3H 系統由来の細胞に特異的に反応する抗体が作製された。その C3H 系統特異抗原タンパク質 (CSA) は、ほぼ全ての組織で発現されており、細胞質内に局在している。抗 CSA 抗体を細胞識別マーカーとして有効に利用するためには、CSA の分子構造と機能、生合成の制御機構を明確にしておく必要がある。本研究では、これらの点を解明することを目的として、CSA の cDNA と染色体遺伝子のクローニングを行った。また、抗 CSA 抗体による系統特異的認識についても検討を行った。更に、CSA 染色体遺伝子をクローニングする過程で CSA の偽遺伝子が単離され、これについても構造解析を行った。

CSA は cDNA の塩基配列から、697残基のアミノ酸により構成されるタンパク質であることが明らかになった。そのアミノ酸配列は、既に報告されているペプチド結合タンパク質74 (PBP74) と99.6%一致していた。PBP74は抗原提示に関与していると考えられているストレス-70タンパク質である。しかしながら、CSA の発現はほぼ全ての組織で確認されており、抗原提示以外にも重要な働きをしているものと推測された。間接蛍光抗体法を用いて CSA の細胞内局在部位を調べたところ、ミトコンドリアの染色パターンと一致していた。さらに PBP74/CSA のアミノ末端部に存在するリーダー配列はミトコンドリアへの輸送シグナルとしての特徴を有していた。したがって、PBP74/CSA は免疫系の細胞では抗原提示に関与している可能性があるが、本来はミトコンドリアに局在するストレス-70タンパク質であると結論した。ここで注目すべきことは、PBP74が抗 CSA 抗体に反応しない系統マウス

から単離されていることである。PBP74とCSAの推定アミノ酸配列には3残基のアミノ酸置換が存在しており、これらの抗原性への関与が推測された。3残基のアミノ酸置換のうち2残基については、他の抗CSA抗体陰性系統マウス由来のPBP74/CSAにおいても確認された。マウス系統間でアミノ酸置換が存在する領域を大腸菌内で発現させ、抗CSA抗体との反応性を比較したところ、顕著な変化が見られた。ChouとFasmanの方法を用いて、この領域の二次構造を予測したところ、C3H系統における $\alpha$ -ヘリックス構造が抗CSA抗体陰性系統では $\beta$ -ターンに変化していることが明らかになった。したがって、抗CSA抗体による系統特異的な認識は、PBP74/CSAのアミノ酸置換が原因であると推測された。

続いてPBP74/CSAの機能、発現制御機構等の解明を目的として、PBP74/CSA染色体遺伝子のクローニングを行った。しかしながら、得られたクローンによりコードされている領域は以下に示す特徴を有しており、プロセスされた偽遺伝子であると結論した。(1)cDNAの塩基配列と90%の相同性を有しているが、イントロンは含まれていなかった。(2)リーダーペプチドのカルボキシル末端が欠失しており、フレームシフトが生じていた。(3)3'末端にポリ(A)付加シグナルとそれに続いてアデニンが10塩基連続する配列を含んでいた。(4)5'および3'両末端の隣接領域に9塩基の挿入標的部配列の重複が見られた。プロセスされた偽遺伝子が欠失している領域をプライマーとしてPCRを行ったところ、イントロンを含む領域が増幅された。このイントロンをプローブとして、再びクローニングを行った。得られたクローンの塩基配列を解析した結果、PBP74/CSA染色体遺伝子は全長約17キロ塩基対であり、16個のイントロンによって分断される17個のエクソンから構成されていることが明らかになった。エクソンの配列は全てcDNAの配列と一致していた。リーダー配列は2個のエクソンから構成されており、その配列でのイントロンの挿入パターンはミトコンドリアの膜間腔に局在するシトクロムc1遺伝子と一致していた。また5'上流のプロモーターの領域に2個の熱ショックエレメントの他、核染色体にコードされているミトコンドリアタンパク質遺伝子のプロモーター領域に共通してみられる配列が存在していた。PBP74/CSA染色体遺伝子の発現は心臓と腎臓で最も高く、次いで脳と精巣において高い発現が見られた。しかしながら、脾臓や肺ではあまり発現しなかった。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、CSAの分子構造と機能を解明することを目的として、分子生物学的観点から検討したものである。CSAのアミノ酸配列がストレス-70タンパク質(PBP74)のアミノ酸配列と99.6%一致することと、細胞内分布が一致することを示したのは本研究が初めてである。PBP74/CSA染色体遺伝子が、16個のイントロンによって分断される17個のエクソンから構成される全長約17キロ塩基対であることを明らかにした。PBP74/CSA染色体遺伝子の発現が、代謝活動の盛んな組織ほど高いことを示した。PBP74/CSAの生合成が、細胞のエネルギー需要度に応じて制御されることを示唆した。細胞増殖や分化、癌化、老化などのエネルギー需要度が顕著に変化する現象の解明に有効な道を開くものとして高く評価される。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。