

氏名(本籍)	み よし そう すけ 三好 荘介(岡山県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 乙 第 1842 号		
学位授与年月日	平成14年4月30日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	A Transmembrane Trap Method for Efficient Cloning of Genes Encoding Proteins Possessing Transmembrane Domain. (膜蛋白質をコードする遺伝子の効率的なクローニング方法であるトランスメンブレントラップ法の開発)		
主査	筑波大学教授	医学博士	三輪 正直
副査	筑波大学教授	理学博士	坂内 四郎
副査	筑波大学教授	医学博士	長澤 俊郎

論文の内容の要旨

(目的)

細胞の増殖・分化・アポトーシス調節等の生命現象は、様々な外的因子によって制御されている。これらの外的因子の影響を細胞内へと伝達するのは、細胞膜上に発現している受容体分子あるいは接着分子と言われるような分子群である。一方、例えば、ミトコンドリアの膜上に細胞死調節因子群 (bcl-2 family) 等、細胞内小器官の膜上に発現している分子群にも多彩な機能が知られている。そこで、細胞が発現しているすべての膜上分子について、それらを網羅的に単離できるような新たな発現クローニング法の樹立を目的として、Transmembrane Trap法(TM Trap法)を開発した。

(方法及び原理)

発現ベクターとしては哺乳動物細胞において一過性に高発現を得られるものを使用した (pCAGGS)。まずは、pCAGGSのプロモーター下流にマウスCD4分子の細胞外領域(膜貫通領域および細胞内領域を人工的に削除したもの)を挿入した。次に、その下流に目的の細胞から作製したcDNA断片集団(完全長でないcDNA)を接続して、発現ベクターライブラリーを構築した。もし、挿入されたcDNAの中に膜貫通領域をコードする部位が存在すれば、マウスCD4との融合蛋白質として細胞膜上に発現され、マウスCD4の細胞外領域に存在するエピトープを認識する抗マウスCD4抗体で検出が可能となる。一方、膜貫通領域を持たないcDNAであれば、融合蛋白質が細胞膜上には保持されないため分泌型融合蛋白質となり、これを抗マウスCD4抗体で細胞膜上に検出することは不可能である。この発現ライブラリーを接着性細胞株(COS7細胞または293T細胞)において一過性に発現させ、抗マウスCD4抗体(蛍光標識)にて染色後、FACS (fluorescence-activated cell sorter)にて陽性細胞を回収した。この操作を繰り返すことによって濃縮した陽性細胞群よりベクターを回収し、挿入されている個々のcDNAの塩基配列を決定した。得られた個々の塩基配列につき、疎水性解析により膜貫通領域の有無を判定し、さらにBLAST検索を行った。

(結果)

TM trap法の有用性をヒト造血系細胞株F36Pに発現しているインターロイキン受容体遺伝子のクローニングによって検証した。cDNAの構築にあたっては、まずは5'側に特異的塩基配列(プライマーAを別途作製)を有するランダムヘキサマーを用いて、逆転写を行った。次に、インターロイキン受容体遺伝子群の細胞外領域に共通に存在しているWSxWSモチーフ(Trp-Ser-任意アミノ酸-Trp-Ser)に対応したdegeneratedプライマー(プライマーB)を作製し、プライマーAとプライマーBとを用いてPCR反応を行ない、cDNA断片を作製した。これを挿入した発現ライブラリーをスクリーニングした結果、IL-2R γ , IL-3R β , IL-4R α , IL-5R α , IL-6R α 等の遺伝子を非常に効率良くクローニングすることができた。さらに、TM trap法は、インターロイキン受容体のような細胞表面上の膜蛋白質のクローニングに応用できるのみならず、ミトコンドリア膜上に発現しているbcl-2等、細胞内小器官の膜上に発現している蛋白分子に関しても選択的にクローニングが行える方法であることが確認された。

(考察)

以前に報告されているシグナルシーケンストラップ法は、多くの分泌蛋白質またはI型の膜蛋白質がシグナルシーケンス(シグナルペプチド)を有することを利用した方法である。我々が開発したTM trap法は、膜貫通領域に着目し、シグナルペプチドを持たないような膜蛋白質をも網羅的にクローニングできる点でシグナルシーケンストラップ法とは異なる長所を有している。すなわち、小胞体・ゴルジ体ネットワークを経由しないような膜上蛋白質に関してもそのクローニングが可能であるというのが特徴である。実際に、著者らは本法を用いてI型膜蛋白質以外の細胞膜上分子のクローニングに成功している。一般的にインターロイキン受容体遺伝子群の発現量は比較的低いことが知られている。著者らは以前に、WS \times WSモチーフをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングするという方法で新規受容体のクローニングを試みたが、その効率はきわめて悪かった。そこで、本法を考案した訳であるが、本法を用いることで効率良くインターロイキン受容体遺伝子群をクローニングすることができた。この結果より、本法は、比較的に発現量の低い遺伝子群のクローニングにおいても、特異的PCRプライマーによるcDNAの増幅というような手段と併用することによって、きわめて有用な遺伝子クローニング法となり得ることが示された。また、スクリーニングの過程において、膜貫通領域となり得るような疎水性アミノ酸配列を有していない分子もいくつか細胞膜上に発現され得ることが明らかとなった。その分子機構としては、細胞膜上に発現している他の分子と複合体を形成することによって生じている可能性もあるが、真の機構は現在のところ明らかではなく、生物学的には非常に興味深い現象であった。さらには、bcl-2ファミリー遺伝子のような細胞内小器官の膜上分子のクローニングに対しても本法が有効であることが判明した。例えば、bcl-2ファミリーで保存されているBH domainに対応するdegenerated primerを利用したPCRによりcDNAを増幅し、これを用いてスクリーニングを行うことによって、新規のbcl-2ファミリー遺伝子をクローニングすることも可能であると考えられた。

(結論)

TM Trap法は細胞表面上に発現する膜上分子群をはじめ、細胞内小器官の膜上に存在するような分子群も含めて、効率的に膜上蛋白質分子をクローニングができる方法であることが示された。本法は、標的分子特異的な抗体やそのリガンドを用いることなく、生物学的に膜蛋白質と判定される遺伝子を選別し単離することが可能なシステムであり、近年凄まじい勢いで解析が進んでいるゲノムプロジェクトから得られる多くの構造・機能未知遺伝子の解析においても非常に有効な一手段として期待される。殊に、疎水性アミノ酸配列の検討のみでは予測不能な膜上分子に関しては、本法のような方法を用いることが、きわめて有用であると考えられた。

審査の結果の要旨

著者が開発したTM Trap法は、細胞の増殖・分化・アポトーシスなどの生命現象を司る重要な役割を担っている受容体のクローニングに注目した新規性の高いユニークな方法であると評価できる。論理的な思考のもとに、緻密な実験を積み重ねた方法論であり、degeneratedプライマーを用いることにより偽陽性のクローンが生じる可能性はあるものの、遺伝子のクローニング法としての波及効果は大きいものであると推測される。特に本方法を慢性骨髄性白血病患者などの臨床材料を用いた研究に応用すれば、新規ながんマーカー膜蛋白の発見へつながる可能性も考えられ、基礎研究から臨床研究に至るまで幅広い有用性を持つ研究成果であると判断された。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。