

氏名(本籍)	もと はし つとむ 本 橋 力(東京都)
学位の種類	博 士(医 学)
学位記番号	博 甲 第 2671 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
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Molecular cloning and chromosomal mapping of a novel five-span transmembrane protein gene, M83 (新規5回膜貫通型タンパク質遺伝子M83の遺伝子クローニングと染色体マッピング)
主 査	筑波大学教授 博士(医学) 榎 正 幸
副 査	筑波大学教授 医学博士 住 田 孝 之
副 査	筑波大学講師 医学博士 小 島 寛

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

サイトカインは造血系において細胞の分化・増殖やアポトーシスを制御し、恒常性を維持する液性因子である。特に骨髄中においては、造血支持細胞などから分泌され、造血幹細胞や造血前駆細胞に作用し、造血の維持や制御に深く関与している。現在までに多数のサイトカイン-サイトカイン受容体が同定され機能が解析されているが、造血系細胞の分化や増殖に関与するサイトカインについては未だ全貌は明らかにされていない。今回我々は、造血細胞に発現する新規のサイトカイン受容体の存在を仮定し、degenerate primerによるPCR反応とFACSを用いたTransmembrane Trap法を組み合わせた新たな発現クローニング法を開発することによってそれを同定し、造血細胞の分化・増殖やアポトーシスの制御機構を解明する事を目的とした。

(対象と方法)

(1) degenerate primer 法を用いた cDNA の合成

サイトカイン受容体には共通の構造的特徴が存在する。この中でも特に膜貫通部の近傍に存在する保存されたアミノ酸配列 WSxWS モチーフ (Trp-Ser-任意のアミノ酸-Trp-Ser) に着目し、このアミノ酸配列をカバーする degenerate primer を作成した。ヒト骨髄由来の造血系細胞株である F36P 細胞の mRNA より作成した cDNA をテンプレートにして、degenerate primer と dT primer を用いて PCR 反応を行なった。

(2) Transmembrane Trap 法を用いたスクリーニング

細胞膜上に発現する膜タンパク質は、N末端にシグナル配列と呼ばれる疎水性領域を、下流に膜貫通部位である第二の疎水性領域を有している。Transmembrane Trap 法は、既知の膜貫通分子のシグナル配列と細胞外領域の下流に cDNA を組み込み COS7 細胞に発現させることで、膜貫通部位をもつクローンを効率よく単離する方法である。今回、シグナル配列として、Preprotrypsin、細胞外領域として FLAG-Tag を用いた発現ベクター (pCAGGS-FLAG) を開発した。このベクターでは、組み込んだ cDNA に膜貫通領域が含まれていると、FLAG-Tag とのキメラ分子として細胞膜上に発現される。このベクターに細胞株 F36P より degenerate primer 法を用いて作成した cDNA を組み込み、COS7 細胞に遺伝子導入した後、FACS を用いて FLAG 発現細胞を回収する事により遺伝子にスクリーニングを行った。本研究では遺伝子単離の効率をさらに上昇させるため、ライブラリーを遺伝子導入させた COS7

細胞をFACSでソーティングし、FLAG陽性分画の細胞を濃縮する操作を2回繰り返した。

(結果)

degenerate primer法とTransmembrane Trap法を組み合わせることによりWSxWSモチーフに近いLSAWS配列を持つ新規の膜分子をコードする遺伝子(M83)を同定した。この配列をもとにデータベース検索を行い、マウスの相同遺伝子を同定した。ヒトM83は全長2,316bp, 771アミノ酸, マウスM83は2,310bp, 769アミノ酸から成り、ヒトとマウスとの相同性は塩基レベルで78%, アミノ酸レベルで76%であった。M83分子はサイトカインレセプターファミリーに存在する保存されたモチーフを持たないが、5回膜貫通領域をもつ分子であることが判明した。ヒトM83の組織での発現をRT-PCRで観察してみると、脾臓、胎盤、脾臓、肝臓、腎臓、骨髄、末梢血白血球、扁桃で強い発現が見られた。ヒトの血球系では末梢血のCD4及びCD8 Single Positive T細胞に有意に発現が観られ、これらの細胞をanti-CD3/IL-2で刺激するとmRNAの発現は減少した。FISH法を用いてM83のChromosomal localizationを調べるとヒトで16p13.3, マウスで17B1であった。

(考察と結語)

今回我々は、細胞膜上に発現するサイトカイン受容体分子を効果的にクローニングする発現クローニング法を開発することによって、ヒト造血細胞に発現するM83遺伝子のクローニングに成功した。この分子はサイトカイン受容体と相同性はなかったが、N末端を細胞外にもつ5回膜貫通型の膜分子であった。既知の5回膜貫通分子、4回膜貫通分子、7回膜貫通分子では膜貫通部に高い相同性があることが知られているが、M83分子はこれら既知の膜分子とは相同性がなく、全く新しい膜貫通分子であると考えられる。しかし、現在解析中のタンパク質NAG-5とは細胞外領域のCysや細胞内領域に高い相同性があった。これはM83分子が属する新しい膜貫通分子ファミリーの存在を示唆する。M83遺伝子の発現はヒトの末梢血のT細胞CD4, CD8 single positive cellにもみられ、これらの細胞を活性化させると発現が低下することが確認できた。この発現パターンはT細胞のtraffickingとlocalizationを制御するL-Selectinと似ていることから、M83分子も同様の機能を持っている可能性が示唆される。今後、M83分子の生理的な機能のさらなる解析や、M83分子のリガンドの同定が必要である。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、サイトカイン受容体で保存された配列をもとに作成したdegenerate primerを用いたPCRと膜タンパク質をコードする遺伝子をトラップする発現クローニング法という2つの方法を組み合わせたアプローチにより新規のサイトカイン受容体をクローン化する事を目指した意欲的な研究である。ヒト骨髄由来の造血系細胞株のcDNAに本法を適用して得られた遺伝子(M83)を解析した所、M83はサイトカイン受容体ではなく新規の膜タンパク質をコードしており、血球系細胞などに発現している事が確認された。特に末梢血のCD4及びCD8 Single Positive T細胞に有意に発現が見られ、これらの細胞をanti-CD3/IL-2で刺激するとmRNAの発現は減少する事が観察された。

本研究は新規遺伝子の構造と発現を決定したに留まり、機能の解析が十分でない事が指摘されたが、新しいクローニング法の確立に多大な労力と時間をかけたことが評価された。今後、この遺伝子の機能解析を進める事が強く望まれる。

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。