

[論文の内容の要旨]

①論文題目

Cloning and characterization of a novel subunit of protein serine/threonine phosphatase from human mesangial cells

②論文題目の和訳

ヒトメサンギウム細胞よりの新規プロテインホスファターゼサブユニットのクローニングと解析

③指導教官：後藤淳郎助教授

④専攻名： 内科学専攻（腎臓内科学）

⑤入学： 平成9年4月

⑥学生氏名：和田 健彦

メサンギウム細胞は腎糸球体の構造維持の他に重要な生理学的意義を有すると考えられている。また、各種糸球体疾患における病態にも重要な役割を果たしていると考えられている。

そこで、我々は分子生物学的にメサンギウム細胞の機能を解明する目的で、メサンギウム細胞に発現している遺伝子に対するスクリーニングを行い、この結果と遺伝子データベースを参照することで6種の新規遺伝子を発見した。このうちの1つが以前に我々が報告した Megsin である。Megsin はその構造の特徴から serine protease inhibitor superfamily に属する蛋白をコードしていると考えられ、IgA 腎症において発現が亢進していることが示されている。具体的な機能や糸球体疾患に対する関与については現在検討中である。

今回、我々はもう1つの新規メサンギウム細胞発現遺伝子である PP4_{Rmcg} についてクローニングと機能や局在に関する検討を行ったのでここに報告する。

1. 3'-directed cDNA library の構築・rapid large-scale sequence 法を用いたメサンギウム細胞発現

遺伝子の解析

腎細胞癌患者から摘出された腎臓の正常組織から得た培養メサンギウム細胞から mRNA を抽出し、library の構築に使用した。pUC 19 由来の vector primer を使用して cDNA を合成し、制限酵素 MboI によって切断して 3'側から平均約 300 bp のクローンを作成した。このようにして得られた 1193 クローンの塩基配列を DNA autosequencer により決定し、データベースを参照することにより遺伝子を同定しその発現頻度を集計した。この中で、データベースに登録されていない新規遺伝子が 6 種発見された。

2. ヒト PP4_{Rmeg} のクローニング

培養ヒトメサンギウム細胞由来の mRNA より 5'RACE 法により 5'方向に伸長し、得た全長 cDNA を pCRII ベクターにてクローニングした。この結果、得た遺伝子は全長 3901 bp, コード領域 2850 bp で 950 アミノ酸からなる蛋白をコードすると考えられた。5'側と 3'側に計 13 個の繰り返し配列が見出された。

この塩基配列は遺伝子データベース上、最近報告された protein serine/threonine phosphatase 4 (PP4) の制御配列と非常に homology が高いことが判明した。アミノ酸配列上、開始メチオニンから 18 番目のアミノ酸である serine が PP4_{Rmeg} では計 18 個のアミノ酸に置換されている以外は完全に一致していた。

3. ラット PP4_{Rmeg} のアミノ酸配列決定

そこで哺乳動物を用いた機能解析を考慮し、PP4_{Rmeg} のラットホモログの配列決定を試みた。培養ラットメサンギウム細胞由来の total RNA を逆転写して得られた cDNA を template とし、プライマーはヒト PP4_{Rmeg} の配列を元にしてマウスの Expression sequence tag (EST) データベースより、配列がよく保存されていると考えられる部分を推定して作成した。

その結果、PP4_{Rmeg} のアミノ酸配列は 86.3 %保存されていることが示され、特に繰り返し配列領域はホモロジーが高いことが判明した。また、ラットにおいても PP4_{Rmeg} はヒトと同様に 18 番目のアミノ酸が 18 個の同一のアミノ酸に置換されていた。

4. PP4_{Rmeg} の PP4 の触媒サブユニットに対する結合能

上記の通り、PP4_{Rmeg} は PP4_{R1} と非常にホモロジーが高いことから PP4 の制御サブユニットである可能性が高いと考えられた。これを証明するために、PP4_{Rmeg} を哺乳動物細胞に導入して発現させ、これと細胞内の PP4 触媒サブユニット (PP4c)が重合するかどうかを検討した。PP4_{Rmeg} cDNA と発現ベクター pcDNA 3.1/myc-His B を用いてコンストラクトを作製し、これを cationic liposome 法にて COS-7 細胞に導入し、発現させた。Cell lysate を抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降法で精製し、PP4_{R1} 抗体ならびに PP4c 抗体にて immunoblot 法を行ったところ、導入された細胞由来の蛋白中に PP4c が検出され、PP4_{Rmeg} が PP4c と重合することが示された。

5. PP4_{Rmeg} 発現の局在について (ヒト培養細胞・ヒト臓器における検討)

発現の局在を調べる目的で、各種ヒト培養細胞における発現とヒト臓器における発現を Northern blotting にて検討した。ヒト培養細胞の検討ではメサンギウム細胞・線維芽細胞・尿管上皮細胞・臍静脈内皮細胞・大動脈平滑筋細胞より mRNA を調製し、各レーンに 2 μ g ずつアプライした。プローブとしては、PP4_{Rmeg} 特有の配列を認識する oligodeoxynucleotide probe による Northern Blotting が技術的に困難であったため、PP4_{R1} との共通配列を認識する部分に対し、ヒト PP4_{Rmeg} cDNA を制限酵素 PvuII にて切断して得られた 625 塩基対長の断片を ³²P でラベルして使用した。 β -actin で補正したプロットングの強度はメサンギウム細胞において最も高かった。

また、ヒト臓器については Clontech 社から購入したメンブレンを使用した。このメンブレンには心・脳・胎盤・肺・肝・横紋筋・腎・膝由来の RNA が含まれており、前記のプローブを用いて Northern Blotting を施行した。その結果、臓器によってシグナルの強度には差があるものの PP4 制御サブユニットの ubiquitous な発現が認められた。

6. 発現の局在について (*in situ* hybridization 法による検討)

腎臓における局在を *in vitro* で検討する目的で *in situ* hybridization を施行した。組織は腎細胞癌のため摘出された腎臓の正常部分から得られた正常ヒト腎組織の凍結切片を使用した。プローブとしては PP4_{Rmeg} と PP4_{R1} の共通配列を認識する 34 塩基対長の合成オリゴヌクレオチドをジゴキシゲニンでラベルしたものを使用した。その結果、糸球体内有意に *in vivo* での PP4 制御サブユニットの発現が確認された。

7. メサンギウム増殖性腎炎モデルラットにおける発現の変化についての検討

PP4 の機能としては、後記のとおり細胞分裂に関与している可能性が指摘されている。一方、慢性糸球体腎炎など各種糸球体疾患の病態には細胞増殖が密接に関与していると考えられている。そこで、この腎炎のモデルラットである Thy 1 腎炎ラットを用いて、腎炎におけるメサンギウム細胞の増殖と PP4 制御サブユニット発現量の変化を Northern blotting にて検討した。PP4_{Rmeg} の発現はメサンギウム融解から増殖に転ずる腎炎導入後 2 日目・4 日目で増加した。PCNA 染色では今回のモデルは 7 日目に増殖の極期となっていたが、この時期には PP4_{Rmeg} の発現はコントロールレベルまで低下していた。

【考察】

我々は 3'-directed cDNA library を構築して rapid large-scale sequencing を行うという新たな手法を用いて発現遺伝子の種類と量を検討し、新規遺伝子を発見した。今回検討した PP4_{Rmeg} 遺伝子は 1999 年に Kloeker らによって報告された PP4_{R1} 遺伝子との相同性から PP4 の制御サブ

ユニットをコードしていると考えられた。事実、今回の研究で、哺乳動物細胞で PP4_{Rmeg} を高発現させ、免疫沈降法で精製してアフィニティー精製抗 PP4c 抗体と抗 PP4_{R1} 抗体で immunoblotting を行ったところ、PP4_{Rmeg} が PP4c と重合することが確認され、PP4_{Rmeg} は PP4 の制御サブユニットであると考えられる。

Protein phosphatase は蛋白の serine 残基や threonine 残基における脱リン酸化により様々な細胞内シグナル伝達など生体の基本的機能を担っている。PP4 はその細胞内局在やショウジョウバエの変異株の解析から、細胞分裂、特に中心体と微小管の重合に重要な役割を果たしていることが示されている。PP4_{Rmeg} のアミノ酸配列は PP4_{R1} の 18 番目のアミノ酸である serine が 18 個のアミノ酸に置換されていた。培養メサンギウム細胞の他に腫瘍細胞の cell line である A431 細胞においてもこの両者が発現していることが確認されている。またラットのメサンギウム細胞においても同様に 18 番目の P が 18 個のアミノ酸に置換されていることが示されている。これについては、最近公開されたゲノム情報によると PP4_{Rmeg} 特有配列の直前にイントロンが存在しており、donor / acceptor に相当する部分の配列が consensus sequence に一致していることから PP4_{Rmeg} と PP4_{R1} は互いにスプライシング変異体の関係にある可能性が高いと考えられる。

PP4 の機能に関しては他の protein phosphatase と同様、生命の基本的機能に関与していると考えられる。PP4 触媒サブユニットがヒトおよびショウジョウバエの細胞で中心体に局在していることや、PP4c 変異ショウジョウバエでは微小管重合に異常が認められることが報告されており、細胞分裂における微小管の重合に重要な役割を果たしていると想定されている。体内の発現・局在に関しては、これまで報告されているホロ酵素の局在と同様、PP4 制御サブユニットも ubiquitous に発現していることが、ヒト臓器の Northern blotting により示唆され、このことも PP4 が生命の基本的機能に関与していることを示している。

また、アミノ酸レベルでヒトとラットの間で 86.3 % の homology があり、特に 5' 側と 3' 側の計 13 の繰り返し配列はよく保存されており、この部分が PP4 の活性調節に重要な意味を持つのではないかと想定される。また、培養細胞由来 mRNA における Northern blotting では *in vitro* でメサンギウム細胞における PP4 制御サブユニットの発現量が多いことが示された。PP4_{Rmeg} のメサンギウム細胞における機能については現在検討中である。

メサンギウム増殖性腎炎の代表的動物モデルである Thy-1 腎炎ラットをもちいた PP4_{Rmeg} の発現解析では、メサンギウム増殖前期に発現の増加が認められた。他の protein phosphatase の活性調節が主に翻訳時もしくは翻訳後に行われることを考慮すると、増殖の前段階で細胞分裂に備えて発現が亢進している可能性が示唆された。

以上のように PP4 の新規サブユニットと考えられる PP4_{Rmeg} のクローニングと解析を行った。その詳細な機能や、特有の 18 アミノ酸の意義などについては今後の検討を要する。