

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 SAGE法とDNAマイクロアレイ法を利用した包括的新
規膜分泌タンパク同定法の開発—T細胞にてその有効
性を検討—

指導教官 滝沢 始 助教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士過程

内科学専攻

氏名 豊田 信明

受容体、トランスポーター、接着分子、ホルモン、サイトカイン、ケモカインなどの膜タンパクと分泌タンパクを介した細胞間情報伝達は、生体のホメオスターシスや炎症・防御反応の制御において中心的役割を担っている。したがって、新規の膜分泌タンパクを同定することは、さらなる生体反応の分子メカニズムの解明や、疾病の新しい治療法の確立につながる可能性がある。これまでは、膜分泌タンパクの同定には differential display 法、random screening 法、signal sequence trap 法などが利用されてきた。しかしながらこれらの方法は、ある特定の刺激や、特殊な細胞において特異的に発現する膜分泌タンパクをコードしている遺伝子を包括的に同定するには適していない。加えて、differential display 法は再現性に乏しいこと、random screening 法は多大な時間と労力が必要なこと、signal sequence trap 法は感度の点においてやや難点があることなどの制限がある。そこで、本研究において、私は SAGE 法および DNA マイクロアレイ法という2つの包括的発現遺伝子検索法を組み合わせることによって、新規膜分泌タンパクを包括的に同定する新たな方法の開発を試み、その有用性を T 細胞において検討した。

SAGE 法は、mRNA の polyA tail にもっとも近い NlaIII サイト下流 10bp (tag と呼ばれている) によってそれぞれの遺伝子を代表させる方法で、既知未知を

含め、検索対象としている mRNA population 中の遺伝子発現の定量化を可能とする方法である。SAGE 法により、活性化 Th1 細胞・活性化 Th2 細胞・resting CD4(+) 細胞の expression profile を構築した上で、それぞれのライブラリーの発現量情報を比較した。活性化 Th1 細胞と活性化 Th2 細胞を比較したとき、活性化 Th1 細胞に選択的に発現している可能性が高く、かつ機能未知のタンパクをコードしている遺伝子 10 個を同定した。同様に、活性化 Th2 細胞に選択的に発現していく可能性の高い 1 個の機能未知の分子をコードする遺伝子 1 個を同定した。加えて、活性化 Th1 細胞と活性化 Th2 細胞の発現量情報と resting CD4(+) 細胞の発現量情報を比較することにより、T 細胞の活性化により選択的に誘導されてくる機能未知の分子をコードする遺伝子 20 個を同定した。これら T 細胞の状態により発現量を大きく変化させる遺伝子のなかから、ショ糖密度勾配超遠心法により分離された膜分画と細胞質分画それぞれに含まれる RNA を DNA マイクロアレイ法を利用して解析することにより膜分泌タンパクを同定した。まず 2×10^7 個の抹消血単核細胞（以下 PBMC）を 4 ng/ml IL2 存在下に 14 日間培養し、細胞数を 3×10^8 に増殖させた。 $50 \mu\text{g/ml}$ の PMA と $1 \mu\text{g/ml}$ のイオノマイシンを添加して、さらに 4 時間培養した。その PBMC を $50 \mu\text{M}$ の cycloheximide を加え 37°C で 10 分間培養後、ball-bearing homogenizer で溶解した。ショ糖密度勾配超遠心法にて free ribosome と membrane ribosome を分離したのちそれぞれの分画を採取した。それぞれの分画に含まれる RNA を精製し、T7-RNA polymerase 法によりそれぞれ増幅した。細胞質分画由来の antisense RNA を Cy3-dUTP にて、膜分画由来の antisense RNA を Cy5-dUTP にてラベリングし、プローブを作成した。

次に DNA マイクロアレイガラススライドの作成について概説する。上記、T 細胞のコンディションにより大きく発現量が変化する遺伝子の 3'断片を 3'RACE 法により収集した。また、それら遺伝子のコードするタンパクの細胞内位置情報を推測するためのコントロールとして、すでに細胞内位置が判明している 150 個の細胞質タンパクをコードする遺伝子および 229 個の膜分泌タンパクをコードする遺伝子を収集し、これら計 410 個を含む DNA マイクロアレイガラススライドを作成した。この DNA マイクロアレイガラススライドを自作し、上記プローブをハイブリダイゼーション後、解析した結果、コントロールとして収集した細胞質タンパクをコードする遺伝子のうち 80%が $\text{Cy5/Cy3} < 1.35$ の値をもち、膜分泌タンパクをコードする遺伝子のうち 80%が $\text{Cy5/Cy3} > 1.37$ の値をもった。その結果 $\text{Cy5/Cy3} > 1.37$ の遺伝子は膜分泌タンパクをコードしている可能性が高いと推測されたので、上記の SAGE 法によりスクリーニングされた細胞内位置未知の 31 個の遺伝子に、この条件を適応した。その結果、活性化 Th1 細胞の 2 個、活性化 Th2 細胞の 1 個、活性化 T 細胞の 2 個の遺伝子がこの条件を満たし、それぞれの T 細胞の状態に応じて選択的に誘導されてくる膜分泌タンパクをコードする遺伝子であることが推測された。活性化 Th2 細胞において選択的に誘導されてくる Hs.7718 の遺伝子産物は、本研究の解析結果によると $\text{Cy5/Cy3} = 1.73$ と膜分泌タンパクをコードするに十分な Cy5/Cy3 比を示していたのにも関わらず、膜貫通部位の存在を SOSUI では予測できなかった。そこで、

さらに 5'上流をクローニングした結果、N 末にシグナルペプチドをもつタンパクをコードしていることが判明した。また、T 細胞の活性化に伴って誘導されてくる遺伝子 Hs.182285 は現在 NCBI の public database には EST として 3'断片の塩基配列しか登録されていない。そこで実際に膜貫通部位と思われる疎水性領域があるかどうか検証するため、全長の遺伝子配列を決定した。その結果、翻訳されるタンパクには 4 つの疎水性領域が存在し、膜タンパクであることが推定された。さらに、この 2 つの遺伝子について、その翻訳産物が実際に膜分泌タンパクであるか実験的検証を行った。Hs.7718 の open reading frame(以下 ORF) を pTNT vector (Promega)に組み込み、in vitro translation kit を使って、翻訳産物を発現させた。翻訳産物の分子量は 106kDa であった。マイクロゾーム存在下にて翻訳後、Proteinase K にて消化したところ約 110kDa の産物が確認されたが、Triton X-100 存在下にて消化したところこの分子は完全に消化された。マイクロゾーム存在下、翻訳産物の分子量が大きくなっているのは、Hs.7718 産物は内部に N-glycosylation site を持っているため、糖鎖修飾を受けたためと考えられる。これらの結果は、Hs.7718 産物は分泌タンパクであることを示している。また、Hs.182285 の ORF を pEGFP-C1 vector と pEGFP-N2 vector(ともに clontech)に組み込んだ上で、HEK293 細胞に transfect し GFP 融合 Hs.182285 産物を発現させた。GFP タンパクの green signal を、共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ、膜部分に GFP のシグナルを確認でき、かつ GFP を Hs.182285 産物の N 末または C 末に融合させた物の間で、その細胞内分布に差異は認められなかった。従って、この GFP のシグナルは Hs.182285 産物の細胞内位置を反映しているものと考えられ、Hs.182285 遺伝子産物が膜タンパクであることを示唆している。

まとめると、本研究で示した方法は、単に膜分泌タンパクをコードするだけでなく、刺激に反応して大きく発現が変化する遺伝子を包括的に同定できるシステムであり、加えて、今回の方法は高発現の遺伝子に邪魔されることなく新規の遺伝子を同定できる。この高発現の遺伝子にマスクされて低発現の新規膜分泌タンパクをコードする遺伝子を同定することができないというのは、もっとも基本的な問題であるが、SAGE 法により発現遺伝子をスクリーニングすることによって、かなりの程度克服している。また本研究の方法は、いかなる細胞にも応用可能なので、その結果さらなる新規の膜分泌タンパクの同定が可能であり、生体反応の分子メカニズムの解明や新たな治療法の開発に繋がる可能性がある。