

氏 名	おおしま あつ のり 大 嶋 篤 典
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2677 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	電子顕微鏡観察と生化学的手法によるコネキシン26変異体の多量体および機能解析

論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 吉 好 則	教 授 七 田 芳 則	教 授 平 野 丈 夫
--------	----------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

ギャップジャンクション (GJ) は隣接細胞間を直接連絡するチャネルであり、この構造に関与する分子はコネキシンファミリーに属している。この中で最も短いサブタイプのコネキシン26 (Cx26) は、その突然変異が遺伝性の聴覚障害を引き起こすことで知られている。またコネキシンファミリーに保存されている細胞外ループの6個のシステイン残基は、そのうち一つでも欠失あるいは変異させると GJ としてのチャネル活性は失われることが知られている。これらの変異体はどのような理由から疾患やチャネルの失活が引き起こされるのか明らかではなかった。本研究では聴覚障害に関与するアミノ酸として M34, R75, 保存された6個のシステインの中から C64 に注目してその変異遺伝子を作成し、これらの GJ における機能的および構造的性質を明らかにすることを目的として、昆虫細胞 Sf9 および動物細胞 HeLa による発現を行った。

Cx26 を Sf9 で発現して回収した膜画分の電子顕微鏡観察では、WT, M34T, M34A, R75W, R75A, R75D から典型的な GJ プラークが確認され、これらは GJ 形成能があると考えられた。しかし C64S は GJ プラークを形成しなかった。また C 末に His タグを付加した Cx26 を Sf9 で発現させ、2% dodecylmaltoside で可溶化、精製した試料を電子顕微鏡で観察すると、WT, M34T, M34A, R75A からは均一な6量体構造が観察された。しかし R75W, R75D, C64S からはアグリゲートが観察され、6量体構造は存在しなかった。これらの試料はゲル濾過クロマトグラフィーを用いた生化学的分析からも同様の結果が確認された。また単独発現した R75W は6量体構造が不安定であるが、WT と共発現させることによって R75W の安定性は救済されることが確認された。しかし C64S と R75D は WT と共発現しても安定な6量体構造を作ることはなかった。

C 末に GFP タグを付加した Cx26 を HeLa で発現させると、WT, M34T, M34A, R75W, R75A, R75D はいずれも隣接細胞間の細胞膜上に典型的な GJ の発現分布を示したが、C64S は細胞内部にのみ局在を示した。これらのチャネル活性を GJ 透過性色素 sulforhodamine で定量すると、WT, M34T は80%以上の活性を示したが、M34A, R75D は約30%, R75W, R75A は約20%の透過性という低い値を示した。

以上の結果から M34T は病因遺伝子であるが GJ としての大きな構造的欠損はなく、M34A との活性の比較から M34 は GJ の構造安定性よりもチャネル活性の調節に直接関わっている可能性が示唆された。これにより M34 の側鎖の大きさが GJ チャネルの開いた状態を安定化するモデルが考えられた。R75 はコネキシン6量体の構造安定性に関与しており、R75W の解析から隣接サブユニット間の相互作用に関わるアミノ酸であることが示唆された。その働きは R75 が持つ電荷が作る相互作用によって安定化されている可能性が高いと考えられた。C64 はペプチドの折り畳みあるいはその後の6量体形成過程に深く関与しており、C64 が作るとされるジスルフィド結合がペプチドを細胞表面に輸送するのに必須の構造を作っていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

隣接細胞間を直接連絡するチャンネルで、聴覚障害などの病気の原因としても知られているギャップジャンクション（GJ）は、何種類ものコネキシン分子が存在しておりコネキシンファミリーを形成している。この中で最も短いサブタイプのコネキシン26（Cx26）は、その突然変異が遺伝性の聴覚障害を引き起こすことなどで知られている、蝸牛や肝臓などに多く見られる膜蛋白質である。コネキシンファミリーに保存されている細胞外ループの6個のシステイン残基は、そのうち一つでも欠失あるいは変異させるとGJとしてのチャンネル活性は失われることが知られているが、これらの変異体はどのような理由から疾患やチャンネルの失活が引き起こされるのか明らかではなかった。

申請者は、Cx26において聴覚障害に関与するアミノ酸として知られている、M34とR75、さらに、保存された6個のシステインの中からC64に注目して、それら各種変異遺伝子を作成し、昆虫細胞 Sf9 および動物細胞 HeLa などにおける発現システムを用いることで、GJにおける機能のおよび構造的性質を明らかにする研究を行った。Cx26を Sf9 で発現して回収した膜画分の電子顕微鏡観察実験で、WT, M34T, M34A, R75W, R75A, R75D から典型的な GJ プラークが確認されたことから、これらは GJ 形成能があることを明らかにした。しかし C64S は同様な実験から GJ プラークを形成しないことが明らかとなった。また C 末に His タグを付加した Cx26 を Sf9 で発現させ、2 %dodecylmaltoside で可溶化し、精製した試料を電子顕微鏡で観察する実験により、WT, M34T, M34A, R75A は 6 量体構造を取ることが観察された。しかし R75W, R75D, C64S は 6 量体構造を取らないことが明らかになった。これらの結果はゲル濾過クロマトグラフィーを用いた生化学的分析でも確認された。また単独発現した R75W は 6 量体構造が不安定であるが、WT と共発現させることによって R75W の安定性は救済されることも確認した。ところが、C64S と R75D は WT と共発現しても安定な 6 量体構造を作らないことが明らかになった。

C 末に GFP タグを付加した Cx26 を HeLa で発現させた実験から、WT, M34T, M34A, R75W, R75A, R75D はいずれも隣接細胞間の細胞膜上に典型的な GJ が形成されるが、C64S は細胞内部にのみ局在することが明らかになった。これらのチャンネル活性を GJ 透過性色素 sulforhodamine で定量する実験から、WT, M34T は 80 %以上の活性を示すが、M34A, R75D は約 30 %, R75W, R75A は約 20 %の透過性しか示さないことを明らかにした。

以上の結果から、申請者は、M34T は病因遺伝子であるにも関わらず、GJ としての大きな構造的欠損はなく、M34A との活性の比較から M34 は GJ の構造安定性よりもチャンネル活性の調節に直接関わっている可能性を示唆した。申請者は、M34 の側鎖の大きさが GJ チャンネルの開いた状態を安定化するモデルを提案した。R75 についても、この残基はコネキシン 6 量体の構造安定性に関与しており、R75W の解析から隣接サブユニット間の相互作用に関わるアミノ酸であることを示唆した。各種変異実験から、その働きは R75 が持つ電荷が作る相互作用によって安定化されている可能性の高いことを示唆した。C64 についてはペプチドの折り畳み、あるいはその後の 6 量体形成過程に深く関与しており、C64 が作るとされるジスルフィド結合がペプチドを細胞表面に輸送するのに必須な構造を作っているとのモデルを示した。本研究は、隣接細胞間を直接連絡するチャンネル、ギャップジャンクションの機能を変異体の解析から解明したもので、聴覚障害などの病気の原因としても知られている膜蛋白質の構造と機能の重要な部分を解明し、注目すべき成果をあげた。以上の審査結果を総合して、本論文が理学博士の学位取得に十分な内容を持つものと結論した。