



Molecular Cloning, Expression, and Localization of a Brain-Specific Phosphodiesterase I/Nucleotide Pyrophosphatase (PD-I α) from Rat Brain

成田, 正明

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1994-12-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1338

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001338>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	成 田 正 明 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第926号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付	平成6年12月31日
学位論文題目	Molecular Cloning, Expression, and Localization of a Brain-Specific Phosphodiesterase I / Nucleotide Pyrophosphatase (PD-I α) from rat brain (ラット脳特異的ホスホジエステラーゼ I / ヌクレオチドピロホスファターゼ (PD-I α) のクローニング、発現、局在に関する研究)
審査委員	主査 教授 中村 肇 教授 山村 博平 教授 西塚 泰美

論文内容の要旨

緒言

ホスホジエステラーゼI (EC 3.1.4.1) は、細胞膜に存在する糖蛋白質でATP, ADPを含む様々なヌクレオチドリソ酸化合物のホスホジエステル結合を加水分解する。エクト型ATPaseは細胞外ATPを加水分解しプリン作動性P2レセプターを介する反応を停止させ、また5'ヌクレオチダーゼと共にアデノシンの生成に関与している。生成されたアデノシンは細胞表面レセプターに結合してシグナル伝達を行ったり、ヌクレオシドトランスポーターによって細胞に再び取り込まれる。エクト型ATPaseの中には基質としてATP, ADPのようなヌクレオチドリソ酸化合物を必要とせず他の機能を持つものもあり、例えば最近発見された肝臓特異的エクト型ATPaseは胆汁酸トランスポーターでもあり2つの機能を同じペプチドが持ち合わせている。

牛腸ホスホジエステラーゼIは分子量108kDaの二量体構造として精製され、酵素活性部位のアミノ酸配列のみ明らかにされているがその全一次構造は明らかではない。一方、mouse plasma cell membrane glycoprotein-1 (以下PC-1)はマウス骨髄腫細胞株からクローニングされた糖蛋白質で、ホスホジエステラーゼI/ヌクレオチドピロホスファターゼ活性を持つことが明らかにされており、この2つの蛋白は同じファミリーに属すると考えられる。PC-1のmRNAは脳実質には発現しておらず、またモノクローナル抗体を用いた検索で精巣上体、遠位尿細管、唾液腺、軟骨細胞、肝細胞、脳毛細血管に発現を認めることはPC-1は分泌あるいは巨大分子の輸送に関与していることを示唆している。胃腸粘膜、平滑筋、甲状腺、膵臓、脈絡叢、脳毛細血管以外の中樞神経系にはPC-1は存在しないがこれらの組織にホスホジエステラーゼI/ヌクレオチドピロホスファターゼ活性を持つ蛋白が存在することが判明している。

今回の研究では、ラット脳特異的ホスホジエステラーゼI/ヌクレオチドピロホスファターゼ (PD-I α) のcDNAクローニングを行い、in situハイブリダイゼーション法によりPD-I α mRNAが脈絡叢上皮細胞、眼球毛様突起、網膜色素上皮細胞に局在していることを明らかにした。

方 法

1. PD-I α のcDNAクローニング

既知の牛腸ホスホジエステラーゼ I の活性部位のアミノ酸配列から対応する塩基配列を混合プライマーとして作成し、ラット全脳RNAを用いて逆転写酵素PCR (RT-PCR) を行って176bpのクローンを得た。このcDNA断片をプローブとしてラット脳cDNAライブラリーをスクリーニングした。

長いインサートを含むクローンをベクターにサブクローニングし、ジデオキシ法で塩基配列を決定した。

2. 抗PD-I α ポリクローナル抗体の精製とウエスタンブロッティング

1. で得られたアミノ酸配列から抗原性の高い部分を選びペプチドを精製し日本白兔に免疫してポリクローナル抗体を作成、これを用いてラット各組織でウエスタンブロッティングを行った。

3. PD-I α の局在

(1) ノーザンブロッティング

2か月齢雄SD系ラットの各組織、生後5日、20日の大脳、及び培養アストロサイトからRNAを抽出し、1. で得られたcDNA (1200bp) をプローブとしてノーザンブロッティングを行った。

(2) in situハイブリダイゼーション法

1. で得られたcDNA (1200bp) を用いてRNAポリメラーゼでセンス及びアンチセンスのジデオキシゲンin標識cRNAプローブを作成しラット脳及び眼球切片でin situハイブリダイゼーションを行った。

3. 哺乳類細胞を用いた発現実験

全構造遺伝子配列を含むcDNAを蛋白発現ベクターに組み込み、猿の腎芽細胞で強制発現させホスホジエステラーゼ I の活性を測定した。

結 果

1. PD-I α のcDNAクローニング

PD-I cDNAの全長は3233bpで、885個のアミノ酸をコードしていた。計算上の分子量は99,647であった。アミノ酸配列上、PC-1と58%の相同性を認めた。またアミノ酸の親疎水性解析よりN末端6残基の細胞質領域、24残基の膜貫通領域、855残基の細胞外領域を持つと考えられた。

2. ウエスタンブロッティング

精製したポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ脳抽出物において約100kDのバンドを認めた。

3. PD-I α の組織分布及び局在

ノーザンブロッティングでは、PD-I α mRNAは大脳と小脳に発現し、小腸、心臓、肺、肝臓、腎臓ではほとんど発現を認めなかった。発達過程におけるPD-I α mRNAの発現をみると、日齢と共に増加傾向にあった。

in situハイブリダイゼーション法では、脈絡叢上皮細胞に特異的にPD-I α mRNAの発現を認めた。眼球では、眼球毛様突起、網膜色素上皮細胞に発現を認めた。

3. 哺乳類細胞を用いた発現実験

本蛋白を哺乳類細胞に強制発現させるとホスホジエステラーゼ I の活性の存在を認めた。

考 察

アミノ酸配列上PD-I α はPC-1と58%の相同性を有しておりPD-I α の高次構造はPC-1と極めて類似している。活性部位のアミノ酸配列は、PD-I α 、PC-1、牛腸ホスホジエステラーゼIの間でよく存在されておりこれらの蛋白質は同じような機能を有すると考えられる。

in situハイブリダイゼーション法ではPD-I α mRNAは脈絡叢上皮細胞に局在し脳室を取り巻く脳室上衣細胞には存在しなかった。PD-I α は脈絡叢上皮細胞において髄液の分泌の他、水分や核酸を含む様々な物質を輸送に関与している可能性がある。

PD-I α のmRNAは眼球毛様突起、虹彩色素上皮細胞、網膜色素上皮細胞にも発現を認めた。眼球及び脈絡叢に於けるこれらの分泌上皮細胞は解剖学的に共通の側面を持っている。従って眼球分泌細胞と脈絡叢上皮細胞におけるPD-I α の機能は同じと考えられる。

PD-I α のmRNAは側脳室周囲や小脳分子層の細胞にも発現を認めた。発現細胞の形態及び分布からこれらの細胞はグリア細胞であると考えられる。ノーザンブロッティング法で培養II型アストロサイトではPD-I α のmRNAはほとんど発現していなかったことからこれらの細胞はオリゴデンドロサイトかその他のアストロサイトと考えられる。

我々は、ラット小腸cDNAライブラリーより腸型ホスホジエステラーゼI/ヌクレオチドピロホスファターゼ(PD-I α)のクローニングに成功しその遺伝子が腸管及び肝臓に発現していることを証明している。従って様々な分泌細胞がホスホジエステラーゼI/ヌクレオチドピロホスファターゼファミリー蛋白を分泌しこれらの蛋白はヌクレオチドリン酸化化合物の加水分解のほか様々な機能を持っていることが推測される。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ATP、ADPなどを含むヌクレオチドリン酸化化合物のホスホジエステル結合を加水分解するホスホジエステラーゼIは細胞膜に存在する糖蛋白質であり、5'ヌクレオチダーゼとともにアデノシンの生成に関与している。生成されたアデノシンは細胞表面リセプターに結合してシグナル伝達につかさどり、ヌクレオチドトランスポーターによって細胞に再び取り込まれる。

ホスホジエステラーゼIに関しては、牛腸から分子量108kDaの二量体構造物としてすでに精製され、酵素活性部位のアミノ酸配列のみ明らかにされていたが、その全一次構造は未だ明らかにされていなかった。一方、マウス骨髄腫細胞株からクローニングされた糖蛋白質であるMouse plasma cell membrane glycoprotein-I(PC-I)は、ホスホジエステラーゼI/ヌクレオチドピロホスファターゼを持つことが明らかにされ、二つの蛋白質は同じファミリーに属するものと考えられている。精巢上体、遠位尿細管、唾液腺、軟骨細胞、肝細胞、脳毛細血管において、PC-IのmRNAの発現が確認されており、PC-Iは分泌あるいは巨大分子の輸送に関与していると考えられてきた。

申請者は、既知の牛腸ホスホジエステラーゼIの活性部位のアミノ酸配列から対応する塩基配列を混合プライマーとして作成し、ラット全脳RNAを用いて逆転写酵素PCRを行い176bpのクローンを得、ラット脳cDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、ラット脳に特異的に存在するホスホジエステラーゼI酵素(PD-I α)の塩基配列を決定した。また、抗PD-I α ポリクロナール抗体を精製し、ウエスタンブロッティングを行ったところ、脳抽出物において約100kDのバンドとして検出している。PD-I α の組織分布をみるためにノーザンブロッティングを行い、PD-I α mRNAは脳、小脳に発現し日齢とともに増加するが、小腸、心臓、肺、肝臓、腎臓にはほとんど

発現していないこと、in situハイブリダイゼーション法では脈絡叢上皮細胞に特異的にPD-I α mRNAの発現を認め、眼球では眼球毛様突起、網膜色素上皮細胞に発現を認めている。これらの事実は、PD-I α は脈絡叢上皮細胞において髄液の分泌の他、水分や核酸を含む様々な物質の輸送に関与している可能性を示唆している。

本研究は、ラット脳に特異的に存在するホスホジエステラーゼI酵素をクローニングし、その組織分布と局在を明らかにしたものであり、従来ほとんど行われなかった脳内におけるホスホジエステラーゼ酵素について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。