



線虫Caenorhabditis elegansにおけるcytochrome b561の分子生理機能

三浦, 雅央

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2013-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5712

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005712>

※ 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。



(別紙様式 3)

論文内容の要旨

氏 名 三 浦 雅 央

専 攻 化 学 専 攻

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

線虫 *Caenorhabditis elegans* におけるcytochrome *b*₅₆₁ の分子生理機能

指導教員 罇 本 基 成

本論文では、線虫 cytochrome *b*₅₆₁ ファミリータンパク質のうち、そのアミノ酸配列が高等動物神経系 cytochrome *b*₅₆₁ (CGcytb: Chromaffin Granule cytochrome *b*₅₆₁) や消化器官系 cytochrome *b*₅₆₁ (Dcytb: Duodenal cytochrome *b*₅₆₁) に比較的近い Cecytb-2 に関する研究結果と、そこから推測される Cecytb-2 の分子生理機能について報告している。

第1章では、本研究を遂行するにあたって必要なバックグラウンドについて述べている。動物神経系に存在する Cytochrome *b*₅₆₁ はおそらく6回膜貫通型タンパク質であると考えられており、膜の両端にそれぞれ1つ、合わせて2つの heme *b* を有する電子伝達タンパク質である。この cytochrome *b*₅₆₁ はタンパク質ファミリーを形成しているとされており、消化器官系に発現している Dcytb や、癌抑制遺伝子候補産物である 101F6 (TScytb: Tumor Suppressor cytochrome *b*₅₆₁) などといったタンパク質がこのファミリーに属している。すでによく研究されている CGcytb の生理機能は神経伝達物質ノルアドレナリンの生合成に必要なアスコルビン酸 (AsA) を再生する事であるが、他のファミリータンパク質の生理機能やその分子メカニズムについては詳しい事はほとんど分かっていない。そこで本研究では、高等動物と比較して遺伝子操作が容易な点や、数多くの実験手法がすでに確立されているといった利点を持つ線虫 (*Caenorhabditis elegans*) をモデルとして、cytochrome *b*₅₆₁ ファミリーの分子生理機能を解明する事を目指した。線虫は全部で7種の cytochrome *b*₅₆₁ ファミリータンパク質候補を有しており、これらのタンパク質の生理機能を調べる事で、ヒトなど高等動物と線虫との間で cytochrome *b*₅₆₁ ファミリーの生理機能が保存されているかどうか、そしてその生理機能や分子機能メカニズムの詳細はどうなっているのか、などといった点を明らかにしようと試みた。

第2章では Cecytb-2 の発現系構築について述べている。Cecytb-2 の分子生理機能を明らかにするためには、そのタンパク質としての生化学的性質を明らかにする事が必要である。そこで、Cecytb-2 を組換えタンパク質として発現させる事ができるような異種発現系の構築を目指した。最初は宿主として大腸菌を使用することを検討したが、可溶性・機能性を持ったタンパク質として Cecytb-2 を発現させる事はできなかった。そのため、本研究ではメタノール発化性酵母 *Pichia pastoris* を用いた発現系を用いる事とし、その発現プラスミドの設計と構築を行った。さらに、実際にこのプラスミドを用いた遺伝子組換え酵母から Cecytb-2 タンパク質を精製する事にも成功した。

第3章では異種発現系によって得られた Cecytb-2 タンパク質の生化学的・生物物理的な性質について報告している。Cecytb-2 は AsA によって良く還元されて、cytochrome *b*₅₆₁ ファミリーに特徴的な可視吸収スペクトルを示した。また、Cecytb-2 は1分子あたりに2つの *b*-type heme を有していると推測され、その酸化型 heme 由来の EPR シグナルはヒト神経型 cytochrome *b*₅₆₁ や Dcytb のものと極めて類似しており、特に Dcytb と近い *g* 値を示す事が明らかとなった。

第4章では Cecytb-2 の線虫体内における発現局在について報告している。DIG 標識 probe を用いた *in situ* hybridization の結果では、Cecytb-2 mRNA は腸組織特異的に分布

している事が明らかとなった。より確かな証拠を得るために、抗 Cecytl-2 抗体を作製して免疫染色を行ったが、やはり Cecytl-2 は消化器官において局在している事が分かった。したがって、Cecytl-2 の発現局在はヒト Dcytl に類似しているという事が明らかとなった。

第5章では RNAi 実験による Cecytl-2 の生理機能解析を行った結果を報告している。第3章、第4章の結果より、Cecytl-2 は Dcytl との類似性が非常に高いという事が示されたため、主に線虫における鉄の取り込みに関して、Cecytl-2 抑制株がどのような表現型を示すのかを中心に解析を行った。その結果、二価鉄欠乏条件下で飼育した線虫は、野生型では目立った表現形を示さないものの、Cecytl-2 抑制株では成長速度が低下し、受精卵の孵化率も減少する事が分かった。

第6章では、それまでの結果より推察された Cecytl-2 の三価鉄還元活性について、その有無および Fe^{3+} との直接的な反応の可能性について、人工小胞膜を利用した再構成系実験によって調べた結果を報告している。これまでに三価鉄還元活性を有すると報告されている cytochrome b_{561} ファミリータンパク質は数多く存在しているが、いずれもその活性が Fe^{3+} とタンパク質との直接的な反応によるものなのかどうかについては調べられていなかった。本研究では人工小胞膜を利用する事で、Cecytl-2 が Fe^{3+} を直接 Fe^{2+} へと還元することが可能であることを示した。

これらの結果より、Cecytl-2 は高等動物の Dcytl と非常に良く似た生理機能を有しており、腸細胞表面に分布する三価鉄還元酵素として、周囲の環境中に存在する食事性鉄イオンを消化器官の細胞表面で二価へと還元しているものと考えられた。Dcytl の生理機能に関してはその三価鉄還元酵素としての生理機能に疑問を呈するような報告が過去になされていたが、本研究では Cecytl-2 は明らかに三価鉄を取り込む際に重要な役割を担っている事が示された。さらに、cytochrome b_{561} ファミリータンパク質の中で初めて Fe^{3+} を直接 Fe^{2+} へと還元することが可能であることを示す事にも成功しており、MDA ラジカル結合部位周辺のアミノ酸配列に似た特徴を有する Dcytl も同様の性質を示す可能性が高く、したがって、高等動物における鉄取り込みにはやはり、Dcytl が関与しているものと思われる。

本研究によって、線虫における cytochrome b_{561} ファミリータンパク質の分子生理機能が初めて明らかになっただけでなく、それがヒト等の高等動物と同様のものである事が示された。この事は、線虫という非常に多くの利点を有するモデル生物を用いる事によって、高等動物における他の機能未知な cytochrome b_{561} ファミリータンパク質の生理機能を解明することが可能である事を示唆している。すでに他の線虫 cytochrome b_{561} ファミリー遺伝子のクローニングはほぼ完了しており、今後は本研究と同様の手法を用いることによって、さらなる cytochrome b_{561} ファミリーの分子生理機能の解明が進むものと期待される。

氏名	三浦 雅央		
論文 題目	線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> における cytochrome b_{561} の分子生理機能		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	鰐木 基成
	副 査	教授	富永 圭介
	副 査	准教授	茶谷 絵理
	副 査		印
	副 査		印
要 旨			
概要			
本論文は8章より構成されており、線虫 cytochrome b_{561} ファミリータンパク質のうち、そのアミノ酸配列が高等動物神経系 cytochrome b_{561} (CGcytl: Chromaffin Granule cytochrome b_{561}) や消化器官系 cytochrome b_{561} (Dcytl: Duodenal cytochrome b_{561}) に比較的近い Cecytl-2 に関する研究結果と、そこから推測される Cecytl-2 の分子生理機能について記述されている。 第1章では、本研究を遂行するにあたって必要なバックグラウンドについて述べられている。動物神経系に存在する cytochrome b_{561} はおそらく6回膜貫通型タンパク質であると考えられており、膜の両端にそれぞれ1つ、合わせて2つの heme b を有する電子伝達タンパク質である。この cytochrome b_{561} はタンパク質ファミリーを形成しているとされており、消化器官系に発現している Dcytl や、癌抑制遺伝子候補産物である 101F6 (TScytl: Tumor Suppressor cytochrome b_{561}) 等といったタンパク質がこのファミリーに属している。すでによく研究されている CGcytl の生理機能は神経伝達物質ノルアドレナリンの生合成に必要なアスコルビン酸 (AsA) を再生する事であるが、他のファミリータンパク質の生理機能やその分子メカニズムについては詳しい事はほとんど分かっていない。そこで三浦雅央氏は、高等動物と比較して遺伝子操作が容易な点や、数多くの実験手法がすでに確立されているといった利点を持つ線虫 (<i>Caenorhabditis elegans</i>) をモデルとして、cytochrome b_{561} ファミリーの分子生理機能を解明する事を目指した研究を行った。線虫は全部で7種の cytochrome b_{561} ファミリータンパク質候補を有しており、これらのタンパク質の生理機能を調べる事で、ヒトなど高等動物と線虫との間でファミリーの生理機能が保存されているかどうか、そしてその分子機能メカニズムの詳細はどうなっているのか、などといった点を明らかにしようと試みた。 第2章では Cecytl-2 の発現系構築について記述してある。Cecytl-2 の分子生理機能を明らかにするためには、そのタンパク質としての生化学的性質を明らかにする事が必要である。そこで、Cecytl-2 を組換えタンパク質として発現させる事ができるような異種発現系の構築を行った。最初は宿主として大腸菌を使用することを検討したが、可溶性・機能性を持ったタンパク質として Cecytl-2 を発現させる事はできなかった。そのため、メタノール酸化性酵母 <i>Pichia pastoris</i> を用いた発現系を用いる事とし、その発現プラスミドの設計と構築を行った。さらに、このプラスミドを用いた遺伝子組換え酵母から Cecytl-2 タンパク質を精製する事に成功した。 第3章では異種発現系によって得られた Cecytl-2 タンパク質の生化学的・生物物理的な性質について記述してある。Cecytl-2 は AsA によって良く還元されて、cytochrome b_{561} ファミリーに特徴的な可視吸収スペクトルを示した。また、Cecytl-2 は1分子あたりに2つの b-type heme を有していると推測され、その酸化型 heme 由来の EPR シグナルはヒト神経型 cytochrome b_{561} や Dcytl のものと極めて類似しており、特に Dcytl と近い g 値を示す事が明らかとなった。 第4章では Cecytl-2 の線虫体内における発現局在について記述してある。DIG 標識 probe を用いた <i>in situ</i> hybridization の結果では、Cecytl-2 mRNA は腸組織特異的に分布している事が明らかとなった。より確かな証拠を得るために、抗 Cecytl-2 抗体を作製して免疫染色を行ったが、やはり Cecytl-2 は消化器官において発現し、腸管表面に局在している事が分かった。したがって、Cecytl-2 の発現局在はヒト Dcytl に類似しているという事が明らかとなった。			

第5章では RNAi 実験によって、Cecytlb-2 の線虫における生理機能解析を行った結果が記述してある。第3章、第4章の実験結果より、Cecytlb-2 は Dcytlb との類似性が非常に高いという事が示されたため、主に線虫における鉄の取り込みに関して、Cecytlb-2 抑制株がどのような表現型を示すのかを中心に解析を行った。その結果、二価鉄欠乏条件下で飼育した線虫は、野生型では目立った表現形を示さないものの、Cecytlb-2 抑制株では成長速度が低下し、受精卵の孵化率も減少する事が分かった。したがって、Cecytlb-2 は二価鉄欠乏条件下、すなわち三価鉄を利用せざるを得ない状況において重要である事が示唆され、Dcytlb 同様に三価鉄還元酵素としての生理機能を担っている可能性が高いことが示された。

第6章では、それまでの結果より推察された Cecytlb-2 の三価鉄還元活性について、その有無および Fe^{3+} との直接的な反応の可能性について、人工小胞膜を利用した再構成系実験によって調べた結果が記述してある。これまでに三価鉄還元活性を有すると報告されている cytochrome b_{561} ファミリータンパク質は数多く存在しているが、いずれもその活性が Fe^{3+} とタンパク質との直接的な反応によるものなのかどうかについては調べられていなかった。本研究では人工小胞膜を利用する事で直接的な三価鉄還元活性の有無を調べた。その結果、Cecytlb-2 が Fe^{3+} を直接 Fe^{2+} へと還元可能であることが示され、cytochrome b_{561} ファミリータンパク質の中で初めて、直接的な三価鉄還元活性についての知見を得ることに成功した。

第7章では本論文の結論が記述してある。第2章から第6章までの実験結果と考察により、Cecytlb-2 は高等動物の Dcytlb と非常に良く似た生理機能を有しており、腸細胞表面に分布する三価鉄還元酵素として、周囲の環境中に存在する食事性鉄イオンを消化器官の細胞表面で二価へと還元しているものと考えられた。Dcytlb の生理機能に関してはその三価鉄還元酵素としての生理機能に疑問を呈するような報告が過去になされていたが、本論文では Cecytlb-2 は明らかに三価鉄を取り込む際に重要な役割を担っている事が示された。さらに、cytochrome b_{561} ファミリータンパク質の中で初めて Fe^{3+} を直接的に Fe^{2+} へと還元することが可能であることを示す事にも成功している。Cecytlb-2 の MDA ラジカル結合部位周辺のアミノ酸配列に似た特徴を有する Dcytlb も同様の性質を示す可能性が高いと考えられる。したがって、高等動物における鉄取り込みにはおいては、やはり、Dcytlb が関与しているものと思われる。

本研究によって、線虫における cytochrome b_{561} ファミリータンパク質の分子生理機能が初めて明らかになっただけでなく、それがヒト等の高等動物と同様なものである事が示された。この事は、線虫という非常に多くの利点を有するモデル生物を用いる事によって、高等動物における他の機能未知な cytochrome b_{561} ファミリータンパク質の生理機能を解明することが可能である事を示唆している。すでに他の線虫 cytochrome b_{561} ファミリー遺伝子のクローニングはほぼ完了しており、今後は本研究と同様の手法を用いることによって、さらなる cytochrome b_{561} ファミリーの分子生理機能の解明が進むものと期待される。

第8章においては付録として、ゲノム及び cDNA の塩基配列、アミノ酸配列、実験に使用した試薬などがまとめて記載されている。

以上のように本論文は、線虫における cytochrome b_{561} ファミリータンパク質の 1 つ Cecytlb-2 について、そのタンパク質化学的性質を解明するばかりでなく、その生理機能についての研究を行ったものである。これにより Cecytlb-2 タンパク質が腸細胞表面に分布する三価鉄還元酵素という生理機能を持つことを明らかにしたものであり、cytochrome b_{561} ファミリーの分子生理機能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、学位申請者の 三浦 雅央 は、博士(理学)の学位を得る資格があると認める。