



Alternative splicing variants of the human DBL(MCF-2) proto-oncogene

駒井, 浩一郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-03-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2682

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002682>

※ 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。



【 1 6 3 】

氏 名 ・ (本 籍) 駒 井 浩一郎 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博ろ第1871

学位授与の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位授与の 日 付 平成 1 5 年 3 月 1 4 日

【 学位論文題目 】

Alternative splicing variants of the human DBL (MCF-2)
proto-oncogene
(DBL (MCF-2) プロトオンコジーンの選択的スプライシングバリエント)

審 査 委 員

主 査 教 授 千 原 和 夫

教 授 黒 坂 昌 弘

教 授 南 康 博

目的

Dbl プロトオンコジーンは低分子量 G タンパク質 Rho ファミリー (Rho, Rac, Cdc42) のグアニンヌクレオチド交換因子; guanine nucleotide exchange factor (GEF) の一つである。Dbl によってこれらの低分子量 G タンパク質は GDP 結合型の不活性型から GTP 結合型の活性型へ変化し、種々のエフェクターと結合することで種々の細胞内シグナル伝達、特に細胞骨格制御や細胞増殖を制御する。これまでに Dbl は単一の転写産物であること、脳、精巣および卵巣に局在して発現すること、および RhoA, Cdc42 を活性化することが報告されていた。しかし今回詳細な検討を行った結果、私と共同研究者らは新たに Dbl の 3 種類の選択的スプライシングバリエントを同定したため、これらの組織特異性および生化学的機能の差異を明らかにすることを目的として研究を行った。

材料および方法

それぞれの Dbl バリエントは鋳型として var.1 については脳、var.2 については末梢血、var.3 と var.4 については精巣由来の cDNA を用いた RT-PCR 法によって全長を単離した。使用したプライマーセットは以下の通りである。

F8 (5'-ATGGCAGAAGCAAATCCCCG-3') および

R1 (5'-GCTACTTGCCATTGAC-3') (var.1,2,4)

F14 (5'-ATGCAAGACATCGCCTTC-3') および R1 (var.3)

得られた cDNA は pRc/CMV ベクターを用いて発現ベクターを構築、COS7 細胞に導入し一過性に発現させた。mRNA レベルでの組織分布性解析は市販の 12 種の臓器由来トータル RNA を鋳型とした RT-PCR 法によって行った。用いたプライマーセットは以下の通りである。

var.1 および var.4;

F9 (5'-CAGGCTCGTCAATGCTGTGA-3') および

RE3 (5'-TCTGATTTTGTCTCCAAGTC-3')

var.3;

F11 (5'-ACATCGCCTTCTTGTCTG-3') および

R7 (5'-GGACGTAAAAACCAAAACC-3')

タンパク質レベルでの組織分布性解析は 10 種類のヒト組織由来タンパク質をプロットしてある市販の PVDF 膜と抗 Dbl 抗体を用いたイムノプロット法により行った。生化学的特性解析のために行った GEF 反応は以下の通り行った。まず RhoA, Rac1 および Cdc42 を 1 μ M の [3 H]GDP と 25°C で 20 分反応させ、 [3 H]GDP 結合型 G タンパク質を調製した。次に別途調製した Dbl バリエントを発現させた COS7 細胞の細胞質成分 10 μ g を [3 H]GDP 結合型 RhoA, Rac1 および Cdc42 と反応させ、ニトロセルロース膜で濾過した。得られた膜をシンチレーターで溶解し、液体シンチレーションカウンターで残存放射能を測定した。

結果

・新規 Dbl スプライシングバリエントの同定

新たな 3 種を含め Dbl スプライシングバリエントを計 4 種同定した。var.1 と名付けたものは従来より報告があった分子であり、全部で 25 のエクソンから構成される cDNA 構造 (Acc. No. X12556 として既報) を有していた。var.2 はエクソン 23, 24 を欠損しており、一部の関節リウマチ患者において見出された (Acc.No. AB085901 として新規登録)。var.3 は従来のエクソン 1 が脱落し、代わりに新たな 3 エクソンが付加されており、EST 部分配列解析から存在が予測 (Acc.No. AL117234.1 として既報) されていた分子であったが、今回我々によって実際に発現していることが確認された。var.4 (var.2 および var.3 でも同様) には従来のエクソン 10 と 11 の間に 16 アミノ酸をコードする 48bp の挿入が認められた (Acc.No. AB085902 として新規登録)。var.3 の新たな 3 エクソンおよび var.4 の挿入 48 塩基は既に報告されているヒトゲノム配列の一部 (Acc.No.AL033403) においてそれぞれ 5' 上流領域およびイントロン 10 配列中に存在していた。このことはこれらの配列が選択的にスプライシングされるエクソンであることを示している。

・各 Dbl スプライシングバリエントの組織分布性解析

var.1 はこれまで脳、前立腺、精巣および卵巣でのみ発現が報告されていた。今回私どもは RT-PCR によって var.1 は脳でのみ発現を認めた。また var.3 は心臓、腎臓、脾臓、肝臓および精巣で発現がみられた。さらに var.4 の発現は脳、心臓、腎臓、精巣、胎盤、胃および末梢血で確認された。Dbl タンパク質レベルでの発現は脳、心臓、腎臓、腸、筋肉、肺および精巣で認められた。

・各 Dbl スプライシングバリエントの生化学的特性解析

生物活性を測定した結果、var.1 には RhoA, Rac1 および Cdc42 いずれに対しても GEF 活性は認められなかった。var.2 は cdc42 に対して弱い活性を示し、var.3 は Rac1 と Cdc42 に若干の活性を示した。var.4 は RhoA と Cdc42 に対する明らかな活性を示した。これまでに N 末の 497 アミノ酸を欠損した Dbl がオンコジーン型として知られており、明確な GEF 活性を示すのに対してプロトオンコジーン型はほとんど GEF 活性を示さないことが明らかにされている。このことは今回の私どもの var.1 が活性を示さなかったことと一致する。またこれまでに Dbl は RhoA, Rac1 および Cdc42 に対する活性を示すという報告と、Rac1 に対しては活性化を示さないとの報告が存在し、Dbl の活性化対象 Rho ファミリーは明確ではなかった。今回の結果から var.4 が RhoA と Cdc42 に対して活性を示す一方、var.3 が Rac1 に対して弱い活性を示すことが明らかとなり、バリエント間における機能変化が起きていることが明らかとなった。

結論

これまで知られていなかった新規 Dbl プロトオンコジーンの選択的スプライシングバリエントを3種見出した。これらのバリエントは異なる組織分布性を示しており、それぞれが活性化対象とする Rho ファミリーを異にしていた。このことは Dbl が従来知られていた以外の幅広い組織においても、異なった転写産物を発現することで種々の生理機能を果たしていることを示している。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|------------|---|----|-------|
| 受付番号 | 乙第 1867 号 | 氏名 | 駒井浩一郎 |
| 論文題目 | <p>Alternative splicing variants of the human <i>DBL (MCF-2)</i> proto-oncogene</p> <p><i>DBL (MCF-2)</i> プロトオンコジーンの選択的スプライシングバリエント</p> | | |
| 審査委員 | <p>主 査 千原和夫</p> <p>副 査 黒坂昌弘</p> <p>副 査 衛 康博</p> | | |
| 審査終了日 | 平成 15 年 13 月 5 日 | | |

(要旨は1,000字～2,000字程度)

グアニンヌクレオチド交換因子；guanine nucleotide exchange factor (GEF) は、Rho ファミリーを含めて低分子量 G タンパク質を GDP 結合型の不活性型から GTP 結合型の活性型へ変化させ、種々のエフェクターと結合することによって種々の細胞内シグナル伝達、特に細胞骨格制御や細胞増殖を制御する事が知られている。ヒトにおいて、GEF は、骨格筋や神経の分化・発達および系統発生に重要な役割を果たし、リンパ球の分化、サイトカイン産生にも関与していることが報告されている。また、GEF 遺伝子の変異が faciogenital dysplasia をきたすことも報告されている。本申請者は、GEF の 1 つである Dbl プロトオンコジーンに興味を持ち研究を開始した。今までに Dbl は単一の転写産物であり、脳、精巣および卵巣に局在して発現すること、および RhoA, Cdc42 を活性化することが知られていた。申請者は、既存の DBI 遺伝子塩基配列より幾つかのプライマーセットを作成し、鋳型として脳、末梢血、精巣由来の cDNA を用い RT-PCR 法によって全長を単離した。その結果、新たな 3 種を含め Dbl スプライシングバリエントを計 4 種同定した。まず、Var. 1 は既報の分子であり、全部で 25 のエクソンから構成される cDNA 構造を有していた。Var. 2 はエクソン 23, 24 を欠損しており、一部の関節リウマチ患者において見出された。Var. 3 は従来のエクソン 1 が脱落し、代わりに新たな 3 エクソンが付加され分子であった。Var. 4 には従来のエクソン 10 と 11 の間に 16 アミノ酸をコードする 48bp の挿入が認められた。次に、市販の 12 種の臓器由来トータル RNA を鋳型として RT-PCR 法によって mRNA の組織分布性解析を行ったところ、var. 1 は脳でのみ発現を認めた。また var. 3 は心臓、腎臓、脾臓、肝臓および精巣で発現がみられた。さらに var. 4 の発現は脳、心臓、腎臓、精巣、胎盤、胃および末梢血で確認された。タンパク質レベルでの組織分布性解析は 10 種類のヒト組織由来タンパク質をプロットしてある市販の PVDF 膜と抗 Dbl 抗体を用いたイムノプロット法により行った結果、Dbl タンパク質は脳、心臓、腎臓、腸、筋肉、肺および精巣で認められた。次に、得られた DBI バリエントの cDNA を pRc/CMV ベクターに組み込み、発現ベクターを構築、COS7 細胞に導入し一過性に発現させ、それぞれの DBI の生物活性を測定した結果、

Var. 1 には RhoA, Rac1 および Cdc42 いずれに対しても GEF 活性は認められなかった。Var. 2 は cdc42 に対して弱い活性を示し、Var. 3 は Rac1 と Cdc42 に若干の活性を示した。Var. 4 は RhoA と Cdc42 に対する明らかな活性を示した。

以上、本研究は、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーのグアニンヌクレオチド交換因子の一つである Dbl プロトオンコジーンについて、バリエントの存在の有無、組織特異性および生化学的機能を研究したものであるが、従来知られていなかった新規 Dbl プロトオンコジーンバリエントを 3 種見出し、また これらのバリエントの組織分布性の違いを示すとともにそれぞれが対象とする Rho ファミリーが異なることを見出した価値ある知見の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。