

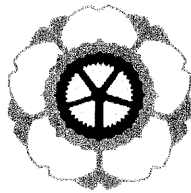
# Nara Women's University

## 小胞形成の新規制御因子SMAPから探る小胞輸送制御メカニズム解明への試み

メタデータ	言語: 出版者: 坂倉郁子 公開日: 2013-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 坂倉,郁子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10935/3503">http://hdl.handle.net/10935/3503</a>

博士申請論文

小胞形成の新規制御因子 SMAP から探る  
小胞輸送制御メカニズム解明への試み



2011 年

奈良女子大学大学院 人間文化研究科  
博士後期課程 共生自然科学専攻

坂 倉 郁 子

<u>参考文献</u> .....	68
<u>表</u> .....	76
<u>図の説明</u> .....	77
<u>図</u> .....	84
<u>誌上発表</u> .....	98
<u>学会発表</u> .....	99
<u>その他の業績</u> .....	101

## I.要旨

細胞内小胞輸送は、細胞内外のタンパク質を、細胞膜から形成される袋状の細胞小胞に包んで輸送する機構であり、細胞膜上での小胞の形成、小胞の膜からの離脱、標的細胞内小器官への輸送、標的細胞膜との融合という複雑な段階を経ることにより行われている。これらの小胞輸送は細胞の情報伝達・恒常性の維持に加え、細胞の高次機能の発揮にとり重要である。細胞小胞の形成は Arf (ADP-ribosylation factor、Arf1-6 の 6 種類が存在する) と呼ばれる GTPase 活性を持つ低分子量 G タンパク質により制御されている。多数の Arf 特異的な GAP(GTPase Activating Protein) により Arf の GTPase 活性は制御されており、GAP による活性化を受けると結合した GTP を加水分解し、Arf は活性化型の GTP 型から不活性化型の GDP 型へと変化する。一方 GEF(Guanine nucleotide Exchanging Factor) は Arf に結合した GDP を GTP と交換する反応を司り、この反応により Arf は不活性化型の GDP 型から活性化型の GTP 型へと変化する。Arf が活性化型になると、膜への結合が引き起こされ、活性化型 Arf を基点として小胞の形成がスタートすると考えられている。一方 Arf が不活性化型になると膜から遊離し同時に小胞の形成は停止すると考えられている。このように GAP や GEF により制御された GTP-GDP サイクルが起こり、正しい場所で正しい時期に活性のオンとオフとを繰り返して Arf は小胞の形成を制御している。

筆者が所属する研究室では、新規の ArfGAP 遺伝子である *SMAP1* と

*SMAP2*を発見しその機能を解析してきた。筆者は、この *SMAP* を手掛りとして未だ不明の点が多い細胞内小胞輸送機構のメカニズムを明らかにしようとして、分子解析から個体の遺伝子破壊までの一連の研究を行った。

*SMAP1* は細胞内で、主に細胞質に存在し一部細胞膜へ集積している。一方、*SMAP2* は細胞質内にドット状に存在していて、両者は明瞭に異なった細胞内局在を呈している。*ArfGAP* が正しく標的の *Arf1-6* に働くためには細胞内の局在の制御が重要と考えられる。標的との相互作用部位や小胞形成因子との相互作用の重要性が推定されているが、多くの *ArfGAP* でその細胞内局在を決める機構や部位に関してはほとんど分かっていない。また、相互作用分子の解析も不十分である。個体レベルでの個々の *ArfGAP* の解析は少なく、さらに *ArfGAP* の標的である *Arf* の個体レベルでの解析および両者の関係に関する解析も十分とは言えない。これらの諸問題を検討するためには、よく似ているが細胞内局在や *Arf* の標的選択性が異なる *ArfGAP* に関して、分子レベルの相互作用解析から遺伝子破壊マウスを用いた個体レベルまでの研究を統合的に行うことが有益であり、そのような目的に合致した遺伝子を解析することが必要であると考えられる。

*SMAP1* と *SMAP2* の *ArfGAP* ドメインは高い相同性があるが局在と機能は異なっている。細胞内の局在の違いが *Arf* タンパク質への標的特異性に寄与すると考えられるが、何によって局在が決定されるかのメカニズムは不明のままである。そこで *SMAP1* と *SMAP2* の N 端領域と C 端領域のアミノ酸配列を交換したキメラタンパク質を作製することにより *SMAP2* の細胞内局在と *Arf* タンパク質の選択に重要な C 端の領域を同定した。

次に、2つのタンパク質の相互作用を検討できる酵母のツーハイブリッ

ド法を用いて、SMAP1 と SMAP2 とは相互作用が検出できるが、SMAP2 と SMAP2 とでは相互作用が検出されないことを新たに見いだした。その相互作用に重要な SMAP1 の領域を同定し、特徴ある相互作用機構に関しても一部明らかにした。さらに詳しい解析を行うために、相互作用に必要な最小の領域の決定を行った。

SMAP1 と SMAP2 とがお互いに分子レベルで相互作用する可能性を新たに見出したが、その意義に関しては今後の解析を待たなければならない。今回得られた知見から遺伝子レベルでも *SMAP1* と *SMAP2* が関連する可能性、すなわち遺伝的な相互作用の存在が示唆される。そこで、筆者の所属する研究室で既に作製していた *SMAP1*, *SMAP2* それぞれの遺伝子破壊マウスを用いて、交配により 2 つの遺伝子を同時に欠損したマウス（二重遺伝子欠損マウス）を作製して、両遺伝子間の相互の関係の解析を行った。その結果、*SMAP1* と *SMAP2* の 2 つの遺伝子を同時に欠損するマウスは、胚発生時期の受精後 7.5 日目から異常が見られ 9.5 日目に死亡していることを見いだした。このことから *SMAP1* と *SMAP2* の両遺伝子の、少なくとも一方が存在しなければマウスは正常に発生しないことが判明した。これは、ArfGAP 間における、個体レベルでの遺伝子の相互作用を示す初めての例である。また、*SMAP1* と *SMAP2* がマウス個体の発生にとりきわめて重要な働きをしていることを示している。*SMAP1* と *SMAP2* が同時に欠損するマウスの表現型の比較検討から、これまでその特異的な ArfGAP が知られていない *Arfrp1* 欠損マウスの表現型が *SMAP1* と *SMAP2* が同時に欠損するマウスの表現型とよく似ていることから、SMAP1 と SMAP2 の新たな標的である可能性を提唱した。

また、所属研究室で作成した *SMAP1* のコンディショナル遺伝子破壊マ

ウスを用いて、組織特異的な効果の検討と、*SMAP1*, *SMAP2*を同時に欠いた培養細胞の樹立へ向けた実験を開始した。

このように筆者が行った *SMAP1* と *SMAP2* の解析から、これら遺伝子の新たな作用機構の一端が明らかになりつつある。一方で、培養細胞の研究から *SMAP1*, *SMAP2* の標的はそれぞれ *Arf6*, *Arf1* と考えられている。しかし、筆者の所属する研究室ではこれまでに *SMAP1*, *SMAP2* の遺伝子破壊マウスを作製しその小胞輸送への効果を解析してきたが、培養細胞での解析から得られたような小胞輸送系の異常は個体レベルでは見られていない。このような培養細胞の知見と個体での知見との不一致は *ArfGAP* だけに認められるわけではないようである。なぜならば、筑波大学の金保らにより小胞輸送、特にエンドサイトーシスに必須と考えられていた *Arf6* の遺伝子破壊マウスが報告されているが、このマウスでも小胞輸送の異常はまったく見られていないからである。

一方で前述したように、*SMAP1* と *SMAP2* との二重欠損体は発生の極めて初期で死亡することを新たに見いだした。このことは以下の 2 つの可能性を示唆している。すなわち、1) *SMAP1*, *SMAP2* に *Arf6*, *Arf1* 以外の共通の標的が存在し、その標的は *SMAP1,2* がなくなると機能異常となりマウスが発生初期で死亡する可能性と、2) *SMAP1* と *SMAP2* は細胞内の局在が異なるが、何らかのメカニズムで一方の欠損を他方が補える可能性である。さらに *SMAP1*, *SMAP2* の標的の *Arf6*, *Arf1* にも同様のことが当てはまる可能性がある。そこで、未だ報告が無い *SMAP2* の標的である *Arf1* の遺伝子欠損マウスを作製し、その生理的機能とこれらの問題を解析することを目指した。その結果、*Arf1* 遺伝子破壊マウスの作製を試みて、*Arf1* の翻訳領域の DNA 配列を全て欠く *Arf1* 遺伝子破壊ヘテロマ

ウスの 2 系統の作製に成功した。今後ヘテロマウス同士の交配を行い、*Arf1* を欠損するマウス個体で生じる現象を検討する予定である。また、筆者が発見した *SMAP1* と *SMAP2* のように *Arf6* と *Arf1* にも遺伝的な相互作用が存在する可能性がある。このことを解析するために、筑波大学との共同研究を計画している。



## II. 序論

細胞内小胞輸送は、細胞内外のタンパク質を、細胞膜から形成される袋状の細胞小胞に包んで輸送する機構であり、細胞膜上での小胞の形成、小胞の膜からの離脱、標的細胞内小器官への輸送、標的細胞膜との融合という複雑な段階を経ることにより行われている(1)。これらの小胞輸送は細胞の情報伝達・恒常性の維持に加え、細胞の高次機能の発揮にとり重要である。(1-4)。最近では単に細胞の恒常性の維持のみならず、発生現象や免疫現象、発がんなどの複雑な生理現象への深い関与が明らかになりつつある(2, 3)。

このように重要な細胞内の小胞輸送は、細胞小胞を形成しその中に運ぶべき積荷となるタンパク質を封入する反応から始まる。この小胞膜の形成と融合とを制御しているのが、*Rab* や *Arf*(*ADP-ribosylation factor*) といった一群の低分子量 G タンパク質と呼ばれる遺伝子群である。これらは低分子量 G タンパク質の中でも *Ras* 型の低分子量 G タンパク質ファミリーに分類されている。*Ras* は、がん遺伝子あるいは受容体から細胞内へのシグナル伝達に重要なことでよく知られている。このファミリー遺伝子には、*Ras*, *Rho*, *Rab*, *Arf*, *Arf-like* 等のファミリーメンバーが存在する。*Rab* は 60 種類以上が知られており、単量体 GTPase のサブファミリーとして最大である。小胞輸送の特異性に重要な役割を担っており、各細胞内小器官の細胞質側表面に少なくとも 1 種類以上存在している。脂質アンカー、*Rab* エフェクターを介して、小胞側の膜と標的側の膜にある相補的な SNARE(soluble NSF attachment protein receptor)タンパク質同士の

融合を促進、調節していると考えられている(1)。一方、細胞小胞の形成は Arf と呼ばれる GTPase 活性を持つ低分子量 G タンパク質により制御されると考えられている。Arf はヒトには 6 種類、マウスには 5 種類存在することが判明している(5-7)。Arf は GTP, GDP と結合する G タンパク質で、GTP と結合すると活性化型となり細胞膜へ結合して小胞形成の起点となり形成を開始させる。Arf はそれ自身 GTP を GDP へと加水分解する GTPase 活性を持っているが、普段はこの活性は抑制されている。

GTPase 活性化因子の GAP によりはじめて Arf の GTPase が活性化され Arf は GTP 結合型から GDP 結合型の不活性化型へと変化することが Arf の特徴の一つである。Arf に結合した GDP は GEF(Guanine nucleotide Exchanging Factor)により GTP と交換され再び Arf は活性化型になる。

多数の Arf 特異的な GAP(GTPase Activating Protein)と GEF が存在しており、これらにより Arf の GTPase 活性は巧妙に制御され、それにより起こる GTP-GDP サイクルに応じて、正しい場所で正しい時期に活性のオンとオフとを繰り返して Arf は小胞の形成を制御していると考えられている(8, 9)。

ヒトでは Arf は 1-6 まで存在する。これらは、そのアミノ酸配列から各々のタンパク質は Arf1, Arf2, Arf3 からなる I 型、Arf4, Arf5 からなる II 型、Arf6 からなる III 型に分類されている。Arf1-5 は GTP 結合型の状態でのみ細胞膜に結合すると考えられているが、Arf6 のみは恒常的に細胞膜に結合できると考えられている(5-7)。

これまでによく解析されているのはゴルジ体付近で働く Arf1 と細胞膜付近で働く Arf6 の 2 つである。Arf1 は小胞の周りを覆う被覆タンパク質として COPI やクラスリンを用いて、ゴルジ体から小胞体へ、ゴルジ体間、

ゴルジ体からエンドソームへの小胞輸送へ関与していると考えられている。一方 Arf6 は細胞膜付近でのクラスリンを用いたエンドサイトーシスに関与していると考えられている(5-7, 10-12)。これまでに、培養細胞を用いた様々な研究が行われ、上に述べたようなことが判明している(図 1)。

筆者が所属する研究室では、研究の途上で新規の ArfGAP 遺伝子である *SMAP(Small ArfGAP Protein) 1* と *SMAP2* とを発見しその機能を解析してきた。*SMAP1* は当初細胞の膜に結合するタンパク質として取られ、その機能は赤血球の分化と増殖を促進する支持細胞因子ではないかと推定されていた(13,14)。その後の研究から、大腸菌を用いて作成した *SMAP1 ArfGAP* ドメインタンパク質が同じく大腸菌を用いて作成した *Arf6* タンパク質に対して *in vitro* の検定系で ArfGAP 活性を示すことが判明して、*SMAP1* は、典型的な Arf GAP であること、また *SMAP1* とよく似た *SMAP2* が存在することが明らかになり、新しい ArfGAP ファミリーメンバーとして広く認知されるようになった(15-20)。また、*SMAP1*, *SMAP2* はそれらが関与する小胞の形成において用いられる被覆タンパク質のクラスリンと結合する初めての ArfGAP でもあり、その作用機構が注目されている(図 2)。

これまでの培養細胞を用いた研究から、*SMAP1*, *SMAP2* がどのように小胞輸送と関与しているかに関する知見がいくつか得られている(15-19, 図 3)。筆者が所属する研究室は、HeLa 細胞や Cos 7 細胞での過剰発現や siRNA を用いた発現抑制の実験を行うことにより、*SMAP1* は細胞膜(Plasma membrane)の周囲に局在し、トランスフェリンや E-カドヘリンのエンドサイトーシスと深く関与していることを明らかにしている(15, 18)。すなわち、*SMAP1* または *SMAP1* の ArfGAP 活性欠損体の過剰発現

は HeLa 細胞におけるトランスフェリンの取り込みを抑制した。さらに siRNA による内在性の SMAP1 の発現低下はトランスフェリンの取り込みを抑制した。トランスフェリンの取り込みはクラスリン被覆に依存したエンドサイトーシスであるが、SMAP1 は直接クラスリンと結合することも明らかとなった。一方でクラスリン非依存性のエンドサイトーシスには SMAP1 または SMAP1 の ArfGAP 活性欠損体の過剰発現は影響を及ぼさないことも明らかになった。また SMAP2 はエンドソームとゴルジ体との輸送に関与している可能性が明らかになっている(16)。SMAP2 は Arf1 を標的として、クラスリンアダプターの AP-1 や EpsinR と初期エンドソームとトランスゴルジネットワーク(TGN)上で共局在した。さらに、SMAP2 の過剰発現は TGN への TGN38/46 分子の集積を遅らせることから、SMAP2 はクラスリンと AP-1 に依存する様式で初期エンドソームから TGN への輸送に関与していることが示唆されている(16)。

このように SMAP1 と SMAP2 とはお互いに異なる Arf を標的として、クラスリンに依存した小胞輸送に関与していることが明らかになっている。しかし、これら SMAP1, SMAP2 がどのようなメカニズムで小胞形成に関与しているかに関しては、はっきりしたことは分かっておらず未だ不明の点が多く残されている。さらに遺伝子欠損マウスの作成が行われているが、培養細胞で予想された大きな小胞輸送の異常は見られておらず、その重要性に関しては不明のままである(渡邊ら、未発表結果)。

ArfGAP が正しく標的の Arf1-6 に働くためには細胞内の局在の制御が重要と考えられる。標的との相互作用部位や小胞形成因子との相互作用の重要性が推定されているが、多くの ArfGAP でその細胞内局在を決める機構や部位に関してはほとんど分かっていない。また、相互作用分子の解析

も不十分である。個体レベルでの個々の ArfGAP の解析は少なく、さらに ArfGAP の標的である Arf の個体レベルでの解析および両者の関係に関する解析も十分とは言えない。これらの諸問題を検討するためには、よく似ているが細胞内局在や Arf の標的選択性が異なる ArfGAP に関して、分子レベルの相互作用解析から遺伝子破壊マウスを用いた個体レベルまでの研究を統合的に行うことが有益であり、そのような目的に合致した遺伝子を解析することが必要であると考えられる。

SMAP1 と SMAP2 の ArfGAP ドメインは高い相同性があるが局在と機能は異なっていることから、このような研究の対象とするに値すると考えられる。

そこで、筆者はこの SMAP を手掛りとして SMAP が関与する細胞内小胞輸送機構のメカニズムを明らかにしようと考え、分子解析から個体の遺伝子破壊までの一連の研究を行った。

SMAP1 は細胞内で、主に細胞質に存在し一部細胞膜へ集積している。一方、SMAP2 は細胞質内にドット状に存在していて、両者は明瞭に異なった細胞内局在を呈している(17)。SMAP1 と SMAP2 の ArfGAP ドメインは高い相同性があるが局在と機能は異なっている。細胞内の局在の違いが Arf タンパク質への標的特異性に寄与すると考えられるが、何によって局在が決定されるかのメカニズムは不明のままである。そこで SMAP1 と SMAP2 の N 端領域と C 端領域のアミノ酸配列を交換したキメラタンパク質を作製することにより SMAP2 の細胞内局在と Arf タンパク質の選択に重要な C 端の領域を同定した。SMAP2 の 339-428aa 領域が SMAP2 タイプの細胞内局在に必要であり、細胞内局在に十分な情報を含むことが明らかになった。またこの領域が標的 Arf の特異性にも重要であることを確認した。

次に、2つのタンパク質の相互作用を検討できる酵母のツーハイブリッド法を用いて、SMAP1とSMAP2とは相互作用が検出できるが、SMAP2とSMAP2とでは相互作用が検出されないことを新たに見いだした。その相互作用に重要なSMAP1の領域を見出し、特徴ある相互作用機構についても一部明らかにした。さらに詳しい解析を行うために、相互作用に必要な最小の領域の決定を行った。

SMAP1とSMAP2がお互いに分子レベルで相互作用する可能性を新たに見出したが、その意義に関しては今後の解析を待たなければならない。今回得られた知見から遺伝子レベルでもSMAP1とSMAP2とが関連する可能性、すなわち遺伝的な相互作用の存在が新たに示唆される。しかし、現在までに作成されたArfGAP遺伝子欠損マウスの例は少なく、さらにArfGAP遺伝子間の相互作用についての報告や考え方の提唱はこれまでなされていない。そこで、筆者の所属する研究室で既に作製していたSMAP1, SMAP2それぞれの遺伝子破壊マウスを用いて、交配により2つの遺伝子を同時に欠損したマウスを作製して、両遺伝子間の相互の関係の解析を行った。両遺伝子欠損マウス共に、予想された細胞内小胞輸送の異常が見られず、正常に発生・成長することが判明していた。二重欠損マウスの解析の結果、SMAP1とSMAP2の2つの遺伝子を同時に欠損するマウスは、胚発生時期の受精後7.5日目から異常が見られ9.5日目に死亡していることを見いだした。このことからSMAP1とSMAP2の両遺伝子の、少なくとも一方が存在しなければマウスは正常に発生しないことが判明した。これは、ArfGAP間における、個体レベルでの遺伝子間の相互作用

を示す初めての例である。また、*SMAP1*と*SMAP2*がマウス個体の発生にとりきわめて重要な働きをしていることを初めて明瞭に示している。*SMAP1*と*SMAP2*が同時に欠損するマウスの表現型の比較検討より、これまでにその特異的な ArfGAP が知られていない *Arfrp1* 欠損マウスの表現型が、*SMAP1*と*SMAP2*が同時に欠損するマウスの表現型とよく似ていることから、*SMAP1*と*SMAP2*の新たな標的である可能性を提唱した。

今回、筆者が行った *SMAP1*と*SMAP2*の解析から、これら遺伝子の新たな作用機構の一端が明らかになりつつある。一方で、培養細胞の研究から *SMAP1*, *SMAP2*の標的はそれぞれ *Arf6*, *Arf1*であろうと考えられている。しかし先にも一部述べたように、筆者の所属する研究室ではこれまでに *SMAP1*, *SMAP2*の遺伝子破壊マウスを作製しその小胞輸送への効果を解析してきたが、培養細胞での解析から得られたような小胞輸送系の異常は個体レベルでは見られていない。このような培養細胞の知見と個体での知見との不一致は特に ArfGAP だけに認められるわけではないようである。なぜならば、筑波大学の金保らにより小胞輸送、特にエンドサイトーシスに必須と考えられていた *Arf6*の遺伝子破壊マウスが報告されているが、このマウスでも小胞輸送の異常は見られていないからである (21、金保・私信)。

一方で前述したように、*SMAP1*と*SMAP2*との二重欠損体は発生の極めて初期で死亡することを新たに見いだした。このことは以下の2つの可能性を示唆している。すなわち、1) *SMAP1*, *SMAP2*に *Arf6*, *Arf1*以外の共通の標的が存在し、その標的は *SMAP1,2*がなくなると機能異常となりマウスが発生初期で死亡する可能性と、2) *SMAP1*と*SMAP2*は細胞

内の局在が異なるが、何らかのメカニズムで一方の欠損を他方が補える可能性である。さらに SMAP1, SMAP2 の標的の Arf6, Arf1 にも同様のことが当てはまる可能性がある。このきわめて新しい可能性を検証するためには *Arf1, Arf6* の遺伝子欠損マウスを用いて、*SMAP1, SMAP2* 遺伝子欠損マウスで行ったのと同様な二重欠損体の解析を行うことが必要である。

そこで、未だ報告が無い SMAP2 の標的である Arf1 タンパク質をコードする *Arf1* の遺伝子欠損マウスを作製して、未解明の *Arf1* 遺伝子の生理的機能と *Arf1, Arf6* 間の遺伝子相互作用の有無の問題を解析することを目指した。そのために、*Arf1* 遺伝子破壊マウスの作製を種々試みて、*Arf1* の翻訳領域の DNA 配列を全て欠く *Arf1* 遺伝子破壊ヘテロマウスの 2 系統の作製に成功した。ヘテロマウスでの異常は見られていない。これにより、*Arf1* を欠損するマウス個体ではどのような現象が見られるかの検討と、筆者が発見した *SMAP1* と *SMAP2* のように *Arf1* と *Arf6* にも遺伝的な相互作用の可能性の検証が初めて行える基盤を確立できた。

以上に述べた研究を行い、小胞形成の新規制御因子 SMAP の機能解明を行い、SMAP に関する 3 つの新しい知見を得ることができた。さらに、ArfGAP である SMAP の標的 Arf1 に注目して、その遺伝子破壊マウスの作成を試みた。ArfGAP の SMAP の解析を通じて、Arf, ArfGAP が関与する未だ不明の点が多く残っている小胞輸送制御メカニズム解明を試みた。



### Ⅲ.材料と方法

#### 1. プラスミド作製

SMAP1 と SMAP2 のキメラは 2 ステップ PCR 法で作製した(22)。全ての PCR に KOD plus DNA polymerase (TOYOBO) を使用した。PCR 産物をアガロースゲルから QIAEX Gel Extraction Kit (Qiagen)で回収した。制限酵素とライゲーションキットは TAKARA から購入した。プライマーとして以下のオリゴヌクレオチドを使用した。(SMAP1 配列は plain type、SMAP2 配列は boldface、制限酵素は italic type)

*HindIII*-HA-N, CCCAAGCTTACCATGTATCCATATGATG;

*XhoI*-SM2-C-3', CCGCTCGAGTTATTTCCACATCTGAGGAC;

*XhoI*-SM1-C-3', CCGCTCGAGTTACTTCCACAGCTGTGC;

SM1-2-1-5', AATACTATGATCGAAGTCTGACATCAATG;

SM1-2-1-3', CAGACTTCGATCATAGTATTTCTTCTTTTC;

SM1-2-2-5', AATGGGTTCATGGGGGGCATGCAGGCGTCC;

SM1-2-2-3', TGCCCCCATGAACCCATTGTGCATGGGCA;

SM2-1-2-5', GCAGGCTATATGGGAAACGCACAGACTGGA;

SM2-1-2-3', GTTTCCCATATAGCCTGCAGGCATGGC

例えば、HA-SMAP1 (aa 1-130)-SMAP2 (aa 126-428) キメラは SMAP1 の N 端の 390 bp と SMAP2 の C 端の 909 bp を融合して作製した。HA-SMAP1 の N 端部分は *HindIII*-HA-N と SM1-2-1-3' プライマーを使用して増幅した。SMAP2 の C 端部分は SM1-2-1-5' と *XhoI*-SM2-C-3' プライマーを使用して増幅した。最終 PCR 産物の *HindIII*-*XhoI* 断片を pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA)に組み込んだ。ほかの組み換え体に

関しても各々のプライマーセットを用いて同様に作成した。

一連の GFP 融合 SMAP2 cDNA は pcDNA3-SMAP2 から切り出すか、又は HA-SMAP2 cDNA から PCR 法で作製した DNA 断片を GFP 発現ベクターに組み込み GFP の C 末端に融合させるように作成した。プライマーとして以下のオリゴヌクレオチドを使用した。

*XhoI*-SM2-300, CG *CTCGAGCTATGGGGGGCATGCAGGCGT*;

*XhoI*-SM2-C-3', CCG *CTCGAGTTATTTCCACATCTGAGGAC*

全長と C 端の SMAP2 cDNA はそれぞれ pEGFP-C2 と pEGFP-C1 (Clontech, CA)にサブクローンした。

酵母ベクター pGBKT7 (Clontech)に SMAP2 の C 端領域(124-428aa)を組み込んだ。酵母ベクター pGADT7 (Clontech)に SMAP1 の 129-449aa が組み込まれたプラスミドを鋳型にして、3 通り (129-386aa,129-367aa,368-440aa)の長さの欠失変異体と 129-367 と 387-440aa の欠失変異体を PCR 法で作成した。作成した欠失変異体をそれぞれ酵母ベクター pGADT7 に、制限酵素部位の *Bam*HI と *Xho*I に翻訳のフレームが合うようにして組み込んだ。

作成したすべてのプラスミドの配列が正しいことをシーケンス解析にて確認した。(ABI PRISM 310 Genetic Analyzer ;Applied Biosystems)

## 2. 酵母ツーハイブリッド実験

Clonotech 社の Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 を用いた。

酵母菌株 AH109 を使用し、酵母ツーハイブリッドスクリーニングのベイト (GAL4 DNA 結合領域との融合タンパク質) とプレイ (GAL4 転写活性化領域との融合タンパク質) とは該当する cDNA の領域を、DNA 増幅時の正確性の高い KOD-plus Taq ポリメラーゼ (Toyobo 社) を用いた PCR 法にて増幅し、組み込みに使用する制限酵素で切断後それぞれ pGBKT7, pGADT7 のプラスミドベクターに組み込んだ。酵母への DNA 導入法は、Clontech 社の Matchmaker GAL4 Tow-hybrid System 3 の使用説明書に記載されている LiCl 法を用いた。

培養プレートは、アデニン・ヒスチジン・ロイシン・トリプトファンを欠いた SD 培地 (Yeast Nitrogen Base w/o amino acids 7.7g/L, Bacto Agar 20g/L, Glucose 20g/L) に 10 × Dropout 溶液 (L-Arginine HCl 200mg/L, L-Isoleucine 300mg/L, L-Lysine HCl 300mg/L, L-Methionine 200 mg/L, L-Phenylalanine 500mg/L, L-Threonine 2000mg/L, L-Tyrosine 300 mg/L, L-Uracil 200mg/L, L-Valine 1500m/L) を加えたものを選択培地として用いた。その他の酵母の取扱の方法は Clontech 社の Matchmaker Tow-hybrid System 3 の使用説明書に従って行った。

### 3. 細胞培養

遺伝子発現を行う細胞は HeLa と Cos 7 細胞とを用いた。HeLa 細胞は京都大学薬学部中山和久博士より、Cos 7 細胞は奈良女子大学理学部生物科学科神経発生学研究室より分与していただいた。

液体窒素で凍結していた細胞を取り出し、37℃のウォーターバスでチューブごと温め内部が半解凍の状態（黄色からピンク色へ変化）になった時点で、アルコール消毒した後にクリーンベンチへ持ち込んだ。事前に温めておいた培地 3ml をパスツールピペットでチューブに移し、半解凍の細胞を完全に溶かした。溶けた細胞を遠心チューブに移し、1,300rpm、4分間の遠心にかけて細胞を沈殿させた。遠心後、遠心チューブ内の上清を取り除き、新しい培地 5ml を加え沈殿した細胞を混濁させた。遠心チューブ内の液を全量、径 6cm シャーレに移し、オートピペッターを用いてシャーレ全体に均一にまいた。37℃の 5%二酸化炭素インキュベータで一晩培養した。シャーレ内で細胞が増えシャーレの底全面が細胞で一杯になった時点で細胞の植継ぎを行った。古い培地を取り除き、PBS 溶液 2 ml で軽くシャーレ内を洗った。PBS 溶液を完全に除いた後、パスツールピペットを用いてトリプシン 0.5ml を全面に加え、37℃の 5%二酸化炭素インキュベータで 5~10 分間反応させた。トリプシン処理によって細胞がシャーレ底より剥がれたことを倒立顕微鏡で確認した。新しい培地 1ml を加え、剥がれた細胞を混濁した。混濁した液を 5ml の培地が入ったシャーレに希釈率に合わせて一定量加え（例えば 10 倍希釈の場合は 150  $\mu$  l）、オートピペッターで均一になるようにまいて、37℃の 5%二酸化炭素インキュベータ内で培養した。

1-2 回細胞の継代を繰り返し細胞の増殖能を安定化させた後に実験に用いた。安定化後の継代は、細胞がシャーレー面に成育（コンフルエント）したら、10 倍に希釈してまき、3 日後にコンフルエントになるようにして培養した。

#### 4. 細胞への遺伝子導入

培養細胞が安定して継代されるようになってから、遺伝子を細胞内へ導入（トランスフェクション）した。コンフルエントに増殖した細胞を 10 倍希釈でまいて、翌日シャーレの底面の 2 割くらいに細胞が増えた地点で遺伝子をトランスフェクトし、24 時間後に観察を行った。

トランスフェクションには QIAGEN 社の Effectene Transfection Reagent Kit を用い、そのプロトコールに従った。トランスフェクションする際は、径 3.5cm シャーレの底にカバーガラス (MICRO COVER GLASS : MATSUNAMI) 1 枚を敷いて培養した。トランスフェクションするプラスミドは一回当たり 0.4  $\mu$ g 使用し、希釈が必要な場合はトランスフェクション用に滅菌した TE で希釈して使用した。この時使用した DNA 溶液の量と Buffer EC の量が Total で 100  $\mu$ l になるよう調整し、そこに Enhancer を 3.2  $\mu$ l 加えた。軽くボルテックスにかけて、遠心機でスピンドウンし、室温で 2~5 分間放置した。その後、Effectene Transfection Reagent を 4  $\mu$ l 加え、10 秒間ボルテックスにかけ、室温で 5~10 分間放置した。その間にインキュベータで培養していた細胞の古い培地を取り除き、PBS 溶液で洗浄し新しい培地 1.6ml を加えた。Effectene Transfection Reagent と反応させたプラスミドが入ったチューブに 600  $\mu$ l の培地を加え、3 回程度マイクロピペットで溶液を上下させ攪拌した。その後、細胞が生育しているカバーガラスの上に満遍なくプラスミド DNA が入った溶液をマイクロピペットで 1 滴 1 滴ゆっくりと滴下した。シャーレを 37°C の 5%二酸化炭素インキュベータで 24 時間培養後、細胞を固定し蛍光免疫染色を行って観察した。

## 5. 顕微鏡観察

### < 蛍光免疫染色による観察 >

トランスフェクションをして 24 時間後にインキュベータより取り出し、培養していた細胞を固定した。固定は、培養液を除いて PBS で 1 回の洗浄後、3.7% ホルマリン/PBS、1 ml に室温で 15 分間浸漬させた。その後、ホルマリン/PBS を除き、再び PBS で 3 回洗浄を行い、0.1% TritonX-100/1% BSA/PBS を 1ml 加え 15 分間静置した。0.1% TritonX-100/BSA/PBS を除いた後、PBS で 3 回の洗浄を行い、1% BSA/PBS を 1 ml 加え 4°C に保存、もしくは 30 分間室温に静置した。

次に、抗原抗体反応を行った。1% BSA/PBS で 200 倍希釈した 1 次抗体（抗 HA ラット IgG 抗体(3F10)(Roche Diagnostics)) 1ml を 1 時間室温にて反応させた。PBS で 5 回洗浄した後、1% BSA/PBS で 200 倍希釈した 2 次抗体（Cy3 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体(Chemicon)) 1ml を 1 時間室温にて反応させた。再び PBS で 5 回洗浄した後、シャーレ内のカバーガラスを、Prolong Gold(Invitrogen)を使用してスライドガラスにのせた。Ar/Kr レーザーを装備した倒立顕微鏡(IX-71;Olympus)上で回転ディスク共焦点顕微鏡(CSU10;Yokogawa Electric Co.)を用いて蛍光観察を行った(23)。

### < GFP 蛍光による生細胞観察 >

トランスフェクションをして 2 日後にインキュベータより取り出し、培地の入ったシャーレのまま倒立型位相差蛍光顕微鏡(ライカ DMI 3000B)を用いて蛍光観察を行った。

### <トランスフェリンの取り込み>

トランスフェリンの取り込みを検出するためトランスフェクションした HeLa 細胞を PBS で洗浄し、0.1%(wt/vol)BSA を含む DMEM で 37°C、30 分間予備培養した。その後 25.μ/ml の Alexa488 標識ヒトトランスフェリンで 37°C、15 分間培養し、PBS で洗浄して 3.7%ホルムアルデヒドを含む PBS で室温、15 分固定した。PBS で 3 回洗浄した後免疫蛍光染色処理を行い、Prolong Gold (Invitrogen)でマウントし観察した(23)。

## 6. 実験動物

*SMAP1* 遺伝子破壊マウスは TT2 ES 細胞 (C57BL/6 マウスと CBA マウスとの交配より作成した F1 ハイブリッドマウスに由来する) を用いて作製したキメラマウスと C57BL/6 との交配により繁殖させた。*SMAP2* 遺伝子破壊マウスは E14 ES 細胞を用いて作製したキメラマウスと C57BL/6 との交配により繁殖させた。交配実験に用いたマウスは (*SMAP1*/*SMAP1*, *SMAP2*<sup>+</sup>/*SMAP2*)として維持した。C57BL/6 は、日本 SLC より購入したマウスを、奈良女子大学の飼育施設で繁殖させて使用した。

マウスの取扱は、奈良女子大学動物実験委員会の承認を受け、講習会に参加後、制定されている指針に従って実験を行った。

## 7. *Arf1* 遺伝子破壊マウスの作製

図 4 に *Arf1* 遺伝子破壊の設計図をまとめた。*Arf1* の翻訳領域を含む 4 つのエキソンを欠損させ、*Arf1* タンパク質の発現をなくすように計画した。*Arf1* 遺伝子を持つ BAC (RP23-316M1) から遺伝子破壊に必要な DNA 断片を Red/ET システムにより DNA 相同組み換え反応にて回収した。Red/ET システムでは必要な DNA 断片の両端の 50 bp の相同領域を用いて、Red/ET による相同組み換え反応後に必要とする DNA 断片を低コピーベクターに回収した。回収した DNA 断片を遺伝子破壊用のプラスミドに組み込む際に必要となる制限酵素部位はプライマーを合成する際にあらかじめ付加しておいた。

図 4 に TV で示すように、遺伝子破壊用のプラスミドは 8kb と 4kb の相同領域で ES 細胞の選別に用いるネオマイシン耐性遺伝子をはさむように構築した。非相同組み換え体を減少させるために、4kb の相同領域の下流に、相同組み換えが起こればなくなるが起こらなければ組み込まれて発現するように、細胞にとって致死効果を持つジフテリア毒の A 断片を付加しておいた。

各々の方法について以下に記載する。



### <Red/ET システムによる DNA のサブクローニング法>

*Arf1* ゲノムを含む BAC(RP23-316M1)をグリセロールストックから LB(Cm:クロラムフェニコール)プレートにストリークし、一晚培養してコロニーを形成させた。形成させたコロニーを LB 培地 2ml(Cm)に 37°Cで一晩培養した。翌日に培養した大腸菌 20  $\mu$ l を 2ml LB(Cm)へ移し 3 時間培養した。エレクトロポレーション一回当たり 2 本を準備した。大腸菌を 1.4ml 分注して、遠心(11,000rpm ,30sec,4°C)し、上清を捨てた。1 ml の 10%グリセロールで懸濁して、遠心(11,000rpm ,30sec)し、上清を捨てることを 2 回行い、40  $\mu$ l の 10%グリセロールで懸濁した。大腸菌懸濁液 40  $\mu$ l に対して 20ng の pRedET ベクターを加えてエレクトロポレーションを行った。ベクターの濃度は 20ng/ $\mu$ l 以上にした。Gene Pulser 2.3kV, 25  $\mu$  F, 200  $\Omega$  (プログラム Ec1)で実行した。Time const.が約 4.8sec になるようにした。1ml LB で回収して 30°Cで 70 分間培養した。100  $\mu$ l (あるいは全量)を LB プレート(Cm,Tet:クロラムフェニコール,テトラサイクリン)へまき 30°Cで一晩培養した。コロニーを 5ml LB(Cm,Tet)へ 5 つぐらい拾い 30°Cで 18 時間培養した。大腸菌培養液 3 ml を使ってミニプレップを行い、pRedET を含んでいることを確認した後グリセロールストックを作製した。一部はプレートへストリークした。

### <DNA 断片回収用の minimal vector の作製>

minimal vector は低コピー数ベクターでアンピシリン(Amp)耐性のものを使用した。minimal vector を鋳型として、欲しい DNA 配列を回収す



4kb の DNA 回収用

*SwaI* と *XhoI* の制限酵素部位を付加した。

FW プライマー :

ATCTCAGGAAGAAGCCTGGCAGTGGTGGCACTGACACACAAGCCC

ATCAAAC TAGTATTTAAATTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATG

REV プライマー :

CTCTGTCTGCTAACCCAGGCCTTGTCCCTGGAAGCTTCTAGCCTCCA

TACACTCGAGGCTCTCCTGATGAGGGACAAATC

8kb の DNA 回収用

*SaII*、*NotI*、*SmaI* の制限酵素部位を付加した。

FW プライマー :

GTGGCTTCTCAATGGCCACCCCTGCTCCACTGGTCTTTACAGAGGG

CATAGTCGACTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATG

REV プライマー :

CTTTTCTTTCCCAGGTCTTTGGCCAGTATCGATTCCACCTGTCCACA

AACCCCGGGGCGGCCGCGCTCTCCTGAGTAGGACAAATC

PCR 反応

TOYOBO 社の KOD plus を用いて行った。

反応条件

10xBuffer	5 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub>	5 $\mu$ l
dNTPs	5 $\mu$ l
Primer FW (50uM)	0.5 $\mu$ l
Primer REV (50uM)	5 $\mu$ l
Minimal Vector 18.5 ng/ $\mu$ l	1.4 $\mu$ l
D.W	31.6 $\mu$ l
KOD plus	1 $\mu$ l
<hr/>	
Total Vol.	50 $\mu$ l

94°C 2min

94°C 15sec }  
50°C 30sec } 30 サイクル

74°C 4min

4°C

エタノール沈殿により精製を行い、最終的に 10  $\mu$  l の精製水に溶かした。  
一部を電気泳動して DNA 濃度を測定した。

DNA 濃度は 200ng/ $\mu$  l 以上(300ng)がよく、エレクトロポレーションには 1  $\mu$  l を用いるようにした。

### < Minimal Vector のエレクトロポレーション >

pRedET を含んだ BAC を 1ml LB(Cm,Tet) で 30°C 18 時間培養した。翌日、培養した大腸菌 20  $\mu$ l を 2ml LB(Cm,Tet) へ移し 3 時間培養した。エレクトロポレーション一回当たり 2 本を準備した。1 M L-アラビノース 26.7  $\mu$ l を 2ml の大腸菌に加え、45min 37°C 培養した。この操作により DNA 組み換え酵素の Red/ET の発現を誘導した。大腸菌を 1.4ml 分注して、遠心(11000rpm, 30sec, 4°C)し、上清を捨てた。1 ml の 10%グリセロールで懸濁して、遠心(11000rpm, 30sec)し、上清を捨てることを 2 回繰り返し、40  $\mu$ l の 10%グリセロールで懸濁した。大腸菌の懸濁液 40  $\mu$ l に対して 1  $\mu$ l(100ng~300ng)の minimal vector を加えてエレクトロポレーションを行った。

Gene Pulser 2.3kV, 25  $\mu$  F, 200  $\Omega$  で実行した。Time const.が約 4.8sec になるようにした。1ml LB で回収して、15ml チューブに移し、37°C で振盪しながら 70 分間培養した。遠心して回収し、LB プレート(Amp)にまき一晩培養した。コロニーを 10 個程度選びミニプレップを行い、欲しい DNA 断片が回収できたか確認を行った。

### < CV、TV の作製 >

CV は Red/ET 法により BAC より minimal vector に回収した 6 kb の DNA 断片を、*Swa*I と *Xho*I で切断して CV 用のゲノム配列とベクター配列を切り離し、CV 用のゲノム配列のみを QIAGEN 社の QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol に従って、電気泳動後アガロースゲルから回収した。あらかじめ *Swa*I, *Xho*I で切断した CV 用のプラスミドに回収した 6 kb の DNA 断片を組み込め、回収後制限酵素切断を行い目的

とする DNA 断片が組み込まれていること確認した。

TV は CV と同様にして回収した 4 kb と 8 kb の DNA 断片を、*SwaI* と *XhoI*、*SaII* と *NotI* とで切断した TV 用のプラスミドに組み込み、ライゲーションさせたものをコンピテントセル(DH5 $\alpha$ )に形質転換させた後、寒天培地(LB Amp)の入ったシャーレにまき、37 度のインキュベータ内で培養した。翌日、生えたシングルコロニーを一つずつ取り、培養後に標準のアルカリ法でプラスミドを精製した(Molecular Cloning、CSH)。アガロースゲルで電気泳動して、予想位置にバンドの見られたプラスミドのみを選出し、制限酵素切断を行い目的とする DNA 断片が組み込まれていることを確認した。

#### < 遺伝子破壊 ES 細胞スクリーニング用 PCR 条件の検討 >

作製した CV をミニカラムにて精製後 *SaII* にて線状化して PCR の鋳型として用いた。使用する ES 細胞のゲノム DNA 10 ng/ $\mu$ l の溶液に CV を 0.5 fg/ $\mu$ l で加え、これを PCR の鋳型とし明瞭なバンドの増幅が見られる条件を検討した。条件の検討は LA-Taq を用いて使用する溶液の Buffer を、MgCl<sub>2</sub> 濃度を 1.5 mM, 2.0 mM, 2.5 mM としたものに加えて、GC Buffer I, GC Buffer II の合計 5 種類とした。PCR 用プライマーとして、TV の *Neo* 遺伝子側に 5 種類、*Arf1* ゲノム DNA 側に 2 種類を設定した。これら 50 種類の反応条件で検討を行った。明瞭なバンドの増幅が見られた条件に関しては、ES 細胞のゲノム DNA 10 ng/ $\mu$ l の溶液に CV を 0 fg/ $\mu$ l, 0.5 fg/ $\mu$ l, 1 fg/ $\mu$ l, 5 fg/ $\mu$ l, 10fg/ $\mu$ l を加えたものを鋳型として、CV 0 fg/ $\mu$ l ではバンドが見られず、CV 0.5 fg/ $\mu$ l, 1 fg/ $\mu$ l, 5 fg/ $\mu$ l, 10fg/ $\mu$ l で明瞭なバンドの増幅が見られる条件を選別した。

最終的に得られた条件は以下のものである。

## PCR 反応

TAKARA 社の LA-Taq を用いて行った。

### 反応条件

10xBuffer	1.5 $\mu$ l
25 mM MgSO <sub>4</sub>	1.5 $\mu$ l
dNTPs	2.4 $\mu$ l
Primer Neo2 (100 $\mu$ M)	0.075 $\mu$ l
Primer Arf 1 CV-1 (100 $\mu$ M)	0.075 $\mu$ l
鋳型	1 $\mu$ l
MiliQ 水	8.3 $\mu$ l
LA-Taq	0.15 $\mu$ l
<hr/>	
Total Vol.	15 $\mu$ l

96°C 1 min

96°C 20 sec }  
68°C 4 min } 50 サイクル

72°C 15 min

4°C

## 8. ゲノム DNA の抽出法

### <ES 細胞からのゲノム DNA 回収法>

Lysis buffer(10mM Tris-HCl(pH8.0)、150mM NaCl、10mM EDTA)を667.5  $\mu$ l加え、先端をカットしたチップでピペッティングした。10% SDSを7.5  $\mu$ l加えた。10mg/ml ProK (Sigma 社)を75  $\mu$ l加えた。55°C 8時間～オーバーナイトで 緩やかに振盪した。100ug/mlRNase A を10  $\mu$ l加え、37°C 1時間静置した。フェノールを750  $\mu$ l(RT)加え、15分間回転させて攪拌(TAITEC RT-5)した。12,000rpm で 5分間室温で遠心した。フェノール/クロロホルム処理を2回、クロロホルム処理を1回行った。イソプロパノールを750  $\mu$ l加えて、ゲノムが析出するまで上下転倒させ、3,000rpmで15分間室温にて遠心を行った。70%エタノールを1ml加え、3,000rpmで15分間室温にて遠心することを2回行い、回収した沈殿を風乾させた。200  $\mu$ lのTE(pH8.0)に溶解した (解けにくい場合は50°Cで温めるか、P200のピペットでピペッティングした。スムーズに通るようになれば解けた状態と判断した) そののちに吸光度測定と、電気泳動とで濃度を確認した。

### <マウスの尾からの DNA 回収法>

初めに個体識別用に耳に切れ目を入れたマウスの尾の先端 0.5cm 程度を切り回収した。回収した尾は、チューブに入れて-20°Cで一晩保存後、Lysis Buffer(10mM Tris-HCl(pH8)、150mM NaCl、10mM EDTA、0.5% SDS)200  $\mu$ lと Proteinase K(10 mg/ml)2  $\mu$ lを加え、しっかりボルテックスにかけて混合させ、55°Cのインキュベータで一晩反応させた。尾がばらばらに溶けたことを確認後、サンプルをフェノール処理した。TE



で飽和させたフェノール  $200\mu\text{l}$  をサンプルに加え、よく振ってフェノール層と DNA 溶液層とをよく混合させた。10,000rpm、5分遠心にかけて上清を回収した。これにイソプロピルアルコール  $200\mu\text{l}$  を加え、サンプルをゆっくり上下転倒させ、DNA 沈殿を形成させた。その後、10,000rpm、5分の遠心にかけて上清を除き、洗浄のための 75%エタノール  $200\mu\text{l}$  を加え、10,000rpm、5分遠心して上清を除いた。沈殿物(DNA)を乾燥させた後に TE $50\mu\text{l}$  を加え  $4^{\circ}\text{C}$  で一晩しっかりと溶解させた。

#### 9. サザンハイブリダイゼーションによる検出

DNA 抽出より得たゲノム DNA のうち、 $10\mu\text{g}$  分を以下の組成で制限酵素にて  $37^{\circ}\text{C}$  (使用する酵素の最適温度) で、一晩切断した。反応液は全量  $100\mu\text{l}$  とし 制限酵素を  $6\mu\text{l}$  加えて切断を行った。反応液のうち  $10\mu\text{l}$  を電気泳動して、切断が正しく行われたかを確認した。切断された DNA 溶液に TE $110\mu\text{l}$  を加え、全液量を  $200\mu\text{l}$  に合わせた。 $200\mu\text{l}$  のフェノール・クロロホルムを加えしっかりと混合させて 10,000rpm、10分の遠心にかけた。得られた上清 ( $\sim 200\mu\text{l}$ ) を回収しエタノール沈殿を行った。エタノール沈殿は、100%エタノール  $500\mu\text{l}$ 、5 M NaCl  $6.1\mu\text{l}$ 、グリコーゲン  $1\mu\text{l}$  をサンプルに加えてしっかりと混合させた後  $-80^{\circ}\text{C}$  で 30分間静置した。その後、10,000rpm、30分間、 $4^{\circ}\text{C}$  の遠心にかけて上清を除いた。沈殿に 75%エタノールを 1 ml 加え再び遠心にかけた。上清を丁寧に除いた後、沈殿が透明になるまで乾燥させ、TE $15\mu\text{l}$  (pH8) を加えて 5分間室温にて溶解させた。その後全量を 0.8%アガロースゲルで 20mA にて一晩電気泳動にかけた。翌日、EtBr 染色し写真を撮った。以後のトランスファーには  $20\times\text{SSC}$  を用いたキャピラリートランスファー法を行った

(Molecular Cloning, CSH)。使用したメンブレンは HybondN+(GE)。トランスファー後、UV クロスリンカー(Stratagene 社)にて、optimal cross link の条件で DNA を膜に結合させた。

ハイブリダイゼーションには、次の組成の Hybridization buffer を用いた。

Hybridization buffer(100ml)の組成

2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7.9ml

1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 34.2ml

これに DW を加え、70ml に合わせた。NAKARAI 社の BSA(pH5.2)を 1 g 加えて溶かした。0.5M EDTA (pH8.0) を 0.2ml 加えた後に溶液を 65°C に温めてから SDS を 7 g 加えて、温めながら溶かし、最後に 100ml にメスアップした。メンブレンをハイブリダイゼーションバッグ(13.5cm × 13.5cm)に入れて 50ml のハイブリダイゼーションバッファーを加えて 65°C で 2~8 時間振盪した。この間にプローブの標識を行った。サザン法のプローブは、TV が正しく相同組み換えによりゲノム DNA に組み込まれたかを確認するために、8kb, 4 kb の相同領域を挟む形でそれぞれ LP, SP として設定した(図 4)。LP と SP とは以下のようにして選んだ。

<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat> の Web でプローブの候補配列 500 ~ 1kbp を Blast にかけて。この Blast で全く他に相同領域が無ければプローブとしてはほぼ優良な配列であると判断した。使えるかどうかを、ゲノム DNA のサザンハイブリダイゼーションで確認した。予想されるバンドが明瞭に検出できるプローブが得られるまでにこれを行った。Neo

probe は Neo の ORF を PCR で増幅してプローブとした。

TaKaRa 社の Random Primer DNA LabelingKit Ver,2 を用いて  $\alpha$   $^{32}\text{P}$ -dCTP で標識した。BAC を鋳型にして PCR にてプローブ DNA を増幅させ、増幅した PCR 産物をゲルから切り出して  $50\text{ng}/\mu\text{l}$  にしたものの  $1\mu\text{l}$  と  $\alpha$   $^{32}\text{P}$ -dCTP(東京メディカル CRO)  $5\mu\text{l}$  を用いて標識を行った。再び、ハイブリダイゼーションバッグ( $13.5\text{cm}\times 13.5\text{cm}$ )にメンブレンとハイブリダイゼーションバッファーを加え、作成したプローブ全量を加えた。 $65^\circ\text{C}$ 、12~17 時間振盪しながら反応させた。

ハイブリダイゼーションバッグから取り出したメンブレンを、常温の  $2\times\text{SSC}$  を用いて 20 分間洗浄した。ガイガーカウンターを  $1\text{cm}$  離して測定した場合はバックグラウンドが  $100\sim 200\text{cpm}$ 、目的の位置のシグナルが  $200\sim 1000\text{cpm}$  であればこの洗浄を止めて FLA9000 にてシグナルの検出を行った。そうでない場合は、さらに常温の  $2\times\text{SSC}$  を用いて 20 分間洗浄した。次に  $65^\circ\text{C}$  の  $2\times\text{SSC}$  を用いて 30 分間洗浄し、引き続き  $65^\circ\text{C}$  の  $0.1\times\text{SSC}$  で 30 分間洗浄した。洗浄液から RI 由来の RI が検出される場合は、新しい  $65^\circ\text{C}$  の  $0.1\times\text{SSC}$  で 30 分間洗浄を加えた。

洗浄が終了したメンブレンは、ハイブリダイゼーションバッグに封入し FLA9000 にてシグナルの検出を行った。必要に応じて感光カセットケースに入れた。X線フィルム(Hyperfilm、GE 社)を載せ、さら増感スクリーンを載せて  $-80^\circ\text{C}$  で 1 晩から 5 晩感光させてから現像した。

## 9. PCR 法によるゲノムタイピング

生まれてきたマウスが特定の導入遺伝子を持っているかどうかを調べるために、マウスの尾から抽出したゲノム DNA を鋳型にして、ネオマイ

シン耐性遺伝子の配列とゲノム DNA の配列の組み合わせで破壊遺伝子を、  
遺伝子破壊により失われるゲノム DNA の配列と残るゲノム DNA 配列の  
組み合わせで野生型ゲノム配列を特異的に増幅させるプライマーセット  
を用いて各遺伝子の検出（ゲノムタイピング）を行った。

ゲノム DNA サンプルを用いて、PCR(Gene Amp 9600 PCR  
System:Applied Biosystems)で DNA の増幅を行った。

以下の組成の反応液 14  $\mu$ l に対しサンプル 1  $\mu$ l を使用した。各々の PCR  
の際に、バンドが出ることが確認されているサンプル（ポジティブコント  
ロール）とバンドが出ないことが確認されているサンプル（ネガティブコ  
ントロール）を加えた。

反応液（チューブ 1 本あたり）

MiliQ 水	11.975 $\mu$ l
Fin-Taq 添付の 10 $\times$ Buffer	1.5 $\mu$ l
Fin-Taq 添付の dNTPs	0.3 $\mu$ l
100uM プライマー(1)	0.075 $\mu$ l
100uM プライマー(2)	0.075 $\mu$ l
Fin-Taq (Fimzyme)	0.075 $\mu$ l
<hr/>	
Total Vol.	14 $\mu$ l

目的とする遺伝子により、以下のプライマーを用いた。

破壊遺伝子検出用 PCR

*SMAP1* 用

HS-2 CCTGCCCTTACCCAGACTGTCTTAG

H3 CCTCTGCTAACTCTACTCAGGTAAC

*SMAP2* 用

Neo13 CGCCTTCTATCGCCTTCTTGACG

Neo21 CTTTCCGCCTCAGAAGCCATAGAG

*Arf1* 用

Neo2 CAGTCAGTTGCTCAATGTACC

Arf1-C ACTGGTGAAACTCACCCA

野生型検出用 PCR

*SMAP1* 用

H5 GTCATCCTGGTTAGCCTCAGTCTTG

H3 CCTCTGCTAACTCTACTCAGGTAAC

*SMAP2* 用

SM2-1 CACTCGGGGTCAAGTGTGCG

SM2-3' CCAGAACCCCCTCCCCACTC

*Arf1* 用

Arf 1-A CCGTCAACAAGCCAGCAGAGTTCACAG

Arf 1-C AGACTCAGGGCACCCACAACGCGGTAG

PCR の条件は以下のものを用いた。

94°C 3min

94°C 15sec

60°C 30sec

72°C 1min

} 32 サイクル

72°C 7min

PCR の反応後、2%アガロースゲルで PCR 産物の 8 $\mu$ l を電気泳動にかけて、染色後バンドの有無を検出した。バンドが予想した位置に見られた個体には、目的の遺伝子が組み込まれていると判断した。

## IV.結果

結果は4つの章に分けて得られた結果を述べることとする。

各章ごとに、章の目的、得られた結果、章のまとめという形式で記述することとする。

## 第 1 章: SMAP2 の C 端領域は細胞内局在および Arf タンパク質特異性を支配する。

### この章の目的

SMAP1 は細胞内で、主に細胞質に存在し一部細胞膜へ集積している。一方、SMAP2 は細胞質内にドット状に存在していて、両者は明瞭に異なった細胞内局在を呈している。ArfGAP が正しく標的の Arf1-6 に働くためには細胞内の局在の制御が重要と考えられる。標的との相互作用部位や小胞形成因子との相互作用の重要性が推定されているが、多くの ArfGAP でその細胞内局在を決める機構や部位に関してはほとんど分かっていない。

SMAP1 と SMAP2 の ArfGAP ドメインは高い相同性があるが局在と機能は異なっている。細胞内の局在の違いが Arf タンパク質への標的特異性に寄与すると考えられるが、何によって局在が決定されるかのメカニズムは不明のままである。

この章では SMAP1 と SMAP2 の N 端領域と C 端領域のアミノ酸配列を交換したキメラタンパク質を作製することにより SMAP2 の細胞内局在と Arf タンパク質の選択に重要な C 端の領域を同定し、検討した結果について述べる。



得られた結果

## SMAP2 の C 端領域は細胞内局在および Arf タンパク質特異性を支配する

SMAP2 の細胞内局在に重要な領域を同定するため SMAP1 と SMAP2 のキメラタンパク質を作製し HeLa 細胞内での局在を共焦点顕微鏡で観察した。(図 5) HA-SMAP2 は多数の点状に分布し、HA-SMAP1 は細胞質全体と細胞膜に拡散した (図 5-1,2)。

SMAP1 と SMAP2 の ArfGAP ドメインは高い相同性を示す (85% アミノ酸相同)(16,17)。そこで HA-SMAP1 (aa 1-130)-SMAP2 (aa 126-428) キメラを作製した。ArfGAP ドメインは SMAP1 由来で、残りは SMAP2 に由来する。HA-SMAP1 (aa 1-130)-SMAP2 (aa 126-428) の細胞内局在は HA-SMAP2 と似ている(データを示さず)。これは SMAP2 の局在は ArfGAP ドメインではなく C 端領域によって決定されていることを示している。

ゴルジ体への ArfGAP2/3 の局在は COPI コートマー相互作用ドメインに依存することが示されている(24)。これはコートタンパク質との相互作用が Arf GAP の細胞内局在に重要である可能性があることを示している。SMAP2 にはクラスリン結合領域がコートタンパク質結合ドメインとして存在し、これらのドメインが ArfGAP2/3 の対応する領域のように細胞内局在を制御している可能性がある (17)。そこで HA-SMAP1 (aa 1-349)-SMAP2 (aa 339-428) (図 5-3) と HA-SMAP2 (aa 1-338)-SMAP1 (aa 350-440) とのキメラを作製した (図 5-4)。ここではクラスリン結合ドメインはそれぞれ SMAP1 と SMAP2 の N 端由来である。キメラタンパク質はそれぞれの C 端のタンパク質が由来する SMAP1 と SMAP2 の局在を示した。従って ArfGAP ドメインとクラスリン結合ドメインを含む

SMAP2 の 1-338aa 領域は細胞内局在を支配しないと考えられる。キメラ解析はまた SMAP2 の 339-428aa が SMAP2 タイプの細胞内局在に必要なことも示した。

SMAP2 の 339-428aa が SMAP2 の細胞内局在に十分な情報を含むかを確かめるために 全長の SMAP2 と SMAP2 の 339-428aa を GFP の C 端に融合させ、Cos 7 内の細胞内局在を 蛍光顕微鏡で観察した(図 6)。GFP 単独では細胞全体に拡散するが (図 6-1)、全長の SMAP2 と SMAP2 の 339-428aa とを融合させたものは共に凝集したような分布を示した (図 6-2,3)。この結果より SMAP2 の C 端 339-428aa 領域は、異種タンパク質である GFP の細胞内局在支配に十分な情報を含むことが確かめられた。

SMAP1 と SMAP2 の ArfGAP ドメインは 85% の アミノ酸の相同性を示すが (17)、*in vitro* で SMAP1 の ArfGAP ドメインは基質として Arf6 に強い親和性を持ち、SMAP2 のそれは Arf1 と Arf6 に同様な親和性を持つ(15, 16)。このことは SMAP2 の局在が Arf への特異性を決定し、SMAP2 は局在が人工的に改変されれば Arf6 の GAP として機能する可能性があることを示唆している。

この仮説を確かめるため 共焦点顕微鏡下でキメラタンパク質が HeLa 細胞内でのトランスフェリンの取り込みを抑制するかどうかを観察した。以前の報告のように HA-SMAP1 はトランスフェリンの取り込みを抑制したが、HA-SMAP2 はしなかった (図 7-1,3) (15,16)。SMAP2 の C 端のアミノ酸を SMAP1 に置き換えた、HA-SMAP2 (aa 1-338)-SMAP1 (aa 350-440)キメラタンパク質はトランスフェリンの取り込みを抑制した (図 7-2)。この結果より SMAP2 の 339-428aa は標的 Arf の特異性にも重要であることが確認できた。

## この章のまとめ

SMAP1 と SMAP2 の N 端領域と C 端領域のアミノ酸配列を交換したキメラタンパク質を作製することにより SMAP2 の細胞内局在と Arf タンパク質の選択に重要な C 端の領域を同定した。

SMAP2 の 339-428aa 領域が SMAP2 タイプの細胞内局在に重要であることが明らかになった。またこの領域が標的 Arf の特異性にも重要であることを示した。従って SMAP2 の C 端領域は細胞内局在および Arf タンパク質特異性の支配に重要であるといえる。

## 第 2 章 : SMAP1 と SMAP2 との相互作用の発見と

### 相互作用に必要な SMAP1 の領域の検討

#### この章の目的

先の章で SMAP2 の C 末端側にある、従来 CALM 結合領域として知られていた領域が、SMAP2 の細胞内局在と標的 Arf の両者の特異性を担っていることを発見した。この領域の機能を理解するうえで重要と考えて、同定したアミノ酸配列と相互作用する分子の検索を行ったところ、SMAP1 が相互作用する可能性を新たに見出していた。そこで、SMAP1 と SMAP2 との相互作用の可能性の確認と、相互作用に必要な SMAP1 タンパク質の領域を探った結果に関してこの章で述べる。

#### 得られた結果

##### SMAP1 と SMAP2 との相互作用の解析

SMAP1 と SMAP2 の機能を理解するために、これらと相互作用する分子の検索を行った(16, 19)。それぞれに特異的な相互作用因子を探るために、両者の相同性が高い GAP 活性ドメイン以降の C 末端側のアミノ酸配列(SMAP2C)を、酵母ツーハイブリッドスクリーニングのベイト (GAL4 DNA 結合領域との融合タンパク質) とした。この際に、SMAP1 の配列はそれ自身のみで選択培地上に酵母が生育できるようになるために、スクリ

ーニングには用いることが出来なかった。このことは、SMAP1の配列が転写活性化能を持つことを示唆しているが、その意義に関しては現時点では不明である（未発表結果）。そこで、スクリーニングには選択培地で生育できなかったSMAP2Cのみを用いた。マウスの脳から作製したライブラリーを選別することにより、SUMO化因子のUbc9やPISA1, 3に加えて様々な相互作用因子が検出された(16, 19)。これ等に加えてSMAP1の全長配列が1つ回収された。

当初は擬陽性と考えられたために公表示に記載されなかったこの相互作用が意味のあるものであるかを検討するために、SMAP2のGAP活性ドメイン以降のC末端側のアミノ酸配列(SMAP2C)をベイトに、SMAP1とSMAP2のGAP活性ドメイン以降のC末端側のアミノ酸配列(SMAP1C, SMAP2C)を転写活性化ドメインと融合させたプレイにして、SMAP1CとSMAP2C、SMAP2CとSMAP2Cとの相互作用の有無を検討した。SMAP1CとSMAP1Cとの相互作用は、先ほど述べたSMAP1Cのベイトが単独で選択培地上で生育することから検討できなかった。

図8に示すようにSMAP1CとSMAP2Cとは相互作用を示して選択培地上で生育したが（図の上段）、SMAP2CとSMAP2Cとの組み合わせでは生育しなかったことから（図の下段）、相互作用しなかったと判断した。すなわちSMAP1CとSMAP2Cとは相互作用し得ることが明らかになった。

ArfGAPファミリーに属するサブファミリーの中にはGit1とGit2を含むGITファミリーが存在し、Git1、Git2が共通に持つドメインを用いてホモダイマー、ヘテロダイマーどちらも構成することが知られている(25-27)。このように構成された複合体がさらなる他の分子と相互作用す

ることは報告されているが、その相互作用の生理学的意味は現在のところあまり解明されていない。

次にこの相互作用にとり、両者のどの領域が重要であるかを検討した。初めに PCR 法を用いて各々の C 末端側からの欠損体を作製し、検討を行おうとした。SMAP2C の欠損を行うと単独で選択培地上で生育するために、SMAP2C 側の領域の検討を行うことは出来なかった。そこで、SMAP1C 側の検討のみを行った。SMAP1C には機能的な領域は、クラスリンと結合するクラスリン結合ボックス以外は判明していないので、C 末端から順にアミノ酸を欠失させて解析を行った(図 9)。解析結果を図 9 に示すように SMAP2C を 3 つの領域に分けて説明する。C 末端側からの欠損を行うと図 9 の C に示す領域を失ったものは相互作用するが C に加えて B の領域までも欠損すると相互作用しなくなった。このことから、B の領域が相互作用に重要であることが判った。そこで B の領域のみを欠損する中抜きの変異体を作製すると、予想に反してこれが相互作用を示した。さらに、B と C の領域のみでは相互作用できないことが明らかになった。これ等のことを総合すると、SMAPC との相互作用は SMAP1C の A, B, C 3 つのドメインが、A 領域と、少なくとも B 又は C 領域の一方とが組み合わせれば可能であることが判明した。このように、SMAP1 は SMAP2 と特徴的な形式で相互作用していることが明らかになった。

これ等の結果から、図 9 の A, B, C の領域が SMAP1C の SMAP2C との相互作用に必要な領域であることが判明した。B, C の領域では SMAP1 と SMAP2 との相同性があまり高くないことが分かる(図 10)。

## この章のまとめ

タンパク質の相互作用を検討できる酵母のツーハイブリッド法を用いて、SMAP1 と SMAP2 とは相互作用するが、SMAP2 と SMAP2 とでは相互作用が検出されないことが明らかになった。さらにその相互作用に必要な SMAP1 の領域を同定した。

## 第3章：*SMAP1*と*SMAP2*との二重欠損体は

### 胎児期早期に死亡する

#### この章の目的

先の章で *SMAP1* と *SMAP2* とがお互いに相互作用する可能性を新たに見出した。その意義に関しては今後の解析を待たなければならないが、この発見から、遺伝子レベルでも *SMAP1* と *SMAP2* とが関連する可能性、すなわち遺伝的な相互作用の存在が示唆される。そこで、既に作製した *SMAP1*、*SMAP2* 遺伝子破壊マウスを用いた交配により作製した、2つの遺伝子を同時に欠損したマウスの解析を行った結果に関してこの章で述べる。

#### 得られた結果

##### *SMAP1*と*SMAP2*とを同時に欠損するマウスの解析

*SMAP1* 欠損マウスと *SMAP2* 欠損マウスは、発生に異常は見られず外観からは正常な個体として存在する（当研究室の得ている未発表実験結果）。*SMAP1* 欠損マウスでは血液成分の軽度異常（赤血球の増加）が見られるがその他に異常は見られていない（未発表結果）。培養細胞の解析から強く予想された、トランスフェリンや E-カドヘリンのエンドサイトーシス異常に関しても、*SMAP1* 欠損マウスでは観察されなかった(18)。一方 *SMAP2* 欠損マウスはオスの精子の形態不全を示し、オスが不妊である（投稿準備中）。これらの結果から、培養細胞の解析では、その遺伝子



の欠損は細胞の小胞輸送に大きな影響を及ぼすことが予想されたものの、実際にマウスの個体レベルで遺伝子を欠損させても培養細胞で観察された現象があまり見られないことが明らかになった。また、それぞれ単独の遺伝子欠損は個体の発生には異常を引き起こさないことも明らかとなった。第2章で報告したように、SMAP1とSMAP2とは相互に関連を持っている可能性が考えられる。そこで、遺伝子欠損マウスを用いて、両遺伝子の相互の関係を解析することにした。

二重欠損体を得るために、(*SMAP1*<sup>-</sup>/*SMAP1*<sup>-</sup>)のメスと(*SMAP2*<sup>+</sup>/*SMAP2*<sup>-</sup>)の交配を行い(*SMAP1*<sup>+</sup>/*SMAP1*<sup>-</sup>, *SMAP2*<sup>+</sup>/*SMAP2*<sup>-</sup>)のマウスを得た。このマウスと(*SMAP1*<sup>-</sup>/*SMAP1*<sup>-</sup>)マウスとの交配から(*SMAP1*<sup>-</sup>/*SMAP1*<sup>-</sup>, *SMAP2*<sup>+</sup>/*SMAP2*<sup>-</sup>)のマウスを得た。  
(*SMAP1*<sup>-</sup>/*SMAP1*<sup>-</sup>, *SMAP2*<sup>+</sup>/*SMAP2*<sup>-</sup>)マウス同士の交配を行い、離乳したマウスの遺伝子型をPCRにて決定した(PCR法によるゲノムタイピング)。表に示すように、合計52匹の離乳後のマウスには二重欠損体(*SMAP1*<sup>-</sup>/*SMAP1*<sup>-</sup>, *SMAP2*<sup>-</sup>/*SMAP2*<sup>-</sup>)の遺伝子型を示すマウスは存在しなかった。このことからSMAP1とSMAP2との両方の遺伝子の少なくとも一方が存在しなければマウスは離乳後に存在しないことが判明した。すなわち両遺伝子はいわゆる合成致死を示すことを発見した。これは、ArfGAP間における、個体レベルでの遺伝子間の相互作用を示す初めての例である。

次に、(*SMAP1*<sup>-</sup>/*SMAP1*<sup>-</sup>, *SMAP2*<sup>-</sup>/*SMAP2*<sup>-</sup>)の遺伝子型を示すマウスは離乳期以前のどの発生段階で死亡しているかに関して、発生段階を遡り検

討を行った(表)。その結果、胚発生の時期の受精後 7.5 日胚で図 11 に示すようにやや小さめの個体を発見した。この胚を PCR 法によるゲノムタイピングにかけると、( $SMAP1^{-}/SMAP1^{-}$ ,  $SMAP2^{-}/SMAP2^{-}$ )の遺伝子型を示す胚であることが判明した。さらに 9.5 日目では( $SMAP1^{-}/SMAP1^{-}$ ,  $SMAP2^{-}/SMAP2^{-}$ )の遺伝子型を示す胚は図 11 に示すように既に死亡していることを見出した。すなわち、 $SMAP1$  と  $SMAP2$  の両遺伝子を欠損した個体は、胚のノード(くぼみ)が顕著になり頭突起と脊索が生じる時期にあたる受精後 7.5 日目から発生の遅延を示し、9.5 日目には死亡してしまうことが判明した(28)。このことは、 $SMAP1$ 、 $SMAP2$  のいずれか一方が存在することが胚の発生にとって必須であることを示している。受精後 7.5 日目には細胞の移動が顕著であり、将来の器官形成の前段階である三胚葉への分化が起こる時期であること、この時期までに異常が見られないことから、細胞の生存といった基本的な反応ではなく、細胞の移動や分化などのより高次の機能への関与が推定される。

## この章のまとめ

*SMAP1* と *SMAP2* の 2 つの遺伝子を同時に欠損するマウスは、胚発生時期の受精後 7.5 日目から異常が見られ 9.5 日目に死亡していることが明らかになった。このことから *SMAP1* と *SMAP2* の両方の遺伝子の少なくとも一方が存在しなければマウスは正常に発生しないことが判明した。これは、ArfGAP 間における、個体レベルでの遺伝子間の相互作用を示す初めての例である。また、*SMAP1, SMAP2* の初期発生過程での重要性も明らかにした。

## 第 4 章 : SMAP2 の標的 *Arf1* 遺伝子破壊マウスの作製

### この章の目的

序論で述べたように、培養細胞の研究から SMAP1, SMAP2 タンパク質の標的はそれぞれ *Arf6*, *Arf1* タンパク質と考えられている(15-17)。筆者の研究室ではこれまでに *SMAP1*, *SMAP2* の遺伝子破壊マウスを作製しその小胞輸送への効果を解析してきたが、第 3 章に一部述べたように、培養細胞での解析から得られたような小胞輸送系の異常は個体レベルでは見られていない。筑波大学の金保らにより *Arf6* の遺伝子破壊マウスが報告されているが(21)、このマウスでも小胞輸送の異常は見られていない。一方で、第 3 章で述べたように、*SMAP1* と *SMAP2* との二重変異体は発生の極めて初期で死亡することが新たに判明している(本論文)。このことは以下の 2 つの可能性を示唆していると考えられる。すなわち、1) *SMAP1*, *SMAP2* に *Arf6*, *Arf1* 以外の共通の標的が存在し、その標的は *SMAP1,2* がなくなると機能異常となりマウスが発生初期で死亡する可能性と、2) *SMAP1* と *SMAP2* は細胞内の局在が異なるが、何らかのメカニズムで一方の欠損を他方が補える可能性である。

さらに最近の *Arf1* がエンドサイトーシスにも関与するという新たな報告から(29)、*SMAP1*, *SMAP2* の標的の *Arf6*, *Arf1* にも同様のことが当てはまる可能性が考えられる。

培養細胞での研究から、*Arf1* を siRNA にてノックダウンしても、細胞内小胞輸送やゴルジ体の構造には異常が見られないが、*Arf1* に加えて、同じサブファミリーに属する。*Arf3* や *Arf4* とともに siRNA にてノックダウンすると、一部の小胞輸送系に異常が出ることが知られている(30)。

このことは、*Arf1* の機能を相補できる他の *Arf* が存在することを示唆している。さらに *Arf1* 単独の遺伝子破壊マウスでは大きな異常は見られない可能性も示唆している。

そこで、未だ報告が無い SMAP2 の標的である *Arf1* の遺伝子欠損マウスを作製し、その生理的機能とこれらの問題を解析することを目指した。

## 得られた結果

### *Arf1* 遺伝子欠損マウスの作製

図 4 に *Arf1* 遺伝子破壊の設計図をまとめた。*Arf1* の全ての翻訳領域を含む 4 つのエキソンを欠損させ、*Arf1* タンパク質の発現をなくすように計画した。

図 4 の 2 段目に Targeting Vector で示すように、遺伝子破壊用のプラスミドは 8kb と 4kb の相同領域で ES 細胞の選別に用いるネオマイシン耐性遺伝子をはさむように構築した。非相同組み換え体を減少させるために、4kb の相同領域の下流に、相同組み換えが起こればなくなるが起これなければ組み込まれて発現するようにした、細胞にとり致死効果を持つジフテリア毒の A 断片を付加しておいた。正しく相同組み換えが起こったことは、図 4 に示す 4kb の相同領域を、ネオマイシン側に設定したプライマーと *Arf1* ゲノム DNA 側に設定したプライマーによる PCR で 1 次選別を行い、さらに図 4 にあるように 8kb, 4kb の相同領域の外側に設定したサザンハイブリダイゼーション用の DNA プローブ(LP, SP)によるサザン法にて確認した。SP プローブによるサザン法では、野生型として C57BL/6 由来と

CBA 由来の 2 本のバンドが検出される。今回は C57BL/6 由来の染色体上の *Arf1* 遺伝子を破壊しているため、遺伝子破壊 ES 細胞では、CBA に由来する野生型のバンドと C57BL/6 に由来する遺伝子破壊型のバンドの 2 本が検出される。

TV を大量調整後 ES 細胞にエレクトロポレーションにて導入し、ネオマイシン耐性コロニーを生育させた。172 個のネオマイシン耐性コロニーから 8 つの PCR 陽性 ES 細胞が得られた。図 12 に示すようにサザン法にて正しく相同組み換えが起こっていることを、図 4 の LP と SP を用いて、さらに他の遺伝子部位に挿入されていないことを、図 4 のネオマイシン遺伝子を検出するプローブにて確認した。

これ等の ES 細胞のうち 3 つのクローンからキメラマウスの作製を行った。2 つのクローンからは ES 細胞の寄与率の高いキメラマウスが得られた。残りの 1 つからは寄与率の高いキメラマウスはまだ得られていない。現在再度作成中である。

得られた ES 細胞の寄与率の高いキメラマウスと C57BL/6 マウスとの交配で生まれた子供の尾から回収したゲノム DNA を遺伝子判定用 (genotyping) PCR にて解析し、子孫への破壊遺伝子の伝播を確認した。さらにサザン法により確認を行い、*Arf1* 破壊遺伝子を持つヘテロマウスが得られたことを確認した(図 13)。ヘテロマウスでは現在までに特に異常は見られていない。現在までに得られたヘテロマウスは 12 匹である。ヘテロマウスが交配可能になったので、ホモ欠損体を作製するために *Arf1* ヘテロ欠損体マウス同士の交配を行い、*Arf1* ホモ欠損体がどのような表現型を示すかを検討した。最初に生まれ離乳した 6 匹の子孫には *Arf1* ホモ欠損マウスが存在しなかった。

## この章のまとめ

*Arf1* 遺伝子破壊マウスの作製を試みて、*Arf1* の全ての翻訳領域のゲノム DNA 配列を欠く *Arf1* 遺伝子破壊ヘテロマウスの 2 系統の作製に成功した。

## V. 考察

本研究は、新規の ArfGAP タンパク質の SMAP1, SMAP2 を対象として、(1) SMAP2 の細胞内局在および Arf タンパク質特異性を支配するのに重要な領域の検討、(2) SMAP2 と SMAP1 との相互作用の発見と解析、及び (3) SMAP2 の標的であると考えられている Arf1 を研究することで、ArfGAP の SMAP2 の視点から細胞内小胞輸送の制御メカニズムの一端を明らかにしようとする試みである。研究の結果得られた成果の概要は以下のとおりである。

SMAP2 の細胞内局在制御に重要な領域を同定することに成功した。SMAP1 と SMAP2 の N 末端側領域と C 末端側領域とで作製したキメラタンパク質の細胞内局在解析から、SMAP2 の 339-428aa 領域が SMAP2 タイプの細胞内局在に必要であり、細胞内局在に十分な情報を含むことが明らかになった。また、この領域が標的 Arf の特異性にも重要であることを示した。

さらに、SMAP1 と SMAP2 とが相互作用することを発見し、相互作用に必要な SMAP1 の領域を同定した。1 つのコアドメインと 2 つのサブドメインとの組み合わせにより相互作用していると推測される結果を得ている。加えて、既に作製していた *SMAP1* と *SMAP2* の遺伝子破壊マウスを用いて、*SMAP1* と *SMAP2* の両方を欠損したマウスは胚の初期発生段階で死亡すること、すなわち *SMAP1, SMAP2* は少なくとも一方が存在しなければマウスの胚が正常に発生できない、非常に重要な遺伝子であることを発見した。このことは、これまで別々に考えられていた小胞輸送制御機



構間のクロストークの存在を示唆するものと考えられる。

そこで、(1) 既に作製されている SMAP1 の標的の *Arf6* 遺伝子破壊マウスとの比較と、(2) 交配により *Arf6* と、SMAP2 の標的である *Arf1* の遺伝子間の相互作用の解析を行うことを目指し、新しく *Arf1* 遺伝子破壊マウスの作製を行い、ヘテロ欠損マウスの樹立に成功した。

本論文は相互に関連がある 4 つの解析から成り立っている。これらは相互に関係はあるものの異なる事象を扱っており、4 つをまとめて考察を行うことは難しい。したがって各々の解析ごとに詳しい考察を以下に加えることとする。その際に、相互に関連する事象についても考察を加えることとする。

### SMAP2 の C 端領域は細胞内局在および Arf タンパク質特異性を支配する

Arf タンパク質は異なる細胞内局在を示し、この区分が Arf ファミリーのメンバー間での固有な機能の進化を助けている。

従って各 ArfGAP は標的の Arf と特異的な相互作用を維持するために異なる局在をとることが予想される。しかし、細胞内局在を制御するドメインとその細胞内局在が ArfGAP の標的特異性に影響する方法は不明である。ファミリーメンバー間の ArfGAP ドメインの保存にかかわらず、ArfGAP はこのドメインとは別に短い配列を共有する。従って ArfGAP の他の領域を解明する試みが必要である。

SMAP1 (Small ArfGAP protein 1) と SMAP2 は新規の ArfGAP である (15,16)。それぞれは膜輸送の異なる経路に関与する。異なる細胞内局在と *in vivo* での異なる Arf アイソフォーム (SMAP1 は Arf 6、SMAP2 は Arf1) の選択は両者の機能の違いの原因であるかもしれない (17)。異なる細胞内局在は違いを生じさせる原因の一つであると考えられるが、局在が決定される機構は不

明のままである。

本研究において筆者らは SMAP2 の 339-428aa が SMAP2 の本来の細胞内局在の支配に重要であることを示した。我々は また ArfGAP ドメインとクラスリン結合ドメインとの両方は SMAP2 の細胞内局在支配に不必要であることも示した。加えてこの領域が SMAP2 の標的 Arf タンパク質の特異性に重要であることを確認した。同定した領域中で SMAP1 と SMAP2 で異なるアミノ酸領域は SMAP2 の細胞内局在の確立に重要な役割を果たす可能性がある。

この可能性を、進化の観点から探るために SMAP1 と SMAP2 の相同でないアミノ酸配列を他の種と比較したところ、これがヒト、マウス、イヌ、ラット間でよく保存されていることを見出した。従ってどれが重要であると予測することはできなかった。さらにこの領域で細胞内局在を制御するアミノ酸配列は知られていない。一方、同定された SMAP2 の 339-428aa は CALM (clathrin-assembly protein-like lymphoid-myeloid) と相互作用することが知られている(16)。しかし SMAP2 と CALM の細胞内局在は異なっている。そのうえ CALM の細胞内局在は Cos 7 細胞に SMAP2 と共発現されたとき SMAP2 の影響を受けて本来とは異なる分布を示していた(16)。それゆえ、CALM は SMAP2 の局在を制御する候補ではないと考えられる。

筆者らは SMAP2 の 339-428aa が単独で SMAP2 の局在を支配することが可能で、ArfGAP ドメインもクラスリン結合ドメインも SMAP2 の細胞内局在制御に関与しないことを示した。従って SMAP2 は細胞内局在には ArfGAP2/3 と異なる機構を使っていると考えられる(24)。このキメラ解析において筆者らはまた SMAP2 の 339-428aa が SMAP2 の標的 Arf 特異性に重要であることも示した。SMAP2 の ArfGAP ドメインは SMAP1 の 350-440 aa と融合されたときはトランスフェリンの取り込みを抑制し、SMAP2 の 339-428aa と融合されたときは

抑制しなかった。これは SMAP2 の ArfGAP ドメインは人工的に局在を改変すれば Arf6 の GAP として働くことを示唆している。我々の結果は従来推定されていた ArfGAP の標的特異性に対する細胞内局在の重要性を確かめたといえる。

同定したアミノ酸配列がどのようにして細胞内局在を決定しているのか、またその結果としての SMAP2 の標的特異性を解明するためには、この配列に相互作用するタンパク質を同定する必要がある。現在、この方向で研究を進めている。

SMAP1 に関しても SMAP2 と同様な解析を行い、キメラ分子解析では SMAP2 で同定した配列に相当する SMAP1 の配列が細胞内分布に重要であるという結果を得ているが、GFP との融合実験からはこの部分では不十分であるという結果を得ている(未発表データ)。よく似たファミリータンパク質であるが、両者の細胞内局在機構は少し異なっているようである。

## SMAP1 と SMAP2 との相互作用の発見と SMAP2 との相互作用に必要な SMAP1 の領域

タンパク質の相互作用を検討できる酵母のツーハイブリッド法を用いて、SMAP1 と SMAP2 とは相互作用するが、SMAP2 と SMAP2 とでは相互作用が検出されないことを新たに見いだした。従来の培養細胞を用いた解析からは、細胞内の局在も標的の Arf も異なる SMAP1 と SMAP2 の間には、特段の関係は想定されていなかったことから考えると、大変興味深い発見であると考えている。これは、同じ ArfGAP ファミリーに所属するファミリーメンバー間での相互作用を示した初めての例である。さらにその相互作用に重要な SMAP1 の領域を見出し、特徴ある相互作用機構に関しても一部明らかにした。さらに詳しい解析を行うために、相互作用に必要な最小の領域の決定と、この相互作用が培養細胞レベルでも見られる

かどうかの検討を現在行っている。

図 9 に示すように、SMAP1 の ArfGAP ドメイン以降の C 末端領域が相互作用に重要であり、さらにこの領域は図の A, B, C の 3 つに分けられる。すなわち相互作用に不可欠な A 領域と、A との組み合わせで相互作用に必要となる B 又は C の領域に分けられることが判明した。しかし、SMAP1 に関しては、ArfGAP ドメインとクラスリン結合領域の 2 つしか機能ドメインは知られておらず、これら A, B, C の領域の意味するところは現在のところ不明である。A 領域が結合の基本となり、結合の安定化に B 又は C 領域が必要となるのかも知れないが、現在の知見からでは適当なモデルは不明である。今回はそれぞれの欠損体の相互作用を酵母の増殖の有無でのみ判断している。しかし、今回のように一見すると複雑なドメインの組み合わせによる相互作用の場合は、各ドメインがどの程度寄与するのか、すなわち各々の結合の強さの差を測定する必要があると考えられる。幸い、筆者の使用した酵母の系では、分泌性の LacZ タンパク質が相互作用の強さに応じて生産される系であるので、LacZ 活性の測定を行うことにより、ある程度の相互作用の強さを測定することが可能である。今後、今回検討した相互作用に関して、その強さを測定することにより、相互作用のメカニズムを推定できないか、検討中である。

構造は機能であるという言葉があるように、筆者が今回発見した結合に関与するドメインの働きを推定するうえで、その立体構造を知ることは理解の助けになると考えられる。NMR にて構造解析を行うに当たってあらかじめ構造の感触を得るために作られた簡単な立体構造予測のソフトを用いると、今回同定したこれ等の領域は単独では特に決まった構造をとらないことが予想された。SMAP1 と SMAP2 との混合物の構造解析等を行

えば、その結合メカニズムの一端が明らかになると考えられるが、現時点では次の解析へ進むためには不明の点が多い。そこで、今後の解析を行うにはまずは結合に必要な最小領域の決定が不可欠だと思われる。加えて、結合に必要な最小領域がどのような機能を果たしているかの知見は、その結合の機構の理解のみならず、結合の機能の理解にも役立つと考えられる。

最近共同研究者の今井（奈良女子大学・渡邊研究室）が、培養細胞を用いて SMAP1 と SMAP2 との共局在に関する解析を行っている（未発表データ）。それによると、SMAP1 と SMAP2 とが培養細胞内で共局在するためには、筆者が発見した SMAP2 の細胞内局在に必要な配列と、この配列に対応する場所にある SMAP1 の配列が重要であるという興味深い結果が得られた。筆者が用いた、N 端側と C 端側の由来の異なるキメラタンパク質を用いると、たとえ N 端側が SMAP1 に由来しても C 端側が SMAP2 であれば SMAP1 と共局在するという結果を得ている。つまり、SMAP2 の細胞内局在を決定している領域は、同時に SMAP1 との共局在にも働くという可能性が示唆される。また、それ自身では細胞内局在を決定するのに不十分と考えられた SMAP1 の領域も、共局在化には働いていると考えられる結果を得ている。今後は、GFP との融合タンパク質などを用いて、筆者が同定した領域のみで共局在がみられるかを検討する必要があると考えている。

単独で培養細胞に過剰発現させた場合は、SMAP1 と SMAP2 の両者は異なる細胞内分布を示すにも関わらず、同時に発現させた場合には SMAP1 の細胞内局在が影響を受け、あたかも SMAP2 の局在場所に引き寄せられるかのような結果は奇妙である。目下のところ、良い抗体が存在しないため、内在性の SMAP1 と SMAP2 との細胞内の局在は不明である。

また、筆者の酵母での解析からは両者の結合が予想されるが、今井の結果では共局在のみを見ており、実際に培養細胞内で *SMAP1* と *SMAP2* との両者が結合（複合体を形成）しているかについては不明であり、今後の課題である。*SMAP1* と *SMAP2* との相互作用、細胞内での共局在は、過剰発現系における人工産物なのか、何らかの生理現象を反映したものであるのかは、今後内在性の *SMAP1*, *SMAP2* の挙動を解析することで明らかにする必要があると考えている。

以上に述べたことから、今回筆者が発見した両者の相互作用の生理学的な意義に関しては、現時点では明らかでない。上述したような解析に加えて、第3章で解析した遺伝的な相互作用と絡めた今後の解析とでその重要性が解明されることが期待される。

### *SMAP1* と *SMAP2* との二重欠損体は胎児期早期に死亡する

*SMAP1* と *SMAP2* とがお互いに分子レベルで相互作用する可能性を新たに見出したが、前述したようにその意義に関しては今後の解析を待たなければならない。しかし、この発見から遺伝子レベルでも *SMAP1* と *SMAP2* とが関連する可能性、すなわち遺伝的な相互作用の存在が示唆された。そこで、筆者の所属する研究室で既に作製していた *SMAP1*, *SMAP2* それぞれの遺伝子破壊マウスを用いて、交配により2つの遺伝子を同時に欠損したマウスを作製して、両遺伝子間の相互の関係の解析を行った。その結果、各々単独の欠損では発生に異常を示さないにもかかわらず、*SMAP1* と *SMAP2* の2つの遺伝子を同時に欠損するマウスは、胚発生段階の7.5日目から異常が見られ9.5日目に死亡していることを発見した。このことから *SMAP1* と *SMAP2* との両遺伝子の、少なくとも一方が存在

しなければマウスは正常に発生しないことが判明した。これは、ArfGAP間における、個体レベルでの遺伝子の相互作用を示す初めての例である。また、*SMAP1*と*SMAP2*とがマウス個体の発生にとりきわめて重要な働きをしていることを示している。

今回見いだされた結果からは以下の2つの可能性が示唆される。すなわち、1) *SMAP1*, *SMAP2*に *Arf6*, *Arf1* 以外の共通の標的が存在し、その標的は *SMAP1,2* がなくなると機能異常となりマウスが発生初期で死亡する可能性と、2) *SMAP1* と *SMAP2* は細胞内の局在が異なるが、何らかのメカニズムで一方の欠損を他方が補える可能性である。

これら2つの可能性に関しては、*SMAP1* は細胞質全体に分布しており、*SMAP2* は細胞質にドット状に特徴的な分布していることから、お互いの一部は細胞内の同じ位置に存在することが考えられる。するとその場所では、共通の標的に作用している可能性がある。この際に第2章で報告した両者の相互作用がどのような意味を持つかは興味を持たれるところである。Gitと同様に複合体を形成することにより、新しい分子と高次の複合体を形成して、*SMAP1*, *SMAP2* に共通の標的に作用するのかもしれない。この際に、一方が欠損しても問題が生じないことから、複合体の形成特異的な標的が存在するわけではないと考えられる。複合体を別にしても、*SMAP1* と *SMAP2* とは本来 ArfGAP であるので Arf あるいは Arf に似たタンパク質が共通の標的になっていることが考えられる。事実 Arf-like タンパク質の存在が知られている(31-37)。そこで *SMAP1*, *SMAP2* 二重欠損マウスと同様な表現型を呈する遺伝子欠損体が存在しないかどうかを検討した。その結果、ゴルジ体で働いていることが推定されていた *Arfrp1* の欠損マウスが *SMAP1*, *SMAP2* 二重欠損マウスに似た表現型を

呈することを見出した(図 14)。*Arfrp1* の欠損マウスの解析により、このマウスでは細胞接着分子の E-カドヘリンのエンドサイトーシス異常が原因となり胎生致死が引き起こされていることが明らかになっている(32, 37)。このことは、*SMAP1* が培養細胞レベルの解析から E-カドヘリンのエンドサイトーシスと関わっていることや(18)、*SMAP2* がゴルジ体とエンドソームとの間の小胞輸送に関わっていることを考えると、*SMAP1*, *SMAP2* 二重欠損マウスでも *Arfrp1* 欠損マウスと似た現象が引き起こされている可能性が高いと思われる。このことを明らかにするためには、*SMAP1*, *SMAP2* 二重欠損マウスにおける E-カドヘリンのエンドサイトーシス異常の有無を含めて、*SMAP1* と *SMAP2* とが同時に欠損することで起こる現象の検討を胚の解析で行うことが必要であろう。また、*SMAP1*, *SMAP2* 二重欠損マウス細胞において、細胞内小胞輸送の異常が生じているかどうかの解析を行うことも急務であると思われる。しかし、受精後 8 日前後で胚が死亡してしまうために細胞株の樹立はかなり困難である。そのため、所属研究室で作成した *SMAP1* のコンディショナル遺伝子破壊マウスを用いて発生早期の致死を回避し、*SMAP1* と *SMAP2* の 2 つの遺伝子を同時に欠損する組織で生じる現象、すなわち組織特異的な効果の検討を行うことが最善であると考えられる。例えばエンドサイトーシスの盛んな上皮組織や小胞形成が盛んな神経細胞などの特徴的な組織で Cre を発現させるトランスジェニックマウスの K5-Cre-TG マウスや Nestin-Cre-TG, Synapsin-Cre-TG マウスなどを既に保有しているので、これらのマウスとの交配から上皮や神経細胞特異的に *SMAP1*, *SMAP2* の二重欠損細胞を作成して生理機能の解析を行うことが可能である。加えて、現在のままでは死亡時期が早すぎて培養細胞の樹立が困難であることか



ら、例えば *SMAP1* のコンディショナル遺伝子破壊マウスと *SMAP2* 欠損マウスとの交配から得られるマウスの胎児からマウス胚性繊維芽細胞を樹立後に、外来性の Cre 遺伝子組み換え酵素を発現させ *SMAP1*, *SMAP2* を同時に欠いた培養細胞の樹立を行う事は、細胞レベルで分子機能の解析を行う上で有効な方法と考えられる。*SMAP1*, *SMAP2* の二重欠損細胞が樹立できれば、これまで細胞で行われてきた解析をもとに、欠損細胞レベルでの解析が可能になることから格段に解析が進むことが期待される。このような解析から、*SMAP1*, *SMAP2* の生理的な機能が明らかになることが期待される。

以上に加えてさらに次のような論点も存在する。先にあげたように、*SMAP1* と *SMAP2* は細胞内の局在が異なるが、何らかのメカニズムで一方の欠損を他方が補える可能性である。

例えば、一方が失われた際には他方の細胞内分布が変化してもう一方の機能を補うことができるのかもしれない。これは、第1章で示したように、*SMAP* の標的 Arf の選択制は *SMAP* の細胞内局在を変化させることにより変えうるという結果からも支持される。*SMAP2* の ArfGAP ドメインが *SMAP1* と同様の機能を果たしうることは示しているので、*SMAP1* の ArfGAP ドメインが *SMAP2* と同様の機能を果たしうるのかを調べることで、この可能性を検討できるのではないかと考えている。また、細胞内局在を支配する配列が、両者の相互作用にも関与していることも関係があるかもしれない。このような観点で、遺伝子の相互作用を明らかにしたいと考えている。また、筋肉細胞の分化を誘導する MyoD 転写遺伝子ファミリーで知られているように、ある種のファミリー遺伝子間では、1つのファミリー遺伝子の欠損は他のファミリー遺伝子の発現亢進を引き起こし、そ

の結果失われた遺伝子の機能を相補することがある。多くは、エピジェネティックな機構により支配されていることが知られている。エピジェネティックとは、以下に示すものである。すなわち、一個体の有核細胞はどれもほとんど同じ DNA をもつため、遺伝子にもとづく機構では、選択的遺伝子発現が細胞でどのようにつくり上げられたかを説明することが出来ない。これを説明するために C.H.Waddington は発生過程における遺伝子制御についてエピジェネティックな機構を考案した。エピジェネティックな機構では、DNA の塩基配列に依存することなく遺伝形質が親細胞から子細胞へと受け継がれるため、遺伝子配列に生じた変化（突然変異）とは無関係に遺伝形質が受け継がれる(38)。

二重欠損体の個体における胎生致死の原因にはこうしたエピジェネティックな機構の関与も考慮されねばならない。すなわち、SMAP 遺伝子の欠損は他の SMAP 遺伝子の発現をエピジェネティックに亢進させ、それにより多量となった SMAP タンパク質が本来の局在に加えて、細胞内の多くの場所に局在することにより、結果として、先に述べたような SMAP の機能の代替が生じ、結果として機能の相補が行われるのかもしれない。あるいは、エピジェネティックにスプライシングが起こり、細胞内局在に重要なドメインの欠落が引き起こされて、細胞内の分布が変化するという可能性も考えられる。これらは、各々の SMAP 欠損細胞における欠損していない方の内在性 SMAP の細胞内分布を検討することで検討できると思われる。そのためにも、先に述べたように内在性の SMAP を組織化学的に検出できる抗体の作出が重要と考えられる。これらすべての可能性を統一的に説明することは目下のところ不可能である。SMAP1 と SMSAP2 に関してこのような観点からも説明可能となるよう、今後の解析が必要と

思われる。

### SMAP2 の標的 *Arf1* 遺伝子破壊マウスの作製

これまでに述べた筆者の *SMAP1* と *SMAP2* との解析から、これら遺伝子の新たな作用機構の一端が明らかになった。一方で、培養細胞の研究から *SMAP1*, *SMAP2* の標的はそれぞれ *Arf6*, *Arf1* と考えられている(15-19)。しかし、筆者の所属の研究室ではこれまでに *SMAP1*, *SMAP2* の遺伝子破壊マウスを作製しその小胞輸送への効果を解析しているが、培養細胞での解析から得られたような小胞輸送系の異常は個体レベルでは見られていない(18、未発表結果)。このような、培養細胞レベルの結果と個体レベルでの結果の不一致は *ArfGAP* だけに認められるわけではないようである。なぜならば、筑波大学の金保らにより小胞輸送、特にエンドサイトーシスに必須と考えられていた *Arf6* の遺伝子破壊マウスが報告されているが、このマウスでも小胞輸送の異常は見られていないからである(金保・私信)。培養細胞におけるノックダウンや阻害剤の実験結果はなぜ遺伝子破壊マウスでの結果を反映しないのか。この点は今後の重要な検討課題と考えられる。

一方で前述したように、*SMAP1* と *SMAP2* の二重変異体は発生の極めて初期で死亡することを新たに見いだした。このことは *SMAP1* と *SMAP2* の機能に関して以下の2つの新しい可能性を示唆している。すなわち、1) *SMAP1*, *SMAP2* に *Arf6*, *Arf1* 以外の共通の標的が存在し、その標的は *SMAP1,2* がなくなると機能異常となりマウスが発生初期で死亡する可能性と、2) *SMAP1* と *SMAP2* は細胞内の局在が異なるが、何らかのメカニズムで一方の欠損を他方が補える可能性である。

このことから考えると、さらに SMAP1, SMAP2 の標的の Arf6, Arf1 にも同様のことが当てはまる可能性がある。特に 2) の可能性に関しては、最近になって、これまで細胞膜には存在しないと考えられていた Arf1 が活性化型 (GTP 結合型) で細胞膜に存在し、Arf6 とは異なるエンドサイトーシスに関与する可能性が報告された(29)。このことから考えると、実際には、細胞内の小胞輸送制御因子はこれまで考えられていたように、特定の場所で排他的にのみ働いているわけではないのかもしれない。

そこで、未だ報告が無い SMAP2 の標的である *Arf1* の遺伝子欠損マウスを作製し、その生理的機能とこれらの問題とを解析することを目指した。そのために *Arf1* 遺伝子破壊マウスの作製を試みた。遺伝子破壊マウスを作成する際には、遺伝子が完全になくなっているか、遺伝子の発現が完全になくなっている必要がある。長いゲノム領域にまたがって存在する遺伝子の場合には最初の ATG を含むエクソンへの挿入や、既に機能が判明しているエクソンの欠損などが行われるが、いずれも作成後に遺伝子の発現が完全になくなっていない可能性があり、解析の際に問題になることがある。今回の場合は、*Arf1* の翻訳領域が 2.1 kb と比較的短いゲノム領域に存在していることから、翻訳領域の DNA 配列を全て欠く *Arf1* 遺伝子破壊マウスの系統の作製を試み、マウスを得ることに成功した。既に 2 系統の *Arf1* 遺伝子破壊 ES 細胞に由来する *Arf1* 遺伝子破壊ヘテロマウスの系統を樹立している。現在までに得られたヘテロマウスには、これまで野生型との違いは見られていない。なお、このヘテロマウスの交配を行ったが離乳した 6 匹のマウスに *Arf1* を欠損するマウス個体は存在していなかった。

最近共同研究者の宮本 (奈良女子大学・渡邊研) が行った *Arf1* 欠損マウスの解析から以下のことが明らかになってきた。ヘテロマウス同士の交

配では、受精後 12 日胚の時点で、野生型同士の交配では見られない母親マウスの退縮した子宮が観察された。正常な大きさの子宮には野生型かヘテロ型の胚が存在したが、退縮した子宮内には胚は存在していなかった。すなわち、*Arf1* ホモ欠損マウスは胎生致死である可能性が示唆された（未発表結果）。現在、どの時点でホモ欠損体が死亡しているのかを解析している。siRNA で *Arf1* をノックダウンした培養細胞実験の結果では、細胞に異常が見られなかったことから(30)、*Arf1* 欠損マウスが胎生致死であることは予想外の結果である。*SMAP1, SMAP2* とは逆ではあるが、培養細胞での解析結果と矛盾する結果が *Arf1* でも得られていることは興味深い。

また、筆者が発見した *SMAP1* と *SMAP2* との関係のように *Arf1* と *Arf6* にも遺伝的な相互作用が存在する可能性が大いに考えられる。このことを解析するために、筑波大学との共同研究を計画中で、既に作成されている *Arf6* の遺伝子破壊マウスを導入するための手配を行った。このような解析から、*Arf1* 遺伝子の生理機能と、*Arf1* と *Arf6* の遺伝的關係が明らかになる事が期待できる。

## 謝辞

本博士申請論文執筆にあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました、奈良女子大学大学院 人間文化研究科 共生自然科学専攻 渡邊利雄教授に深く感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり御指導を賜りました、奈良女子大学 理学部生物科学科 鈴木孝仁教授、鍵和田聡准教授、春本晃江教授、岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 脳神経制御学講座 生化学分野 田邊賢司助教に心より感謝を申し上げます。

本研究に対する御教示と御協力を賜りました、奈良女子大学 理学部生物科学科 荒木正介教授、佐伯和彦教授、保智己准教授、岩口伸一准教授、奈良久美准教授、坂口修一准教授、岡崎伸助教に心より感謝を申し上げます。

本研究に御協力賜りました、理学部生物科学科 渡邊研究室、保研究室の諸氏、理学部生物科学科 荒木研究室、佐伯研究室および生活環境学部 食物栄養学科 井上研究室、中田研究室の関係各位に感謝を申し上げます。

本研究には、これらの方々と書き記すことの出来ない多くの方からのご指導と御協力を賜りました。ここに改めて心よりの御礼を申し上げます。

## 参考文献

- 1) Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K, Walter P.  
Molecular Biology of the Cell. 2008, Garland Press.
  
- 2) Seto ES, Bellen HJ, Lloyd TE.  
When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways.  
Genes Dev. 2002, 16(11), 1314-1336.
  
- 3) Taner SB, Onfelt B, Pirinen NJ, McCann FE, Magee AI, Davis DM.  
Control of immune responses by trafficking cell surface proteins, vesicles and lipid rafts to and from the immunological synapse.  
Traffic. 2004, 5, 651-661.
  
- 4) Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J.  
Sorting and signaling at the Golgi complex.  
Cell. 2000, 101, 693-696.
  
- 5) Molendijk AJ, Ruperti B, Palme K.  
Small GTPases in vesicle trafficking.  
Curr Opin Plant Biol. 2004, 7, 694-700.
  
- 6) Gillingham AK, Munro S.

The small G proteins of the Arf family and their regulators.

*Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007, 23, 579-611.

7) D'Souza-Schorey C, Chavrier P.

ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond.

*Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006, 7, 347-358.

8) Inoue H, Randazzo PA.

Arf GAPs and their interacting proteins.

*Traffic.* 2007, 8, 1465-1475.

9) Nie Z, Randazzo PA.

Arf GAPs and membrane traffic.

*J Cell Sci.* 2006, 119, 1203-1211.

10) Donaldson JG.

Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane.

*J Biol Chem.* 2003, 278, 41573-41576.

11) Sabe H.

Requirement for Arf6 in cell adhesion, migration, and cancer cell invasion.

*J Biochem.* 2003, 134, 485-489.



12) Jaworski J.

ARF6 in the nervous system.

Eur J Cell Biol. 2007, 86, 513-524.

13) Sato Y, Hong HN, Yanai N, Obinata M.

Involvement of stromal membrane-associated protein (SMAP-1) in erythropoietic microenvironment.

J Biochem. 1998, 124, 209-216.

14) Obinata M, Yanai N.

Cellular and molecular regulation of an erythropoietic inductive microenvironment (EIM).

Cell Struct Funct. 1999, 4, 171-179.

15) Tanabe, K., Torii, T., Braesch-Andersen, S., Watanabe, T., and Satake, M.

A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates the clathrin-dependent endocytosis.

Mol. Biol. Cell 2005, 16, 1617-1628.

16) Natsume, W., Tanabe, K., Kon, S., Yoshida, N., Watanabe, T., Torii, T., and Satake, M.

SMAP2, a novel ARF GTPase-activating protein, interacts with clathrin and clathrin assembly protein, and functions on the

AP-1-positive early endosome/trans-Golgi-network.

Mol. Biol. Cell. 2006, 17, 2592-2603.

17) Tanabe, K., Kon, S., Natsume, W., Torii, T., Watanabe, T., and Satake, M.

Involvement of a novel ArfGAP protein, SMAP, in membrane trafficking: Implications in cancer cell biology.

Cancer Sci. 2006, 97, 801-806.

18) Kon S, Tanabe K, Watanabe T, Sabe H, Satake M.

Clathrin dependent endocytosis of E-cadherin is regulated by the Arf6GAP isoform SMAP1.

Exp Cell Res. 2008, 314, 1415-1428.

19) Tanabe K, Kon S, Ichijo N, Funaki T, Natsume W, Watanabe T, Satake M.

A SMAP gene family encoding ARF GTPase-activating proteins and its implication in membrane trafficking.

Methods Enzymol. 2008, 438, 155-170.

20) Kahn RA, Bruford E, Inoue H, Logsdon JM Jr, Nie Z, Premont RT, Randazzo PA, Satake M, Theibert AB, Zapp ML, Cassel D.

Consensus nomenclature for the human ArfGAP domain-containing proteins.

J Cell Biol. 2008, 182,1039-1044.

21) Suzuki T, Kanai Y, Hara T, Sasaki J, Sasaki T, Kohara M, Maehama T, Taya C, Shitara H, Yonekawa H, Frohman MA, Yokozeki T, Kanaho Y.

Crucial role of the small GTPase ARF6 in hepatic cord formation during liver development.

Mol Cell Biol. 2006, 26, 6149-6156.

22) Al-Awar O, Radhakrishna H, Powell NN, et al.

Separation of membrane trafficking and actin remodeling functions of ARF6 with an effector domain mutant.

Mol. Cell Biol. 2000, 20, 5998-6007.

23) Tanabe K, Takei K.

Dynamic instability of microtubules requires dynamin 2 and is impaired in a Charcot-Marie-Tooth mutant.

J. Cell Biol. 2009, 185, 939-948.

24) Kliouchnikov K, Bigay J, Mesmin B, et al.

Discrete determinants in ArfGAP2/3 conferring Golgi localization and regulation by the COPI coat.

Mol. Biol. Cell. 2009, 20, 859-869.

25) Hoefen RJ, Berk BC.

The multifunctional GIT family of proteins.

J Cell Sci. 2006, 119, 1469-1475.

26) Premont RT, Perry SJ, Schmalzigaug R, Roseman JT, Xing Y, Claing A.

The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors.

Cell Signal. 2004, 16(9), 1001-1011.

27) Kim S, Ko J, Shin H, Lee JR, Lim C, Han JH, Altmann WD, Garner CC, Gundelfinger ED, Premont RT, Kaang BK, Kim E.

The GIT family of proteins forms multimers and associates with the presynaptic cytomatrix protein Piccolo.

J Biol Chem. 2003, 278(8), 6291-6300.

28) Andras N., Marina G., Kristina V., Richard B.

Manipulating the Mouse Embryo .

2002, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

29) Kumari S, Mayor S.

ARF1 is directly involved in dynamin-independent endocytosis.

Nat Cell Biol. 2008, 10, 30-41.

30) Volpicelli-Daley LA, Li Y, Zhang CJ, Kahn RA.

Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic.

Mol Biol Cell. 2005, 16, 4495-508.

31) Burd CG, Strohlic TI, Gangi Setty SR.

Arf-like GTPases: not so Arf-like after all.

TRENDS in Cell Biology. 2004, 687-694.

32) Mueller AG, Moser M, Kluge R, Leder S, Blum M, Büttner R, Joost HG, Schürmann A.

Embryonic lethality caused by apoptosis during gastrulation in mice lacking the gene of the ADP-ribosylation factor-related protein 1.

Mol Cell Biol. 2002, 22, 1488-1494.

33) Panic B, Whyte JR, Munro S.

The ARF-like GTPases Arl1p and Arl3p act in a pathway that interacts with vesicle-tethering factors at the Golgi apparatus.

Curr Biol. 2003, 13, 405-410.

34) Shin HW, Kobayashi H, Kitamura M, Waguri S, Suganuma T, Uchiyama Y, Nakayama K.

Roles of ARFRP1 (ADP-ribosylation factor-related protein 1) in post-Golgi membrane trafficking.

J Cell Sci. 2005, 118, 4039-4048.

35) Zahn C, Hommel A, Lu L, Hong W, Walther DJ, Florian S, Joost HG, Schürmann A.

Knockout of *Arfrp1* leads to disruption of ARF-like1 (ARL1) targeting to the trans-Golgi in mouse embryos and HeLa cells.

Mol Membr Biol. 2006, 23, 475-485.

36) Zahn C, Jaschke A, Weiske J, Hommel A, Hesse D, Augustin R, Lu L, Hong W, Florian S, Scheepers A, Joost HG, Huber O, Schürmann A. ADP-ribosylation factor-like GTPase ARFRP1 is required for trans-Golgi to plasma membrane trafficking of E-cadherin.

J Biol Chem. 2008, 283, 27179-27188.

37) Nishimoto-Morita K, Shin HW, Mitsuhashi H, Kitamura M, Zhang Q, Johannes L, Nakayama K.

Differential effects of depletion of ARL1 and ARFRP1 on membrane trafficking between the trans-Golgi network and endosomes.

J Biol Chem. 2009, 284, 10583-10592.

38) Strachan T, Read A. P.

Human Molecular Genetics. 2004, Garland Publishing.

表

SMAP1、SMAP2二重欠損体は発生の初期に異常を呈し  
 離乳後にSMAP1、SMAP2二重欠損体は存在しない

遺伝子型

発生段階	(SMAP1 <sup>-</sup> /SMAP1 <sup>-</sup> SMAP2 <sup>+</sup> /SMAP2 <sup>+</sup> )	(SMAP1 <sup>-</sup> /SMAP1 <sup>-</sup> SMAP2 <sup>+</sup> /SMAP2 <sup>-</sup> )	(SMAP1 <sup>-</sup> /SMAP1 <sup>-</sup> SMAP2 <sup>-</sup> /SMAP2 <sup>-</sup> )
P28	19	35	0
E12.5	3	11	(5)
E9.5	2	5	2

受精後9.5日にはSMAP1、SMAP2二重欠損体が存在するが、  
 12.5日には胚が存在せず、退縮した子宮が見られた。( )内にその数を示す。  
 誕生後の離乳期にはSMAP1、SMAP2二重欠損体は存在しない。

## 図の説明

### 図 1 : Arf は小胞輸送を制御する

良く解析されている Arf1 と Arf6 とが関与する小胞輸送を模式的に表した。Arf1 は被覆タンパク質として COPI や clathrin を用い、Golgi から ER(Endoplasmic Reticulum) への小胞輸送と TGN(Trans Golgi Network) とエンドソーム間の小胞輸送を制御していると考えられている。一方 Arf6 は細胞膜の周辺に存在し、被覆タンパク質として clathrin を用い、細胞膜とエンドソーム間の、エンドサイトーシス等の小胞輸送を制御していると考えられている。

### 図 2 : Arf GAP ファミリーメンバーの模式図

Arf GAP ファミリーメンバーの代表的な分子の模式図を示した。全てのファミリーメンバーは Arf GAP ドメイン(ArfGAP)に加えて、他の分子と相互作用する様々なドメインを持つ。SMAP1 はクラスリン、SMAP2 はクラスリンとクラスリン集合因子の CALM との結合ドメインを有する初めての Arf GAP である。

図中の略語は以下である。ArfGAP, ArfGAP domain; CB, clathrin box; CALM BD, CALM-binding domain; A, ankyrin repeat; SHD, spa homology domain; PBS2, paxillin binding sequence 2; CC, coiled coil domain; PH, pleckstrin homology domain; PRD, proline rich domain; (E/DLPPKP)8, eight repeats of the sequence E/DLPPKP; SH3, Src homology 3 domain ; SAM, sterile-motif domain; RhoGAP, RhoGAP



domain; GLD,GTP-binding protein-like domain

図 3: SMAP1、SMAP2 の関与する小胞輸送部位の模式図

SMAP1 はトランスフェリンや E-カドヘリンのエンドサイトーシスなど、細胞膜 (Plasma membrane) 付近の小胞輸送と深く関与していることが報告されている。また SMAP2 は Early endosome (初期エンドソーム) と Trans Golgi Network (トランスゴルジ網) との輸送に関与している可能性が明らかになっている。

図 4: *Arf1* 遺伝子破壊遺伝子座を作成するための設計図

*Arf1* の翻訳領域は 4 つのエキソンに渡っており図に示した ORF+ $\alpha$  の 2.1kb の領域に含まれている。この領域を遺伝子破壊細胞の選別マーカー遺伝子であるネオマイシン耐性遺伝子(neo)の発現単位と置き換える形での遺伝子破壊を計画した。遺伝子を破壊するために、図に示した Targeting Vector(TV)を作成した。相同組み換えを起こすためのゲノムの相同領域は上流 8 kb、下流 4 kb とした。正しく組み換えが起こり、予想した *Arf1* の遺伝子座に TV が組み込まれたかは、初めに 4 kb 側の相同領域を挟んで、組み込まれる neo 遺伝子側と受けて側のゲノム DNA の配列とにプライマーを設定した PCR にて確認する。そのために、図最下段に示す Control Vector(CV)を作成し条件を設定する。

PCR にて、4 kb 側で正しく組み換えが起こったと考えられる ES 細胞に関して、図に LP, SP で示した DNA 配列をプローブとしたサザンハイ

ブリダイゼーションで確認する。正しく組み込まれれば LP で野生型 20.3 kb、遺伝子破壊型 (KO 型) 14.9 kb が、SP で野生型 18.3 kb、遺伝子破壊型 (KO 型) 11.3 kb が、neo で 9.5 kb のバンドが検出されるはずである。この図では B6 マウスのゲノム情報をもとに設計図を作成している。使用した ES 細胞 TT2 は B6 と CBA の雑種 ES 細胞であるので SP で B6 由来の 18.3 kb に加えて CBA 由来の 4 kb のバンドが検出される。

#### 図 5 : SMAP1 と SMAP2 の派生体の細胞内局在

SMAP1 と SMAP2 の全長とキメラ体の cDNA を HeLa 細胞に導入し、免疫蛍光染色して共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールは 4 に示した。

Bar は 20 $\mu$ m。

1. 全長の SMAP2 SMAP2(1-428aa)
  2. 全長の SMAP1 SMAP1(1-440aa)
  3. SMAP1 と SMAP2 の N 端と C 端の領域を交換して作製したキメラタンパク質。SMAP1(1-349aa)-SMAP2(339-428aa)
  4. SMAP1 と SMAP2 の N 端領域と C 端領域のアミノ酸配列を交換して作製したキメラタンパク質。SMAP2(1-338aa)-SMAP1(350-440aa)
- 模式図中の Arf GAP, CB, CALM-B はそれぞれ Arf GAP ドメイン, クラスリン結合領域, CALM 結合ドメインを示す。

図 6: SMAP2 の 339-428aa と GFP の融合タンパク質は全長の SMAP2 と融合した GFP タンパク質と似た細胞内局在を示す

各融合タンパク質遺伝子を Cos-7 細胞にトランスフェクションし蛍光顕微鏡で観察した。スケールは 3 に示した。Bar は 20 $\mu$ m。

1. GFP
2. GFP-SMAP2(1-428aa)
3. GFP-SMAP2(339-428aa)

図 7: キメラタンパク質 SMAP2 (1-338aa)-SMAP1 (350-440aa)は HeLa 細胞でのトランスフェリンのエンドサイトーシスを抑制する

各プラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクションし、細胞を Alexa488-Tfn と共に 15 分培養後、固定し、免疫蛍光染色処理を行い、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。スケールは 3 に示した。Bar は 20  $\mu$ m。

1. SMAP1 (1-440aa)
2. SMAP2 (1-338aa)-SMAP1 (350-440aa)
3. SMAP2 (1-428aa)

図 8: SMAP1 と SMAP2、SMAP2 と SMAP2 との相互作用の検討

SMAP1、SMAP2 の Arf GAP ドメインを除いた部分 (SMAP1C と SMAP2C と表記) での相互作用の有無を酵母のツーハイブリッド法にて検討した。上段の SMAP1C と SMAP2C とは選択培地 (-Trp, -Leu, -His, -Ade) 上で生育したことから相互作用を示したと判断した。一方、下段の SMAP2C と SMAP2C との組み合わせでは選択培地上で生育できなかった。

図 9： SMAP1 と SMAP2 との相互作用に必要な領域の検討

SMAP1 の Arf GAP ドメインを除いた SMAP1C(129-440aa)では機能的な領域は、クラスリンと結合するクラスリン結合ボックス以外に判明していない。そこで、C 末端から順にアミノ酸を欠失させて解析を行った。カッコ内は SMAP1 のアミノ酸の位置番号を示している。図の下に書いた線の A, B, C はそれぞれアミノ酸で、A(129-367), B(368-386), C(387-440)を示している。さらに、図の B, C 領域のみを有するものや、B 領域のみを欠くなどの様々な SMAP1 の欠失変異体を作成し、SMAP2 との相互作用を検討した。選択培地上で生育した場合は+、しなかった場合は-で表記した。

図 10： SMAP1 と SMAP2 とのアミノ酸配列の比較

SMAP1 と SMAP2 のアミノ酸の配列を比較した。SMAP2 を 4 つの領域に分けると Arf GAP 領域では SMAP1 との相同性が高いが、その他の領域では相同性があまり高くなく、黒塗りの同一アミノ酸領域も狭いことが分かる。A 領域を青、B 領域を黄緑、C 領域を赤で示した。

図 11： 受精後 7.5 日、9.5 日で胚の異常が観察される

向かって左が SMAP1、SMAP2 二重欠損胚（矢印で示した）、右は SMAP1 が欠損し、SMAP2 がヘテロ欠損体の胚である。

上段が受精後 7.5 日目、下段が 9.5 日目の胚である。7.5 日で胚が小さいことがわかり、9.5 日目では発生が正常に起こらずに死亡しているこ

とが分かる。

図 12: サザンハイブリダイゼーションによる ES 細胞の相同組み換えの確認

PCR にて 4 kb 側で正しく相同組み換えが起こったと考えられた ES 細胞に関して、図に LP, SP で示した DNA 配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションで確認した。予想したように、1 つの ES 細胞以外で、*Arf1* 遺伝子が破壊されたヘテロ体の ES 細胞で検出されると予想される、LP で野生型 20.3 kb、遺伝子破壊型 (KO 型) 14.9 kb のバンド、SP で野生型 18.3 kb、遺伝子破壊型 (KO 型) 11.3 kb、neo で 9.5 kb のバンドがそれぞれ検出された。レーンに向かって左から 4 つ目の ES 細胞のみが正しく組み換えが起こっていなかったことが判明した。使用した ES 細胞 TT2 は B6 と CBA の雑種 ES 細胞であるので SP で B6 由来の 18.3 kb に加えて CBA 由来の 4 kb のバンドが検出されている。

図 13: *Arf1* 破壊遺伝子が伝わった子孫の確認

ES 細胞から作製したキメラマウスと B6 マウスとを交配させ生まれた子供の遺伝子型を PCR にて確認した。*Arf1* KO 遺伝子座を持つと判断されたマウスのゲノム DNA を SP プローブでのサザンハイブリダイゼーションにて確認した。

向かって左から、野生型 ES の TT2 細胞、キメラマウス、キメラマウスと B6 マウスとの交配から生まれた F1 マウス。予想されるように、B6 の野生型と遺伝子破壊型 (KO 型) の 2 つのバンドが検出された。

図 14: *SMAP1*、*SMAP2* 二重欠損体と *Arfrp1* 欠損胚との比較

上段が *SMAP1*、*SMAP2* 二重欠損体の 7.5 日胚で、下段が *Arfrp1* 欠損胚を示す。胚の大きさに加えて、両者の形態が一部似ていることが分かる。

A,C は野生型と同じ形態の胚。B,D はヘテロ同士の交配でのみ見られる形態が野生型とは異なる胚。

图 1

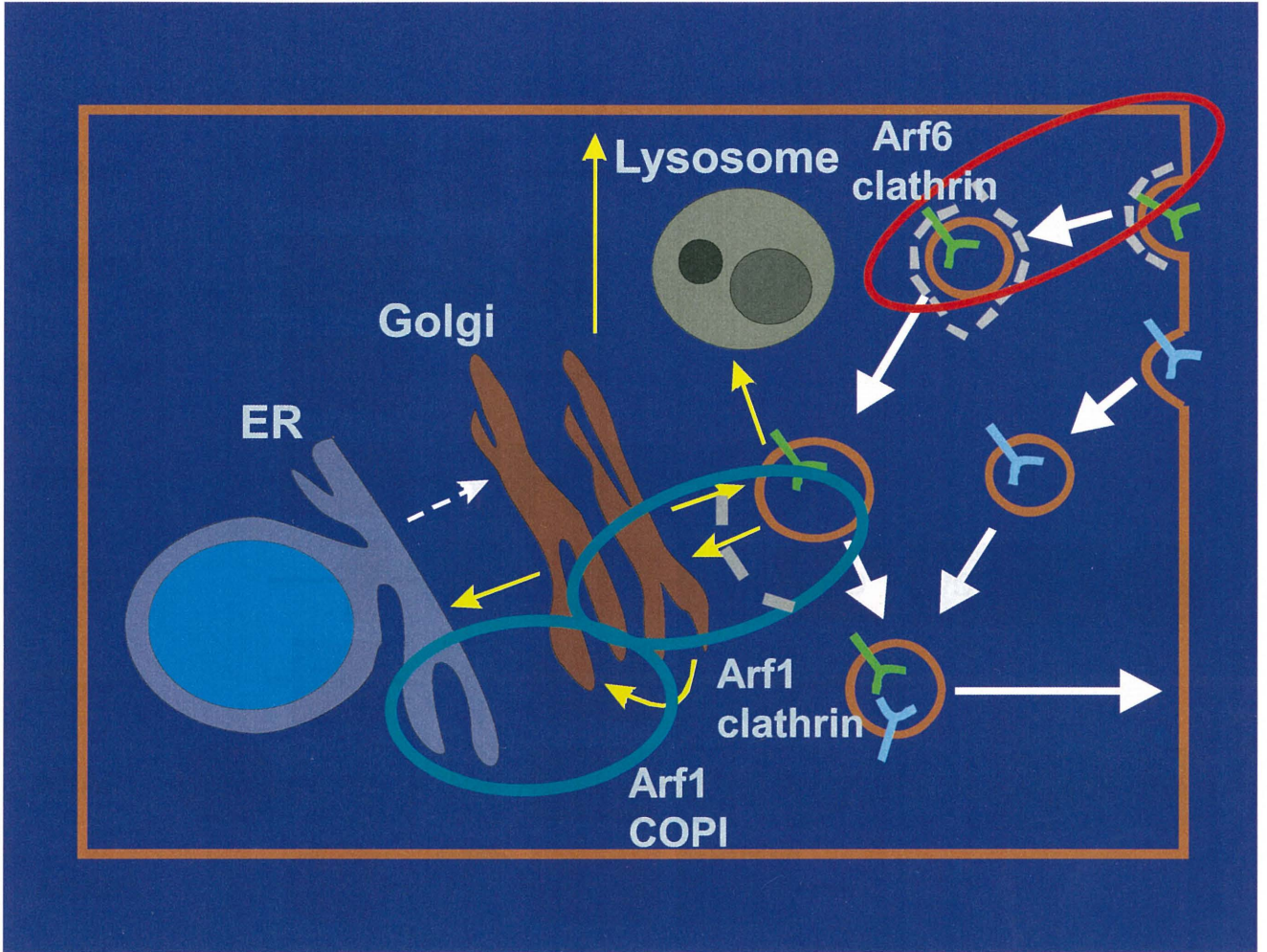
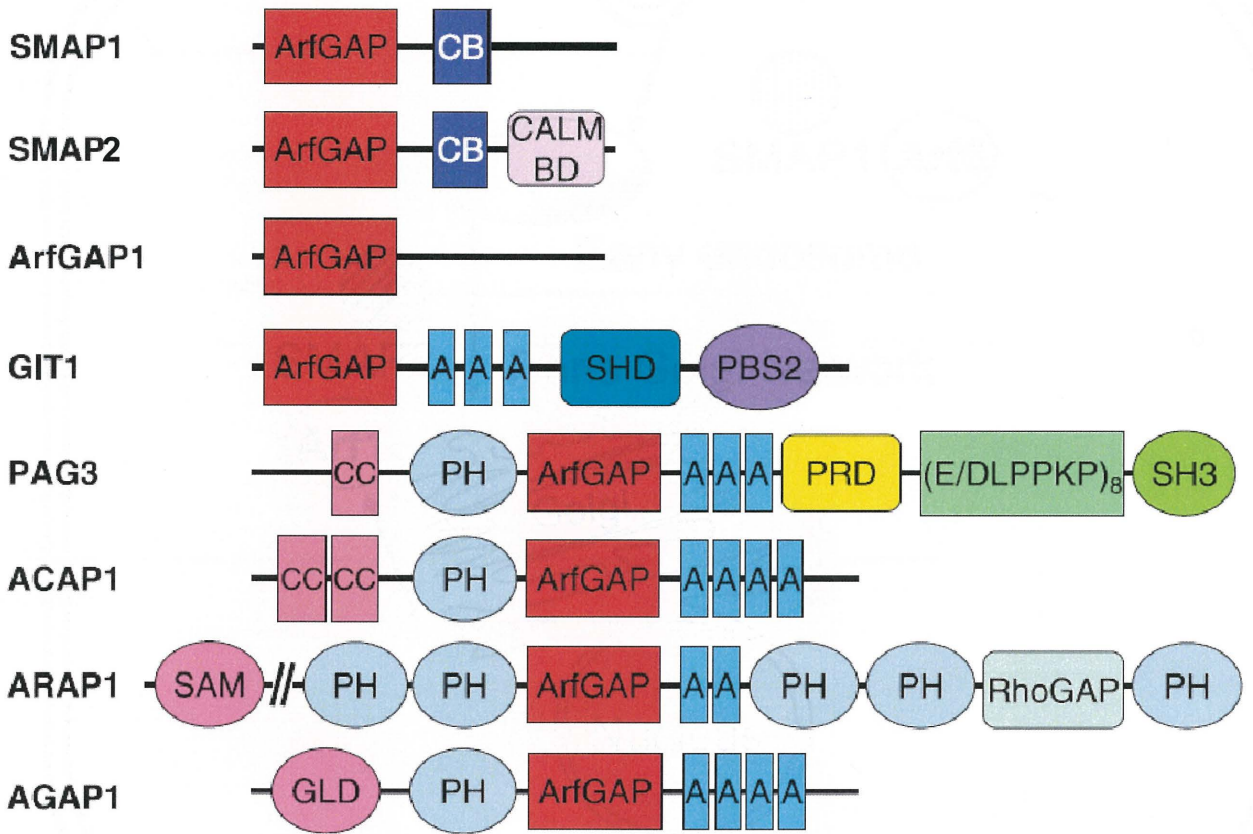
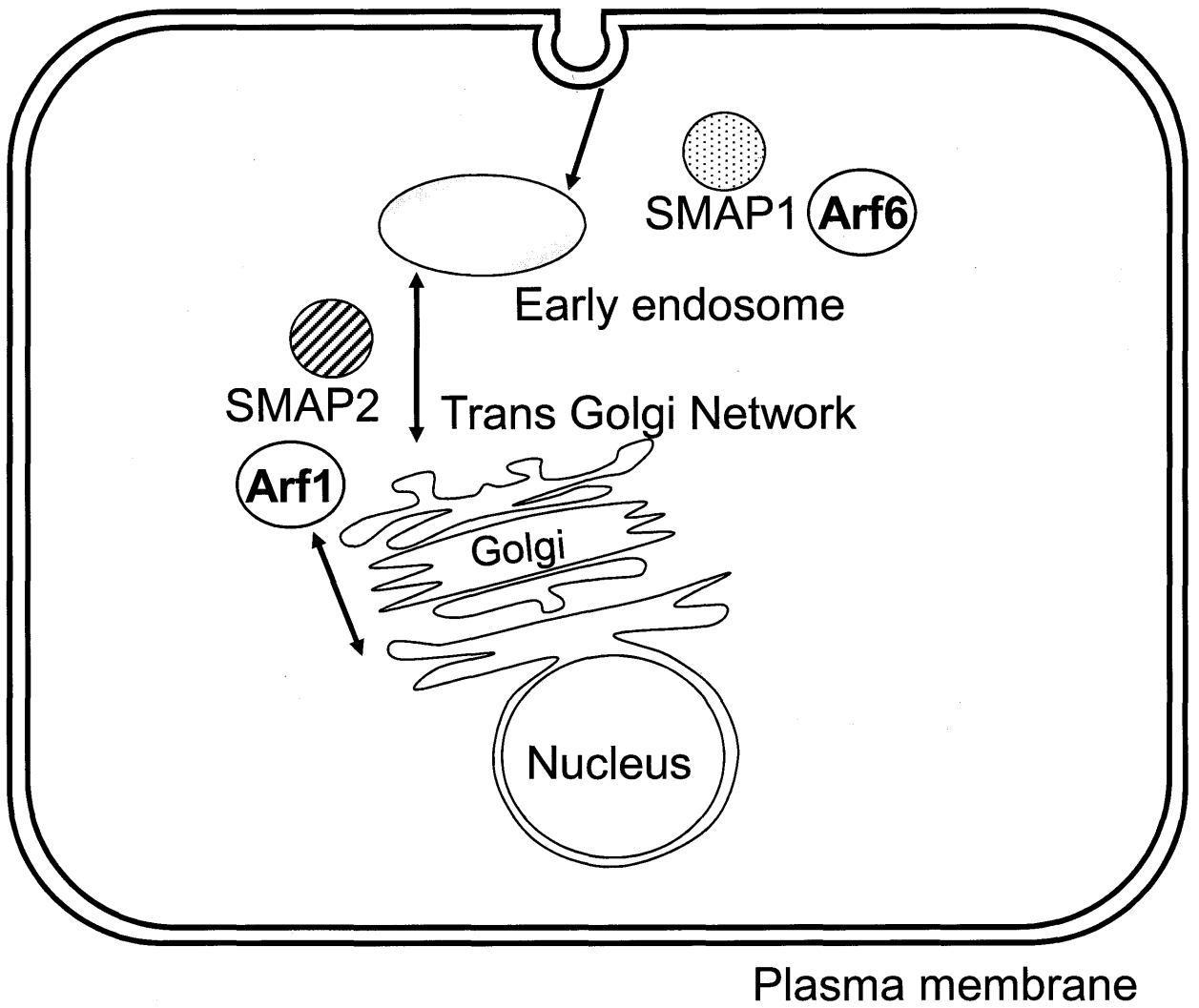


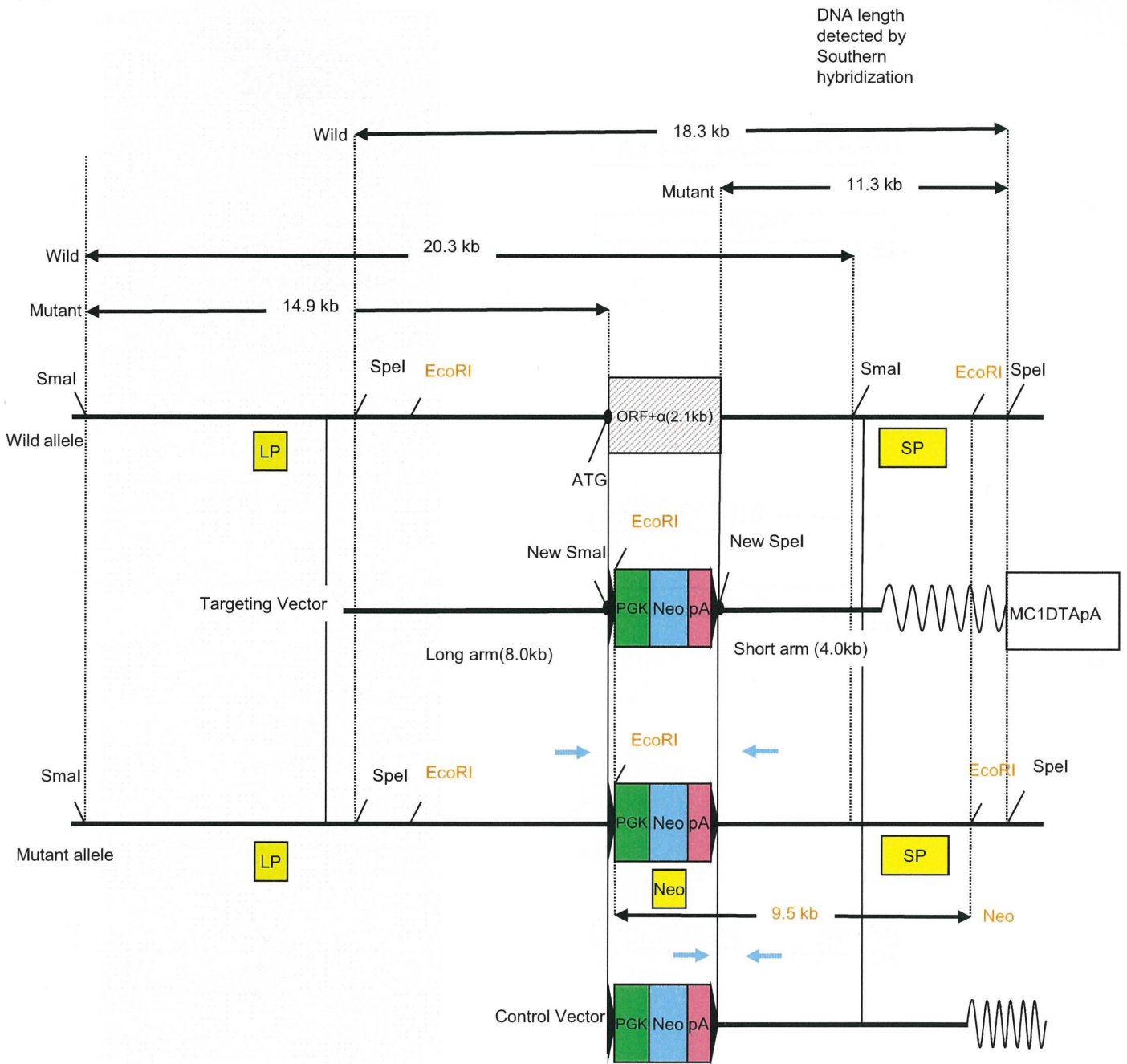
図2







4



	loxP		Neo cassette
ATG	Translation start site		
SmaI/SpeI/EcoRI	Restriction enzymes for Southern hybridization		} Probe for Southern hybridization
	Diphtheria toxin A fragment cassette		
	Primers for isolating of homologous recombinants		

図 5

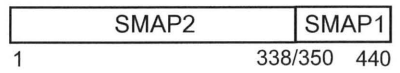
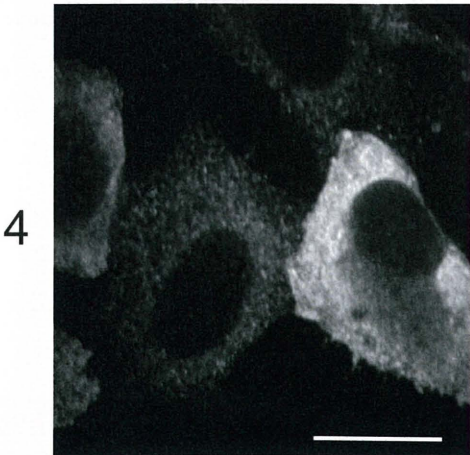
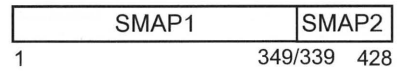
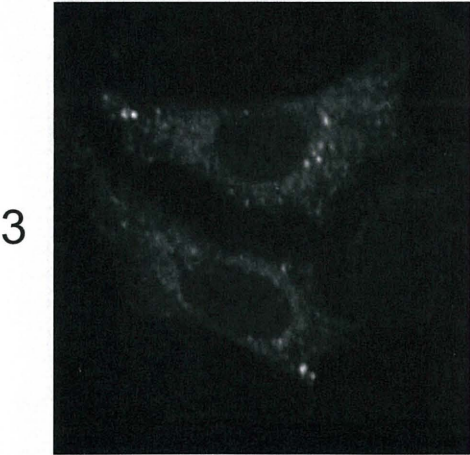
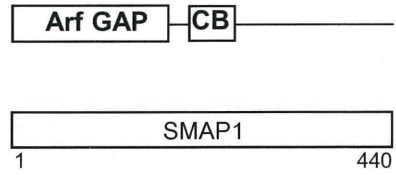
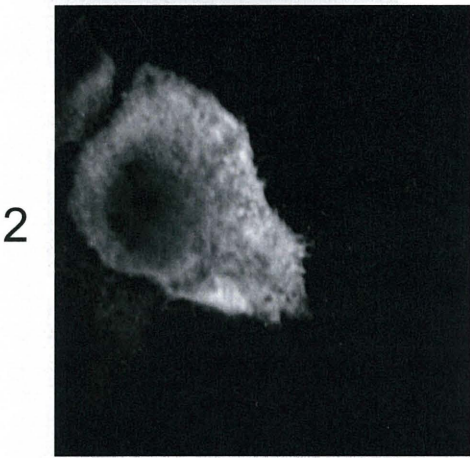
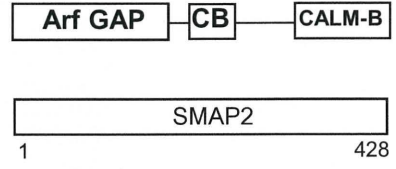
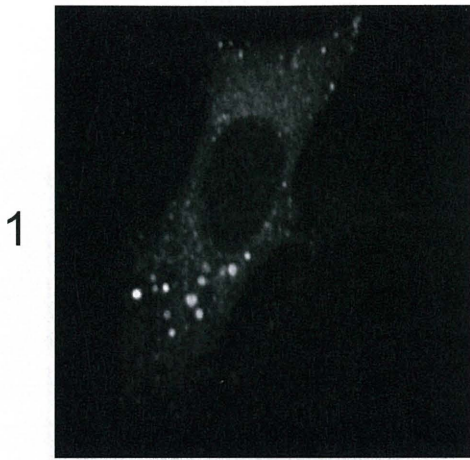


図6

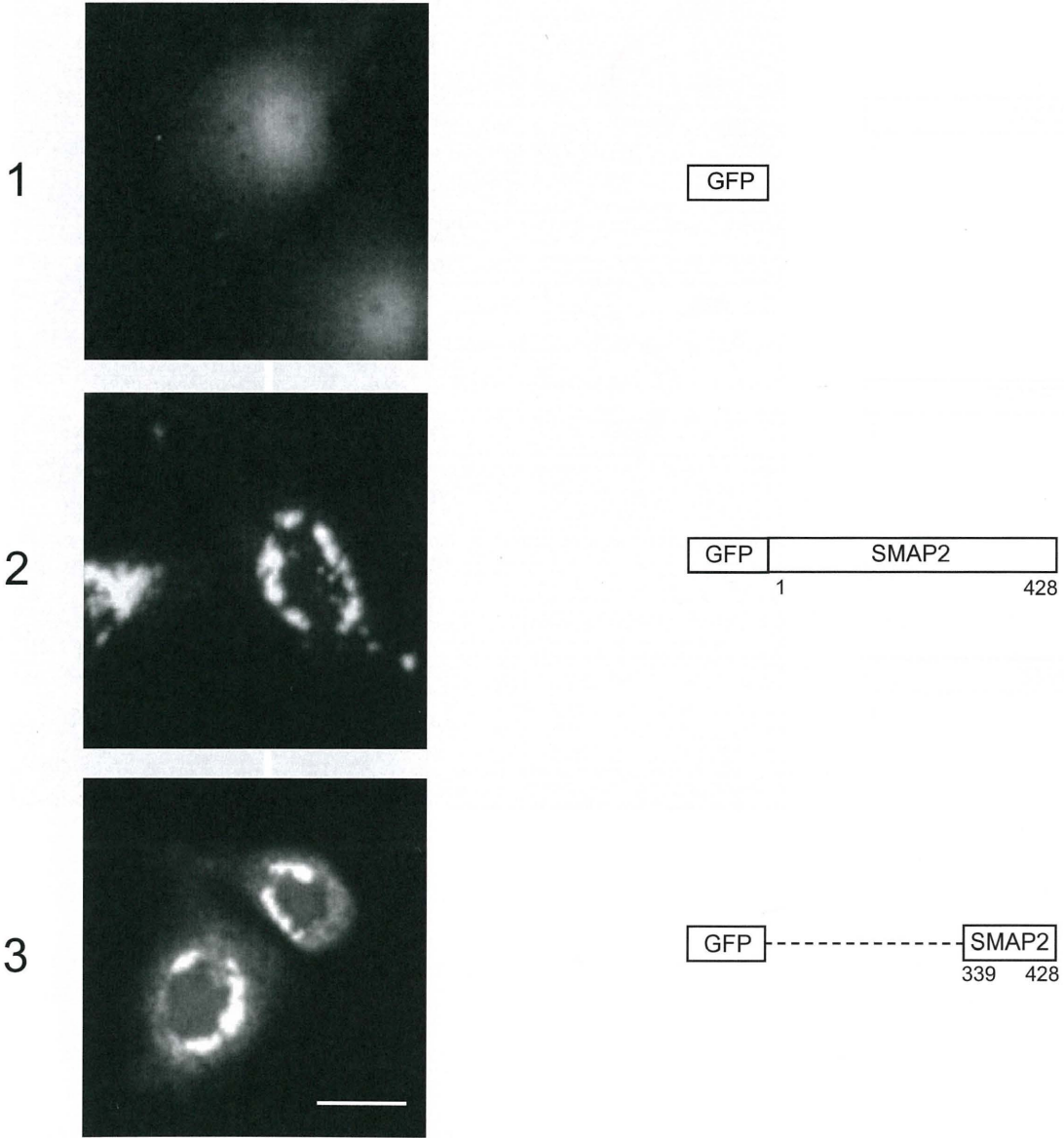


図7

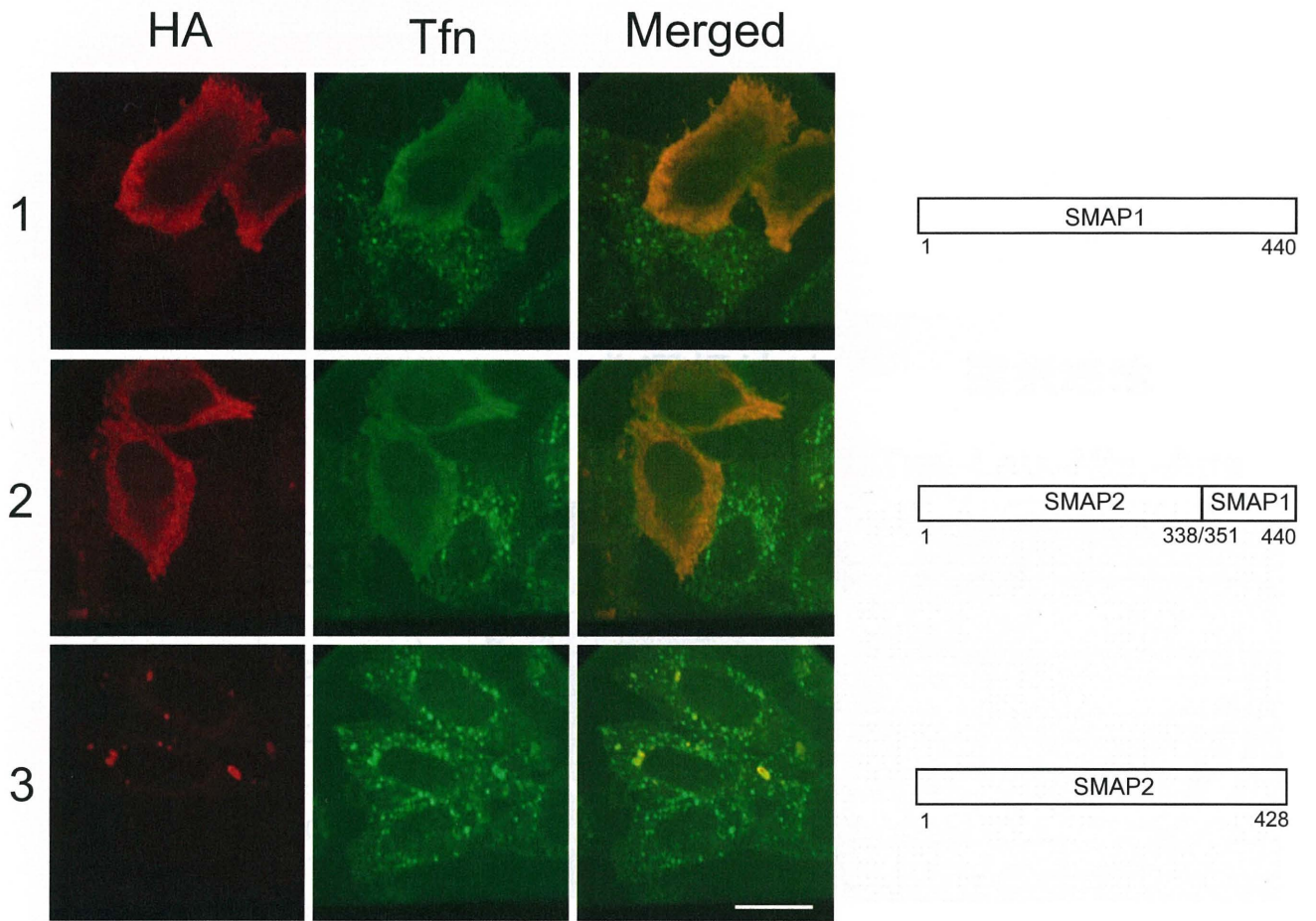
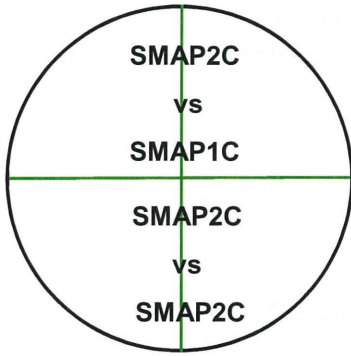


図8



非選択培地

選択培地

-Trp,-Leu

-Trp,-Leu,-His,-Ade



図9

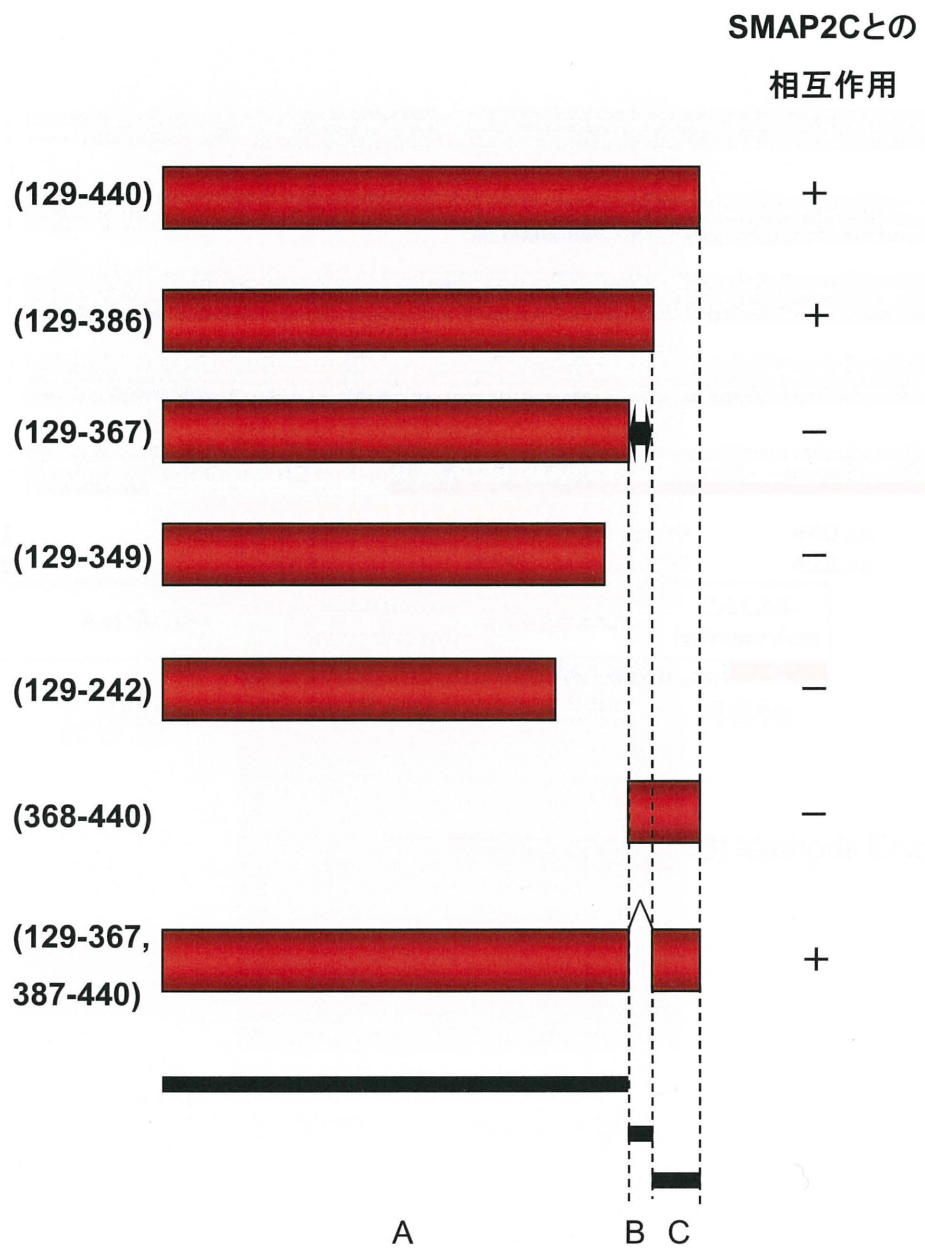


図10

```

SMAP1 1 : MATRSCREKACKLNBOEQLITSKLLPEEDNKMCADCEAKGPRRASWNICVFICIRCAGIHRNLGVHISRVRSVNLQDWTAEQIQCMQMG
SMAP2 1 : -----MTCSRVRDVRVCAVLANLLPEEDNKECADQOSKGRRASWNICVFICIRCAGIHRNLGVHISRVRSVNLQDWTAEQIQCMQMG

SMAP1 91 : NTRARLLYEANLPEFRRRPQDDCAVEFFIRDRYEKKKYMKNNAIAITNKEKEKKKEEKKREKEPEKPAKDLTAERL---QKKDQOLEEK
SMAP2 86 : NGRANRLYEANLPEFRRRPQDDCAVEGFIRDRYEKKKYMRSLDINVLKKEKDDKWRKRGNEPAPEKKMEPVVEERVKMEQKKEDAQLERK

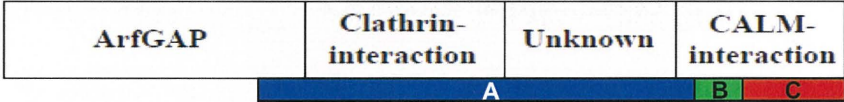
SMAP1 178 : STSPKRAAEPTVDLLGLDCAVAFAVINGMTVPPFDNDLLIFGEMISNPHLATVMPFACGTLSPAPPAATLSTVTSGLDLELPEQTKSEB
SMAP2 176 : S-SPKSAA-EVMOLLGILAPVACSIANSKTS-NALEKDLL---IASVPSSESSVSRRAVGC--SMETAGSAGSVPE-NINLEPEPGSKSEB

SMAP1 268 : VAKKQLSKDSILSLYGTCIICQOSTPGVETGETNIPFTSQAFAAFQGHPSMGVVPVPAEGLIGNMGQSES-EMVGMEMENCFMGNACTG
SMAP2 257 : TGRKQLSKDSILSLYGSQI-EQMEACAMFAACMAYPTAYESFPGVTPPNSIMGGMVPEFVGMVACPGASGLLIEPMIACYMGGMCAS

SMAP1 357 : VMPIEQNVVGH---GGVGCMPGPKSKFLPCADQPCWSTLQMNQDQAGMSISSATPTAGRCQPSSTTAGWSGSSSGOTLSTQIWR
SMAP2 346 : MGVVENGMMTQCAQYMASMAAMPQIVYVQEFACQICWNLQMGQDQAGMNFYCGNGMMNYC---SMCGGNCQAAANTLSPQNWK

```

SMAP1: 1                                    167                                    241                                    350                                    440 aa  
SMAP2: 1                                    163                                    231                                    339                                    428 aa



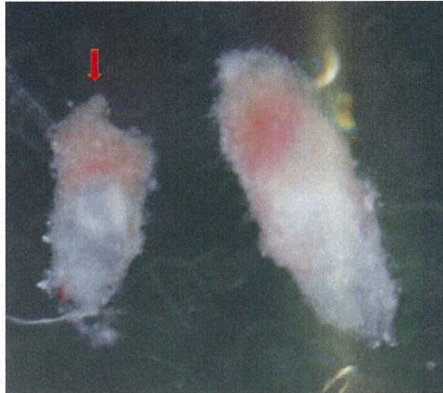
相同性                                    85%                                    74%                                    69%                                    48%

Tanabe et al.(2008) Methods Enzymol.



(SMAP1<sup>-</sup>/SMAP1<sup>-</sup>, (SMAP1<sup>-</sup>/SMAP1<sup>-</sup>,  
SMAP2<sup>-</sup>/SMAP2<sup>-</sup>) SMAP2<sup>+</sup>/SMAP2<sup>+</sup>)

**E7.5**



**E9.5**



图12

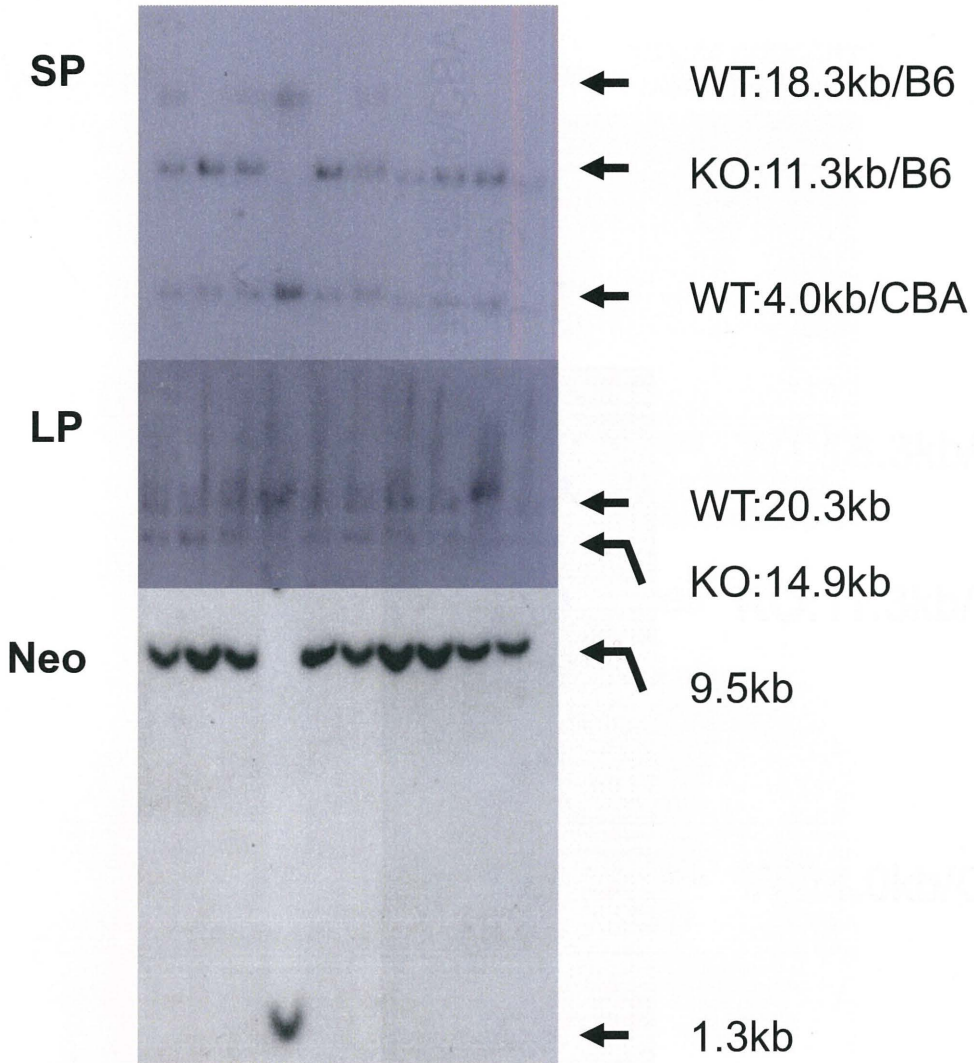


図13

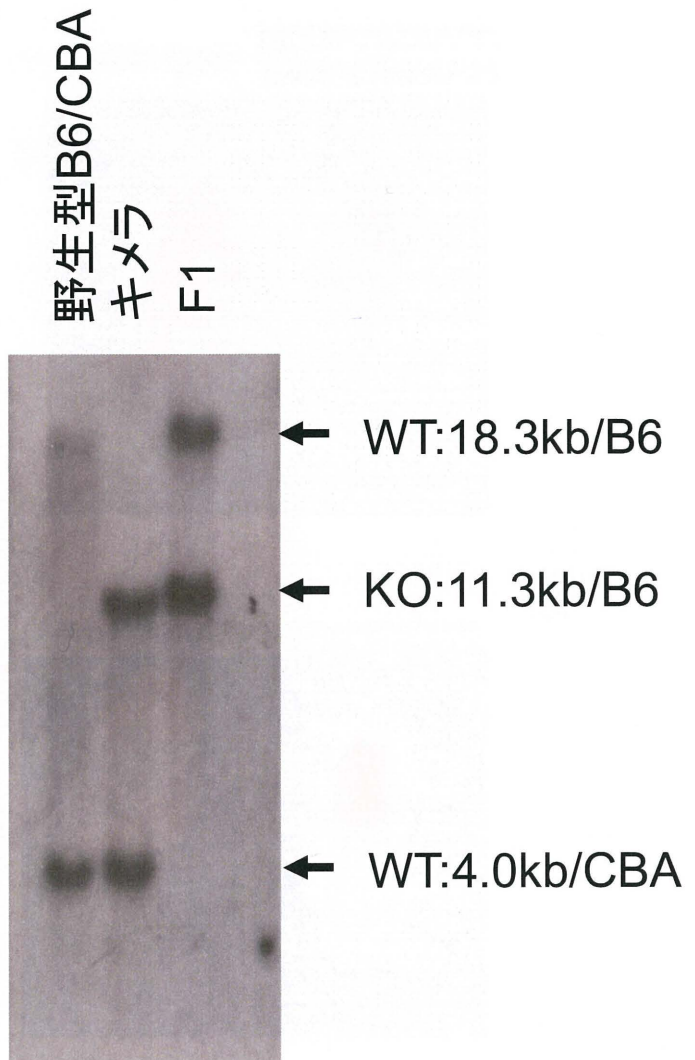
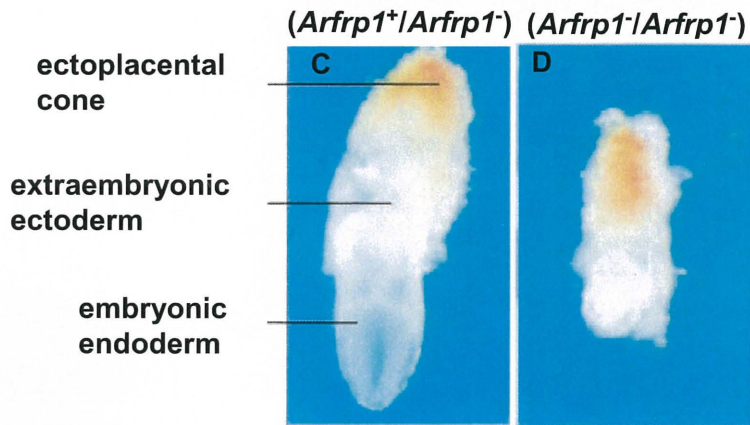
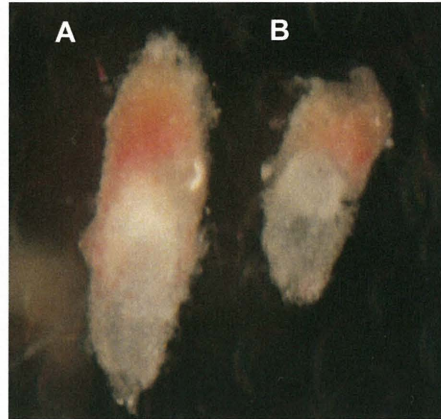


图14

Wild type (*SMAP1*<sup>+/+</sup>*SMAP1*<sup>+/+</sup>,  
*SMAP2*<sup>+/+</sup>*SMAP2*<sup>+/+</sup>)



Mueller *et al.* (2002) M.C.B.

## 誌上発表

The carboxy-terminal region of SMAP2 directs subcellular localization as well as Arf protein specificity.

Ikuko Sakakura, Kenji Tanabe, Natsumi Nouki, Mai Suzuki, Masanobu Satake, and Toshio Watanabe

Biochemical and Biophysical Research Communications , 2011, 404, 661-666.

## 学会発表

### 1. 国内学会・シンポジウム等

納城なつみ<sup>1</sup>、鈴木麻衣<sup>1</sup>、坂倉郁子<sup>1</sup>、今井恵理<sup>1</sup>、佐竹正延<sup>2</sup>、渡邊利雄

1. Arf GTPase 活性化因子の SMAP1,2 の個体機能解析と相互の関係. <sup>1</sup>

奈良女子大学大学院人間文化研究科/理学部生物科学科、<sup>2</sup> 東北大学 加齢  
医学研究所

基生研研究会：リン酸化シグナルの統合的理解を目指して (2008.4.19)

渡邊利雄、納城なつみ、坂倉郁子、鈴木麻衣、今井恵理、前出侑子. 小胞  
形成制御因子 SMAP(Arf GAP)の機能解析—癌細胞の浸潤との関連性—.

奈良女子大学大学院人間文化研究科/理学部生物科学科

第7回北陸ポストゲノム研究フォーラム (2008.6.26)

今井恵理<sup>1)</sup>、坂倉郁子<sup>1)</sup>、納城なつみ<sup>1)</sup>、鈴木麻衣<sup>1)</sup>、前出侑子<sup>1)</sup>、照  
屋由里子<sup>1)</sup>、船木智<sup>2)</sup>、昆俊介<sup>2)</sup>、佐竹正延<sup>2)</sup>、渡邊利雄<sup>1)</sup> <sup>1)</sup> 奈良  
女子大学・大学院、理学部、<sup>2)</sup> 東北大学・加齢研

「Arf GAP の SMAP1 が SMAP2 と相互作用するのに必要な領域の決定」

Identification of a SMAP2-interacting domain in SMAP1

第31回 日本分子生物学会年会(2008.12.12)

鈴木麻衣、照屋由里子、坂倉郁子、今井恵理、国下侑子、山下愛子、山名  
文果、渡邊利雄 奈良女子大学大学院・人間文化研究科

「CALM (Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukemia) 欠損マウ  
スの作製へ」

An attempt to make a CALM (Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid

Leukemia) knock-out mice.

第 32 回 日本分子生物学会年会(2009.12.10)

坂倉郁子<sup>1</sup>、鈴木麻衣<sup>1</sup>、今井恵理<sup>1</sup>、照屋由里子<sup>1</sup>、国下侑里<sup>1</sup>、佐竹正延<sup>2</sup>、渡邊利雄<sup>1</sup> <sup>1</sup>奈良女子大学大学院・人間文化研究科、<sup>2</sup>東北大学加齢医学研究所・免疫遺伝子制御

「クラスリン集合因子の CALM が Arf GAP の SMAP2 と相互作用するのに必要な領域の決定」

Identification of a SMAP2-interacting domain in CALM

第 32 回 日本分子生物学会年会(2009.12.11)

坂倉郁子<sup>1</sup>、納城なつみ<sup>1</sup>、鈴木麻衣<sup>1</sup>、佐竹正延<sup>2</sup>、渡邊利雄<sup>1</sup> <sup>1</sup>奈良女子大学大学院・人間文化研究科、<sup>2</sup>東北大学加齢医学研究所・免疫遺伝子制御

「2つの低分子量 Arf GAP タンパク質 SMAP1 と SMAP2 との細胞内局在に重要な領域の同定」

Identification of the critical region for the cellular localization of two small Arf GAP proteins, SMAP1 and SMAP2

第 33 回 日本分子生物学会年会(2010.12.8)

## 2. 国際会議

Eri Imai<sup>1</sup>, Ikuko Sakakura<sup>1</sup>, Mai Suzuki<sup>1</sup>, Yuko Maede<sup>1</sup>, Yuriko Teruya<sup>1</sup>, Natsumi Nohki<sup>1</sup>, Masanobu Satake<sup>2</sup>, and ○Toshio Watanabe<sup>1</sup>. Molecular interaction of two novel Arf GAPs, SMAP 1 & 2: Identification of a SMAP2 -interacting domain in SMAP1. <sup>1</sup> Grad. School of Humanities and Sciences, Nara Women's Univ., <sup>2</sup> Institute of Development, Aging & Cancer., Tohoku Univ. 8<sup>th</sup>. International Protein Phosphatase Conference. November, 2008.

## その他の業績

### 原著論文

Silica Hollow Spheres with Nano-Macroholes Like Diatomaceous Earth.  
Masahiro Fujiwara, Kumi Shiokawa, Ikuko Sakakura, Yoshiko Nakahara  
Nano Lett., 2006, 6(12), 2925-2928.

Preparation of Hierarchical Architectures of Silica Particles with Hollow  
Structure and Nanoparticle Shells: A Material for the High Reflectivity of  
UV and Visible Light.  
Masahiro Fujiwara, Kumi Shiokawa, Ikuko Sakakura, Yoshiko Nakahara  
Langmuir, 2010, 26(9), 6561-6567.