

氏名(本籍)	松川 聡子 (韓国)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	博課第360号
学位授与年月日	平成19年9月28日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 人間文化研究科
論文題目	グルタミン酸デカルボキシラーゼに関する分子生物学的・ 生化学的考察
論文審査委員	(委員長) 教授 植野 洋志 教授 小 城 勝 相 客員准教授 鄭 基 晩 教授 池 原 健 二

## 論文内容の要旨

### 第一～三章 Glutamate decarboxylase (GAD) の分子生物学的・生化学的考察

1977年、真核生物の遺伝子が不連続である、すなわちイントロンとエキソンが存在することが発見された。以来、エキソンシャッフリングによる合理的な遺伝子進化の加速という概念が提唱されるなど、その意義に関する議論が続けられてきた。また、近年はイントロン自体にも機能が見出され、改めて遺伝子構造の不連続性に対する関心が高まりつつある。本研究では、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)をモデルとし、遺伝子上のイントロン・エクソン構造とタンパク質の進化・構造・発現調節の関係を考察した。

GADは神経系に働く生理活性物質γ-アミノ酪酸(GABA)を産生する酵素で、原生生物から哺乳類にいたる幅広い生物分布を示す。また、哺乳類は異なる遺伝子にコードされた2種類のアイソフォーム(GAD65とGAD67)を持つ。これらの特徴から、GADが古い起源と複雑な分子進化を経たタンパク質であることが推測できる。

第一章では哺乳類とショウジョウバエのGAD遺伝子におけるイントロン-エキソン構造の比較を通し、分子進化に対するイントロン-エキソンの関与を検討した。GAD65、67およびショウジョウバエGADをアミノ酸配列相同性に基づき配列整形すると、イントロンの挿入位置は非常に良く対応していた。GAD65、67の非相同性が集中するN末端側に着目すると、このセグメントがエキソン1-3に相当し、なおかつエキソンごとにアミノ酸残基の置換度が異なることが判った。また、ショウジョウバエGADではエキソン1-3に相当する部分が欠落し、GAD65、67に存在するいくつかのイン

トロンが消失していた。以上から、イントロン、エキソンが GAD の分子進化において機能的に働いていた可能性が示唆される。すなわち、祖先遺伝子が哺乳類型 GAD とショウジョウバエ GAD に分化する過程で、エキソン、イントロン単位で遺伝子の消失もしくは付加が行われ、GAD65そして GAD67の分化においてはエキソンが遺伝子突然変異の頻度を決定する要素であったという仮説を導き出すことができる。

第二章では、ヒト GAD65と GAD67の結晶構造において、各エキソンに対応するセグメントの配置とタンパク質の構造、機能の関係を考察した。球状タンパク質のドメインが連続した数十残基からなる構造と機能の単位「モジュール」に分割されるという仮説により、多くの結晶構造の網羅的解析から、エキソン境界がモジュール境界の近傍に存在することが明らかになっている。これより、エキソンが複数のモジュールの集合であり、構造・機能の単位としての性質を示す可能性が想定できる。ヒト GAD のアイソフォーム同士を検討した結果では、お互いによく類似した構造を持ち、エキソンの立体構造上での配置もほぼ同じであった。ペプチド鎖上に反映されたエキソンの境界は、結晶構造に見出される構造・機能の境界と良く対応することが判明した。また、モジュールの位置に関しては、一箇所を除いてすべて二次構造を形成するユニット内に位置することが判明した。これより、エキソンそのものはタンパク質の立体構造においても構造単位としての性質を持つものであり、モジュールという単位を内在することが提唱できる。

第三章では、ヒトの末梢血に存在する細胞をモデルに、ウェスタンブロッティングによって実際に発現する GAD の解析を試みた。前述のように、GAD は神経伝達物質を産生する酵素でありながら、神経系を持たない生物にまで分布が及ぶ。このことから、GABA 産生以外の存在意義に興味を持たれてきた。実際、ヒト GAD65タンパク質が糖尿病の自己免疫抗体のターゲット抗原タンパク質であることが示されている。このような新しい知見を得るためには、個々の組織や細胞に発現するタンパク質の実態を良く知ることが不可欠である。本研では、タンパク質 C 末端側を認識する抗体で、通常の分子量とは異なる30および80 kDa のバンドが検出された。このバンドが GAD 由来であることは、エピトープ近傍を増幅するプライマーを用いた PCR で確認された。また、プライマーの位置と増幅の可否との関係から、エキソン16の欠落が示唆された。検出されたタンパク質の分子量異常はエキソン16の欠落だけは説明ができないが、少なくとも1箇所ですプライシング異常がおきており、それが原因でこれまで検出されてこなかった新たな分子量の GAD タンパク質発現につながる可能性を示すものである。

以上、一～三章では GAD をモデルとして多面的なアプローチを行うことで、分子進化・立体構造、組織特異的な形態の発現調節など、タンパク質の多様な局面におけるイントロン・エキソン構造の意義について具体的な知見を導くことができたと考えている。

#### 第四章 Carboxypeptidase Y (CPY) の低温圧力変性

超高压力によるタンパク質変性の研究は、タンパク質の構造の成り立ちを知る有用な手段の一つである。酵母カルボキシペプチダーゼ (CPY) は低温と圧力を同時に作用させることで酵素活性を失うことが知られている。第四章では、CPY の低温圧力変性について、その特徴を検討した。不可逆に失活した状態を分光学的手法により解析すると、全体のバックキングが緩み、疎水性コアが表面へ露出する現象が観察される一方、一部の二次構造は破壊されずに保たれていることがわかった。また、化学修飾剤への反応性から、活性中心に存在するセリン・ヒスチジン・アスパラギン酸の電荷リレー系が攪乱されているが、その近傍にある基質結合サブサイトの構造は保たれていることが示唆された。以上はモルテングロビュールとよばれる変性中間体の特徴によく一致している。したがって、低温圧力が不可逆的にモルテングロビュール構造への状態変化を誘発する可能性が示された。これは、熱や化学的な変性剤には見られないユニークな特徴である。また、CPY の分子量の16%に相当する糖鎖を欠損させた $\Delta\text{glyCPY}$  もほぼ同様の挙動を示したことから、低温圧力がポリペプチド鎖に与える構造変化に糖鎖は関与しないことが明らかになった。一方、圧力存在下での比較においては $\Delta\text{glyCPY}$  がより早く活性を失うことが観察され、糖鎖の存在はポリペプチド鎖の動的性質に影響を与えると考えられる。そのメカニズムとしては、直接的 (立体障害)、間接的 (剛直性を与える) 作用両方によることが想定できる。

以上、本論第四章は低温圧力がタンパク質の構造に与える変化およびその動的変化において糖鎖の影響について新しい知見を与えるものである。

## 論文審査の結果の要旨

真核生物の遺伝子がイントロンによって分断されることが発見されて以来、エキソンシャッフリングによる遺伝子進化の加速など、その意義について議論が続けられてきた。また、当初ジャンクとみなされていたイントロン自体にも機能が見出され、遺伝子構造の不連続性に対する関心が高まりつつある。本研究はグルタミン酸の脱炭酸反応を触媒する酵素、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) が示す進化学的、生理学的に興味深い特徴に着目し、遺伝子の不連続性との関連に則った解析を試みている。

第一章では、GAD が原生生物、植物、哺乳類など広く生物界に分布することを示し、哺乳類ではアイソフォーム (GAD65、GAD67) が独立して遺伝子にコードされている特長を踏まえ、その進化の過程におけるイントロン-エキソン構造の関与について検討を行っている。ハエ・哺乳類のイントロン構造の対応から、最も変異が集中する領域とエキソンとの対応を見出し、ハエと哺乳類あるいは哺乳類におけるアイソフォームの分岐においてエキソンが遺伝子の付加消失の単位として、また遺伝子突然変異の頻度に影響する因子として機能していた可能性を見出すことに成功している。

第二章では、タンパク質の構造単位モジュールとエキソンの対応説に基づき、ヒト GAD 67 結晶構造を対象に、エキソンという遺伝子上の単位が立体構造においてどのような意味を持ちうるかを考察している。各エキソン境界と二次構造の関係を解析した結果、エキソン境界が二次構造に該当しない位置に偏る傾向があり、立体構造において比較的安定した要素として存在する可能性を提唱している。

GAD は神経伝達物質 GABA の産生酵素である一方、神経系を持たない生物にまで分布が及ぶ。また、糖尿病発症シェーマへの関与が示されるなど GABA 産生以外の生理的意義に興味を持たれてきた。しかし、その基礎となるべき個々の組織や細胞に発現する GAD タンパク質の実態については、まだ報告例が希少である。

この空白を埋める試みとして、第三章ではヒトの末梢血細胞に発現する GAD の検出・解析を行っている。2 種類の GAD 65 抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果、一方の抗体にのみ反応する 28 kDa および 80 kDa のタンパク質が見出された。用いた抗体は、ペプチド抗原により作成されたので、それらのエピトープ近傍に注目し、それぞれを増幅する 2 種類のプライマーの位置と増幅の可否との関係から、これらはエキソン 16 が欠落した GAD 様タンパク質であることが示唆されている。これを基に GAD 遺伝子がスプライシング機構を利用する Polymorphism について始めて示唆するもので、生体内の組織を特徴づけるための臓器特異的な多様なタンパク質発現の可能性にも言及し、遺伝子の不連続性と個体における細胞の多様な表現型との研究に GAD が有用なモデル材料であるこ

とを論じている。

以上のように、本研究において、第一から三章では進化・立体構造・発現調節といった、タンパク質をめぐる様々な事象と遺伝子の不連続性の関連を考察し、新たな知見をもたらす興味深い指摘を行っている。

第四章では、カルボキシペプチダーゼ Y (CPY) の低温圧力変性状態について分光学的、化学的手法を駆使した解析を行い、一定のネイティブ構造を残しながら不可逆に活性を失うという特徴を明らかにしている。タンパク質の超高圧処理は、熱変性とは異なるタンパク質の加工法として注目されている新しい技術である。新規な食品加工製品の開発には、本研究で行われた基礎的な知見は必須とされる。ここでは、低温における超高圧処理が、従来知られてきた熱や尿素などとは異なる性質であり、タンパク質の立体構造構築原理を解明するためのユニークな方法論であることを示すことに成功している。

以上、本研究は、グルタミン酸デカルボキシラーゼをモデルとして、エキソンとイントロンの情報がどのように立体構造に反映されており、タンパク質生成過程における RNA のプロセッシングとその異常について考察し、新たなスプライシング異常の可能性を示唆している。さらに、タンパク質化学分野の応用として、超高圧下でのタンパク質の状態変化を解析し、貴重な物理化学的知見を提供するものである。本研究の第一章、第二章の研究成果は、二つの論文（英文）として国際的な学術雑誌（Refereed Journals）に受理され、現在、出版準備中である。第三章の研究成果は、二つの論文（英文）として執筆が完了し、投稿する予定である。

なお、松川聡子は社会人学生として就業しながら、本研究成果を挙げている。

よって、本論文は、奈良女子大学博士（学術）の学位を授与するに十分な内容を備えていると判断される。