

平成18年11月

田・路晴 学位論文審査要旨

主 査 佐 藤 建 三
副主査 大 浜 栄 作
同 渡 辺 高 志

主論文

Cloning of rat p47^{phox} and comparison with human p47^{phox}

(ラットp47^{phox}のクローニングとヒトp47^{phox}との比較)

(著者：田・路晴、Olof Rådmark、渡辺高志、塩瀬明、住本英樹)

平成17年2月 DNA sequence 16巻 65頁～68頁

学位論文要旨

Cloning of rat p47^{phox} and comparison with human p47^{phox} (ラットp47^{phox}のクローニングとヒトp47^{phox}との比較)

p47^{phox} は宿主免疫に重要なNADPHオキシダーゼの活性に必要な因子である。この遺伝子の欠損は慢性肉芽腫症を生じることが知られており、マウスにおいてはp47^{phox}が関節炎の感受性や重症度に関連していることが報告されている。

これまでにヒト白血球のcDNAライブラリーを用いてラットの12リポキシゲナーゼと相互反応する蛋白を酵母ツーハイブリッド法にてスクリーニングしたところ、ヒトp47^{phox}と相互反応を示すことが示唆された。そこで本研究では新たにラットのp47^{phox} cDNA全長をクローニングして、発現される蛋白とヒトp47^{phox}との生化学的異同について検討した。

方法

ラット脾臓cDNAライブラリーよりrapid amplification of cDNA ends法によりラットp47^{phox}のクローニングを行った。プライマーはGenBank AF260779より作成した。

クローニングの後に、pGEX-2Tを用い大腸菌JM101でラットp47^{phox}をGST結合蛋白として発現させて、GSH-セファロースで精製した。

無細胞系でのヒトNADPHオキシダーゼ活性測定法において、ラットおよびヒトのp47^{phox}の活性を調べた。さらに酵母PJ69-4A株を用いたツーハイブリッド法で、ラットおよびヒトのp47^{phox}がラット12リポキシゲナーゼと相互反応を示すかどうかを調べた。

結果

ラットp47^{phox}のcDNAは1167個の塩基からなり、389個のアミノ酸をコードしていた。マウスのp47^{phox}とは94.3%の同一性と95.1%の類似性を有し、ヒトp47^{phox}とは82.7%の同一性と86.9%の類似性を有していた。

ヒトNADPHオキシダーゼ活性系では、ラットp47^{phox}はヒトp47^{phox}の半分程度の活性しか示さなかった。

酵母ツーハイブリッド法では、ヒトp47^{phox}はラット12リポキシゲナーゼと相互反応を示し、adenine、histidine、LacZそれぞれのレポーター遺伝子を発現したが、ラットのp47^{phox}は相互反応を示さなかった。また、ヒトp47^{phox}のC末端を欠くと12リポキシゲナーゼと相互

反応を呈さなかった。

考 察

ラット12リポキシゲナーゼ活性の測定系において、ヒトp47^{phox}を加えるとその活性が約60%程度になるが、ヒトp47^{phox}のC末端を欠くと12リポキシゲナーゼの活性に影響を与えなかった。酵母ツーハイブリッド法においても、ヒトp47^{phox}のC末端を欠くと12リポキシゲナーゼと相互反応を呈さなかった。このことよりヒトp47^{phox}のC末端が相互反応に関与していることが示唆される。ヒトp47^{phox}とラットp47^{phox}のC末端を比べると349から359でアミノ酸の配列が大きく異なり、ラットにおいてはERK1/2キナーゼの構造モチーフのリン酸化による関与の可能性が示唆される。

結 論

ラットp47^{phox}cDNAをクローニングした。発現した蛋白は生化学的にヒトp47^{phox}と異なる特徴を有した。