

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ニールセン ティア
キルケゴール

Na^+ , K^+ -ATPase (NKA) は細胞膜に存在する P 型 ATPase で、ATP1 分子の加水分解に伴い、3 個の Na イオンを細胞外へ、2 個の K イオンを細胞内へ能動輸送し、浸透圧や膜電位の維持に必須な働きを行なう。腎機能・心機能・神経系とも密接な関係があり、その異常は重篤な疾患に直結するため、機能・構造の両面から作用機序の解明が強く求められている。だが、結晶構造解析には精製蛋白質が大量に必要であるが、NKA の有効な大量発現手法は現在のところ存在しない。そのため、結晶構造解析は生体から大量調製が可能なブタ腎臓由来の $\alpha 1/\beta 1/\text{FXVD2}$ 複合体やサメ直腸腺由来の $\alpha 1/\beta 1/\text{FXVD10}$ 複合体に限られてきた。また、変異体解析でも、内在性の NKA の影響を無視できず、これまでの解析は限定的なものであった。申請者はアデノウイルス/哺乳類培養細胞発現系によるヒト NKA の大量発現・精製系の構築により、この問題の解決に取り組んだ。本論文はその研究成果をまとめたもので全 4 章から構成される。

第 1 章の序論では、最初に NKA 研究の背景として、疾患との関連、立体構造とイオン輸送のメカニズムを述べている。その後、一般的な蛋白質の発現に比べ真核生物由来の膜蛋白質の発現が困難であることをまず言及して、一般的な蛋白質大量発現系の長・短所についての記述後、本研究の主眼である NKA の大量発現・精製がいかに挑戦的であるかについて述べている。第 1 章に引き続き、第 2 章では、本研究で用いた全ての実験手法についての記載がなされている。

第 3 章は実験結果の記載に当てられており、全部で 4 つのセクションから構成されている。第 3-1 章ではヒト NKA の発現に最適な宿主細胞の検討結果が述べられている。哺乳類で最も NKA を含む臓器の 1 つは腎臓である。そこで、哺乳類腎細胞由来の細胞株としてアフリカミドリザル腎臓由来の COS1/7 細胞、イヌ腎臓由来の MDCKII 細胞とその派生株の MC2 細胞に焦点を絞り検討を行っている。内在性の NKA の発現を調べたところ、MDCKII 細胞と MC2 細胞では内在性の NKA の発現量が COS 細胞に比べて多いことが分かったが、両細胞はアデノウイルスによる感染効率が COS 細胞に比べて極端に悪く、NKA の大量発現には不向きであることを示した。その結果、4 種類の細胞のうち、NKA の発現に最適な細胞株は COS 細胞であると結論づけている。

第 3-2 章では発現 NKA の精製に必要なタグと、その挿入に最適な位置を、発現 NKA の局在を調べることで行っている。タグは、類縁の SERCA1a の大量発現で実績のあるハロタグが用いられ、挿入位置として、 α サブユニットの N 末 (N-Halo- α)、 β サブユニットの N

末 (N-Halo- β)、 β サブユニットのC末 (β -C-Halo) に融合したものを作成し、検討を行っている。ハロタグ特異的に結合する蛍光色素に、細胞膜を透過するものと、細胞膜を透過しないものがあることを利用し、発現 NKA の局在を共焦点レーザー顕微鏡で調べた結果、N-Halo- β と β -C-Halo を用いた場合には発現 NKA の大部分がゴルジに局在するが、N-Halo- α の場合には発現 NKA のほぼ全てが細胞膜に移行することが示された。以上のことから、精製に適したハロタグの融合位置は SERCA1a の場合と同様に、 α サブユニットのN末であると結論づけている。また、細胞に導入する α サブユニットと β サブユニットの遺伝子量の比率を変化させ発現 NKA の局在を調べたところ、 α と β の遺伝子が同量の場合に細胞膜への移行が最大となることも判明したので、N-Halo- α と β を同時に発現するコンストラクト(N-Halo- α/β)も新たに作成している。実際、このコンストラクトを用いた場合には、発現 NKA はほぼ全て細胞膜へ移行していたことから、最終的な変異アデノウイルスとして、N-Halo- α/β ウィルス、FXVD1 ウィルスの2種類が作成されたと記述している。

第3-3章では作成した2種類のウィルスを用い、大量発現へ向けた諸条件の検討を行っている。2種類のウィルスの使用量の比率を変化させたところ、 α N-Halo- α/β ウィルス4に対し、FXVD1 ウィルス1の割合で感染させた場合に、NKAの発現量が最大になることを見出した。また、また、FXVD1 ウィルスの量を一定にし、N-Halo- α/β ウィルスの量を増やすことによって、発現 NKA は増加し、内在性 NKA の発現量は減少することを見出した。この結果から、ウィルス量を更に増すことで、更に多くの発現 NKA を産生可能なことを示唆しており、さらに発現 NKA 量を増やすことができる可能性がある」と記述している。

第3-4章では作成した2種類のウィルスを用い、40枚の150mmディッシュに培養したCOS細胞に感染させ大量発現を行った結果を記述している。精製標品は純度も高く、濃縮サンプルをSDS-PAGE後、CBB染色したところ、精製された α サブユニット、 β サブユニット、FXVD1の3本のバンドを観察できている。また、blue-native電気泳動によって3者が複合体を形成していることを確認している。最終的に得られた精製NKA量は40枚の150mmディッシュから0.63mgと、結晶化が十分可能な量であり、今後結晶化が期待される。

第4章では総合討論を行い、本発現系を用いた今後の展開について議論を行っている。

以上、本研究はこれまで有効な大量発現の手段が存在しなかったヒト NKA の大量発現に対し、アデノウイルス/哺乳類培養細胞発現系が有効であることを示した初の報告である。特に、アデノウイルスを用いて、細胞膜に発現する蛋白質を大量発現した例はこれまで無いことから、新たな膜蛋白質発現手段の開発という観点からも特筆すべき成果である。また、初期段階ではあるが、発現 NKA の精製にも成功した。これらの研究成果は学術上、応用上貢献するところが少なく無い。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。