



機関番号 11301 研究機関名 東北大学

研究種目名 基盤研究(C)(2) 研究期間 平成8年度～平成9年度

課題番号 08672004

研究課題名 フォスデュージン遺伝子の解析

研究代表者名 阿部俊明 東北大学医学部附属病院 講師

東北大学図書



00010174691

附属図書館

## 平成9年度科学研究費補助金実施報告書

機関番号 11301 遺伝子研究機関名 東北大学

研究種目名 基盤研究(C)(2) 研究期間 平成8年度～平成9年度

課題番号 08672004

### 研究課題名 フォスデュージン遺伝子の解析

研究代表者名 阿部俊明 東北大学医学部附属病院 講師

フォスデューシンは杆体視細胞内において唯一 cAMP 依存性にリン酸化をうける蛋白質として報告されてからさまざまな研究がなされてきた (1)。最近になり、G蛋白質であるトランスデューシンと相互作用をしながら光情報変換機構を制御している蛋白質であることが判明した (2)。我々は、この遺伝子の解析を中心におこなってきたが、この遺伝子は類似したものが複数存在することが判明した (3)。また、最近の研究により眼以外の部位にも発現しており、脳において、アドレナージックレセプターを介するシグナルトランスダクションシステムで、レセプターレベル以外で、このトランスダクションを抑制する蛋白質として抽出された (4)。フォスデューシンは視細胞内では、トランスデューシン  $\beta\gamma$  サブユニットと相互作用して光伝達機構を抑制するが、この光伝達機構の始まりのレベルに関与するのではないことが判明している。また、我々のこれまでの研究により、フォスデューシンの遺伝子構造ならびに、アミノ酸配列はヒト、マウス、ラット、ウシで非常に類似していることが判明している。また、サザンブロットングでは、フォスデューシンは遺伝子ファミリーを形成していることも推測された (3)。

さらに、フォスデューシン遺伝子の連鎖解析により、この遺伝子は染色体 1 番長腕に存在することも判明した。この領域は Usher 症候群や、常染色体劣性遺伝を示す、網膜色素変性の家系の連鎖が報告され、この遺伝子の解析には興味もたれる (5)。

まず、我々は、遺伝子ファミリーを形成していると思われる、フォスデューシン以外のファミリー遺伝子を単離、解析することを試みた。また、フォスデューシンに変異が存在した場合、網膜に与える影響を調べる目的で、フォスデューシン cDNA に点変異を作成しトランスジェニックマウスを作成し解析した。

#### <方法>

ラット網膜より mRNA を抽出し、cDNA に変換後、フォスデューシンの各種間によく保存されている領域より、プライマーを作成し、PCR を施行した。PCR のプライマーとして、5' 側をライブラリーのベクターのプロモーターの塩基配列を利用し、3' 側は、牛眼フォスデューシンの塩基配列より数カ所を利用して行った。PCR の条件は 94 °C、1 分、50 °C ~ 55 °C、2 分、72 °C、2 分で合計 35 サイクルおこなった。新しく増幅された断片の塩基配列は、Sanger のジオキターミネーション法 (6) を用いてファルマシアのオートシーケンサーにて確認した。この中で、フォスデューシンと類似性を持つものをプローブとしてジゴキシンでラベルし、ウシ網膜 cDNA ライブラリー (bovine  $\lambda$  Zap library) (stratagene, La Jolla, CA, U.S.A.) のスクリーニングをおこなった。ハイブリダイゼーションの条件は以前我々が報告したように (3)、ニトロセルロース膜を使用し、5x SSC (1x SSC = 0.15 M NaCl, 15 mM Na<sub>3</sub> citrate, pH 7.5), 0.5% SDS, blocking reagent, 100  $\mu$ g/ml の salmon sperm を使用し、68 °C に保ちながらおこなった。最終的にクローニングされた cDNA は Stratagene の in vivo excision 法を用いて作成した。cDNA のシーケンスは cDNA を、SauIII で部分切断したのち、Bluescript II に取込み、Sanger 法を用いておこなった。その解析は、Gene Works (IntelliGenetics, Inc., Mountain View, USA) を用いた。

また、網膜内での発現の程度を知る目的で半定量的 PCR をおこなった (7)。すなわち網膜より 4M guanidinium thiocyanate と 0.5% N-lauroyl sarcosine を利用して全 RNA を抽出後 (Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Sweden)、ランダムプライマーにて

cDNAを合成し(Pharmacia Biotech Inc., Uppsala, Sweden) PCRをおこなった。PCR産物がcDNA濃度に対して、あるいはPCRの回数に対して、直線的あるいは指数的に増加することを確認後、ロドプシンに対するmRNAの発現の程度をフォスデュージンならびに新しいフォスデュージンについて調べた。

フォスデュージンの点変異は、フォスデュージンcDNAとStratageneのin vivo mutagenesisを利用して作成した。すなわち、フォスデュージンの活性を調節すると考えられるリン酸化部位、73番目のアミノ酸のセリンをイソロイシンに変異させたが、このセリンをイソロイシンに変換することで、新しく制限酵素部位が作成され(BsmI)、それを用いて、スクリーニングに利用した。この新しく作成されたmutant Phosducin cDNAは、アレスチンプロモーターをその上流に結合させ、RDマウスに導入後、バッククロスしてSDマウスのトランスジェニックマウスを作成し解析した。

### <結果>

ウシ網膜cDNAライブラリーよりスクリーニングされたものは3個あり、最長のもは1929bpよりなっていた。1つは5'約20bpが他の2つと完全に異なっていた。推定上のアミノ酸配列は297個よりなっておりフォスデュージンのそれより約50個多く、分子量は33.9kDa、等電点は4.45であった。しかし全体では、約40%の相同性を示し、主とした違いは、5'領域に認められた(図1)。フォスデュージンは、73番のセリンがcAMP依存性プロテインキナーゼにリン酸化されることにより、活性が制御されているが、新しいフォスデュージンも推定上のリン酸化部位が存在した。Milesらにより報告された(8) rat phosducin-like protein (RPhLP)と82%同一であった。すなわち、bovine phosducin-loke protein (BPhLP)と考えられた。

半定量的PCRでは、フォスデュージンはロドプシンに対して、約6%、新しいフォスデュージンは約0.9%発現していると推測された。しかしながら、RPhLPで報告されているRPhLPLとRPhLPsというアイソフォームの発現を調べると、RPhLPLはさまざまな臓器で、ほぼ均一に発現していると考えられたが、RPhLPsは網膜に特異的に発現していると考えられた(図2)。

トランスジェニックマウスの解析で判明したことは、電気生理学的にみて光刺激後の網膜伝図のB波の回復が、正常マウスに比較してやく50%の回復率であり、また明順応下での網膜伝図の回復の正常の約50%であることが判明した。これは、フォスデュージンが視細胞の順応に関与する蛋白質であることを推測させる結果であると思われた。

免疫染色では、推測どおり、トランスジェニックマウスでは視細胞に強い染色が認められた。さらに組織検索を進めたが、トランスジェニックマウスでは初期には正常像を示すが、次第に視細胞外節の空胞化が出現し、視細胞の核もpyknosisを示した。さらに進行すると、外節は短くなり、外顆粒層は2~3層となり、内節の遊離リボゾームも増加した。さらにフォスデュージンの免疫染色を眼内だけでなく脳を中心にその他の臓器まで適応してみると、脳内の一部の細胞群に、フォスデュージンとアレスチン、またごく微量のロドプシンが染色される部分があることが判明した。これらの細胞群はhabenula commissura amygdala や superior colliculus であった。

### <考察>

光情報変換機構と類似した、G蛋白質を介する細胞内変換機構は数多くあり、これ

らは少なくとも、リセプターレベルとG蛋白質レベルで制御されることが知られている。フォスデュシンは、明順応下で、G蛋白質であるトランスデュシンと相互作用しながら、光情報伝達を抑制しているが、暗順応下で73番のセリンがリン酸化を受け、その活性を失う。今回、牛眼網膜ライブラリーより新しくスクリーニングされたフォスデュシンは、フォスデュシンと40%の相同性を持ち、推定上のリン酸化部位も存在し、フォスデュシンと似たような機能を持つことを推測させた。また、Crafftらは(9)、フォスデュシン類似蛋白質が5'側のエクソンのスプライシングにより複数網膜に発現していることを推測した。塩基配列を示していないが、今回我々が得たcDNAのうち5'側が異なったcDNAが1つあり、Crafftらが報告したものと同一のものである可能性がある。

フォスデュシンの網膜内での発現量は、我々が行った方法によれば、ロドプシンの約6%となるがこれは、Leeらが報告した(10)網膜内の量に近いと考えられる。新しいフォスデュシンは発現がより少ないと推測されるが、網膜内での発現部位や、特異性についてはまだ不明である。RPhLPLが様々な臓器に発現し、それぞれのシグナルトランスダクションを制御していることが推測されたが、RPhLPsは網膜特異的な発現を示し、この遺伝子の解析ならびに、網膜内でどのシグナルトランスダクションに関与するのか興味もたれる。

トランスジェニックマウスの解析で推測できることは、この蛋白質は、眼の順応に関与する蛋白質であるということである。しかしながら、時間経過とともに組織学的な検査をすると、初期にはほぼ正常であった視細胞内に、時間がたつにつれてさまざまな変性が引き起こされる。このことは、変異したフォスデュシンが視細胞内に存在すると、最終的に網膜変性を引き起こす可能性があることを示すと考えられた。これまでの報告によれば、フォスデュシンは染色体1番の長腕、1q25-1q32.1に存在する(11)。Usher症候群タイプIIは同じ染色体1番でも詳細には、1q41に存在する(12)ため、今回は、Usher症候群患者の遺伝子解析は行わなかった。しかし、フォスデュシン遺伝子座近傍に連鎖する網膜変性を示す家系の報告(13)や、まだ、連鎖解析が行われていない網膜変性のタイプもたくさん存在するため、この後も、この遺伝子の解析は有意義と思われた。

#### <文献>

- (1) Lolley RN, Brown BM, Farber DB: Protein phosphorylation in rod outer segments from bovine retina: cyclic nucleotide-activated protein kinase and its endogenous substrate. *Biochem Biophys Res Comm* 1977; 78: 572-578.
- (2) Lee RH, Ting D, Lieberman BS, Tobias DE, Lolly RN, Ho Y-K: Regulation of retinal cGMP cascade by phosducin in bovine rod photoreceptor cells: interaction of phosducin and transducin. *J. Biol. Chem.* 1993; 267: 25104-25112.
- (3) Abe T, Kikuchi T, Chang T, Shinohara T: The sequence of the mouse phosducin-encoding gene and its 5'-flanking region. *Gene* 1993; 133: 179-186.
- (4) Bauer PH, Muller S, Puzicha M, Pippig S, Obermaier B, Helmreich EJM, Lohse MJ: Phosducin is a protein kinase A-regulated G-protein regulator. *Nature* 1992; 358: 73-



(5) Abe T, Kikuchi T, Shinohara T: The sequence of the human phosducin gene (PDC) and its 5' flanking region. *Genomics* 1994; 19: 369-372.

(6) Sanger F, Coulson AR, Barrel GBG, Smith AJH, Roe BA: Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol* 1980; 143: 161-167.

#### Original Paper

(7) Moore NC, Anderson G, Williams GT, Owen JJT, Jenkinson EJ: Developmental regulation of bcl-2 expression in the thymus. *Immunology* 1994; 18: 115-119.

(8) Miles MF, Barhite S, Sganga M, Elliott M: Phosducin-like protein: An ethanol-responsive potential modulator of guanine nucleotide-binding protein function. *Pro Natl Acad Sci.USA* 1993; 90: 10831-10835.

(9) Craft MC, Lolley RN, Seldin MF, Lee RH: Rat pineal gland phosducin: cDNA isolation, nucleotide sequence, and chromosomal assignment in the mouse. *Genomics* 1991; 10: 400-409.

(10) Lee RH, Lieberman BS, Lolley RN: A novel complex from bovine visual cells of a 33,000-dalton phosphoprotein with b-and g-transducin: purification and subunit structure. *Biochemistry* 1987; 26: 3983-3990.

(11) Sparkes RS, Lee RH, Shinohara T, Craft CM, Kolis T, Klisak I, Heinzmann C, Bateman JB: Assignment of the phosducin (PDC) gene to human chromosome 1q25-1q32.1. *Genomics* 1993; 18: 426-428.

(12) Kimberling WJ, Weston MD, Moller C, Davenport SLH, Shugart YY, Priluck IA, Martini A, Milani M, Smith RJ: Localization of Usher syndrome type II to chromosome 1q. *Genomics* 1990; 7: 245-249.

(13) van Soest S, van den Born LI, Gal A, Farrar GJ, Bleeker-Wagemakers LM, Westerveld A, Humphries P, Sandkuul LA, Bergen AAB: Assignment of a gene for autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP 12) to chromosome 1q31-q32.1 in an inbred and genetically heterogeneous disease population. *Genomics* 1994; 22: 499-504.

Phosducin has been reported as the only protein phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase A in rat photoreceptor cells [1]. Recent reports have shown that phosducin is also expressed in cone photoreceptor cells [2], pineal gland [3], and other tissues [4], and that it inhibits not only phototransduction [5] but other signal transduction cascades [4] by interacting with G-protein  $\beta$ -subunits [6]. We have demonstrated the sequences of

Phosducin, which is expressed abundantly in the retina, me- and that each phosducin may mediate G-protein-coupled signal transduction cascades. To elucidate new genes that may mediate signal transduction cascades in the retina, we cloned a cDNA that looked the same as the phosducin-like protein of the rat, as reported by other investigators. We examined the gene expression in rat retina using semiquantita-

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録していません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。