

氏名(本籍) 北 川 元 生

学位の種類 医 学 博 士

学位記番号 医 博 第 1037 号

学位授与年月日 平 成 2 年 3 月 28 日

学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当

研究科専攻 東北大学大学院医学研究科  
(博士課程) 生理学系専攻

学位論文題目 A Possible Correspondence of the rig Protein  
to Ribosomal Protein S15  
(rig蚕白とリボソーム蚕白S15との同一性について)

(主 査)  
論文審査委員 教授 岡 本 宏 教授 林 典 夫  
教授 立 木 蔚

## 論 文 内 容 要 旨

ラットインスリノーマから発見された遺伝子 *rig* (rat insulinoma gene) は、種々のがん細胞や培養細胞で高い発現が認められているほか、再生肝などの正常細胞の増殖時にも発現が増大することが見出されている。*rig* のコードしている145アミノ酸からなる蛋白質の一次構造は哺乳類およびニワトリで完全に保存されており、*rig* が進化上強い制約を受けてきたことが示唆されている。また、*rig* は哺乳類で多重遺伝子群を構成しており、ヒトゲノムはハプロイドあたり1コピーの機能性遺伝子と6コピーの偽遺伝子を含む。この機能性*rig* 遺伝子の5'領域はTATA boxを欠き、GC boxを有し、CpGアイランドを形成している。以上のような発現状態と構造上の特徴から、*rig* は house keeping gene のひとつであることが考えられている。

本研究では、*rig* 遺伝子の産物である*rig* 蛋白質の生理的役割を知る目的で、*rig* 蛋白質に対する抗体を調製し、これらの抗体を用いたウエスタン法により*rig* 蛋白質の細胞内局在を決定した。

その結果、1) *rig* cDNAの塩基配列から推定されたアミノ酸配列に基づき20~25アミノ酸からなる8種のペプチドを合成し、それぞれをハプテンとしてウサギ抗血清を得た。このうち少なくとも5種 (P-1-b, P-2-b, P-3-a, P-4-a, P-5-b) はウエスタン法でラット肝の17kDaの蛋白を認識した。この分子量はcDNAから推定された分子量とよく一致したことから上記の17kDaの蛋白は、*rig* 蛋白であると考えられた。P-5-bと同一の抗原に対するモノクロナール抗体12B8も得られた。2) ラット肝を核、ミトコンドリア、ミクロソーム、サイトソルに遠心分画し、上記の抗体のひとつP-5-bを用いて17kDa蛋白の局在について検索すると、この蛋白はほとんどがミクロソーム画分に回収されていた。ミクロソーム画分を、さらにリボソーム画分とそれ以外に分画した。モノクロナール抗体12B8を用い17kDa蛋白はリボソーム画分に回収されるという結果を得た。このリボソーム画分の17kDa蛋白は、*rig* 蛋白中の異なる領域に対する他の二種類の抗血清によっても同様に認識された。3) リボソームをサブユニットに解離するために、1M KClとインキュベートしたあとショ糖密度勾配超遠心にかけて。分取した分画を260nmでの吸光度、SDS-PAGE後の非特異染色、12B8を用いたウエスタン法で解析したところ、17kDaの蛋白は40Sサブユニットに回収されていた。4) 40Sサブユニットの蛋白を抽出し、basic-acidicおよびbasic-SDSの二種類の二次元電気泳動法で展開した後、フィルターにプロットし12B8を用いて染色した。この結果いずれにおいてもリボソーム蛋白S15のスポットが検出された。5) [<sup>35</sup>S]メチオニンでラベルした*rig* cDNAの試験管内転写-翻訳産物をラット肝の40Sサブユニット蛋白と共に二次元電気泳動したところ、同産物はS15蛋白と同一の位置に泳動された。6) *rig* 蛋白の分子量、アミノ酸組成は、すでに報告されているS15蛋白の分子量、アミノ酸組成とよく一致した。

なおCollatzらは、アミノ酸組成のデータよりS15は60Sサブユニットの蛋白L25と構造上関連するかもしくは同一の蛋白と考えていたが、本研究においては、60Sサブユニットには12B8と反応する蛋白が見られなかったことからL25は別の蛋白もしくはS15の混入物と考えられた。7) リボソーム蛋白のデータベースの検索により、rig蛋白は種々の原核生物および葉緑体のS19蛋白と一次構造上25~50%の相同性を有することを見出した。

以上の結果から、rig蛋白は、ラット肝ではその大部分がリボソームの40Sサブユニットに局在し、リボソーム蛋白S15と一致すると結論された。この知見はrigが house keeping gene であるという先の知見とも合致する。rig/S15蛋白との相同性が見出された大腸菌のS19蛋白は、initiation factor の結合部位や peptidyl transferase の活性中心の近傍に存在することが報告されていることから、rig/S15蛋白も翻訳の開始、ペプチド鎖の伸長になんらかの役割をはたしていることも考えられた。

## 審査結果の要旨

ラットインスリノーマから発見された遺伝子rig (rat insulinoma gene) は、種々のがん細胞や培養細胞で高い発現が認められているほか、再生肝などの正常細胞の増殖時にも発現が増大することが見出されている。rigのコードしている145アミノ酸からなる蛋白質の一次構造は哺乳類およびニワトリで完全に保存されており、rigが進化上強い制約を受けてきたことが示唆されている。

本研究では、rig遺伝子の産物であるrig蛋白質の生理的役割を知る目的で、rig蛋白質に対する抗体を調製し、これらの抗体を用いたウエスタン法によりrig蛋白質の細胞内局在を決定した。

その結果、1) rig cDNAの塩基配列に基づき20~25アミノ酸からなる8種のペプチドを合成し、それぞれをハプテンとしてウサギ抗血清を得た。このうち少なくとも5種 (P-1-b, P-2-b, P-3-a, P-4-a, P-5-b) はウエスタン法でラット肝の17kDaの蛋白を認識した。この分子量はrig cDNAから推定された蛋白の分子量とよく一致した。P-5-bと同一の抗原に対するモノクローナル抗体12B8も得られた。2) ラット肝を核、ミトコンドリア、ミクロソーム、サイトソルに遠心分画し、上記の抗体のひとつP-5-bを用いて17kDa蛋白の局在について検索すると、この蛋白の大部分はミクロソーム画分に回収された。さらにミクロソーム画分をリボソームとそれ以外に分画すると、この蛋白はリボソーム画分に回収された。3) リボソームをサブユニットに解離した結果、17kDaの蛋白は40Sサブユニットに回収された。4) 40Sサブユニットの蛋白を抽出し、basic-acidicおよびbasic-SDSの二種類の二次元電気泳動法で展開した後、フィルターにプロットしモノクローナル抗体12B8を用いて染色した。この結果いずれにおいてもリボソーム蛋白S15のスポットが検出された。5) [<sup>35</sup>S] メチオニンでラベルしたrig cDNAの試験管内転写-翻訳産物をラット肝の40Sサブユニット蛋白と共に二次元電気泳動したところ、同産物はS15蛋白と同一の位置に泳動された。6) rig蛋白の分子量、アミノ酸組成はS15蛋白の分子量、アミノ酸組成とよく一致した。

以上、本論文はrig蛋白がリボソーム蛋白の一つに相当するものであることを示したもので学位論文に値するものとする。