

原核、真核生物に共通した浸透圧センサー遺伝子の同定と機能解析

隠木達也 (新潟大学脳研究所 システム脳生理)

多くの生命体には外環境の塩濃度を感知し順応するための浸透圧センサーが備わっています。近年の研究結果から、単細胞生物においてはこの浸透圧調節が2コンポーネント系と総称されるヒスチジンリン酸化酵素活性を持つ遺伝子ファミリーと機械受容チャネルの働きであることが明らかになっています。一方、ヒトなどの多細胞哺乳動物の体内では舌に存在する味覚センサーの他に、脳、腎臓などの多様に分化した細胞に多様な浸透圧センサー機能が示されていますが、その遺伝子構造はよく知られていません。本研究はヒトから細菌に至るまでの多くの生物で解読されたゲノムDNAが規定する蛋白構造を比較解析する手法を用いて、哺乳動物細胞における浸透圧センサー遺伝子を同定し、その規定するセンサー蛋白機能を解析することを目的としています。

原核生物の2コンポーネント系に対応する哺乳動物の浸透圧センサーの存在を検索する目的で、私はまず真菌浸透圧センサーのヒスチジンリン酸化酵素触媒部位に対してアミノ酸配列ホモロジーを持つ数十個のマウス、ヒト遺伝子をコンピューター検索を用いてデータベースから抽出しました。そして、これら遺伝子 cDNA を大腸菌細胞に導入し発現させ、発現蛋白が大腸菌細胞の蛋白リン酸化情報伝達経路に及ぼす作用と細胞増殖速度に与える影響を調べました。cDNA 導入細胞を NaCl 付加により高浸透圧刺激した後、溶菌した細胞液中の蛋白リン酸化酵素活性を測定する *in vivo* 系を用いて解析した結果、1つのヒトクローン (PTP1 と命名) で NaCl 付加後に 55 k d の大きさを持つ細胞蛋白が特異的にリン酸化させ、細胞の増殖が抑制されることを見出しました。また *in vitro* の系においても、精製 PTP1 蛋白は同じ 55 k d の大腸菌蛋白の酸に安定なリン酸化を亢進しました。PTP1 の cDNA から予測される蛋白構造は機能モチーフ配列として Myosin tail と ATP 結合部位を含む 700 アミノ酸残基です。PTP1 に最も相同性の高い大腸菌蛋白は Myosin tail 構造をもち浸透圧調節機能のある機械受容チャネルでした。大腸菌細胞で発現させた PTP1 蛋白は 100 k d の大きさを持ち、この組み換え PTP1 蛋白を抗原として作製した抗体を用いたウエスタンブロットは同じ 100 k d の単一バンドをヒト小脳組織中に検出しました。RT-PCR 法と *In situ* ハイブリダイゼーション法の結果から、PTP1 の mRNA は調べた 9 つすべてのラット臓器で発現しており、脳内では海馬、小脳顆粒細胞、大脳皮質に高濃度発現していました。以上の結果は PTP1 蛋白が広い範囲の生物、細胞で共通した浸透圧センサーとして働く可能性を示しています。

2

助成番号 0138

原核、真核生物に共通した浸透圧センサー遺伝子の同定と機能解析

隠木達也 (新潟大学脳研究所 システム脳生理)

1. 研究目的

本研究はヒトから細菌に至るまでの多くの生物で解読されたゲノムDNAが規定する蛋白構造を比較解析する手法を用いて、哺乳動物細胞における塩濃度知覚(浸透圧)センサー遺伝子を同定し、その規定するセンサー蛋白機能を解析することを目的としています。

多くの生命体には外環境の塩濃度を感知し順応するための浸透圧センサーが備わっています。近年の研究成果から、細菌に代表される単細胞生物においてはこの浸透圧調節が2コンポーネント系と総称されるヒスチジンリン酸化酵素活性を持つ遺伝子ファミリーと機械受容チャネルの働きであることが明らかになっています¹。一方、ヒトなどの多細胞哺乳動物の体内では舌に存在する味覚センサーの他に、脳、腎臓などの多様に分化した細胞に多様な浸透圧センサー機能が示されていますが、その遺伝子構造はよく知られていません。これまでのヒト細胞での研究は高浸透圧刺激によって細胞内で作動する蛋白間情報伝達経路と遺伝子発現の変化に必然的に焦点があてられてきました。しかし、バクテリア、酵母、ヒトを始めとする多数の生物ゲノムが解読されつつある現在、私は浸透圧変化感知機構を含めた未解明の細胞機能を明らかにするアプローチ方法として、異なる生物種間で対応した細胞機能を担う遺伝子とその規定蛋白を比較する方法を用いて研究を進めています。

細菌、酵母の2コンポーネント系リン酸化転移機構と同様に、細胞外の浸透圧刺激は哺乳動物細胞においても、MAPカイネース活性化経路などの主要な細胞蛋白リン酸化情報伝達経路を介して伝搬して核内の遺伝子発現に影響を与えることが示されています²。しかし、この情報伝達に関する蛋白リン酸化の内訳は生物種により異なり大きく2界に分かれます。すなわち原核生物界では蛋白ヒスチジン残基のリン酸化が情報を伝達し、真核生物界ではチロシンとセリン・スレオニン残基のリン酸化が伝達しています³。本研究では、まず細菌と酵母の浸透圧センサーに構造類似性を示すヒトのcDNA遺伝子群を大腸菌細胞内に導入し、高浸透圧刺激を与えてこの大腸菌細胞を活性化し導入されたヒト遺伝子の規定蛋白の発現を誘導します。このヒト蛋白の大腸菌細胞へ与える作用とリン酸化変化を指標にもちいて、この2つの異なる細胞蛋白リン酸化シグナル様式を同じ細胞内で交差、連結させる遺伝子を探索し解析していきます。本研究結果から明らかになる内容として、1) 原核と真核生物に共通した浸透圧センサー遺伝子・機構の同定、2) 浸透圧センサー機構における生物の進化分化、3) 浸透圧センサー機構における蛋白リン酸化酵素の役割などがあります。

2. 研究方法

2・1 浸透圧センサー構造が保存された動物 cDNA 遺伝子検索

原核生物の2コンポーネント系に対応する哺乳動物の浸透圧センサーの存在を検索する目的で、私はバクテリア、酵母、植物などの2コンポーネント系のヒスチジンリン酸化触媒領域に対してアミノ酸配列ホモロジーを持つマウス、ヒト蛋白質をコンピューター検索を用いてデータベースから抽出しました。まず、ヒトやマウスの遺伝子データベースの中から、真菌浸透圧センサー（CaSln, CaNik）のヒスチジンリン酸化酵素触媒部位が保存された遺伝子群を検索していき、既知遺伝子と機能・構造が未知な EST (Expression Sequence Tag) を含む数十個の遺伝子を拾い上げました。拾い上げられた遺伝子は構造から2コンポーネント系センサーと同じ蛋白ファミリーに属すると判断できる相同性の極めて高い群と、分化が進行し相同性が低下し2コンポーネント系センサー蛋白と判断できない群に分類されます。

2・2 選抜された動物 cDNA 遺伝子の⁵大腸菌細胞への導入、発現誘導、蛋白リン酸化活性化

次に、拾い上げられた遺伝子の cDNA を PCR 増幅などの方法で全長が得られる物はすべて取得し発現ベクターに組み込み大腸菌細胞 BL21-SI に導入し、その蛋白活性を調べるリン酸化実験を行いました。BL21-SI は高浸透圧刺激に対する生体反応として大腸菌細胞が遺伝子発現を増加させるゲノム中の proU オペロン内に RNA 合成酵素が人為的に組み込まれた株であり、浸透圧刺激に対する細胞の反応と同時に導入された発現ベクターから動物遺伝子の規定蛋白が合成されます⁵。

cDNA を大腸菌細胞に導入し発現させ、発現蛋白が大腸菌細胞の蛋白リン酸化情報伝達経路に及ぼす作用を、導入細胞の溶菌液中の蛋白リン酸化酵素活性を[γ -³²P]ATP 存在下で測定する *in vivo* 系を用いて解析しました。また *in vitro* 蛋白リン酸化実験では、cDNA 導入により PTP 蛋白を発現した大腸菌の溶菌液からヒスチジン6 残基精製カラムを用いて PTP1 蛋白を精製し、これに[γ -³²P]ATP 存在下で別の大腸菌蛋白を基質として作用させてリン酸化酵素活性を測定しました。さらに、導入された遺伝子を発現させて大腸菌の細胞増殖速度やその他の形質に与える影響を調べました。

2・3 PTP1 の蛋白と mRNA の組織分布

発現させる PTP1 蛋白の末端にヒスチジン6 残基を融合させる融合型発現ベクターにこの全長 cDNA を組み込み大腸菌細胞へ導入し発現させ、この大腸菌細胞の溶菌液からヒスチジン6 残基精製カラムを用いて精製した組み換え蛋白を抗原に抗体を作製しました。そしてこの抗体を用いてヒト各臓器蛋白に対するウエスタンブロットを行いました。また PTP1 遺伝子に特異的な2つの DNA プライマーを用いてラット各臓器の cDNA に対して RT-PCR を行い、各臓器における mRNA 発現の有無を調べました。さらに PTP1 遺伝子の ³⁵S 標識プローブを用いたラット脳の *In situ* ハイブリダイゼーション法を行い、脳での PTP1 の mRNA 発現分布を決定し

ました。

3. 研究結果

3・1 PTP1 蛋白の細胞蛋白リン酸化酵素活性

バクテリア、酵母、植物などの2コンポーネント系の浸透圧センサーのヒスチジンリン酸化酵素触媒部位が保存された遺伝子群を検索していき ARA160、SCARP などの既知遺伝子とクローン#1-7などの機能と構造が未知な EST(Expression Sequence Tag) を含む約20個の遺伝子を拾い上げました。

これら遺伝子の大部分の cDNA を大腸菌細胞に導入し発現させ、発現蛋白が大腸菌細胞の蛋白リン酸化情報伝達経路に及ぼす作用と大腸菌細胞増殖速度に与える影響を調べました。cDNA 導入細胞を NaCl 付加により高浸透圧刺激した後、溶菌した細胞液中の蛋白リン酸化酵素活性を測定する *in vivo* 系を用いて解析した結果、1つのヒトクローン (PTP1 と命名) で NaCl 付加後に 55 k d の大きさを持つ細胞蛋白が特異的にリン酸化させることを見出されました (Fig. 1A 列1の矢印)。

この *in vivo* 系の結果が高浸透圧刺激により大腸菌細胞で 55 k d 蛋白の蛋白全体量が増加したことを反映しているのではなく、蛋白のリン酸化が増加したことを確認する目的から、私は以下の *in vitro* 蛋白リン酸化実験を行いました。すなわち cDNA 導入により PTP 蛋白を発現した大腸菌の溶菌液からヒスチジン精製カラムを用いて PTP1 蛋白を精製し、別の大腸菌蛋白を基質としてリン酸化酵素活性を測定しました。結果は精製 PTP1 蛋白の作用により 55 k d 蛋白を含めた複数の蛋白に著しいリン酸化が認められました (Fig. 1A 列2)。ヒスチジン残基のリン酸化は酸処理により容易に脱リン酸化する特徴を利用して SDS-PAGE 解析によって他のアミノ酸残基 (チロシン、セリン、スレオニン) のリン酸化との識別が可能です。さらに酸処理により蛋白リン酸化の化学特性を調べたところ、55 k d 蛋白のリン酸化のみ酸耐性であり、55 k d 以外の全ての蛋白バンドは消失しました (Fig. 1A 列2と3)。すなわち 55 k d 蛋白はチロシン、セリン、スレオニン残基のいずれかがリン酸化されており、それ以外のバンドはヒスチジン残基がリン酸化されている可能性が高いことを示しています。以上の結果から大腸菌細胞内で PTP1 は細胞蛋白をリン酸化する酵素活性をもつことが明らかになりました。

3・2 PTP1 蛋白の細胞増殖抑制効果

PTP1 遺伝子が規定する蛋白を発現していると確認されたこの発現ベクターを用いて、PTP1 蛋白を大腸菌細胞で発現させて細胞増殖への影響を再度調べました。その結果、PTP1 蛋白を発現する大腸菌細胞は明確な細胞増殖抑制性示すことが再現されました (Fig. 1B)。

3・3 PTP1の遺伝子と蛋白構造解析

PTP1 遺伝子の cDNA を全長は 4.5Kb であり N 末端から約 50 塩基下流に翻訳開始コドンが存在し、翻訳領域の長さは 2.1Kb でした。予測される規定蛋白の全長はアミノ酸 700 残基であり、機能モチーフ配列として Myosin tail と ATP 結合部位を含んでいました (Fig. 2A)。PTP1 構造は 2 コンポーネント系から分化が進行し構造のみからは 2 コンポーネント系センサー蛋白と判断できない低い相同性群に属しています。大腸菌蛋白の中で PTP1 に対し最も高い構造ホモロジーをしめす蛋白は機械刺激チャンネル Msc であり、大腸菌 Msc 蛋白には Myosin tail 構造が存在し細胞の浸透圧調整チャンネルとして働いています (Fig. 2A)。

次に発現蛋白の末端にヒスチジン 6 残基を融合させる融合型発現ベクターにこの全長 cDNA を組み込み大腸菌細胞へ導入し発現させ SDS-PAGE 解析した結果、規定蛋白に予測される大きさに近い 100Kd の大きさをもつ蛋白バンドの出現が認められました。さらにこの大腸菌細胞の溶菌液からヒスチジン精製カラムを用いて精製した蛋白の SDS-PAGE 解析結果、同じ 100Kd の大きさを持つ単独バンドが確認されました (Fig. 2B の右端)。この精製 PTP1 蛋白を抗原として作製した抗体は、ヒト小脳組織において抗原 PTP1 蛋白と完全に一致した 100Kd の大きさを持つ単独バンドを認識しました (Fig. 2B)。以上の結果から PTP1 はヒトの小脳で 100Kd の蛋白として発現していることが明らかになりました。

3・4 PTP1 の mRNA 組織分布

2つの PTP1 遺伝子に特異的な DNA プライマーを用いてラット各臓器の cDNA に対して RT-PCR を行い、各臓器における mRNA 発現の有無を調べました。その結果、調べた 9 つの臓器全てに 1.2Kb の単独バンドの増幅が認められました。この 1.2Kb の大きさは PTP1 遺伝子から増幅されると予測されるバンドの大きさと一致しています。この結果より PTP1 の mRNA は広い臓器に発現分布していることが明らかになりました (Fig. 3A)。

次に ³⁵S 標識プローブを用いた脳の In situ ハイブリダイゼーション法を行い、ラット脳の PTP1 の mRNA 発現分布を決定しました。最も高いレベルの mRNA 発現が認められる領域は海馬の歯状回と小脳の顆粒細胞層でした。その他で高い発現が認められる領域に大脳新皮質、梨状皮質、海馬の CA 領域がありました (Fig. 3B)。

3・5 PTP1 より 2 コンポーネント系浸透圧センサーに高い構造相同性を示したクローン PTP1 は 2 コンポーネント系分化が進行し 2 コンポーネント系センサー蛋白への相同性は低い群に属していますが、最初に選抜された動物遺伝子クローンの中には 2 コンポーネント系センサーと同じ蛋白ファミリーに属すると判断できる相同性の極めて高い群に属するものが複数存在した。しかし、これらのクローンの動物体内での発現はほとんどが再現できませんでした。唯一、RT-PCR で発現が確認できたクローン # 6 (Fig. 4) も Northern analysis やヒトゲノム DNA データーでの確認はありません。以上の結果は 2 コンポーネント系浸透圧センサーに相同性の

極めて高い群クローンは動物細胞への寄生体、感染体由来の可能性を示しています。

4. 考察

医学分野におけるヒト遺伝子の塩基構造の解読が完了した後の『ポストゲノム時代』の重要課題は遺伝子産物の機能解析であると広く認識されていますが、実験による蛋白機能解析に有用な一般的方法はありません。本研究は動物細胞すべてに存在するの浸透圧センサー機能理解のためにアミノ酸配列から得られる情報に、原核と真核の両生物界間で異なる蛋白リン酸化様式の解析を利用した点に特色があります。このような視点から研究方法として原核、真核の両生物に広く分布する細胞の2コンポーネント系センサー蛋白と細胞内蛋白リン酸化情報伝達系を指標にスクリーニングを行いました。

本研究で示された PTP1 は真菌の2コンポーネント系浸透圧センサーへの構造類似性から選ばれ、大腸菌細胞の高浸透圧刺激条件下での蛋白リン酸化作用を示しました。さらに PTP1 の蛋白構造は Myosin tail 構造を持ち、既知の多くの動物 Myosin heavy chain と同じ蛋白ファミリーに属しています。これまでの多くの研究の中で原核と真核の両生物が持つ2コンポーネント系浸透圧センサーに最も近い動物蛋白は Myosin heavy chain であるということは確立された事実です。PTP1 の持つ蛋白リン酸化作用の詳細な解析は浸透圧センサーがどのように動物細胞で進化したかを明らかにすると期待しています。

5. 今後の課題

現在は研究の完成に向けた後半段階であり、以下の各点で現在研究が進行中です。(1) PTP1 が細胞内で直接作用する相手蛋白を大腸菌と真核細胞の両方において免疫沈降法、GST 精製法、酵母2ハイブリッド法などの蛋白間相互作用を利用する方法で検索同定しています。(2) リン酸化が示された 55 k d 大腸菌蛋白を蛋白精製して同定しています。さらにリン酸化が予測されるこのアミノ酸残基を他の残基へ置換した変異型 cDNA を点突然変異導入法により作製して、PTP1 蛋白の作用によるこの変異型蛋白のリン酸化状態の解析により PTP1 蛋白と他の原核生物シグナル蛋白間の直接相互作用の有無が明らかにされる可能性があります。(3) COS 細胞、初代神経細胞の培養系に PTP1 遺伝子の野生型、変異型を導入し発現させた系において高浸透圧で細胞を刺激しています。そして PTP1 下流のシグナル蛋白のリン酸化、細胞増殖、細胞分化の形態的・生化学的発現を解析しています。

6. 文献

1. Blount, P. & Moe, P. C. Bacterial mechanosensitive channels: integrating physiology, structure and function. *Trends Microbiol* 7, 420-4. (1999).
2. Posas, F. et al. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell*

- 86, 865-75. (1996).
- Galcheva-Gargova, Z., Derijard, B., Wu, I. H. & Davis, R. J. An osmosensing signal transduction pathway in mammalian cells. *Science* 265, 806-8. (1994).
 - Swanson, R. V., Alex, L. A. & Simon, M. I. Histidine and aspartate phosphorylation: two-component systems and the limits of homology. *Trends Biochem Sci* 19, 485-90. (1994).
 - Bhandari, P. & Gowrishankar, J. An *Escherichia coli* host strain useful for efficient overproduction of cloned gene products with NaCl as the inducer. *J Bacteriol* 179, 4403-6. (1997).

7. Figure legend

Figure 1

(A) E coli protein phosphorylation effect of PTP1

Protein phosphorylation experiments using [γ - 32 P]ATP were performed with cell lysate of PTP1 cDNA-transfected E coli cells (*in vivo*). NaCl-induced PTP1 protein expression strongly enhanced phosphorylation state of 55-Kd protein (arrow in lane 1). High osmotic stress changed significantly reduced total phosphorylation level of these lysate in the presence and absence of PTP1.

Protein phosphorylation effects of purified histidine-tagged PTP1 were assayed with native E coli cell lysate in the presence of [γ - 32 P]ATP (*in vitro*). PTP1 protein strongly enhanced total protein phosphorylation level of cell lysate (lane 2). Acid treatment depleted the phosphorylation of histidine residues of E coli proteins, which reveal the the same phosphorylation enhancement effect of PTP1 on 55-Kd protein (arrow in lane 1).

(B) E coli cell growth arrest effect of PTP1

In the right plate, PTP1 cDNA-transfected E coli cells were incubated at 37°C for 16 hrs. In the left plate, mock-transfected E coli cells were incubated at the same condition. Growth of PTP1 cDNA-transfected E coli cells were significantly suppressed by the effect of PTP1 protein expression.

Figure 2

(A) Protein structure of human PTP1

Predicted open reading frame of PTP1 gene encode protein of 700 amino acid residues. PTP1 have the protein motif of myosin tail and ATP binding site. An E coli protein shows

the closest homology to PTP1 is the Msc mechanosensitive channel, which functions as osmoregulatory channel.

(B) Protein expression of PTP1 in human cerebellum

CBB staining of purified histidine-tagged recombinant PTP1 protein revealed the single 100-Kd band in SDS-PAGE (right lane). This purified protein was used immunogen to produce PTP1-specific antibody. Western blot analysis of anti-PTP antibody for human cerebellum (CLB) revealed the main band with the size of 100 Kd, exactly matched the position of purified histidine-tagged recombinant PTP1 protein. -3, -4 and 0 indicates 1/1000, 1/10000 and 1/1 dilution from PTP1 protein sample shown in the right CBB lane.

Figure 3

(A) RT-PCR analysis of PTP1 mRNA expression in rat 9 organs

Oligo(dT)-primed cDNA from each organ was amplified by PCR using two PTP1-specific primers for 35 cycles. In all lanes, single bands of PCR product were observed. The predicted size of PCR products of PTP1 is 1.2 kb.

(B) *In situ* hybridization of rat brain sections with anti-sense cRNA probes of PTP1. Bright-field photomicrographs of film autoradiograms illustrating the labeling patterns of rat brain sections for ³⁵S-labeled cRNA probes of PTP1. High level expression of PTP1 mRNA were observed in hippocampus (Hip), dentate gyrus (DG), cerebellar granule cell layer (Gr), neocortex (Neo) and piriform cortex (Pri).

Figure 4

RT-PCR analysis of clone#6 mRNA expression in rat 8 organs

Oligo(dT)-primed cDNA from each organ was amplified by PCR using two clone#6-specific primers for 35 cycles. In all lanes, single bands of PCR product were observed. The predicted size of PCR products of PTP1 is 0.8 kb. In the lower panel, PCR products were blotted to filter, and then hybridized with ³²P-labeled cDNA probe of clone#6.

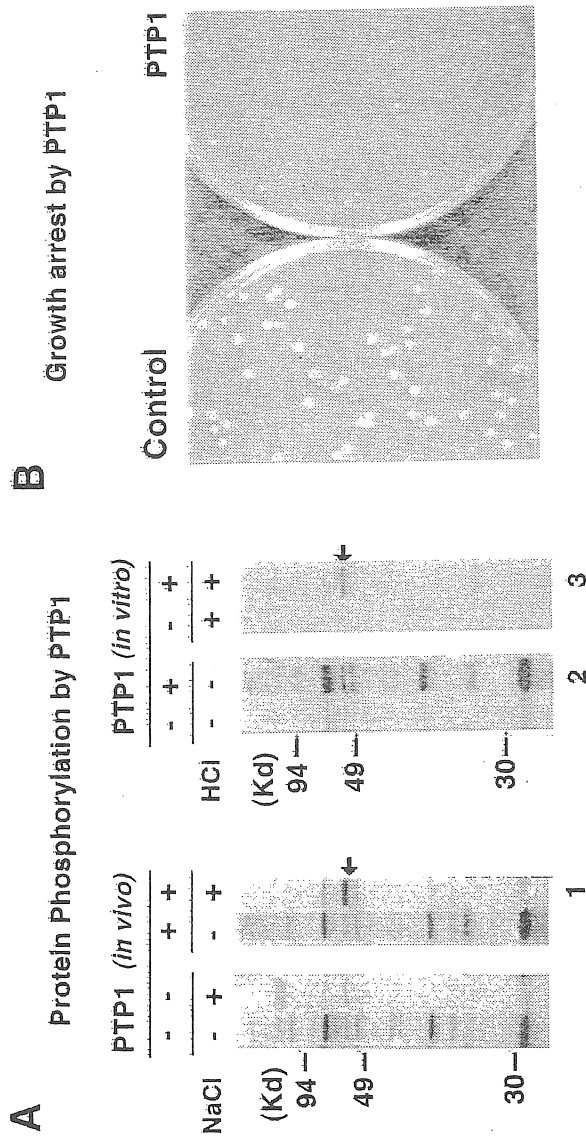


Figure 1

新潟大学脳研究所 隠木達也

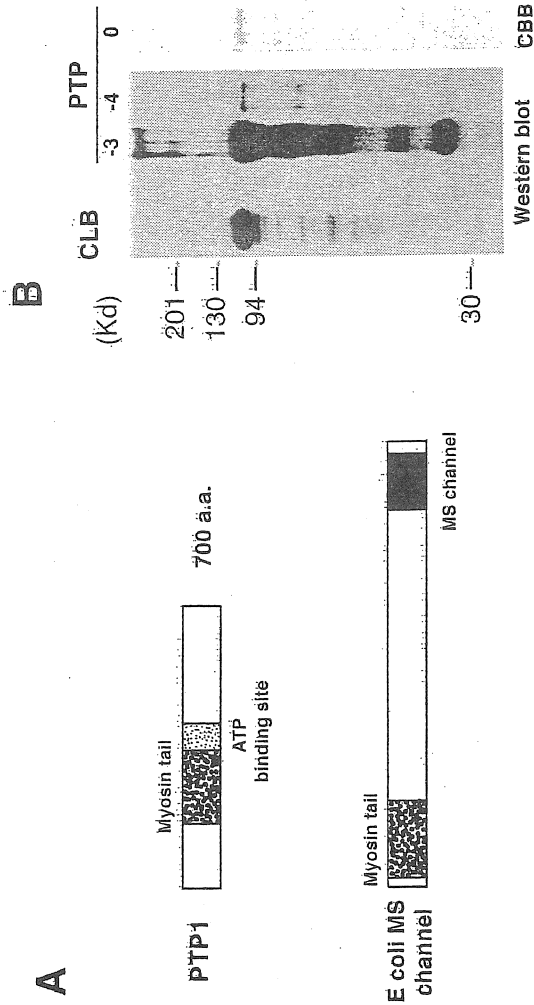


Figure 2

新潟大学脳研究所 隠木達也

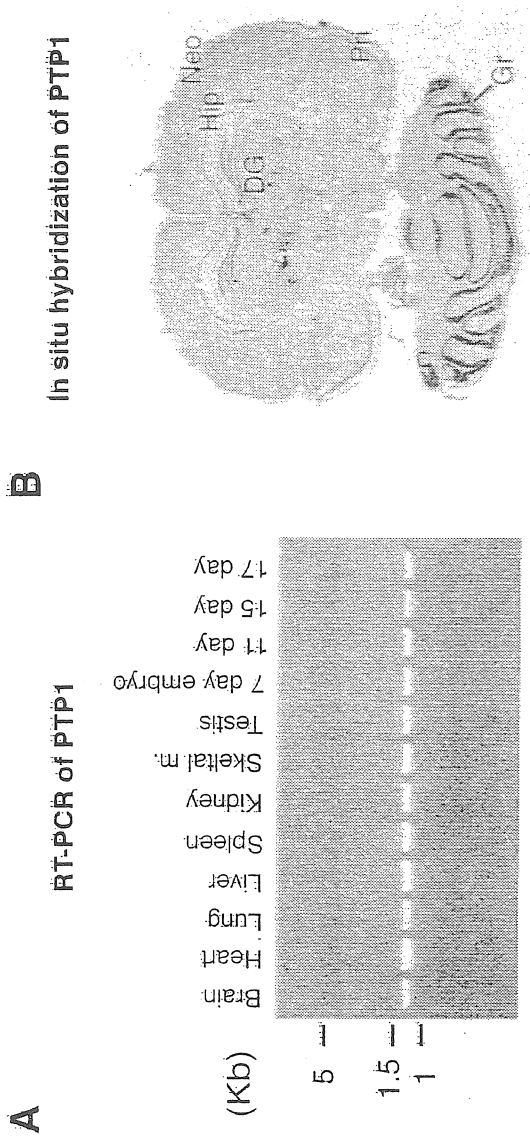


Figure 3

新潟大学脳研究所 隠木達也

RT-PCR analysis of Clone #6

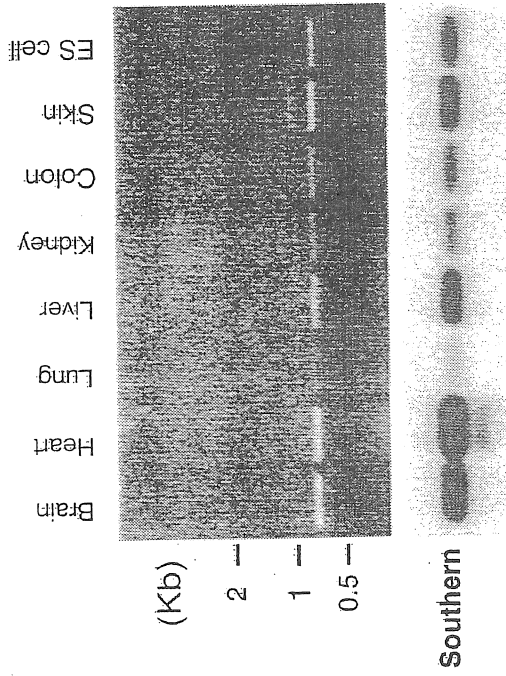


Figure 4

新潟大学脳研究所 隠木達也

Identification of the common osmosensor in the prokaryotic and eukaryotic cell

Tatsuya Ingi

Department of Neurophysiology
Brain Research Institute, Niigata University

Summary

For the purpose of isolation of animal osmosensor genes, 20 human and mouse cDNAs were selected from gene databases by computer homology search to bacterial and fungal osmosensor kinase domains. For the screening of protein kinase activity, these cDNAs in NaCl-induced expression vectors were transfected into E coli cell. After high osmotic stimulation on the transfected cells, protein phosphorylation pattern of cell lysate were examined. A human gene, named PTP1, was found to increase the protein phosphorylation of E coli and suppress these cell growth. Both *in vitro* and *vivo*, PTP1 protein enhanced the acid-stable phosphorylation of 55Kd protein of E coli. PTP1 mRNA encodes a protein of 700 amino acids that has the motif of myosin tail and ATP binding site. Among all E coli protein, a mechanosensitive channel that functions as a osmoprotective channel in cells, shows the highest homology to PTP1. PTP1 protein expressed from cloned cDNA in E coli., migrated as a single band with the molecular mass of 100Kd. Western blot analysis using the anti-PTP1 antibody for human cerebellum tissue demonstrated a single band with the same size, 100Kd. RT-PCR amplified PTP1 specific bands from all rat organ tissues surveyed. *In situ* hybridization to brain sections revealed the high level expression of PTP1 mRNA in cerebral cortex, hippocampus and cerebellum.