

# 論文内容の要旨

申請者氏名 秋山 元英

ギャップ結合は隣接する細胞間に構成される膜貫通型チャネルであり、種々のイオン、分子量約 1kDa 以下の低分子量分子の拡散を可能にする。その構成タンパク質であるコネクシン(Cx)は、N 末端、C 末端領域が細胞質内に位置する 4 回膜貫通型タンパク質であり、これまでに約 20 種類のコネクシン遺伝子が同定されている。しかし、コネクシンの六量体化、膜への輸送などギャップ結合構築機構の詳細には不明な点が多く残されている。そこで本研究では、Cx43 を材料として、ギャップ結合構築ならびに機能制御機構を理解することを目的に、yeast two-hybrid 法による Cx43 会合タンパク質の探索とその機能解析を行った。

**Cx43 新規会合タンパク質 CIP150 の同定：**Cx43-C 末端領域を bait、ラット卵巣 cDNA ライブラリーを prey としたスクリーニングを行った結果、かずさ DNA 研究所クローン KIAA1432 に対するラット相同遺伝子を単離することができた。KIAA1432 のデータが全長配列を含んでいなかったことから、全長 cDNA のクローニングと塩基配列の決定を行った。その結果、予想されるタンパク質分子量が約 150kDa の新規遺伝子であることが分かり、CIP150 (Connexin43-Interacting Protein of 150 kDa) と命名した。

**細胞内における Cx43 と CIP150 の会合：**CIP150 に対する抗体を作製し、内在性の CIP150 と Cx43 が発現している細胞においてこれら 2 つのタンパク質が会合することを示した。その際、リン酸化レベルが高い Cx43 が優先的に共沈することも確認した。

**Cx43 のギャップ結合構築に関わる CIP150 の機能：**Cx43 およびその欠損変異体の組換えタンパク質を作製し、CIP150 との結合様式を調べた結果、Cx43 膜貫通領域下流の 227-242 番目の 16 アミノ酸が会合に必須であることが明らかとなった。この CIP150 結合領域を欠損した変異型 Cx43 (Cx43  $\Delta_{227-242}$ ) ではギャップ結合の形成が見られず、物質透過活性を有さないこと、リン酸化による修飾をほとんど受けないことも明らかとなった。逆に、CIP150siRNA 発現細胞における Cx43 への影響を解析した結果、Cx43 ギャップ結合の形成、物質透過活性が著しく低下することが確認された。

以上の結果から、本研究により新しく Cx43 会合タンパク質として同定した CIP150 は、その C 末端領域を介して Cx43 と会合することにより、膜への輸送、リン酸化などを伴う機能的なギャップ結合形成に関与することが明らかとなった。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 秋山 元英

ギャップ結合は隣接する細胞間に構成される膜貫通型チャンネルであり、種々のイオン、分子量約 1kDa 以下の低分子量分子の拡散を可能にする。その構成タンパク質であるコネクシン(Cx)は、N 末端、C 末端領域が細胞質内に位置する 4 回膜貫通型タンパク質であり、これまでに約 20 種類のコネクシン遺伝子が同定されている。しかし、コネクシンの六量体化、膜への輸送などギャップ結合構築機構の詳細には不明な点が多く残されている。そこで、申請者は、Cx43 を材料として、ギャップ結合構築ならびに機能制御機構を理解することを目的に、yeast two-hybrid 法による Cx43 会合タンパク質の探索とその機能解析を行った。

まず、Cx43-C 末端領域を bait、ラット卵巣 cDNA ライブラリーを prey としたスクリーニングを行った結果 CIP150 (Connexin43-Interacting Protein of 150 kDa) と命名した新規遺伝子を同定することができた。そこで、CIP150 に対する抗体を作製し、その産物が確かに発現していること、内在性の BP43CT と Cx43 が発現している細胞において実際にこれら 2 つのタンパク質が会合することなどを示した。つぎに、Cx43 およびその欠損変異体の組換えタンパク質を作製し、CIP150 との結合様式を調べた結果、Cx43 膜貫通領域下流の 227-242 番目の 16 アミノ酸が会合に必須であることを見出した。この CIP150 結合領域を欠損した変異型 Cx43 (Cx43  $\Delta_{227-242}$ ) ではギャップ結合の形成が見られず、物質透過活性を有さないこと、リン酸化による修飾をほとんど受けないことも明らかとなった。逆に、CIP150siRNA 発現細胞における Cx43 への影響を解析した結果、Cx43 ギャップ結合の形成、物質透過活性が著しく低下することが確認された。以上の結果から、本研究により新しく Cx43 会合タンパク質として同定した CIP150 は、その C 末端領域を介して Cx43 の膜貫通ドメイン下流部位と会合することにより、膜への輸送、リン酸化などを伴う CX43 による機能的なギャップ結合形成に関与することが明らかとなった。

以上のように、本論文はコネクシンに会合する新規たんぱく質を単離・同定するとともにその機能解析を行ったもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。