1PA089

リーラーフェノタイプを示す神経奇形ラット・
Shaking rat Kawasaki (SRK) のリーリン遺伝子
の解析
○吉川知志、寺島俊雄 (神戸大・医・1解剖)

Shaking rat Kawasaki (SRK) は、自然発症性の常染色体劣性遺伝性神経奇形ラットで、運動障害や中枢神経系の形態異常がリーラー (*reeler*) マウスに酷似している。リーラーの原因遺伝子は1995年にクローニングされ、リーリン (*reelin*) と名付けられた。リーリン蛋白質の機能はまだはっきりしないが、大脳皮質表層に位置するカハール・レチウスニューロン表面に本来発現するべきリーリン蛋白質の欠失により奇形が生じる。一方、SRKラットの分子生物学的研究はほとんど行われていない。我々は、SRKラット脳におけるリーリンの発現をmRNAおよび蛋白質レベルで検討し、いずれにおいてもリーラーマウス同様の著しい発現低下を認めた(昨年度年会で発表)。ところが、ノーザンブロット上でわずかに発現の認められたSRKラットのリーリンmRNAのサイズは、リーラーマウスのそれとは異なり正常とほぼ同じサイズであった。そこで、SRKリーリン遺伝子の構造異常を明らかにする目的で、RT-PCR法によりリーリンcDNA断片を増幅し解析を試みた。翻訳領域両端部のプライマーにより増幅したPCR断片のサイズは、正常およびSRKにおいて相違は認められなかった。また、両PCR産物の制限酵素サイトに今ものところ明らかな違いは見いだされていない。両PCR産物の塩基配列を現在解析中であるが、翻訳領域中に欠損のあるリーラーマウスの場合とは異なり、SRKラットにおけるリーリン遺伝子の異常は、著しい発現低下をもたらすような非翻訳領域(例えば転写調節領域など)における変異の可能性が出てきた。

S. Kikkwa, T. Terashima: Analysis of the *reelin* gene in Shaking rat Kawasaki, a *reeler*-phenotype neuronal mutant rat

1PA091

大腸菌温度感覚レセプターTarの細胞質側ヘリックス間相互作用
変異による温度受容能の変化
○深見賢二、本間道夫、川岸郁朗 (名大・院・理・生命理学)

生物が温度を感じる仕組みはどのようなものであろうか。この疑問を追求するために、我々は、温度センサーとしては最も解析が進んでいる大腸菌レセプター Tar を研究対象としている。Tar は、温度だけでなく、アスパラギン酸や pH 変化なども認識する多刺激受容性をもち、2 回膜貫通型で、刺激の有無に関わらずホモダイマーを形成する。Tar の細胞質側には 2 つの α -ヘリックス領域 (MH1, MH2) があり、適応に際して可逆的メチル化を受ける 4 つのグルタミン酸残基を含んでいる(まとめて QEQE と表記する)。メチル化部位が翻訳後修飾を受けず QEQE のときには、Tar は温度受容能を示さない。脱アミド化され EEEE になると、温度上昇を誘引刺激、低下を忌避刺激として認識する温レセプターとして働き、アスパラギン酸が結合してメチル化が進行したとき (EmEmEmEm など) は、全く逆の温度応答を示す冷レセプターとして働く。当研究室の西山ら (1997) は、温度刺激が、MH 領域における相互作用を直接変化させ、シグナル産生を制御するのではないかと提唱している。もしこの仮説が正しいとすれば、メチル化以外の方法で MH 相互作用を変化させれば、温度受容能が変化すると考えられる。

Trammell と Falke (1998) は、サルモネラ菌 Tar の MH1 におけるサブユニット間界面に存在する Gly278 残基を様々なアミノ酸に置換した。その結果、この残基が変異するとシグナル産生状態が変化すること、それは MH1-MH1' 相互作用の変化によって説明できることが示されている。そこで、本研究では、大腸菌 Tar の G278 残基が A または C に置換された変異体 (当研究室で単離されたもの) について温度受容能を解析した。具体的には、これらの変異レセプターを全レセプター欠損株中で発現させ、菌懸濁液の温度を変化させて、菌の泳ぎの変化を顕微鏡で観察した。いずれの置換体が発現する菌も、アスパラギン酸存在下では、野生型 Tar と同様に冷レセプターとしての応答を示した。つまり、両置換体は温度受容能を保持していた。つぎに、両置換体を、全レセプターおよびメチル化酵素・脱メチル化酵素欠損株中で発現させた。その結果、A 置換体はアスパラギン酸存在下で冷レセプターとしての性質を示した。メチル化部位が QEQE であるにも関わらず、温度受容能が見られたようになったのは、G278A 変異により MH1-MH1' 間相互作用が変化したためと考えられる。今後は、MH1-MH1' 相互作用の変化と温度受容能の関係について、系統的に調べる予定である。

K. Fukami, M. Homma and I. Kawagishi: Changes in thermosensing property of the bacterial receptor Tar by the mutations that alter the interaction between the cytoplasmic methylation helices.

1PA090

カイコガ触角由来膜結合型グアニレートシクラーゼ
遺伝子のクローニング
○田ノ上 信太郎、住田 繁紀、西岡 孝明
(京大院・農・応用生物)

カイコガは性フェロモンを鋭敏にかつ正確に認識する。性フェロモン受容時、触角で cGMP が増大すること、cGMP によって開くイオンチャネルが存在することがこれまでに報告されているものの (Ziegelberger, G. et al. (1990) *J. Neuroscience*, **10**, 1217-1225.; Zufall, F. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8520-8524.)、この cGMP の性フェロモン受容における生理学的意義は不明である。そこで本研究ではカイコガ雄触角から cGMP を合成する酵素、グアニレートシクラーゼ遺伝子のクローニングを行った。

【方法と結果】これまでにラットやショウジョウバエでクローニングされたグアニレートシクラーゼで保存されているアミノ酸配列をもとに縮重プライマーを設計し、RT-PCR 法によりカイコガ雄触角から遺伝子断片を増幅した。得られた遺伝子断片をプローブとして、カイコガ雄触角 cDNA ライブラリーから全長 4.5 kbp の cDNA を獲得した。塩基配列解析の結果、1058 アミノ残基の 1 回膜貫通型の膜タンパク質であり、N 末端からリガンド結合ドメイン、膜貫通部位、キナーゼ様ドメイン、グアニレートシクラーゼドメインを持つと推定した。さらに RT-PCR 法を用いてこの遺伝子のカイコガの各器官、組織における発現の検討を行ったところ、触角以外にも、神経節、中腸、精巣において発現が認められた。

現在、本酵素の活性化機構を明らかにするために、ヨトウガ培養細胞 Sf21 で本遺伝子の発現を行い、リガンドや活性化因子について検討を行っているのでその結果についても報告する予定である。

S. Tanoue, S. Sumida, T. Nishioka: The membrane form guanylyl cyclase found in the antenna of *Bombyx mori*.

1PA092

ショウジョウバエ味覚受容遺伝子 Tre の機能的同定と分子生物学的解析

○上野耕平¹、磯野邦夫¹、森田ひろみ¹、太田雅之¹、三國由佳²、中嶋敏²、山本和生²、塚原保夫¹ (¹東北大学・情報、²東北大学・理・生物)

ハエの唇弁やふ節にある感覚毛には数個の感覚ニューロンがあり、その中の 1 個は糖やアミノ酸に対し応答性を示すことが知られている。ショウジョウバエではこのニューロンのトレハロースに対する味覚応答に特異的に関与する遺伝子 Tre (Trehalose sensitivity) があり、他の糖類などに対する応答性に影響がほとんど見られないことから味覚の受容機構に関与する遺伝子であると推定されてきた。我々はこの遺伝子のクローニングをするために P 因子による Tre 突然変異体作成を試みた。Tre 近傍に P 因子が挿入された数種類の系統を用いて交配により転移を誘発し、転移が近傍のゲノム DNA の一部を欠失させることを利用して、行動学的・生理学的な選別を行ったところ、そのうちの 1 系統からトレハロース特異的に味感度が低下するゲノムの欠失変異体を数多く得ることができた。P 因子配列を標識として周辺のゲノム DNA 配列を解析し、cDNA ライブラリーからこれに対応する cDNA クローンを得た。この遺伝子は 7 回膜貫通型受容体をコードするが、今までに報告されている味覚・嗅覚受容体やその候補遺伝子とは相溶性が低かった。トレハロース感度が顕著に低下している変異体の 1 つのゲノム DNA を調べたところ、転写開始部を含む約 2 Kbp の欠失が確認され、また組織における発現レベルが顕著に低下していることがわかった。これらにより Tre はその一次構造が決定され、リガンドの同定された初めての味覚受容体遺伝子といえる。我々はこれらの P 因子誘起変異体や自然突然変異体における Tre 遺伝子のゲノムと転写産物の解析をおこない、それらの味覚感度の変化と比較することにより、味覚感度に関与する遺伝的機構を推定した。また成虫の各組織や、発生の各段階における Tre の発現について時間的・空間的に解析を行ったので報告する。

K. Ueno, K. Isono, H. Morita, M. Ohta, Y. Mikuni, S. Nakajima, K. Yamamoto and Y. Tsukahara : Functional identification and molecular analysis of *Drosophila* taste receptor gene Tre.