

平成 10 年度厚生科学特別研究事業  
糖尿病に関与する遺伝子 Rad に関する研究

京都大学大学院医学研究科臨床生体統御医学講座  
(成人・老年病病態学)  
堀内久徳

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）  
総括研究報告書

糖尿病に關与する遺伝子Radに關する研究

主任研究者名=堀内久徳（京都大学大学院医学研究科助手）

**研究要旨** 糖尿病患者の骨格筋で著増している遺伝子Rad(Ras associated with diabeties)は、細胞内情報伝達分子Rasスーパーファミリーに属する新しい低分子量GTP結合タンパク質をコードしていたが、その機能解明に向け、本研究を遂行した。まず、RadのcDNAをクローン化し、それを用いてリコンビナントタンパク質を作成、精製した。そして、ウェスタンブロット、免疫沈降可能なモノクローナル抗体を作成した。Radは細胞内では細胞質中に大部分存在し、種々の刺激でも大きな局在の変化は捕らえられなかった。RadへのGTPの結合動態は他のRasファミリーのメンバーと大きく異なっていたが、その理由についてはわからなかった。最後に、種々の方法を用いてRad結合タンパク質の同定を試み、クロスリンク法により数個の候補タンパク質を確認した。目下、それらの同定につとめている。

分担研究者、なし

A. 研究目的

1993年に糖尿病関連遺伝子として同定されたRad(Ras associated with diabeties)は、細胞内情報伝達分子Rasスーパーファミリーに属する新しい低分子量GTP結合タンパク質をコードしており、糖尿病患者の骨格筋で著増していた。Radを強発現した培養骨格筋細胞では糖の取り込みが強く抑制されているので、Radは細胞の糖の取り込みに関連した情報伝達を担っている可能性が考えられる。しかし、これまでのところRadの具体的な作用メカニズムやRad自身の制御メカニズムはほとんど解明されておらず、本研究ではそれらを解明し、糖尿病発症における意義を見いだすことを目的とした。

B. 研究方法

大腸菌でリコンビナントRadタンパク質を作成、精製した。また、それを用いてモノクローナル抗体を作成した。そして、その抗体を用いて間接蛍光抗体法による免疫染色や、GFP-Radコンストラクトを発現させてRadの細胞内局在を解析した。次に、リコン

ピナントRadを用いて、GTPオーバーレイ法とフィルター法でGTPの結合動態を検討した。Rad結合タンパク質をウサギ骨格筋細胞質分画より精製すべく、Radの免疫沈降、Radリガンドオーバーレイ、Radアフィニティークロマトグラフィー<sup>125</sup>I-Radを用いたクロスリンク法を実施した。

### C. 結果

まず、リコンビナントRadを作成・精製し、それを用いて抗Radモノクローナル抗体を作成したが、それはウェスタンブロット及び免疫沈降が可能であった。その抗体を用い、Radを強発現した培養骨格筋細胞C2C12細胞でRadの局在を間接蛍光抗体法を用いて解析したが、Radは細胞質中に一様に染色されたので、主として細胞質に存在すると考えられた。インスリン刺激や高血糖刺激ではその局在はほとんど変化しなかった。また、蛍光タンパク質(GFP)との融合タンパク質GFP-Radを作成しC2C12細胞に発現させたがRadの局在は同様であり、また、細胞形態にも変化は認められなかった。

GTPオーバーレイ法で、リコンビナントRadにGTPが結合することを確認した。そして、フィルター法を用いて精製リコンビナントRadへのGTPの結合動態を解析した。一般にRasファミリーの場合GTPの結合はMgイオン濃度が低いほど結合速度(GDP/GTP交換反応の速度)は速くなる。しかし、Radの場合、Rasファミリーの他のタンパク質ならGDP/GTP交換反応がもっとも速くなる $0.5\mu\text{M Mg}^{2+}$ の条件ではほとんどGTPは結合しなかった。他のメンバーでは、GDP/GTP交換反応の速度が大変遅くなるような $5\text{mM Mg}^{2+}$ の条件でもっとも多くGTPがRadに結合したが、加えたRadの2-3%にとどまった。この性質は他のメンバーと大きく異なるが、原因あるいは意義は不明である。

Radと相互作用するタンパク質を同定するため、ウサギ筋肉組織細胞質分画を用いて、リコンビナントRadと非水解性GTPアナログGTPγS存在化にRadを免疫沈降したが特異的なタンパク質は、共沈されなかった。また、GST-Radタンパク質を作成・精製し、グルタチオンビーズに結合させた後ウサギ筋肉組織細胞質分画を用いてアフィニティークロマトグラフィーを試みたが特異的なバンドは検出できなかった。ウサギ筋肉組織細胞質分画をSDS-PAGE電気泳動・ブロット・リネイチャー後、 $[^{32}\text{P}]$ GTP-Radを用いてRad

リガンドオーバーレイを試みた。しかし、特異的なバンド（タンパク質）は検出されなかった。最後に、精製リコンビナントRadを $^{125}\text{I}$ で標識し、ウサギ筋肉組織細胞質分画とインキュベート後、クロスリンカーを加えた。そして、そのサンプルを電気泳動後、オートラジオグラフィーしたが、数本の特異的なバンドが検出された。それらはRad結合タンパク質である可能性があり、現在、それらを精製中である。

#### D. 考察

作成したRadのリコンビナントタンパク質より抗Radモノクローナル抗体が完成し、解析の結果、ウェスタンブロット、免疫沈降とも可能な抗体であった。細胞内における局在が機能を示唆することがあるので、その抗体を用いた間接免疫蛍光法やGFPとの融合タンパク質を用いて局在を解析した。しかし、Radは細胞質中に存在し、種々の刺激でも局在を変えなかったため、機能を示唆するような情報にはならなかった。Radに対するGTPの結合動態は他のRasファミリーのGTP結合タンパク質と大きく異なっており、今後の研究はその生化学的性質を考えあわせて進めていかなければならぬと考えられた。Rad結合タンパク質を同定すべく種々の方法を実施したが、クロスリンク法にて候補タンパク質が検出された。今後はその同定につとめたいと考えている。また、種々のツールも完成したので、糖尿病患者の骨格筋における発現様式も検討していきたいと考えている。

#### E. 結論

すでに、RadのcDNAをクローニングし、リコンビナントタンパク質も作成・精製した。そして、Radに対するGTP結合動態を解析し、その特異性を認識し得た。そして、モノクローナル抗体を作成・解析し終え、それが、ウェスタンブロット・免疫沈降ともに可能であることがわかった。本研究は順調に進行しており、Radに関する今後の研究の下地は完成したと言え、この研究を計画した方向に押し進めていきたいと考えている。具体的には、まず、クロスリンク法により検出した数個のRad結合タンパク質の精製・同定に取り組んでいく予定である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

2. 学会発表  
なし

G. 知的所有権の取得状況

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |