The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト唾液腺および膵α-アミラーゼcDNAのクローニング
Author(s)	中村, 祐輔
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34808
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【37】

氏名・（本籍）	中村祐輔（なかむら ゆうすけ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6581 号
学位授与の日付	昭和59年8月6日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**ヒト唾液腺および膵α－アミラーゼcDNAのクローニング**
論文審査委員	（主査）教授 森 武貞 （副査）教授 松原 謙一　教授 近藤 宗平

論文内容の要旨

（目　的）

α－アミラーゼは炭水化物のα－1，4グリコシド結合を水解する消化酵素であり，ヒトでは唾液および膵液中に分泌されている代表的なアイソザイムの一つである。また，近年，肺癌患者や卵巣癌患者の一部に，癌組織の異所性α－アミラーゼ産生に伴なう高アミラーゼ血症が見い出され，腫瘍マーカーとしての意義についても論議されている。従って，α－アミラーゼの遺伝子の構造およびその発現機序を明らかにすることは，単に遺伝子発現の臓器特異性のみならず，発癌のメカニズムを解明する上においても重要な手がかりとなろう。本研究は，この目的にそってヒト正常耳下腺および膵組織のα－アミラーゼcDNAをクローニングし，その一次構造を決定したものである。

（方法ならびに結果）

1. poly(A)RNAの精製およびimmunoprecipitation

手術時に摘出された耳下腺および膵組織よりグアニジン塩酸，フェノール－クロロホルム－イソアミールアルコール法により全RNAを摘出し，これをオリゴ（dT）セルロースクロマトグラフィーにかけ，poly(A)RNAを精製した。この方法により，組織1gあたり30～50μgのpoly(A)RNAを精製し得た。このpoly(A)RNAを用いて^{35}S－メチオニン存在下に，ウサギ網状赤血球lysateでin vitroの無細胞蛋白合成を行ない，これにヒト唾液腺または膵α－アミラーゼに対する抗体を加えてimmunoprecipitationを施行し，α－アミラーゼのバンドを同定した。この結果，耳下腺では約58Kダルトン，膵では約57.5Kダルトンの前駆体蛋白の存在が明らかになった。

2. cDNAクローニングおよびα－アミラーゼcDNAの同定

AMV（avian myeloblastosis virus）の逆転写酵素を用い，poly(A)RNAよりオリゴ（dT）$_{12-18}$をプライマーとして一本鎖cDNAを，次いで二本鎖cDNAを合成した。SIヌクレアーゼによりこのcDNAの末端を平滑にした後，末端移転酵素で約20個のdC tailを付加し，pBR 322のPst I siteに約20個のdG tailを付加したベクターとannealingを行なった。これらのプラスミドで大腸菌HB 101を形質転換した。得られた形質転換菌よりα－アミラーゼcDNAを保持する菌を選択するためにコロニーハイブリダイゼーションを行なった。このプローブとして，耳下腺poly(A)RNAをショ糖密度勾配遠心してα－アミラーゼmRNAを部分精製し，これを高比活性にcDNA合成したものを用いた。コロニーハイブリダイゼーションpositive菌がα－アミラーゼcDNAを有することをさらに確認するためにhybrid-arrested translationテストを行なった。

3. 塩基配列の決定

Maxam-Gilbert法およびSanger法を用いて塩基配列を決定した。この結果，耳下腺より得たプラスミドpHSA 7とpHSA15は，両者を合せて1536 bpの翻訳領域と200 bpの5′－非翻訳領域および32bpの3′-非翻訳領域を含むことがわかった。また，膵より得たプラスミドpHPA76は約1.5 Kbpのc DNAを含んでいたが，翻訳領域の5′側の一部を欠いていたため，primer extension法よりさらにcDNAを合成した。この結果得たプラスミドpHPA86は，残りの翻訳領域と3 bpの5′-非翻訳領域を含んでいた。膵の翻訳領域は1536 bpであり，耳下腺と同じく512アミノ酸をコードしていた。両者を比較したところ，翻訳領域において核酸レベルで96%，アミノ酸レベルで94%のホモロジーが認められた。cDNAの結果から両者が異なる遺伝子の産物であることは明らかであるが，1982年にSchiblerらが報告したマウスのα－アミラーゼcDNAの配列と比較した結果，ヒトの臓器間ホモロジーが非常に高く，耳下腺と膵のα－アミラーゼ遺伝子間でgene conversionが起った可能性が強く示唆された。

（総　　括）

ヒト耳下腺および膵よりpoly(A)RNAを精製し，これよりα－アミラーゼのcDNAをクローニングした。Maxam-Gilbert法，Sanger法を用いて塩基配列を決定した結果，膵・耳下腺とも512個のアミノ酸をコードしていることが明らかとなった。核酸配列から予想される前駆体蛋白の分子量は，膵で57631ダルトン，耳下腺で58000ダルトンであった。また，Northern法から推定されたmRNAの長さは，膵で約1650ヌクレオチド，耳下腺で約1850ヌクレオチドであった。両者のホモロジーはアミノ酸レベルで94%，核酸レベルで96%と非常に高く，両遺伝子間でgene conversionが起った可能性が強く示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究は，ヒトの正常唾液腺および膵臓のα－アミラーゼcDNAをクローニングし，その一次構造を決定したものである。この結果，前駆体蛋白の存在，両者が異なる遺伝子の産物であることなどが明らかになった。α－アミラーゼの臓器特異的な発現や，癌化に伴なうα－アミラーゼ遺伝子の活性化を解明する上で非常に意義のある研究であり，学位論文に十分値する。