

Title	ヒト膵分泌性トリプシンインヒビター (PST I) cDNAのクローニングと塩基配列の解析
Author(s)	山本, 龍夫
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35631
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	山本龍夫
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8003 号
学位授与の日付	昭和 63 年 3 月 1 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	ヒト膵分泌性トリプシンインヒビター (PST I) cDNA のクローニングと塩基配列の解析
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 教授 松原 謙一 教授 吉川 寛

論文内容の要旨

〔目的〕

膵分泌性トリプシンインヒビター (PST I) は哺乳動物の膵腺房細胞より膵液中に分泌され、その主な作用は膵管内でのトリプシンの活性阻害であると考えられてきた。しかし、血中 PST I 測定 of RIA 系が確立されるとともに、PST I は膵疾患時に膵臓からの逸脱物質として血中に増加するのみならず、各種の悪性腫瘍患者や外科的侵襲の後にもその血中レベルが上昇することが明らかとなった。また膵全摘後にも血中に PST I が存在することから、その産生臓器も膵臓だけではないと考えられるようになった。さらに、PST I のアミノ酸配列が上皮成長因子 (EGF) のそれに類似していることを考え合わせると、PST I にはトリプシン活性阻害物質という作用以外に全く別の生物学的活性があるのではないかと推測される。

本研究は、ヒト PST I cDNA の構造を解析することによりその臓器発現の制御機構解明の第一歩とするとともに、核酸レベルでの PST I と EGF との類似性を検討することを目的とした。

〔方法ならびに成績〕

1) ヒト膵 cDNA ライブラリーの作製

胃癌に対する胃全摘術のリンパ節廓清に際して得られた新鮮なヒト膵臓から poly(A) RNA を精製した。これを Schibler らの方法により二重鎖 cDNA とし、プラスミド pBR322 の Pst I 部位に組み込んだ。この組換え体を大腸菌 K12 株 HB101 にトランスフェクションし、テトラサイクリンの選択培地上でコロニー形成を行った。

2) PST I cDNA クローンのスクリーニング

PSTIの第8～12アミノ酸に対する14ヌクレオチド、16種類の混合プローブをリン酸トリエステル固相法により合成し、HPLCカラムクロマトグラフィーで精製した。³²Pにより5'末端ラベルを行なった後、1)で精製したヒト膵cDNAライブラリーを転写したナイロンフィルターを用いてコロニー・ハイブリダイゼーションを行なった。1800クローン中9個の陽性クローンを得た。さらに、PSTI cDNA中に存在すると考えられる制限酵素切断部位をマーカーとした第2次スクリーニングにより、そのうちから2クローンを得た。塩基配列解析の結果、そのうちの1つはPSTI cDNAの配列の一部を持つ約260 b.p.のクローンであったので、次にそれをプローブとして、より厳しい条件下で再スクリーニングを行なった。最終的に1800クローン中20の陽性クローンが得られ、そのうちで最長の約430b.p.のインサートを持つクローンを選び、pHTI 112とした。

3) PSTI cDNAの塩基配列の解析

pHTI 112の塩基配列をMaxam and Gilbert法及びM13法により解析した。その結果、pHTI 112は237ヌクレオチドの蛋白コード領域、116、78ヌクレオチドの5'側及び3'側非翻訳領域より構成されていた。分泌型PSTIのアミノ酸配列はGreeneらが発表した精製ヒトPSTIのアミノ酸配列と2カ所(Asn²¹→Asp²¹, Asp²⁹→Asn²⁹)異なっていた。また、分泌型PSTIのN末端側には分泌蛋白に特徴的なシグナルペプチドと考えられる23アミノ酸の配列が認められた。

4) 他臓器におけるPSTIの発現

ヒト胃粘膜、耳下腺、肝臓のmRNAを用いてNorthern blottingを行なった結果、耳下腺及び肝臓では検出感度以下であったが、胃粘膜で膵臓と同一サイズのPSTI mRNAが微量(膵臓の40～50分の1)発現していることが認められた。

5) ヒトゲノム中のPSTI遺伝子数

pHTI 112をプローブとして用い、ヒト白血球より精製したDNAを数種の制限酵素処理してSouthern blottingを行なった。その結果、pHTI 112のfull sizeのプローブで出現する3本のバンドは、pHTI 112を5'側より3分割した部分プローブ1、2、3を用いることにより順次出現・消退した。このことから、PSTI遺伝子は半数体当たり1コピーのみ存在することが示された。

6) ヒトPSTI mRNAとマウスEGF mRNAの類似性

今回得られたPSTI mRNAをマウスEGF mRNAの対応部分と比較すると、異種間にもかかわらず46%という高いhomologyが認められた。またHarr-plottingによる解析でも両者の間に高いhomologyをみた。

[総括]

1. 合成プローブを用いてヒト膵cDNAライブラリーをスクリーニングし、ほぼ全長に近いPSTI cDNAクローンを得、その塩基配列を決定した。
2. ヒトPSTIはN末端側に23アミノ酸よりなるシグナルペプチドを有する前駆体として産生されることが考えられた。
3. Northern blottingにより、PSTIが膵臓以外の臓器でも発現していることを明らかにした。
4. Southern blottingにより、PSTI遺伝子は半数体当たり1コピーのみ存在することを明らかにし

た。

5. ヒト PSTI mRNA とマウス EGF mRNA との間には、蛋白レベルでの比較よりも更に高い homology が認められた。

論文の審査結果の要旨

本研究はヒト膵分泌性トリプシン・インヒビター (PSII) cDNA をクローニングし、その全塩基配列を決定するとともに、膵臓以外の臓器においても PSII が発現していることを明らかにしたものである。急性相反応物質としての PSTI の活性化機構解明につながる重要な研究であり、学位論文に値すると思われる。