The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Analyses of Polypeptides in the Liver of a Novel Mutant (LEC Rats) to Hereditary Hepatitis and Hepatoma by Two-Dimensional Gel Electrophoresis : Identification of p29/6.8 as Carbonic Anhydrase III and Triosephosphate Isomerase
Author(s)	永瀬, 寿彦
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37804
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

【25】

氏名・(本籍)	永瀬寿彦（ながせ　としひこ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第　9822　号
学位授与の日付	平成3年6月3日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文名	Analyses of Polypeptides in the Liver of a Novel Mutant (LEC Rats) to Hereditary Hepatitis and Hepatoma by Two-Dimensional Gel Electrophoresis : Identification of p 29/6.8 as Carbonic Anhydrase Ⅲ and Triosephosphate Isomerase (二次元ゲル電気泳動による肝炎肝癌自然発症ラット（LECラット）の肝蛋白の解析　—p29/6.8蛋白の同定—)
論文審査委員	(主査) 大手前病院顧問　垂井清一郎 (副査) 教授　谷口　直之　　教授　田川　邦夫

論文内容の要旨

〔目　的〕

LECラットは生後4，5カ月で急性肝炎を自然発症し，その多くは劇症肝炎に極めて類似した病状を呈して死亡する。一方，肝炎による死を免れて生き延びたLECラットは，約1年を経過すると肝癌を高率に自然発症する。現在，LECラットにおける肝炎の発症は，常染色体劣性遺伝様式に従うことが明らかにされている。そこで肝臓において発現される蛋白の変化を明らかにする目的で，LECラット及びその対照として肝炎肝癌を発症しないLEAラットを用い，二次元電気泳動による解析を試みた。さらに，LEAラットに比較してLECラットで発現量が異なるいくつかの蛋白のうち，特に差が著しいものをアミノ酸配列及びウエスタンブロッティング法により同定した。

〔方　法〕

対象として，4，16，52週齢の雄LEC（4週齢：6例，16週齢：5例，52週齢：5例）及びLEAラット肝（4週齢：5例，16週齢：5例，52週齢：2例）を用いた。52週齢のLECラット肝では全例に肝癌がみられたが，癌部を正確に切り出せる2例のみ癌部，非癌部に分け，他は担癌肝全体を用いた。1）二次元ゲル電気泳動法：PMSF，NP-40の存在化にホモジナイズし，RNase Aを加えた後，超音波処理を行った。次に，DNase 1を加えた後，3000xg，10分間の遠心を行い，その上清に尿素，Ampholine（pH 3.5−10），2-メルカプトエタノールを加えたものを検体として用いた。0′ Farrell電気泳動を行い，Coomassie Brilliant Blue（CBB）で染色した。2）アミノ酸配列分析：目的とするスポットを切り出し一定量集めた後，二群に分けた。一方はV 8プロテアーゼで消化し，他方は未

消化で，135x150mmの18%アクリルアミドゲルを用い，SDS-PAGEを行った。つぎに，polyvinylidene difluoride膜にブロッティング後，CBBで染色した。染色されたバンドを切り出し，protein sequencerにてアミノ酸配列分析を行った。3）ウエスタンブロッティング法：アミノ酸配列から推定された蛋白に対する抗体を用い，ウエスタンブロッティングを行った。ウエスタンブロッティングにて発色したスポットがゲルから切り出したスポットと一致することを，ニトロセルロース膜をAmido Blackで染色し，周囲のスポットとの相互関係から確認した。

〔成　績〕

1）4週齢で，LECラット肝では，LEAラット肝に比較して，p51/6.8（分子量x10^{-3}/等電点）の蛋白が減少し，p43/6.4，p29/6.8の蛋白が増加していた。また，p50/7.2の蛋白がLEAラット肝で発現していなかったが，LECラット肝では発現していた。特に，p29/6.8の蛋白は著増する傾向があった。2）p29/6.8蛋白の解析：p29/6.8の蛋白はLECラット肝で，16週齢で更に増加したが，52週齢では，16週齢より減少する傾向があった。一方，LEAラット肝では，16週齢で著増し，52週齢では16週齢と変化なかった。また，LEAラット肝と比較するとLECラット肝では，その蛋白量は，16，52週齢共むしろ減少していた。癌部と非癌部を比較すると，癌部で著減している傾向がみられた。p29/6.8の蛋白の部分的なアミノ酸配列は，V8プロテアーゼ消化した時は，LYPIAKGDNQXPIEL，未消化の時，すなわちN末端アミノ酸配列は，APSXKFFVGGNXKMNGであった。既知の蛋白とのホモロジー検索より，前者は，炭酸脱水酵素Ⅲと，後者は解糖系の酵素であるトリオースリン酸イソメラーゼと有意なホモロジーがあった。上記の二つの蛋白に対する抗体を用いたウエスタンブロッティング法により，p29/6.8の蛋白は炭酸脱水酵素Ⅲとトリオースリン酸イソメラーゼにより構成されており，このスポットの蛋白量の変化は炭酸脱水酵素Ⅲの酵素量の変動によるものであることがわかった。3）p51/6.8，p50/7.2，p43/6.4蛋白の週齢による変動：16，52週齢とも，4週齢のときとほぼ同じように，LEAラット肝に比較して，LECラット肝でp51/6.8の蛋白が減少し，p43/6.4の蛋白が増加していた。また，p50/7.2の蛋白は4週齢と同様に，LECラット肝でのみ発現されていた。

〔総　括〕

1）肝炎発症前の4週齢のLECラット肝蛋白の解析より同週齢のLEAラット肝に比較して，LECラット肝ではp29/6.8蛋白が著増する傾向があり，この蛋白量の変化は炭酸脱水酵素Ⅲの増加によるものであった。しかし，16，52週齢では，逆に減少していた。

2）4，16，52週齢で，LEAラット肝に比較してLECラット肝でp51/6.8の蛋白が減少し，p43/6.4の蛋白が増加していた。また，p50/7.2の蛋白がLECラット肝で発現していた。

論文審査の結果の要旨

本研究では，肝炎肝癌自然発症ラット（LECラット）の肝臓において発現される蛋白の変化を明らかにする目的で，LECラット及びその対照として肝炎肝癌を発症しないLEAラットを用い，二次元電気泳動による解析を行った。その結果，肝炎発症前の4週齢のLECラット肝蛋白の解析より同週齢のLEAラット肝に比較して，LECラット肝ではp29/6.8蛋白が著増する傾向があった。このp29/6.8の蛋白は炭酸脱水酵素Ⅲとトリオースリン酸イソメラーゼにより構成されており，この蛋白量の変動は炭酸脱水酵素Ⅲの蛋白量の変動によることを明らかにした。LECラット肝ではp43/6.4，p50/7.2，p51/6.8の蛋白も変動していた。本研究はLECラットの肝臓で発現される蛋白の変動に関して貴重な知見を与えたものであり，学位に値すると考えられる。