Osaka University Knowledge Archive

Title	ラット腎臓よりの新種チロシンホスファターゼのcDNAクローニング
Author(s)	川西, 幸夫
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38109
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【43】

氏　　名	川　西　幸　夫（かわ　にし　さち　お）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　10651　号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学　位　論　文　名	**ラット腎臓よりの新種チロシンホスファターゼのcDNAクローニング**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　鎌田　武信 （副査） 教　授　松沢　佑次　　教　授　田中　武彦

論　文　内　容　の　要　旨

（目　　的）

慢性糸球体腎炎の多くに糸球体内メサンギウム細胞の増殖が認められる。これらメサンギウム増殖性糸球体腎炎の発症・進展には種々のサイトカイン，増殖因子，血管作動性物質が関与しており，その細胞内情報伝達・活性発現には細胞内蛋白質チロシン残基のリン酸化がメディエーターとして重要な役割を果たしていることが報告されている。細胞内蛋白質チロシン残基のリン酸化レベルはチロシンキナーゼ（PTK）によるリン酸化とチロシンホスファターゼ（PTP）による脱リン酸化により可逆的に調節されている。増殖因子受容体の多くがPTK活性を有する事や，PTPはその存在は知られていたが蛋白として単離精製することが困難である事などから，細胞増殖機転の解明においてPTKによるリン酸化の観点からの研究が先行していた。しかし1989年にPTP1Bと呼ばれるPTPが初めてヒト胎盤よりクローニングされて以来，分子生物学的手法をもちいて20種類をこえるPTPがクローニングされ，その生理的・病態生理的意義の検討も急速になされつつある。またPTPはその構造上の類似性からPTKと同様に遺伝子ファミリーを成していると考えられており，さらに未知のPTPの存在も予想され関心を集めている。

そこで，本研究ではラット腎臓およびメサンギウム細胞に発現している新種のPTPのcDNAをクローニングし，その一次構造を明らかにする事を目的とした。

（方法ならびに成績）

1：PTP触媒ドメイン部分DNA断片の増幅

ラット腎臓よりtotal RNAを抽出し，逆転写酵素をもちいてcDNAを合成した。このcDNAを既知のPTPの触媒ドメインのよく保存された特徴的なアミノ酸配列から推定して作成したmixed oligonucleotidesをprimerとしてPCRを行った。PCR産物をsubcloningし，得られた60クローンの塩基配列をdideoxy法にて決定し既知PTPの塩基・アミノ酸配列と比較したところ，6クローン（4種）にPTPに特徴的なアミノ酸配列を認めた（P34－6，P34－7，P34－11，P34－35）。P34－6，P34－7はそれぞれ既に報告されているマウスのLAR，LRPと95％以上のhomologyを示すためこれらはラットのLAR，LRPと考えられた。一方，P34－11，P34－35はPTPの保存された特徴的なアミノ酸配列をもつものの全体の塩基配列・アミノ酸配列のhomologyは既知の全PTPに対して最高でも約50％と低いため，これらは未報告の新種PTPのDNA断片と考えられた。

2：新種PTP mRNA発現の臓器分布の検討

ラット腎臓・肝臓・脳・肺・心臓・脾臓よりtotal RNAを抽出し，P34－11，P34－35をプローブとしてノーザン法をおこなった。P34－11はこれら6種の臓器すべてに，そのmRNAの発現が認められた。またラット腎臓より単離した糸球体を培養することにより得られる培養メサンギウム細胞およびラット腎臓由来のNRK細胞においてもP34－11のmRNAの発現は認められた。一方，P34－35のmRNA発現は脳に強く認められた。これらの結果から，P34－11をプローブとしてラット腎臓からのcDNAクローニングをおこなうことにした。

3：ラット腎臓およびNRK細胞cDNAライブラリーの作成

ラット腎臓および培養NRK細胞よりpoly-A RNAを抽出した。各5μgのpoly-A RNAからGubler-Hoffmanの方法でcDNAライブラリーを作成しλgt10 vectorに挿入後タイターの確認をおこなった。

4：新種PTP cDNAのクローニングと塩基配列の決定

各10^6個のindependent cloneをP34－11および得られたクローンの異なる部分をプローブとして繰り返しスクリーニングをおこなった。11個のpositiveのcDNAクローンをsubcloning後、両鎖のdeletion mutantを作成しdideoxy法でその塩基配列を決定した。アミノ酸配列の解析よりこの新種PTPは382個のアミノ酸からなり，1個の触媒ドメインを持ち膜貫通部位に相当する疎水性アミノ酸配列を持たない－すなわちcytosolic typeのPTPである事が推定された。

また触媒ドメインには全PTPによく保存されたアミノ酸配列およびシステイン残基をふくむ活性発現に必須とされる構造が存在していた。

5：新種PTP遺伝子のラットゲノム上のコピー数の検討

ラット肝臓よりgenomic DNAを抽出し，BamHI，KpnI，PstI，EcoRI，HindIIIで消化したのち，プローブとして新種PTP cDNAの翻訳領域のうち内部にこれらの制限酵素認識部位をもたないDNA断片をもちいてサザン法をおこなった。

PstIでゲノムを消化した場合のみsingle hybridization bandを認め，他の制限酵素で消化した場合は幾つかのbandを認めた。すなわちこの新種PTP遺伝子はゲノム上にsingle copy geneとして存在し，かつ幾つかのexonから構成されている事が明らかとなった。

（総　　括）

新種PTPをラット腎臓よりcDNAクローニングし，一次構造を決定した。その結果，アミノ酸382個よりなる，1個の触媒ドメインを有するcytosolic typeと推定された。

論文審査の結果の要旨

慢性糸球体腎炎の特徴である腎糸球体メサンギウム細胞の増殖には，種々のサイトカイン・成長因子・血管作動性物質が関与している。これら生理活性物質の作用発現にいたる細胞内情報伝達には，細胞内蛋白質チロシン残基のチロシンキナーゼ（PTK）によるリン酸化およびチロシンホスファターゼ（PTP）による脱リン酸化が重要な役割を果たしている。このPTPは遺伝子ファミリーを成しておりさらに未知の新種PTPの存在が予想されている。また，PTPは構造やアミノ酸配列上の特徴から，その局在部位や基質あるいは活性調節機序を推定することができる。したがって，メサンギウム細胞増殖制御機構を解明するために，腎臓およびメサンギウム細胞に発現している未知の新種PTPをcDNAクローニングし，その一次構造を検討することはきわめて重要と考えられる。本研究では，ラット腎臓cDNAライブラリーからこれまでに報告のない新種PTPをクローニングすることに成功している。またこの新種PTPのmRNAが種々の臓器や培養メサンギウム細胞に発現していることを明らかにした。また，この新種PTPの一次構造を検討し，これが細胞質型のPTPであることやキナーゼによるリン酸化により活性調節をうける可能性のあることを明らかにした。なお，融合蛋白として発現させたこの新種PTPの触媒ドメインが，実際に脱リン酸化活性を有していることも確認している。以上，本研究によりクローニングされた新種PTPは，慢性腎炎の発症・進展とりわけメサンギウム細胞増殖機序の研究に新たな視点をあたえるものであり，本研究は学位に値するものといえる。