

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	
Issue Date	
oaire:version	
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	川 西 幸 夫
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 5 μ g の poly-A RNA から Gubler-Hoffman の方法で cDNA ライブラリーを作成し λ gt10 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。