OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	reg/PAP遺伝子ファミリーの解析とその機能解明のための分子生物学的研究
Author(s)	伊藤, 誉子
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39611
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

【4】

氏名	伊藤誉子
博士の専攻分野の名称	博士（薬学）
学位記番号	第12058号
学位授与年月日	平成7年8月1日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	reg／PAP遺伝子ファミリーの解析とその機能解明のための分子生物学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 三村 務 (副査) 教授 真弓 忠範　教授 溝口 正　教授 田中 慶一

論文内容の要旨

reg（regenerating gene）は1988年にラット膵臓のランゲルハンス島再生に関与する遺伝子としてクローニングされたものであり，当初単一の遺伝子として考えられていたが，その後の研究によりこれは互いに類似した複数のメンバーからなるファミリーの一員であることがわかってきた。我々は，膵ランゲルハンス島を再生させる可能性から糖尿病薬への期待を込めて研究を始めたが，フランスとアメリカでは別の機能からアプローチをしているグループがあることがわかり，さらにクローニングの過程において新たなメンバーがわかったり，膵炎関連蛋白質PAPとして命名されたものや，ヒトの肝細胞癌で特異的に発現しているHIPも同じファミリーに属することがわかった。こうして最初に見つけたreg遺伝子とこれの翻訳産物であるreg蛋白質の生理機能解明のためにも，この研究はファミリーとして捉えて，ヒトへの適用を目指して必要なファミリーメンバーのクローニング及び，それらの翻訳産物の生理機能解明にも近づくための分子生物学的な基礎的研究を行った。

まず，ラットおよびヒト reg cDNA 配列より，各々165及び166アミノ酸をコードすることが推測できた。どちらも分泌蛋白質特有のシグナル配列をN未満側に有していたので，酵母*S.cerevisiae*を用いてレコンビナント蛋白質の生産を行い成功した。これらを精製したところ，推定通りの位置でシグナル配列が切れた成熟蛋白質として得られたことがわかった。各々についてのモノクローナル抗体を作製して以後の研究に用いた。また，精製した reg protein は生理機能を検討するための実験に用いた。

生理機能を調べる手段として3つのアプローチを行った。1つ目は，糖尿病や消化器癌との関係を疑って，レコンビナント蛋白質を標準蛋白質として血清中の reg protein 濃度を測定する系を開発した。急性膵炎では慢性膵炎に比べて高くなっていたし，膵炎マーカーとして用いられている elastase－1 との相関から reg protein も膵炎マーカーとして利用し得ることがわかった。また，腎疾患では常に高値を示したが，これは，クレアチニンとの相関から，クリアランス低下によると推定された。肝疾患では高値を示す人もいたが，それほど有意な相関とは言い難い結果であった。糖尿病患者では健常人との間で有意な血中濃度の変化は観察できなかった。

2番目に，トランスジェニックマウスを作製したり，ジーンターゲティングをする前段階としてマウスreg遺伝子の

クローニングを行ったところ，2種のregがマウスでは存在することがわかったので，reg－Ⅰ，Ⅱと命名した。マウスregⅠは165アミノ酸をコードしており，regⅡはアミノ末端側に7アミノ酸の挿入配列をもった計8アミノ酸多い173アミノ酸からなっていた。両者間で7個のシステイン残基はすべて保存されており，二次構造は類似していることが予想された。regⅠ，ⅡmRNAともに膵臓で強く発現しており，ⅠはⅡの約3倍多く発現していた。胆嚢ではregⅠのみが発現していた。さらにゲノム解析を行い，各々別々の遺伝子上にあり，6つのエキソンと5つのイントロンからなることが明らかになった。クロモゾームマッピングによりマウスregⅠ遺伝子は12番染色体上に存在し，regⅡ遺伝子は3番染色体上に存在することがわかり，2種あることで複雑さは増したが，生理機能解明への足掛りをつけた。

三番目に，ラット reg protein を大量に調製することにより，*in vitro, in vivo* でのランゲルハンス島再生または糖尿病緩解に対する効果を調べる準備を行った。最近，共同研究者らにより，*in vivo* で60日間連日腹腔内投与により糖尿病状態が緩解し，*in vitro* で単離ランゲルハンス島の複製が確認できたと報告された。

一方，ラット急性膵炎時に特異的に発現する蛋白質として報告されたPAPもregファミリーの一員であることが明らかになり，ウシPTPとして報告されたものも，PAPのホモローグであることがわかったが，ヒトについては材料入手が困難なこともあって，研究が遅れていたところを，RT－PCR 法を用いたことと，小腸での多量発現を発見したことで，ヒト，マウスのホモローグのクローニングに成功した。小腸以外では大腸や膵にわずかにmRNAの発現が確認できた。また，ヒトでは3種の転写産物があることがわかり，これは1つの遺伝子からのオルターナティブスプライシング産物であることがわかり，病態との関係を調べたところ，胃癌組織ではタイプ2の発現が特異的で，肝細胞癌ではタイプ3の発現が特異的であったことから，これらの転写調節と発病に何らかの関係があるかもしれないことを示唆する結果を得た。

reg／PAP 遺伝子ファミリーについては，2，3の研究チームが名前をバラバラに用いて統一ができていない状態であるが，一応まとまりがつけられる時期にきている。現時点で，10のメンバーがわかっていて，アミノ酸の配列から大きく3つのグループに分けられており，7つのシステインはいずれも保存している。

論文審査の結果の要旨

本論文はreg遺伝子とその翻訳産物であるreg蛋白質の生理機能解明を目的として必要なファミリーメンバーのクローニング及び翻訳産物の人への適用を目指して分子生物学的な基礎研究を行ったもので，以下の知見を得ている。

1) ラットおよびヒトの reg protein を酵母 *S.cerevisiae* AH22 を用いて分泌生産させレコンビナント蛋白質を得，その性質を検討した結果，naturalと同じものであること明らかにした。
2) 得られたレコンビナント蛋白質は従来の elastase－1 に匹敵する膵炎マーカーになりうることが判った。
3) マウスでは別の遺伝子上に位置する2種のregが存在することが判り，各々regⅠ，regⅡと命名した。どちらもアウルチオグルコースで過形成したランゲルハンス島で強く発現しており，胆嚢ではreg－Ⅰのみ発現していることが明らかになった。
4) reg protein の連日投与により糖尿ラットの血糖値は低値に抑えられ，尿糖も減少したことから糖尿病状態を有意に改善することが示され，これは膵ランゲルハンス島のβ細胞複製によるものであることが明らかとなった。
5) ヒトのホモローグのクローニングが困難とされて研究が進まなかった膵炎関連蛋白質 PAP cDNA のヒトホモローグを RT－PCR 法および小腸での多量発現を利用して成功させた。また，同時にマウスのホモローグのクローニングも行い，実験に用いることが可能になった。
6) ヒト PAP cDNA には少なくとも3種の転写産物があり，これらは単一の遺伝子からオルターナテイブスプライシングによって生じることが判った。転写タイプは病態と密接に係わっており，胃癌ではタイプ2，肝細胞癌ではタイプ3が発現する特徴があった。

以上のように本論文は糖尿病の病態の解明に大きく寄与したもので，博士論文として価値あるものと認められる。