

Title	新規顎下腺特異的遺伝子 $\delta$ 20S1 の特性に関する研究
Author(s)	井上, 正朗
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47609">https://hdl.handle.net/11094/47609</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	井上正朗
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 21050 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	新規顎下腺特異的遺伝子 $\delta$ 20S1 の特性に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 由良 義明 (副査) 教授 阪井 丘芳    助教授 杉村 光隆    助教授 和田孝一郎

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

生体が成長に伴って性差を生ずる時期には多くの臓器がその機能を獲得する。成長段階で特異的に発現する遺伝子群を網羅的に単離する方法として、サブトラクション法が知られている。この方法を用いて、半数体精子細胞で特異的に働く遺伝子群を単離するため、35 日齢マウス精巣 cDNA ライブラリーから 17 日齢マウス精巣の mRNA を差し引いたサブトラクティブライブラリーが作製され、現在までに様々な遺伝子の解析が行われている。

本研究では、このライブラリーを構成するクローン TISP-79 をプローブとして当該遺伝子の全長 cDNA をクローニングし、シーケンシングにて既知の遺伝子と比較し、構造の解析と生体での発現様式について検討した。

#### 【材料と方法】

- 1) TISP-79 をプローブとして cDNA 全長遺伝子をクローニングするため、35 日齢の雄マウス精巣から作成したライブラリーを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った。得られたクローンに対して塩基配列を決定するため、Genetic Analyzer 3100 を用いてシーケンシングを行った。
- 2) 塩基配列をもとにデータベース情報とコンピュータを用いて、既存遺伝子とのホモロジー検索ならびにアミノ酸配列の検索を行った。
- 3) 各種組織より全 RNA を抽出し、mRNA の発現をノザンプロットにて検討した。スプライシングバリエーションはバリエーション特異的プライマーを設定し reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で検出した。
- 4) 組換え体タンパク質を作製するため PCR 法で増幅させた遺伝子を pET30a(+) に導入し、菌体内タンパク質として産生させた。タンパク質の精製には TALOM™ Purification Resin を用いた。このタンパク質をさらにポリアクリルアミドゲル電気泳動にて精製したのち SD ラットに免疫し、抗体を得た。
- 5) 遺伝子産物は作製したラット抗体を用いたウエスタンブロットならびに免疫組織化学染色にて検出した。

#### 【結果】

- 1) コロニーハイブリダイゼーションにより単離した遺伝子の全長は 1953bp であった。この塩基配列をもとにコン

ピュータ解析を行ったところ、マウスでは第5染色体上に存在していた。2つの open reading frame (ORF)-1 と ORF-2 が存在し、ともに既知のドメインは保有していなかった。2つのスプライシングバリエーションが存在し、唾液腺と精巣で発現が想定されたため、それぞれ  $\delta$  20S1、 $\delta$  20T2 と名付けた。また、ヒトでは第7番染色体上に対応する遺伝子が認められた。マウスとヒトの相同性は、ORF1 で 98.5%、ORF2 で 43.9%であった。

- 2)  $\delta$  20 遺伝子の全長をプローブとしノザンブロットを行ったところ、マウス精巣でのみ発現が認められた。しかし、 $\delta$  20S1 に特異的な部位のプローブを用いた場合には、顎下腺でのみ発現が認められた。 $\delta$  20ORF1 および ORF2 領域にプライマーを設定しマウス組織を用いて RT-PCR による検討を行ったところ、それぞれ顎下腺、精巣でのみ発現が認められた。
- 3)  $\delta$  20S1 タンパク質のマウス組織での発現を知るため、 $\delta$  20S1 が転写される  $\delta$  20ORF1 に対する抗体を作製し、ウエスタンブロットを行った結果、顎下腺でのみタンパク質が検出された。また、マウス顎下腺では3週齢から検出され、週齢を増すごとに増加がみられた。
- 4)  $\delta$  20S1 タンパク質につき免疫組織化学染色を行ったところ、マウス顆粒性導管で発現が認められた。
- 5) ヒトでも  $\delta$  20S1 タンパク質はウエスタンブロットで顎下腺に検出された。免疫組織化学染色にて顎下腺の線条部で発現が認められた。
- 6) ワルトン管から排出されるヒト唾液を採取しウエスタンブロットで解析した結果、 $\delta$  20S1 タンパク質の存在が確認された。

#### 【考察と結論】

サブトラクション法を用いた実験結果から、精巣で発現する遺伝子がスプライシングを受けて唾液腺で特異的に発現することが明らかとなった。この  $\delta$  20S1 遺伝子はマウス精巣が発達する時期から顎下腺で発現しており、顎下腺機能と密に関連するタンパク質と考えられた。発現はマウス顎下腺の顆粒管、ヒトでは線状部導管に限局しており、外分泌されるものと推察された。実際、ヒト唾液中に含まれることが確認された。マウス顆粒管は上皮増殖因子、神経増殖因子などが産生される部位である。しかしながら、 $\delta$  20S1 遺伝子産物はこれら既存の生物学的活性因子とは構造的に異なっており、新規の唾液分泌型の顎下腺特異的因子と考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、新規遺伝子  $\delta$  20S1 の構造の解析と生体での発現様式について検討したものである。

その結果、マウス顎下腺顆粒性導管及びヒト顎下腺線条部に特異的に発現する新規の唾液分泌型顎下腺特異的因子であることが明らかとなった。

以上の結果は、新規遺伝子  $\delta$  20S1 を単離し、構造、発現様式をはじめ明らかにしたものであり、博士（歯学）の称号を与えるに値するものと認める。