



## 論 文 内 容 要 旨

reg (regenerating gene) はラット臍ランゲルハンス島の再生・増殖時に発現が増大する遺伝子である。その発現量はランゲルハンス島 $\beta$ 細胞の増殖が盛んな時期に最も高く、正常ランゲルハンス島ではほとんど検出されない。再生ランゲルハンス島ではreg蛋白は $\beta$ 細胞の分泌顆粒中に存在し、顆粒中でインスリンと共存している。またヒト臍cDNAライブラリーからヒトreg cDNAも単離された。本研究ではヒトreg遺伝子を単離し全塩基配列を決定するとともに、各種ヒト組織におけるその発現を検討した。

①ヒトreg cDNAをプローブとしてヒト血球細胞由来のゲノミックDNAライブラリーをスクリーニングすることによりreg遺伝子の全長とその上流約1.2kbpを含む4.3kbpのDNA断片を単離し、その全塩基配列を決定した。転写開始点はマングビーンヌクレアーゼ・マッピングによって決定した。ヒトreg遺伝子は全長約3 kbpの遺伝子であり、6個のエクソンと5個のイントロンから構成されていた。エクソン部分の塩基配列をヒトreg cDNAの配列と比較したところ、アミノ酸を変化させない2個所の塩基置換が認められる以外は完全に一致していた。転写開始点の27bp上流にTATA box, 100bp上流にCAAT boxが存在していた。この遺伝子の第4イントロン中のDNA断片をプローブとしたヒトゲノムDNAの各制限酵素消化物のサザンブロットでは、おのおの酵素で単一のバンドのみが検出された。この結果からこの遺伝子はハプロイドあたり単一コピーしか存在しないと考えられた。しかしながらヒトreg cDNAをプローブとしてサザンブロットをおこない、検出されたバンドをreg遺伝子の制限酵素地図と比較したところ、この遺伝子に由来するとは考えられないバンドが見出された。この結果はこの遺伝子以外にreg cDNAとホモロジーをもつ配列がヒトゲノム中に存在することを示唆していた。このreg関連配列に由来する1.5kbpのDNA断片を単離し、その全塩基配列を決定したところ、この配列はヒトreg遺伝子の第1イントロンから第4イントロンにかけての範囲にホモロジーを有していた。このなかでエクソンに対応する部分の塩基配列をアミノ酸配列に置き換えてみると、16%のアミノ酸が異なっている上、読み枠の途中で停止コドンが見出された。この結果からこの塩基配列がreg蛋白をコードするものではないことが明らかとなり、ヒトreg遺伝子は先に単離した約3 kbpの遺伝子のみであることが確かめられた。

②ヒト組織におけるreg mRNAの発現を検討するため、各種手術摘出組織からRNAを抽出し、ヒトreg cDNAをプローブとしてノーザンブロットを行った。その結果、正常組織におけるヒトreg mRNAの発現は臍で著しく強く、胃粘膜、腎でもわずかに発現が認められた。肝、脾、脳、甲状腺、顎下腺、食道粘膜、大腸粘膜、およびリンパ球ではreg mRNAは検出されなかった。

また腫瘍組織について同様の検討を行ったところ、大腸癌、ポリープなどの大腸腫瘍8例中7例、および、胃癌2例中2例で発現が認められた。正常大腸粘膜ではreg mRNAの発現が検出されないことから、大腸腫瘍では腫瘍化に伴う異所性の発現がおこっていると考えられた。また、食道癌9例の検討では発現を認める例がなく、異所性発現は腫瘍の発生母地、あるいは組織型に関係すると考えられた。

③酵母によって産生された組換えヒトreg蛋白に対して作られたモノクローナル抗体を用い、ヒト膵抽出物についてウェスタンブロットを行った。その結果、16kDaから18kDaの範囲に少なくとも5本の明瞭なバンドが認められた。また15kDaの位置にも弱い1本のバンドが認められた。16kDaから18kDaにかけて検出されたバンドは、トリフルオロメタンスルホン酸によって化学的に糖鎖を切断する処理により16kDa付近のバンドに収斂したことから、ヒトreg蛋白は糖鎖による修飾をうけていると考えられた。

④最近、ヒト膵液から分離されたpancreatic stone protein (PSP) の全アミノ酸配列(144アミノ酸)、およびpancreatic thread protein (PTP) の部分アミノ酸配列(45アミノ酸)がcDNAから推定されたヒトreg蛋白のアミノ酸配列(シグナル配列を含め166アミノ酸)の中に含まれることが明らかになった。ヒトreg遺伝子が単一コピーの遺伝子であることから、reg蛋白、PSP、およびPTPはreg遺伝子にコードされる同一蛋白、もしくはそのプロセッシング産物であると考えられた。

以上の知見からreg蛋白は、膵β細胞の再生・増殖に関係する一方、外分泌機能の一部を担うことが考えられ、膵の発生・分化・病態を理解する上で重要な手掛かりとなるものと考えられた。

## 審査結果の要旨

reg (regenerating gene) はラット臍ランゲルハンス島の再生・増殖時に発現が増大する遺伝子である。本研究で著者はヒトreg遺伝子を単離し全塩基配列を決定するとともに、各種ヒト組織におけるその発現を検討し、以下の新知見を得た。

①ヒトreg cDNAをプローブとしてヒト血球細胞由来のゲノミックDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、reg遺伝子の全長とその上流約1.2kbpを含む4.3kbpのDNA断片を単離しその全塩基配列を決定した。ヒトreg遺伝子は全長約3kbpの遺伝子であり、6個のエクソンと5個のイントロンから構成されていた。遺伝子の第4イントロン中のDNA断片をプローブとしたヒトゲノムDNAの各制限酵素消化物のサザンプロットでは、おのおのの酵素で単一のバンドのみが検出された。この結果からこの遺伝子はハプロイドあたり単一コピーしか存在しないと考えられた。しかしながらヒトreg cDNAをプローブとしてサザンプロットをおこない、検出されたバンドをreg遺伝子の制限酵素地図と比較したところ、この遺伝子に由来するとは考えられないバンドが見出された。この結果はこの遺伝子以外にreg cDNAとホモロジーをもつ配列がヒトゲノム中に存在することを示唆していた。このreg関連配列に由来する1.5kbpのDNA断片を単離し、その全塩基配列を決定したところ、この配列はヒトreg遺伝子の第1イントロンから第4イントロンにかけての範囲にホモロジーを有していた。このなかでエクソンに対応する部分の塩基配列をアミノ酸配列に置き換えてみると、16%のアミノ酸が異なっている上、読み枠の途中で停止コドンが見出された。この結果からこの塩基配列がreg蛋白をコードするものではないことが明らかとなり、ヒトreg遺伝子は先に単離した約3kbp遺伝子のみであることが確かめられた。

②ヒト正常組織におけるreg mRNAの発現は臍で著しく強く、胃粘膜、腎でもわずかに発現が認められた。また、ヒト大腸癌、ポリープなどの大腸腫瘍8例中7例、および、胃癌2例中2例で発現が認められた。

③最近、ヒト臍液から分離されたpancreatic stone protein (PSP) の全アミノ酸配列 (144アミノ酸)、及びpancreatic thread protein (PTP) の部分アミノ酸配列 (45アミノ酸) がcDNAから推定されたヒトreg蛋白のアミノ酸配列 (シグナル配列を含め166アミノ酸) の中に含まれることが明らかになった。ヒトreg遺伝子が単一コピーの遺伝子であることから、reg蛋白、PSP、およびPTPはreg遺伝子にコードされる同一蛋白、もしくはそのプロセッシング産物であると考えられた。

以上の知見からreg蛋白は、臍β細胞の再生・増殖に関係する一方、外分泌機能の一部を担うことが考えられ、本論文は臍の発生・分化・病態を理解する上で極めて重要な知見を提示したもので学位論文に値すると思われる。