

氏 名 (本籍)	うん 海	の 野	みち 倫	あき 明
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	医 博 第 1 1 6 2 号			
学位授与年月日	平 成 5 年 3 月 25 日			
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院医学研究科 (博士課程) 外科学系専攻			
学位論文題目	Structure, Chromosomal Localization, and Expression of Mouse <i>reg</i> Genes, <i>reg I</i> and <i>reg II</i> . —A NOVEL TYPE OF <i>REG</i> GENE, <i>REG II</i> , EXISTS IN THE MOUSE GENOME— (マウス <i>reg</i> 遺伝子, <i>reg I</i> と <i>reg II</i> の構造, 染 色体局在, 発現)			
	(主 査)			
論文審査委員	教授 松 野 正 紀 教授 林 典 夫 教授 柴 原 茂 樹			

論文内容要旨

1984年、米村らは90%膵切除ラットに、ニコチン酸アミド等の poly (ADP-ribose) 合成酵素阻害剤を投与すると膵ランゲルハンス島(ラ島) β 細胞の再生が誘導され、糖尿病の発症が防止されることを見いだした。*reg*はこのラット再生膵ラ島 cDNA ライブラリーより分離された遺伝子で、正常ラ島ではほとんど発現していないのに対し、再生ラ島で強く発現する。その後我々は、ヒト *reg* の cDNA と遺伝子を分離し構造を決定した。一方、ヒト膵外分泌腺より分離され、pancreatic stone protein (PSP), pancreatic thread protein (PTP) と呼ばれてきた蛋白は、最近になり *reg* 蛋白と同一のものであり *reg* 遺伝子の産物であることが明らかになった。このように、これまでヒト、ラットでは、*reg* 蛋白/PSP/PTP をコードしている遺伝子は1種類と考えられてきた。

著者は、本研究でトランスジェニックマウス作製のためマウス *reg* 遺伝子を単離したところ、マウス膵臓には、*reg* I, *reg* II という、異なった遺伝子に由来する2種のメッセンジャー RNA が存在していることを見いだした。さらに、これら2種のマウス *reg* 遺伝子を単離し、構造と染色体上の局在を決定するとともに、過形成ラ島および各種臓器での発現を検討した。

【実験方法】

マウス膵臓より抽出した RNA を鋳型にして PCR 法を行ない、2種類の cDNA を分離した。これらをプローブとして、ラムダファージをベクターとするマウス遺伝子ライブラリーより各々の遺伝子全長を単離し、全塩基配列を決定した。また染色体上の局在を、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法で決定した。さらに、アウロチオグルコース投与マウスより単離した過形成ラ島、正常ラ島、正常マウス各種臓器より RNA を調整し、ノーザンブロット法、スロットブロット法で発現を検討した。

【結果】

(1) 膵臓より PCR 法で単離した2種の *reg* cDNA のうち、一方は165個のアミノ酸よりなる蛋白質をコードしており、これまで知られていたラット、ヒト *reg* のカウンターパートと考えられ、*reg* I と命名した。もう一方は、シグナルペプチドが1アミノ酸多く、またその N 端側に7アミノ酸の挿入配列を持つ、計8アミノ酸多い173個のアミノ酸よりなる蛋白質をコードしており、新しいタイプの *reg* と考えられ、*reg* II と命名した。

(2) *reg* I 蛋白質と、*reg* II 蛋白質はアミノ酸で76%の相同性を有しており、全てのシステイン

残基が保存され、共通の高次構造をとっていると考えられた。また、どちらもカルシウム依存性レクチンのコンセンサス配列である、Drickamerモチーフがよく保存されていた。

(3) 両遺伝子は、どちらも6個のエクソンと5個のイントロンよりなる全長約3kbpの遺伝子であった。両遺伝子とも5'上流域にはTATAボックスが存在していたが、CAATボックスは認められなかった。

(4) *reg I* 遺伝子は、マウス第12番染色体上に、*reg II* 遺伝子は第3番染色体上に局在しており、両者は異なった染色体上に位置していることが明らかとなった。

(5) *reg I*, *reg II* ともに、アウロチウオグルコース投与マウスより分離した過形成ラ島と、正常膵外分泌腺で強く発現していたが、正常ラ島では発現していなかった。膵臓での *reg I*, *reg II* の発現量比は、約8対1で、*reg I* が多かった。また、ノーザンブロットの結果、過形成ラ島ではマウス α -amylase, elastase II の発現を認めなかったことより、過形成ラ島での *reg I*, *reg II* の発現は、ラ島細胞自身の発現増大によるものと考えられた。

(6) *reg I*, *reg II* ともに、肝臓で弱く発現していた。また、*reg I* は、胆嚢でも発現しており、両者は組織によって異なった発現調節を受けていると考えられた。

【考 察】

本研究により、*reg* 遺伝子は一群の遺伝子ファミリー、*reg/pAST* (pancreatitis-associated/pancreatic stone/pancreatic thread) protein family を形成していることが初めて明らかとなった。最近 *reg* 遺伝子と相同性を有し、C端側に5アミノ酸の挿入配列を持つ、pancreatitis-associated protein (PAP)、また、HIPと名付けられた遺伝子が報告されたが、これらも *reg/pAST* protein family に含まれる。*reg/pAST* protein family のメンバーは、相互の相同性、挿入配列の有無により次の3つのサブタイプに分類される。即ち、(i)タイプI：マウス *reg I*, ラット *reg*, ヒト *reg/PSP/PTP*, (ii)タイプII：マウス *reg II*, (iii)タイプIII：ラット PAP, ヒト HIP, である。

このように、マウスには類似しているが明らかに異なった2種の *reg* 遺伝子が存在し、膵ラ島過形成・再生時に強く発現することより、これら2種の *reg* 蛋白はラ島の過形成・再生に関わっている可能性が考えられた。これら *reg* 蛋白の機能を今後トランスジェニックマウスなどのモデル動物を用いて検討して行きたい。

審査結果の要旨

膵ランゲルハンス島（ α 島） β 細胞の再生という現象は、糖尿病の病態生理・治療上また細胞生物学上、極めて重要かつ興味ある問題である。近年、Okamotoらは膵 β 細胞再生モデルラットを作製し、分子生物学的手法を用いて、*reg*と名付けられた新しい遺伝子を分離し、その構造と発現を検討してきた。*reg*遺伝子は、再生 α 島で強く発現するが、正常 α 島ではほとんど発現していないことから、 α 島再生現象との関連が強く示唆されている。また、ヒト膵外分泌腺より分離され、pancreatic stone protein (PSP), pancreatic thread protein (PTP)と呼ばれてきた蛋白は、最近になり*reg*蛋白と同一のものであることが明らかとなり、*reg*遺伝子は膵外分泌組織でも何らかの重要な機能を有していることが示唆されている。これまで明らかにされたヒト・ラットでは*reg*遺伝子は1種類しか存在しないと考えられてきたが、本論文は、マウスには*reg* I, *reg* IIという2種類の*reg*遺伝子が存在していることを初めて明らかにし、さらに*reg*遺伝子は、一群の遺伝子ファミリー“*reg* gene family”を形成していることを初めて提唱したものである。

本論文で著者は、マウス膵臓より2種類の*reg* cDNAを分離し、各々を*reg* I, *reg* IIと命名した。*reg* I cDNAがコードしている蛋白は165アミノ酸よりなり、先に分離されたヒト・ラット*reg*のカウンターパートと考えられたが、*reg* II cDNAがコードしている蛋白は173アミノ酸よりなり、これまで知られていない新しい*reg*蛋白をコードしていると考えられた。さらに著者は、両染色体遺伝子を単離し、その塩基配列と構造、染色体上の局在を決定し、マウスには類似しているが明らかに異なった2種の*reg*遺伝子が存在していることを証明した。この両遺伝子の発現を検討すると、*reg* I, *reg* II遺伝子ともAurothioglucose投与マウスの過形成 α 島と正常マウス膵外分泌組織で強く発現するが、正常 α 島では発現していないという重要な知見を得た。また興味あることに胆嚢では*reg* Iのみ発現しており、両遺伝子は組織によって異なった発現調節を受けている可能性を示している。さらに本研究により著者は、*reg*遺伝子は最近報告されたpancreatitis-associated protein (PAP), HIPと名付けられた遺伝子をも含めた一群の遺伝子ファミリーを形成していること、またこの*reg* gene familyは3つのサブタイプに分類されることを提唱するに至った。

このようにマウスには2種の*reg*遺伝子が存在し膵 α 島過形成時に強く発現することより、これら2種の*reg*遺伝子は α 島の再生・過形成に関わっている可能性が考えられる。さらに本研究結果は、ヒト・ラットにもこれまで知られていない新しい*reg*遺伝子が存在することを示唆するものである。また、今回マウス*reg*遺伝子が単離されたことによりトランスジェニックマウスの作製が可能となり、*reg*蛋白の生理的機能の解明に新たな展開が期待される。

以上、本研究により得られた知見は医学・生物学上極めて重要な発見であり本論文は学位論文に値すると考える。