

氏 名 (本籍) 森 泉 茂 樹

学位の種類 博 士 (医 学)

学位記番号 医 第 2706 号

学位授与年月日 平成 6 年 9 月 7 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当

最終学歴 昭和 62 年 3 月 25 日
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 Isolation, expression and chromosomal localization of a novel *reg* gene, human *reg Iβ*.
(新しい *reg* 遺伝子, ヒト *reg Iβ* の単離, 発現の検討及び染色体座位の決定)

(主 査)

論文審査委員 教授 豊 田 隆 謙 教授 渡 辺 民 朗

教授 柴 原 茂 樹

論 文 内 容 要 旨

90%膵切除後のラットにニコチン酸アミドなどのポリ ADP リボース合成酵素阻害剤を投与すると残存膵中のランゲルハンス島(ラ島) β 細胞の再生・増殖が誘導される。*reg* (*regenereteing gene*) は、このラットの再生ラ島由来の cDNA ライブラリーから分離された遺伝子で、165 アミノ酸からなる分泌蛋白をコードしている。*reg* はラ島の再生時に発現することから、膵 β 細胞の再生に関与していると考えられてきた。最近になり、90%膵切除ラットに酵母で産生した組換えラット *reg* 蛋白を投与すると β 細胞が再生し糖尿病状態が改善すること、*reg* 蛋白が単離ラ島 β 細胞の DNA 合成を促進することが示され、*reg* 蛋白は膵 β 細胞の増殖因子であると考えられるようになった。また最近、ラット *reg* 蛋白に相同性のある蛋白やその遺伝子が複数分離・同定され、これらが遺伝子ファミリーを形成していることが明らかになった。この *reg* ファミリーは個々の遺伝子がコードする蛋白の一次構造の違いにより、Type I, II, III の三つのサブクラスに分類される。

ヒトでも、ラット *reg* 蛋白と70%の相同性を有する166アミノ酸の蛋白をコードするヒト *reg* の cDNA と遺伝子が単離され、その構造が明らかにされた。ヒト *reg* は、膵 β 細胞増殖刺激活性が示されたラット *reg* と同じ Type I に属しており、ヒト *reg* 蛋白も膵 β 細胞の増殖因子であると推測されている。本研究で著者は、ヒトには先に分離されたヒト *reg* と構造上類似しているが異なった、新しい Type I の *reg* 遺伝子が存在することを見だし、この新しい *reg* 遺伝子 (human *reg* I β) を分離し構造を決定した。さらに *reg* I β の発現を検討するとともに、先に分離されていた *reg* 遺伝子 (human *reg* I α) と併せて、二つのヒト *reg* 遺伝子の染色体座位を決定した。

1) ヒトゲノム DNA を *Hind*III で消化し弱い条件で Southern blot 分析を行なうと、ヒト *reg* cDNA と hybridize する四つのフラグメントが検出された。このうち二つのフラグメントは既知の遺伝子 (ヒト *reg* 及び *reg* pseudogene) に由来するものであったが、3.4kbp および 2.2kbp のフラグメントは既知の遺伝子では説明できず、*reg* と相同性のある未知の遺伝子の存在が示された。2) そこで、*Hind*III で消化したヒト DNA から 3-3.5kbp と 2-2.5kbp の DNA 断片を分離して各々ライブラリーを作製し、ヒト *reg* cDNA をプローブとしてスクリーニングを行ない陽性クローンを得た。3) 得られた遺伝子 DNA の全塩基配列を決定した結果、分離された遺伝子は、以前に分離されていたヒト *reg* 遺伝子と高い相同性を有するが、全く新しい *reg* 遺伝子であることが判明した。4) 新しい *reg* 遺伝子はその 5' 側が *Hind*III で消化した 3.4kbp の DNA 断片として、3' 側が 2.2kbp の DNA 断片として分離された。5) この遺伝子がコードする *reg*

蛋白は Type I に属することから、新しい遺伝子をヒト *reg I β* と命名し、先に単離されていた *reg* は *reg I α* と改称した。6) ヒト膵臓から抽出した RNA を鋳型として 5' RACE 法 (Rapid Amplification of cDNA Ends) 及び 3' RACE 法を行ない、767bp からなるヒト *reg I β* の cDNA を分離した。7) *reg I β* cDNA は 166 個のアミノ酸からなる、Type I の *reg* 蛋白をコードしていることが確認された。8) ヒト *reg I β* と *reg I α* がコードする蛋白のアミノ酸配列を比較すると 22 個のアミノ酸置換が存在した。一方、両蛋白はそのアミノ端にいずれも 22 アミノ酸からなるシグナル配列を含む分泌蛋白であること、分子内で disulfide 結合を形成している 6 個のシステイン残基が保存されていることから、互いに類似した立体構造をとっていると考えられた。9) *reg I β* 遺伝子は約 3kbp の遺伝子で、6 個のエクソンと 5 個のイントロンからなる *reg* ファミリーに共通の構造を有し第 2 エクソンに開始コドンが、また第 6 エクソンに終止コドンが存在した。10) *reg I β* 遺伝子の転写開始点を S1 ヌクレアーゼマッピング法により決定した。11) FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法により染色体マッピングを行ない、*reg I α* と *reg I β* は第 2 染色体短腕上 (2p12→13) にタンデムに配列していることを明らかにした。12) *reg I α* と *reg I β* 各々に特異的な合成 DNA をプローブとした Northern blot 分析の結果、*reg I α* は膵臓だけでなく胃粘膜と腎臓でも発現が認められたのに対して、*reg I β* は膵臓のみに発現を認めた。

従来 *reg I* 遺伝子は一種類であると考えられてきたが、本研究により、ヒトでは二種類の *reg I* 遺伝子 (*reg I α* と *reg I β*) が存在することが明らかになった。ラット *reg I* 蛋白は膵ラ島 β 細胞の増殖因子であり、*reg I α* 蛋白と今回初めてその存在が明らかになった *reg I β* 蛋白もヒトの膵 β 細胞に対し同様の生理活性をもつと推測され、将来的には糖尿病治療への臨床応用が期待される。特に、*reg I β* は膵臓に特異的に発現していることから、膵 β 細胞の再生に関してより重要な役割を担っている可能性が考えられる。

審査結果の要旨

膵β細胞は生体における唯一のインスリン産生細胞であり、その再生・増殖能が限られたものであることがインスリン依存性糖尿病の発症および進展の過程の背景をなしている。膵β細胞を再生・増殖させることができれば原理的には糖尿病に対する全く新しい治療が可能になる。

reg は90%膵切除ラットにニコチン酸アミドなどのポリADPリボース合成酵素阻害剤を投与して膵β細胞の再生を誘導した際に、膵ランゲルハンス島に特異的に発現する遺伝子として分離された。*reg* 遺伝子がコードする蛋白、*reg* 蛋白は、膵β細胞の再生に関与すると考えられてきたが、最近になりラット *reg* 蛋白はラット膵β細胞の増殖因子であることが明らかになってきた。

本研究の第一の意義は、ヒトにおける新しい *reg* 遺伝子を分離しその遺伝子構造を決定したことにある。*reg* は複数の類似した遺伝子からなる遺伝子ファミリーを形成していることがわかってきたが、本研究以前にラット *reg* と同じサブクラス (Type I) に属するヒト *reg* 遺伝子が分離・同定されている。それ以来ヒトの *reg* は一つであると考えられてきたが、著者はヒト *reg* のサザンブロット分析の結果を改めて詳細に検討することにより、新しい第二のヒト *reg* 遺伝子の存在を予測した。これは慧眼であり、著者は予測したとおり、先に分離されていた *reg* と高い相同性を有するが、それとは異なる全く新しい遺伝子の分離に成功した。

著者はさらに、新たに分離した *reg* 遺伝子が膵臓において特異的に発現していることを明らかにし、その遺伝子産物が166アミノ酸からなる分泌蛋白で、先に分離されていたヒト *reg* 蛋白と86%、ラット *reg* 蛋白と70%の相同性を有し、さらに *reg* ファミリーに共通の6個のシステイン残基が保存されていることを明らかにした。二つのヒト *reg* 遺伝子がコードする蛋白はいずれもラット *reg* 蛋白と同じ、*reg* ファミリーの Type I に属しており、ラット *reg* 蛋白と同様、膵β細胞に対する増殖刺激活性を持つと推測されている。(新しい遺伝子は著者によってヒト *reg* I βと名づけられ、先に分離されていた *reg* は *reg* I βと改称された。) この点については今後の検討が必要であるが、将来的には糖尿病治療の観点から極めて興味深い。

さらに本研究の成果で特筆すべきは、染色体マッピングの結果、ヒト *reg* I βと *reg* I αが第二染色体短腕上 (2p12→13) にタンデムに配列していることを明らかにした点である。遺伝子ファミリーを形成する遺伝子群がゲノム上でクラスターをなしている例の一つとして特記すべきであろう。

以上、本研究は膵β細胞の再生に関わる全く新しいヒト遺伝子を分離してその発現を明らかにし、染色体座位を決定するなど学位論文に値する。