

氏名	齊田 要
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博乙第 2811 号
学位授与年月	平成 29年 1月 31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Preproendothelin-2: gene structure, expression, evolution, production, function, and regulation

(エンドセリン 2 前駆体の遺伝子の構造、発現、進化、産生、機能および制御に関する研究)

主査	筑波大学教授	薬学博士	熊谷 嘉人
副査	筑波大学教授	博士（医学）	土屋 尚之
副査	筑波大学教授	博士（医学）	島野 仁
副査	筑波大学准教授	博士（生物科学）	村谷 匡史

論文の内容の要旨

齊田要氏の博士学位論文は、血管内皮由来ペプチドであるエンドセリン2の遺伝子を単離して、その構造解析、エンドセリン2の産生、機能および制御について検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

(目的)

エンドセリン (ET) は血管収縮活性を持つ生体分子 (生理活性ペプチド) で、筑波大学により哺乳類で発見され、3種類のファミリーペプチド (ET1, ET2, ET3) の存在が推定された。エンドセリン2 (ET2) はアミノ酸配列が遺伝子解析から推定され、化学合成 ET2 は平滑筋収縮活性を有したが、詳細は不明であった。そこで著者は、ET2 の生理機能を推定するために、ET2 前駆体遺伝子の全長を単離してその構造、発現、産生及び制御の解析を行ったものである。

(対象と方法)

マウス染色体 DNA のフェージライブラリーから、ET2 のマウス遺伝子の全長 DNA を、ET2 の cDNA をプローブにして単離した。その結果、著者はマウス DNA 全塩基配列を決定して、cDNA 塩基配列と比較することにより、マウス ET2 の前駆体遺伝子の全長構造を明らかにしている。塩基をアミノ酸配列に翻訳し、ET2 前駆体タンパク質を明らかにし、ET2 前駆体遺伝子に特異的なプライマー配列を設計・合成して RT-PCR 法にて ET2 前駆体遺伝子発現組織の解析を行っている。さらに、ET2 前駆体遺伝子の発現調節機能を解明するため、著者は培養細胞株を RT-PCR 法にて探索し、ET2 前駆体遺伝子の発現細胞株を同定している。また、ET2 前駆体遺伝子の上流域をレポーター遺伝子に連結し発現細胞株に導入し、ET2 前駆体遺伝子のプロモーターを解析している。

(結果)

著者はマウス染色体フェージライブラリーから 2 種類の遺伝子を単離し、それらを繋いでマウス ET2 前駆体遺伝子とその上流域の全構造 (25kb) を解明している。その結果、ET2 前駆体タンパク質はアミノ酸 175 個で、中間体ペプチドを経てアミノ酸 21 個の成熟型 (生理活性を有する) ET2 が生成する生合成構造であることを見出している。エクソン-イントロン構造解析より、ET2 前駆体タンパク質は 6 kb に渡る 5 個のエクソンに分割して存在していること、前駆体タンパク質には ET2 と類似ペプチドが存在し、エクソン 2 と 3 に分断して存在することを見出している。ヒト ET1 前駆体遺伝子と比較すると、成熟ペプチドに相同性が見られ、ACHN 腎癌細胞に ET2 前駆体 cDNA を導入すると ET2 が産生し、ペプチド産生は cDNA の 3' 非翻訳領域 (AU 配列) を欠損すると増大した。著者は高感度特異的な RT-PCR 法で ET2 前駆体遺伝子の発現組織を解析し、マウス胎仔後期において発現を見出し、ET2 発現は胎仔や成体の腸管でも見出され、胎仔よりも成体の腸で発現が 10 倍高かったことを観察している。さらに著者は、ET2 発現細胞株を探索し、PC12 細胞でも同定し、PC12 細胞に ET2 前駆体遺伝子の上流域をレポーター遺伝子に連結し導入するとレポーター発現が観察することも明らかにしている。

(考察)

著者は、ET2 前駆体タンパク質では ET2 と類似ペプチドがエクソン 2 と 3 に分断して存在したことから、共通の原始エクソンからエクソン重複が起こって ET2 前駆体遺伝子が生成したと推定している。ヒト ET1 前駆体遺伝子と比較すると、成熟ペプチドに相同性が見られ、二つの ET 前駆体遺伝子は進化的に共通祖先から遺伝子重複によって生成したことを示唆している。また、ET2cDNA を導入した ACHN 腎癌細胞は ET2 を産生したが、cDNA 3' 非翻訳領域 (AU 配列) を欠損すると産生増大したことから、AU 配列は mRNA の寿命を短く (不安定化) することを考察している。ET2 前駆体遺伝子発現はマウス後期胎仔や成体の腸管で見出され、胎仔よりも成体の腸において発現が 10 倍高いことから、腸の成長や機能に関与することを憶測している。さらに著者は、レポーター遺伝子解析から ET2 前駆体遺伝子の上流域 1 kb に発現調節領域が存在することを推定している。

審査の結果の要旨

(批評)

著者は ET2 前駆体のマウス遺伝子を単離してそれを解析することにより、当該前駆体遺伝子の構造、進化、産生、発現、制御を解明し、ET2 の生体機能の一部を明らかにしている。遺伝子欠損マウスの作成や発現調節機構の詳細解析が可能になるので、ET2 機能が確定できることが予想される。マウスの基礎研究はヒト ET2 の機能解明に繋がり、ET2 に起因するヒト疾患の診断や治療に貢献できると期待される。

平成 28 年 12 月 1 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、学力の確認を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。