

氏 名(本 籍)	佐 藤 昇 (岩 手 県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 甲 第 1126 号
学位授与年月日	平成 5 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	医 学 研 究 科
学位論文題目	Molecular cloning of the gene encoding rat cystatin β (ラットシスタチン β 遺伝子のクローニング)
主 査	筑波大学教授 医学博士 三 輪 正 直
副 査	理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター 分子遺伝学研究室主任研究員 (筑波大学客員教授) 理学博士 石 井 俊 輔
副 査	筑波大学教授 医学博士 滝 田 齋
副 査	筑波大学教授 医学博士 濱 口 秀 夫
副 査	筑波大学助教授 医学博士 中 野 秀 樹

論 文 の 要 旨

〈目的〉

システインプロテアーゼには内在性インヒビターの存在が知られ、これらインヒビターはプロテアーゼの機能調節に関与するものと推測されている。現在までに単離された同インヒビターは同一の祖先遺伝子に由来すると考えられ、シスタチンスーパーファミリーとしてまとめられている。シスタチンスーパーファミリーのなかで細胞質に局在する低分子シスタチン (シスタチン α , β) はファミリー 1 シスタチンとして分類されているが、その遺伝子構造に関しては未だ報告がない。近年、シスタチン β がラット脾臓 B 細胞の細胞質ではなく分泌顆粒に局在することが免疫組織化学的に明らかにされ、その一次構造に関しても興味を持たれている。

これらの点を踏まえ、本研究ではラットシスタチン β の cDNA 及びゲノム DNA クローンを単離しその遺伝子レベルでの解析を試みた。

〈対象および方法〉

1) ラットシスタチン β cDNA クローンの単離は、ラット再生脾臓 cDNA ライブラリー (東北大学寺園博士提供) をスクリーニングすることによって行った。スクリーニングには、既に蛋白質レベルで決定されたアミノ酸配列の基に 3 種類の合成オリゴヌクレオチドプローブを作製し、その 5' 末端を ^{32}P で標識したものをを用いた。陽性クローンの制限酵素切断地図を作製しその全塩基配列をジ

デオキシ法にて決定した。

2) 各臓器におけるシスタチン β の発現をノーザンブロット法にて検討した。ラットの各臓器から AGPC 法により RNA を抽出し, poly(A)⁺RNA を精製した。各々の poly(A)⁺RNA 2.5 μ g を電気泳動し, ³²P 標識ラットシスタチン β cDNA をプローブとしてハイブリダイズさせた。結果はオートラジオグラフィーによって確認した。

3) ラットシスタチン β のゲノムの解析はサザンブロット法で施行した。ラットからゲノム DNA を調製後, 制限酵素 (*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind* III) で完全に切断した。各 DNA 断片 5 μ g を電気泳動し, ³²P 標識ラットシスタチン β cDNA をプローブとしてハイブリダイズさせた。結果はオートラジオグラフィーによって確認した。

4) ラットシスタチン β のゲノム DNA クローンを単離は, ラットゲノム DNA ライブラリー (大阪大学野島博士提供) をスクリーニングすることによって行なった。ジゴキシゲニンで標識したラットシスタチン β cDNA をスクリーニングプローブとした。陽性クローンの制限酵素切断地図を作製し, その全塩基配列を DNA シーケンサー (Model 373A, Applied Biosystems) を用いて決定した。また, ゲノム DNA クローンの一部をプローブとして S 1 ヌクレアーゼマッピングを行い, ラットシスタチン β の転写開始点を決定した。

〈結果と考察〉

1) 単離されたラットシスタチン β の cDNA クローンは 590 塩基対からなり 294 塩基対の open reading frame を有していた。同クローンから予想されるアミノ酸配列は, 既に蛋白質レベルで決定されたものと完全に一致し, 所謂シグナル配列に相当する部分は認められなかった。このことはシスタチン β が細胞質蛋白質として同定されている事実と一致する。脾臓 B 細胞の分泌顆粒に認められるシスタチン β は通説に従えばシグナル配列を持つ蛋白質であることが予想され, 今回はその cDNA クローンを単離することができなかった。

2) ノーザンブロット法によりシスタチン β mRNA の発現を検討した結果, 調べた各臓器に約 900 塩基対のバンドが認められ, シスタチン β が広く体組織に発現していることが明らかとなった。

3) サザンブロット法によりシスタチン β 遺伝子のコピー数を検討した結果, 制限酵素 *Eco*RI および *Hind* III で切断されたゲノム DNA は単一のバンドを示し, シスタチン β 遺伝子が単一コピー遺伝子であることが明らかとなった。

4) 単離されたラットシスタチン β のゲノム DNA クローンは 2566 塩基対で 3 つのエキソンからなることが明らかとなった。他のシスタチンファミリーはイントロンの挿入位置がアミノ酸配列上同じ位置であると報告されているが, ファミリー 1 シスタチンであるシスタチン β はこれと異なっていた。この事実は, シスタチンファミリー分子進化を考察する上で重要な所見であり, 早期にファミリー 1 とファミリー 2, 3 シスタチンとが分かれ, 次にファミリー 2 と 3 シスタチンとが分かれたことを示唆している。

5) シスタチン β 遺伝子の 5' 上流には, TATA-box および CAAT-box は認められず Sp-1 結合部

位が3ヶ所認められた。また、SIヌクレアーゼマッピングにより複数の転写開始点が存在することが示唆された。これらの結果はシスタチン β が所謂ハウスキーピング遺伝子の一つであることを示している。

審 査 の 要 旨

システインプロテアーゼの内在性インヒビターの一つであるシスタチン β のcDNAとゲノムDNAクローンを単離し分子生物学的に調べた本研究は、ファミリー1シスタチンとしては初めて遺伝子構造を明らかにしたという点で評価される。また、本研究はスーパーファミリーを形成する内在性システインプロテアーゼインヒビター群の分子進化を考察する上で重要な知見をもたらした。本研究で明らかにされなかった問題についても今後の研究の進め方をよく考察しており、本研究が将来さらに発展することが期待される。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。