

氏名	ひがしのあつのり 東濃篤徳
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第3181号
学位授与の日付	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	Structure and tissue expression of calreticulin in the Japanese monkey, <i>Macaca fuscata</i> (ニホンザルにおけるカルレティキュリンの構造と組織発現)
論文調査委員	(主査) 教授 景山 節 教授 平井 啓久 教授 渡邊 邦夫

論 文 内 容 の 要 旨

動物が精神的あるいは身体的ストレスを受けると細胞内環境が変化し、タンパク質の合成過程に影響を与えることにより変性タンパク質が増加する。分子シャペロンと呼ばれるストレスタンパク質はこれら変性タンパク質の修復をおこなうものである。修復には複数のストレスタンパク質が関与しており、細胞質ストレス応答系・小胞体ストレス応答系の2つが知られる。

両者ともにタンパク質合成の際に正しい立体構造を持った成熟タンパク質の形成に関与するものであり、変性したタンパク質を正常なものに戻し生体の恒常性を維持する役割を持っているが、後者では特に小胞体中で合成される糖鎖結合の分泌タンパク質や膜タンパク質などの重要なタンパク質の修復に関与するものである。代表的な小胞体ストレスタンパク質として immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP), calreticulin (Crt), protein disulfide isomerase (PDI) が知られている。本研究ではニホンザルにおける小胞体ストレスタンパク質に関して以下のことを明らかにした。

1) BiP, Crt, PDI の cDNA クローニングをおこないそれぞれ 1965bp, 1254bp, 1533bp の全塩基配列を決定した。これらの構造上の特徴や分子進化の過程を明らかにするとともに、ノーザン分析によって遺伝子発現を調べた。BiP は腎臓、副腎、肝臓で比較的多く発現し、PDI は肝臓、副腎、腎臓と腸で発現していた。Crt は組織全般に均等に発現する傾向にあり、それぞれ発現の組織特異性が異なることからサル類におけるストレス応答系の多様性が示唆された。

2) ニホンザル Crt タンパク質定量のため ELISA 系を初めて確立した。標準 Crt としてニホンザル Crt-cDNA を大腸菌および酵母で発現させ、リコンビナントタンパク質を調製した。サンドイッチ法を用いた ELISA 系を開発し、10 ng/ml 以下の Crt でも検出可能となった。各種疾患ニホンザルの血中 Crt 濃度を測定したところ肺炎、下痢などの症状が見られるサルで高い値となることが明らかとなり、疾病診断など臨床応用の可能性が示唆された。

3) この ELISA 測定系を用いて新生児・若年・成体ニホンザルの各組織における Crt タンパク質の発現分布を調べた。大脳皮質の各領域では新生児で低い値を示し発達に伴い増加する傾向が見られた。また他の組織では新生児の心臓や肺、肝臓で若年個体や成体に比べて高い Crt 量が見られた。これらはいずれも発達に伴う組織における糖タンパク質の生合成の増減と関連していると考えられた。

以上、本研究では小胞体ストレスタンパク質 BiP, Crt, PDI の構造と遺伝子の組織発現についてサル類で初めて明らかにした。さらに Crt ではタンパク質定量のために標準物質となる組み換えタンパク質発現系を構築し、ELISA 測定系の確立に成功した。これを用いてニホンザルで血中 Crt 測定による臨床応用の可能性を示すと同時に、脳などの組織発現分布と発達過程での変化についての基礎データを得た。Crt-ELISA 系の確立と発達に伴う組織発現解析は霊長類以外の動物も含めて本研究が初めての報告である。

論文審査の結果の要旨

生体細胞には遺伝子情報にもとづき合成された種々のタンパク質が正常な高次構造をとるために、介添え機能をもつ分子シャペロンと呼ばれる一連のタンパク質が存在する。これらはまた、ストレスによる細胞内環境の変化で増えてくる変性タンパク質の修復にあたることからストレスタンパク質とも呼ばれる。ストレスタンパク質には細胞内での働く場所の違いにより、細胞質系と小胞体系が知られている。小胞体系は特に糖タンパク質の構造修復に重要である。申請者はニホンザルを対象に代表的な小胞体系ストレスタンパク質である immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP), calreticulin (Crt), protein disulfide isomerase (PDI) の遺伝子クローニング、分子進化解析、遺伝子発現解析を進めるとともに、Crt について ELISA 測定系を確立し臨床応用の可能性を検討した。さらに脳を含む各組織の発達過程における発現変化の解析を進めた。

第1章では、ニホンザルで BiP, Crt, PDI の cDNA クローニングと塩基配列決定、それぞれの分子進化解析、ノーザン分析による遺伝子発現解析をおこなった。これらはヒト以外の霊長類で初めておこなわれた研究であり、ストレスタンパク質により構造の保存性が異なること、このことは修復対象となるタンパク質の認識部位の大きさと相関すること、組織における遺伝子発現はストレスタンパク質によりパターンが異なること、このことからストレス応答系の多様性が示唆されることなどを明らかにした。これらの成果はサル類で初めて小胞体ストレスタンパク質の分子的解析をおこなった研究として価値あるものである。

第2章では、Crt に着目し、その ELISA による測定系の開発と臨床応用の可能性を検討した。高感度な ELISA 法の確立のためにいくつかの抗体の組み合わせの詳細な検討を進め、最終的に 10ng/ml 以下の Crt 量の定量を可能にした。この ELISA 法を用いて種々の疾患サルの血液内 Crt 濃度の測定をおこない、いくつかの個体で顕著に高い濃度を観察した。本論文で申請者の確立した ELISA 法は他の動物種でも未だ開発されておらず、組織や細胞レベルでの研究以外に、ストレス評価や臨床応用など広範な利用が可能となると考えられ、価値ある成果であると評価できる。特に実際に疾患サルにおいて血中 Crt 濃度が高いことを検出できたことは臨床応用が十分期待できることを示している。さらに ELISA に使う標準ニホンザル Crt を遺伝子工学的に得たことも、生体組織にたよらない調製を可能にした点が評価できる。

第3章では、ニホンザルの各組織で生後の発達過程での Crt の発現量の変化を調べた。大脳皮質では灰白質に多く分布していること、各大脳皮質領野で新生児から若年個体や成体に至る過程で発現量が有意に増加すること、肝臓や肺など他の主要な組織では逆に減少することを明らかにした。これらの組織での変化と小胞体で合成される糖タンパク質との相関について議論した。この研究で申請者が開発した ELISA 法を用いてニホンザル組織全般での Crt の発現変化を明らかにしたことは、他動物でもなされていない解析であり、Crt の組織発現に関する基礎的知見として価値あるものと考えられる。

以上、本申請論文はストレスタンパク質の遺伝子クローニングをニホンザルで進め、3種類のタンパク質の構造解析などで成果を得ているとともに、Crt の ELISA 測定系を国際的にも初めて開発し血液を用いる臨床応用の可能性や、Crt の組織での発現、発達過程での変化などを明らかにしている。これらの成果はサル類での初めての知見である他、ストレスタンパク質の分野でも高く評価できるものである。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。