

学 位 論 文 題 名

ウシ乳腺上皮における膜繫留タンパク質
p115遺伝子の発現に関する研究

学位論文内容の要旨

膜繫留タンパク質 p115 はゴルジ装置表在タンパク質であり、サイトゾルにも分布する。哺乳動物の細胞において p115 は小胞体からゴルジ装置への輸送、ゴルジ装置内輸送、そして分泌小胞から細胞膜への輸送などの様々な小胞輸送に携わる。これらの小胞輸送において、p115 は輸送小胞を標的膜に繫留することによって輸送小胞の拡散を防ぎ、小胞輸送の効率を高めるものと考えられている。

本研究は、泌乳サイクルの過程における乳腺の発達や機能分化に伴う p115 およびその mRNA 含量の動態、さらに乳腺上皮細胞における p115 遺伝子転写調節および p115 誘導のメカニズムを明らかにすることを目的に行った。

第1章においては、ホルモン誘起泌乳の過程におけるウシ乳腺の発達・機能分化をモデルに、乳腺組織中の p115 およびその mRNA 含量の変動を調べた。乳腺組織中の p115 mRNA 含量をノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーション法で調べたところ、total RNA 量および組織 DNA 量のどちらで補正した場合においても、発達期の乳腺で最も高値であった。一方、p115 タンパク質含量をウシ p115 に由来する組換えタンパク質に対する抗血清を用いた免疫ブロット法で調べたところ、泌乳期で最も高かった。乳腺組織における p115 の局在を免疫組織化学的に調べたところ、p115 はどの発達・分化の段階においても主に乳腺上皮細胞に分布していた。乳腺以外の組織についても p115 は検出されたが、乳腺の場合とは異なり、p115 およびその mRNA 含量は泌乳のステージによって変化しなかった。乳腺の発達期における p115 mRNA 含量の増加および泌乳期において最も高い p115 含量が観察されたことから、乳腺において p115 の合成は泌乳サイクルにおける乳腺の発達や機能分化や泌乳に関与することが示唆された。

第2章においては、膜繫留タンパク質 p115 の発現調節機構について分子生物学的な検討を行った。ウシ p115 遺伝子の 5'上流領域、最初のエクソン、最初のイントロンの一部を含むクローンを入ファージ・ベクターに構築されたウシ・ゲノム DNA ライブラリーより単離した。様々な制限酵素で切断したウシ・ゲノム DNA に対する p115 の翻訳開始

点を含む約 0.2 kb に由来する cDNA プローブのサザン・ハイブリダイゼーション解析により、p115 遺伝子はシングル・コピーの遺伝子であると推定された。9 つの転写開始点をキャップサイト・ハンティング法によって同定した。ルシフェラーゼ・レポーター遺伝子に連結した 2.6 kb のウシ p115 遺伝子の 5' 上流領域の断片は、ウシ乳腺初代培養細胞 (BME) およびヒト乳腺上皮ガン細胞株 MCF-7 中で機能的なプロモーター活性を示した。5' 上流領域の 5' 側および 3' 側欠失断片のプロモーター活性をルシフェラーゼ・レポーター遺伝子アッセイによって調べ、プロモーター機能に要求される部位を限定した。プロモーター機能が維持されている領域には 1 つの nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) 共通配列が含まれていた。この NRF-1 共通配列を無為にするような変異を導入すると、BME および MCF-7 細胞における p115 のプロモーター活性が著しく低下した。Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) によって p115 遺伝子プロモーター領域に存在する NRF-1 共通配列は MCF-7 由来の核タンパク質と特異的に複合体を形成することが示された。この複合体形成はウシ・チトクローム c オキシダーゼ VIIa 肝臓イソ型遺伝子プロモーター由来の NRF-1 結合部位を持つオリゴヌクレオチドによって阻止された。スーパーシフト・アッセイによって、p115 遺伝子プロモーター領域にある NRF-1 共通配列に結合する核タンパク質は NRF-1 であることが示された。また、estradiol-17 β (E_2) あるいはインスリンおよびそれら両者の組み合わせによる刺激は、p115 遺伝子プロモーターの転写活性を細胞増殖刺激の強さに従い上昇させた。以上の結果から、p115 遺伝子プロモーター領域に存在する NRF-1 共通配列への NRF-1 の結合は、乳腺上皮細胞における p115 遺伝子の転写活性化に重要であり、p115 遺伝子の転写は、 E_2 およびインスリンによって刺激される乳腺上皮細胞の増殖に関連して活性化されることが示された。

これらの結果を統合すると、発達期の乳腺においては、 E_2 によって誘発された乳腺上皮細胞の増殖に関連して p115 遺伝子転写が活性化され、これには転写調節因子 NRF-1 が関与すると推察される。第 1 章で示したように、泌乳サイクルでの p115 タンパク質含量の変動パターンは、p115 mRNA 量の場合とはやや異なるので、転写レベルのみならず、翻訳や分解レベルでの調節も考慮する必要があるが、いずれにせよ、乳腺の発達を含めた泌乳過程においては、活発な小胞輸送が行われており、これに p115 が深く関わっていると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齊 藤 昌 之

副 査 教 授 桑 原 幹 典

副 査 教 授 稲 葉 睦

副 査 助教授 木 村 和 弘

学 位 論 文 題 名

ウシ乳腺上皮における膜繫留タンパク質

p115遺伝子の発現に関する研究

膜繫留タンパク質 p115 はゴルジ装置表在タンパク質であり、小胞体からゴルジ装置やゴルジ装置内、分泌小胞から細胞膜へなど、様々な小胞輸送において、輸送小胞を標的膜に繫留することによって小胞輸送の効率を高める分子と考えられている。このような小胞輸送は、タンパク質の合成・分泌を伴う乳腺で活発であると考えられる。本学位論文は、ウシの泌乳サイクルにおける乳腺の発達や機能分化に伴う p115 の動態、さらに乳腺上皮細胞における p115 遺伝子転写調節のメカニズムを明らかにしたものである。

第1章においては、ウシ乳腺の発達・機能分化と p115 の関係を把握するために、ホルモン誘起泌乳モデルを用いて乳腺組織中の p115 とその mRNA 含量の変動を調べた。乳腺組織における p115 の局在を免疫組織化学的に調べたところ、p115 はどの発達・分化の段階においても主に乳腺上皮細胞に分布しており、mRNA は発達期で最も高値であった。一方、p115 タンパク質含量は、泌乳期で最も高かった。他の組織についても p115 は検出されたが、乳腺とは異なり泌乳のステージによっては変化しなかった。これらの結果から、p115 は泌乳サイクルでの乳腺の発達・機能分化や泌乳に関与することが示唆された。

第2章においては、p115 の発現調節機構について分子生物学的な検討を行った。即ち、ウシ p115 遺伝子の 5'上流領域 2.6kb をルシフェラーゼ・レポーター遺伝子に連結し、ウシ乳腺初代培養細胞およびヒト乳腺上皮ガン細胞株 MCF-7 中でのプロモーター活性を調べた。5'側や 3'側欠失断片、変異導入断片でのプロモーター活性の測定や、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) による解析の結果、p115 遺伝子プロモーター領域に nuclear respiratory factor-1 (NRF-1) 共通配列が存在し、これへの NRF-1 の結合が乳腺上皮細胞における p115 遺伝子の転写活性化に重要であることが明らかとなった。更に、p115 遺伝子の転写は、エストロゲンおよびインスリンによって刺激される乳腺上皮細胞の増殖に関連して活性化されることが示された。

このように本研究は、乳腺の発達を含めた泌乳課程において活発な小胞輸送が行われており、これに p115 が深く関わっていることを示したものであり、獣医生理学・生化学の発展に貢献するものである。よって審査員一同は上記学位論文提出者渡部淳氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。