

サブテーマ名：3 高速分子進化の医療応用

小テーマ名：C3 新規生理活性物質等に関連した機能分子の解析と創出

フェーズ I<3-1-d>

[概要]

高速進化分子工学のための創薬資源を開発することを目的として下垂体前葉細胞の比較プロテオームによる新規物質の探索、成長遅延症マウスの病因の解明、脳機能研究のための遺伝子改変動物の開発などを行った。

本研究で発見した新規タンパク質は遺伝子以外の情報が明らかになっていない新規性の高い物質であり、今後の研究により重要な医療応用の可能性を持つ。また近年、脳神経疾患の病因解明に注目されているグリア細胞のアストロサイトを生きのまま同定できるトランスジェニックラットの作成は本研究により世界で始めて成功した。

[フェーズ I の研究成果]：

(1) 新規分泌タンパク質の発見と機能解析

ラットプロラクチン産生腫瘍(プロラクチノーマ)からクローン細胞株を得た (Inoue et al. Endocrinology 1990)。これらの細胞株はホルモン産生能や腫瘍形成能に差異があり、これらの異なった性質の原因物質の探索のために、比較プロテオームを行った。細胞間の比較には成長ホルモンを大量に分泌する MtT/S 細胞と、ホルモンを産生しない MtT/E-B3 細胞を使用した。まず二次元電気泳動から、それぞれの細胞のみに存在するタンパク質スポットに注目した。これらの電気泳動スポットは質量分析 (peptide mass fingerprinting (PMF)) により解析し、分子量 4 万ほどで酸性タンパク質スポットに注目した。我々はこのタンパク質の遺伝子配列に疎水性アミノ酸配列からなる分泌シグナルが存在し、実際に細胞外に分泌されることを発見した (図 1)。

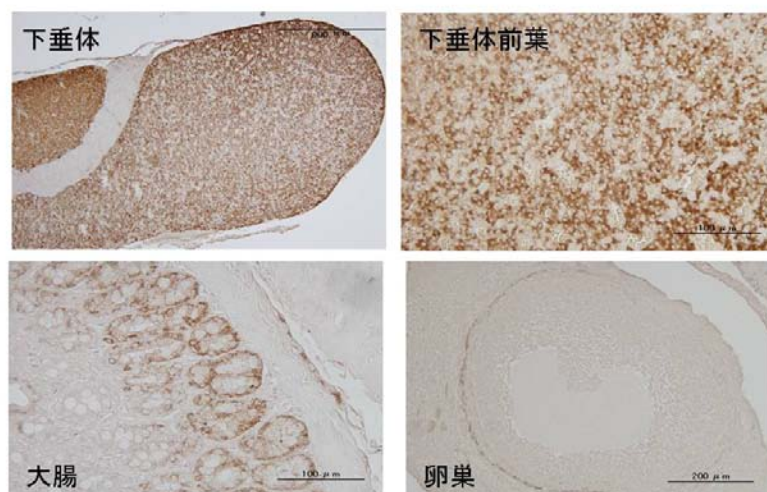


図 1 各組織における somatogenin の局在

somatogenin は下垂体、大腸、卵巣などの細胞で産生されることが明らかになった。

(2) 成長遅延マウス遺伝子の機能解析

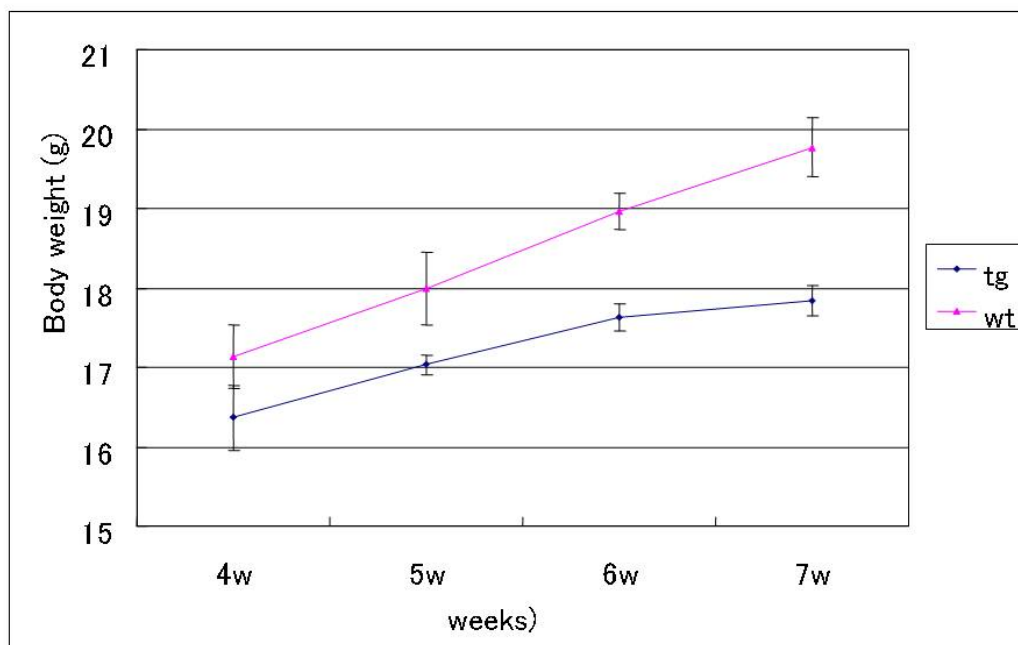
成長遅延症 (grt) マウスは、生後 2~3 週齢頃からの著しい成長の遅滞とその後の回復という極めて珍しい成長様式を持つ。grt マウスでは、成長の遅滞が顕著になる時期から、栄養物

の消化と吸収に関わる器官の相対重量に変化が認められる。このことより、成長遅延現象と栄養代謝の関わりが推測された。解析の結果、grt マウスでは、軽度の空腹時高血糖に加えて、糖負荷に対する耐糖能異常及びインスリン分泌能の低下等、糖代謝の異常が認められたが、膵ランゲルハンス島β細胞の分泌顆粒内にはインスリンが検出されることから、本マウスに観察される糖代謝異常は、糖負荷に応じたインスリン分泌能の低下が原因と推測される。

[フェーズ II の研究成果] :

(1) 新規分泌タンパク質遺伝子のトランスジェニックマウスの作成と機能解析

免疫細胞化学および定量 PCR により新規分泌タンパク質は脳、下垂体、胃、皮膚、卵巣、腎臓など種々の組織に発現することが明らかになった。興味深いことに下垂体前葉におけるこのタンパク質は女性ホルモンによって著しく増加する。さらに我々は培養細胞に研究から本タンパク質が興味深い機能を持つことを明らかにした。また、このタンパク質を過剰に産生するトランスジェニックマウス作成した。トランスジェニックマウスの体重は野生型に比較して軽いなどの興味深い形質を示す。さらに、これらの動物などの解析により新規分泌タンパク質は代謝などに関わる重要な機能を持つことが考えられた (図 2)。



somatogenin 遺伝子トランスジェニックマウスの体重変化

n=3
* P<0.05
** P<0.01

図 2 somatogen 遺伝子のトランスジェニックマウスの体重変化
トランスジェニックマウスは野生マウスに比較して体重が軽い。

(2) 成長遅延マウス遺伝子の機能解析

単離した膵ランゲルハンス島を用いて *in vitro* 系でのインスリン分泌能と GLUT2 及び GK の発現を検討した結果、grt マウス膵ランゲルハンス島では、グルコース依存性インスリン分泌経路における K_{ATP} チャネル以降のシグナル伝達は正常に機能しているが、グルコース濃度の検出機構に異常があるものと推測された。現在、膵ランゲルハンス島における本酵素の標的分子を同定するために、TPST2 により附加される修飾分子を認識する抗体の作成と検出法の開発を試みている。今後、この分子の同定は、インスリンの分泌機構の解明のみならず、糖尿病などの糖代謝異常の創薬の標的分子としても大変興味深い。

(3) S100 β プロモータ依存的に GFP を発現するトランスジェニックラットの開発

我々は新規タンパク質の探索に加えて、脳、内分泌、代謝に関わる重要な細胞である、アストロサイト、下垂体濾胞星状細胞、脂肪細胞、軟骨細胞などに特異的に発現する S100 β 遺伝子に着目した。この遺伝子は細胞特異的に発現する遺伝子であり、特に脳のアストロサイトや下垂体の濾胞星状細胞のマーカーとして広く知られている遺伝子である。S100 β そのものの機能は未知であるが、その細胞特異的な発現は注目される。特に脳のアストロサイトは中枢神経系の支持細胞として極めて重要である。もし S100 β 遺伝子の細胞特異的な発現に関わるプロモータが明らかになれば、そのプロモータ依存的に緑色蛍光タンパク質を産生することができ、生きたままこれらの細胞を集める、基礎研究や応用研究上の重要なツールを供給できると考えた。我々は種々の研究により S100 β 遺伝子の細胞特異的な発現に関わる遺伝子領域の特定に成功し、これらの細胞に特異的に GFP を産生するトランスジェニックラットを樹立した (Itakura et al. Endocrinology 2007)。このラットは現在京都大学の実験動物センターに寄託し国際的に使用できるようにした (図 3)。

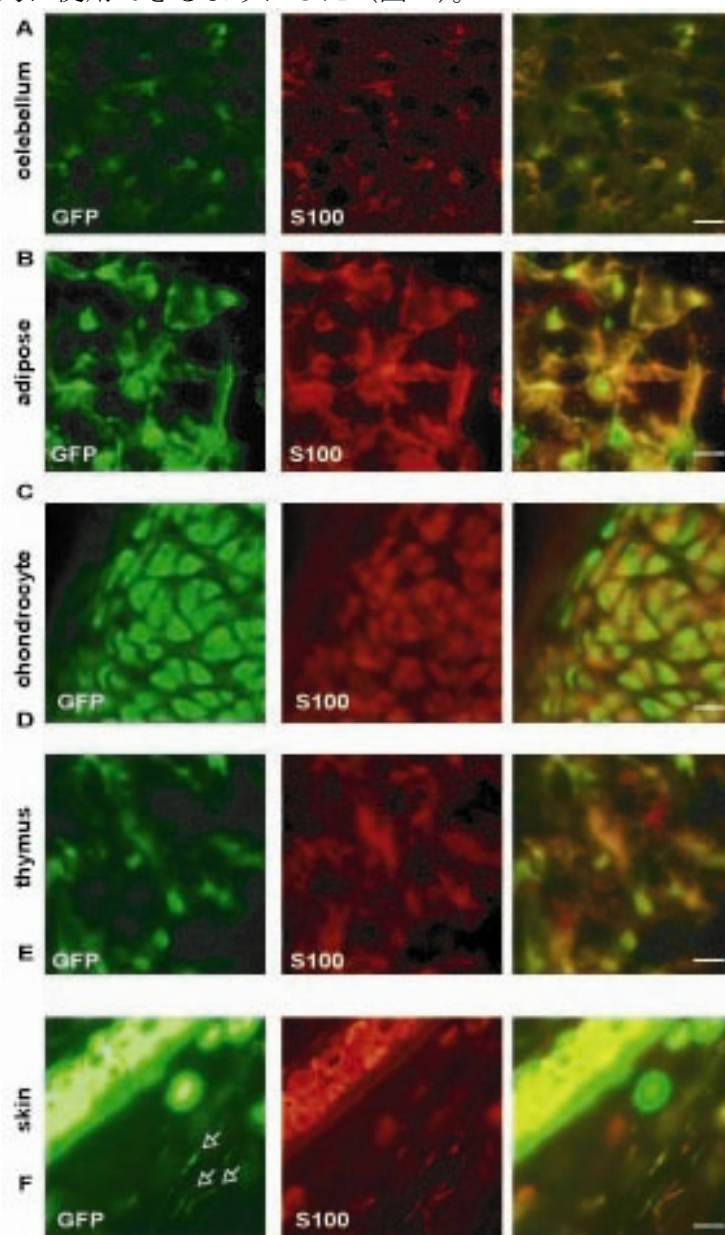


図 3 S100 β -GFP ラットにおける GFP 発現組織

GFP は下垂体の他、脳、脂肪細胞、軟骨、皮膚などの S100 β 産生細胞に特異的に発現する。

[今後の展開] :

本プロジェクトで発見された新規タンパク質は今後更なる機能解析により医薬品開発の標的分子としての可能性を探りたい。また、これらの物質はヒトの下垂体にも発現されていることが明らかになっており、この物質がヒトでも重要な機能に関わることが示唆された。今後、何らかの病態との関連を明らかにし、診断薬、治療薬への可能性を検討する必要がある。また、新規物質はヒトの血液中にも多く含まれる可能性がある。また、この物質はヒトにおける何らかの病態に関わり、血液中の濃度が変化することが考えられる。このためにはこの物質に対する血中レベルの測定系を早急に開発する必要がある。このことに関して現在、いくつかの方法により免疫学的な測定法の開発を進めつつある。