Identification of protein-tyrosine kinase genes preferentially expressed in embryo stomack and gastric cancer

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 岩瀬, 利郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1029

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第　１７６号	学位授与年月日	平成　７年　３月２７日
氏　　名	岩　瀬　利　郎		
論文題目	Identification of protein – tyrosine kinase genes preferentially expressed in embryo stomach and gastric cancer (胎仔胃および胃癌で高発現するチロシンキナーゼ遺伝子の同定)		

博士(医学)　岩瀬利郎

論文題目

Identification of protein-tyrosine kinase genes preferentially expressed in embryo stomach and gastric cancer

(胎仔胃および胃癌で高発現するチロシンキナーゼ遺伝子の同定)

論文の内容の要旨

〔目的〕

チロシンキナーゼは構造的にも機能的にも細胞内情報伝達、特に細胞増殖と分化に密接に関係している酵素である。幾つかのチロシンキナーゼが胎児の発育に伴ってその発現が調節されていることが知られており、癌の発生や増殖に重要な役割を演じているとされるチロシンキナーゼもある。例えばレセプタータイプのチロシンキナーゼの一つであるK-sam/bekは、あるタイプの胃癌で高発現および遺伝子増幅が報告されている。以上のような知見を踏まえて、胎児の発育と胃癌の発生に重要な役割を果たしている、新たなチロシンキナーゼ遺伝子を同定するのが、本研究の目的である。

〔方法〕

Wistarラット胎仔の胃およびヒト胃癌組織から、グアニジン・チオシアネート法により全RNAを抽出し、各mRNAを分離してλZAP-Ⅱ上にcDNAライブラリーを構築した。抗リン酸化チロシン抗体PY20を用い、発現ライブラリーを抗体でスクリーニングすることにより、β-ガラクトシダーゼとリン酸化チロシンとの融合蛋白を発現している幾つかのクローンを得た。各クローンはサンガー法にて塩基配列を決定し、DDBJに登録されている既知の遺伝子との相同性を検索した。つぎにこれらのcDNAクローンをプローブとしてラット胎仔の胃およびヒト胃癌での発現の程度をノーザンブロットにより解析した。

〔結果〕

ラットの2.0×10^5クローンと、ヒトの3.2×10^5クローンからそれぞれ4つずつの独立したクローンが得られ、おのおのR1-4およびH1-4と名付けた。DDBJとの相同性検索の結果、R1がelk、R3がfyn、R4とH3はK-sam/bekと既知のチロシンキナーゼ遺伝子であった。R2とH2はそれぞれesk、TTKという同じファミリーに属すると考えられるセリン/スレオニン/チロシンキナーゼ遺伝子だった。クローンH1は、erkと非常に相同性が高かったが(98.9%)、それまでerkは180塩基しか報告されておらず、H1は細胞内ドメインのほぼ全長をカバーするより長いerkのクローンと考えられた。このH1についてクローン全長の塩基配列およびアミノ酸配列を決定したところ、cek5、elk、eckなどと相同性が高く、eph-ファミリーに属するチロシンキナーゼ遺伝子であることが示された。クローンH4は、癌遺伝子v-rykと76%の相同性を有するのみで、新しいチロシンキナーゼ遺伝子であった。上記で単離した各クローンをプローブとして用い、16日齢のラットの胎仔胃と成体の胃での発現をノーザンブロットで解析したところ、R1、R2、R3、H1およびH2については胎仔胃で強く発現しており、成体の胃ではほとんど発現が認められなかった。R4、H3については胎仔、成体ともに発現が認められた。H4は胎仔、成体とも発現が認められなかった。

つづいてR1(elk)、H1(erk)、R2(esk)、H2(TTK)についてラットの胃を発育の日齢を追ってその発現を調べたが、いずれの遺伝子も胎仔16日齢が最も強く発現しており、新生仔になるにしたがって発現は低下し成体ではほとんど発現していないことが示された。

さらに上記四つの遺伝子についてヒト胃癌組織と正常胃組織での発現を、ノーザンブロットで調べたところ、いずれの遺伝子も胃癌組織のほうに高発現が認められ、その傾向は特にＨ１（erk）で顕著であった。

〔結論〕

eph－ファミリーに属するチロシンキナーゼ遺伝子 elk/erk と、同じファミリーに属すると推定されるセリン／スレオニン／チロシンキナーゼ遺伝子 esk/TTK は、胎仔の胃の発育に重要な役割を果たしており、かつこれらの遺伝子の異常発現が、胃癌発生に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

チロシン（Tyr）キナーゼは細胞の信号伝達系、特に細胞増殖や分化に密接に関係することが急速に明らかにされつつある。申請者は学位申請論文の研究において、胎仔ラットの胃の発育と胃癌の発生に関係する Tyr キナーゼ遺伝子の同定を試みた。研究の概要は次のとおりである。

1）胎仔16日齢のラットの胃およびヒト胃癌組織から構築した cDNA 発現ライブラリーを抗ホスホチロシン抗体を用いてスクリーニングすることにより、ラット由来４個、ヒト由来４個、計８個の cDNA クローンが得られた（それぞれＲ１－４、Ｈ１－４と命名）、塩基配列決定により、Ｒ１はラット elk、Ｒ２はマウス esk 対応遺伝子、Ｒ３は非受容体型 Tyr キナーゼであるヒト FYN 対応遺伝子、Ｈ２は Ser/Thr/Tyr キナーゼである TTK、Ｒ４とＨ３はそれぞれ K-sam Ｉ、マウス bek 対応遺伝子と同定された。Ｈ４はこの時点では新しい Tyr キナーゼと考えられたが、翌年全構造が解明された c-mer と同一遺伝子であった。Ｈ１は部分塩基配列しか知られていなかった ERK と同一と推定されたが、後に申請者のグループはその全長 cDNA のクローン化に成功し、細胞接着に関与すると云われている受容体型 Tyr キナーゼ ＶⅢ型（eph ファミリー）、すなわち、細胞外の Ｃ末端から順に Ig 様配列、Cys 豊富な配列、FNⅢ反復配列（FN:fibronectin）、TM 領域、キナーゼ領域を持つ受容体型 Tyr キナーゼであることを明らかにした。

2）これら遺伝子の内、Ｒ１、Ｒ２、Ｒ３、Ｈ１、Ｈ２は胎仔16日齢のラットの胃では発現されていたが、成体ではほとんど発現していなかった。更にＲ１、Ｒ２、Ｈ１、Ｈ２の発現をヒト胃癌組織と正常胃組織で比較したところ、いずれも胃癌組織の方に高発現が認められ、その傾向は特にＨ１（ERK）で顕著であった。申請者は以上の結果より、これら遺伝子が胎仔の胃の発育において何らかの役割を演じており、且つその異常発現が胃癌発生に関与しているのではないかと推定した。

審査委員会は、以上の内容の口頭発表の過程および終了後に次のような質疑、試問を行った。

1）スクリーニングにおいて、抗ホスホチロシン抗体で検出された蛋白質は自己リン酸化を受けた Tyr キナーゼか、それともリン酸化された大腸菌の蛋白質か

2）Tyr キナーゼの自己リン酸化のリガンド依存性について

3）elk および FYN の発現における alternative splicing の有無について

4）塩基配列の比較から、ある遺伝子が他の動物種で既に同定されている遺伝子の対応遺伝子と言うための基準

5）Ｒ３、Ｒ４、Ｈ３の mRNA が成体ラット前胃にはあるが腺胃には検出されないことの解釈、および前胃と腺胃の組織学的異同

6）ERK 等 eph ファミリー遺伝子に由来する受容体型 Tyr キナーゼ VⅢ型のリガンド、およびこの遺伝子産物に見られる FNⅢ反復配列に推定されている生理的役割

7）eph ファミリー遺伝子の作用は細胞増殖かあるいは抑制か、ERK は癌遺伝子か、なぜ胃癌で高発現していると考えられるか

8）申請者がクローン化した ERKcDNA の塩基配列から演繹される Ala→Arg 点変異は、ERK 発現産物の過剰生産に結びつくと考えられるか

これらの質問に対する申請者の応答は適切であり、また研究そのものが有意義と思われる新しい知見を含む立派な研究と高く評価された。以上により、本論文は博士（医学）の学位授与に値する内容を備えていると論文審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者　主査　教授　市山　新
副査　教授　筒井祥博　副査　教授　馬場正三
副査　助教授　小出幸夫　副査　助教授　西村正彦