



Isolation and localization of Type II b Na/Pi cotransporter in the developing rat lung

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 橋本, 光義 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1150

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 297号	学位授与年月日	平成12年 3月27日
氏名	橋本光義		
論文題目	Isolation and localization of Type II b Na/Pi cotransporter in the developing rat lung (ラット肺発生時に発現するIIb型Na/Piコトランスポーターの単離と局在)		

博士(医学) 橋本光義

論文題目

Isolation and localization of Type II b Na/Pi cotransporter in the developing rat lung

(ラット肺発生時に発現するIIb型Na/Piコトランスポーターの単離と局在)

論文の内容の要旨

[はじめに]

肺発生に関わる遺伝子を解析することを目的として、ラット胎仔の肺発生の進展に伴い発現の変化する遺伝子を探索した。胎生期(15日目)より1日ごとに肺あるいはその原基のRNAを抽出しディファレンシャルディスプレイ法を用いて各段階の遺伝子発現を解析した。その中でラット胎仔肺の妊娠16日目から発現する遺伝子を単離したところ、ナトリウム依存性無機リン共輸送遺伝子とホモロジーが認められた。Na/Piコトランスポーターはいくつかの生物種から単離されており、ホモロジーの相違から3つのグループ(Type I~III)に分類されている。さらにType IIに属するNa/Piコトランスポーターは、ホモロジーや発現臓器、そのpH依存性からさらに2つのグループ(Type II、Type II b)に分類されることが提案されている。我々が単離した遺伝子はType II bに属するラットNa/Piコトランスポーター(rNaPi II b)であった。最近、ヒトのType II b相同遺伝子が単離され、肺において強い発現が確認されているが、その局在は報告されていない。rNaPi II b遺伝子の発現をin situハイブリダイゼーション法で解析し、肺発生時における意義を考察した。

[材料ならびに方法]

妊娠15日から21日の胎仔および生後1日、1週、14週のラット肺あるいはその原基からそれぞれRNAを抽出し、ディファレンシャルディスプレイ法を用いて発生に伴い発現の変化する遺伝子を同定した。ディファレンシャルディスプレイにはH-AP73~80、H-T11A/C/Gのプライマーセット[GenHunter]を用いた。同定したバンドを切り出し、さらに単離し得たものについて塩基配列を決定しホモロジー検索を行ったところNa/Piコトランスポーターとホモロジーのある遺伝子であった。出生1日目のラット肺組織のcDNAライブラリー作製とスクリーニングを行い全塩基配列を決定した。単離した遺伝子は、ノーザンブロット法により発現する組織を確認した。また、肺における発現の局在を検討するために、妊娠15日から18日、20日、21日の胎児および生後1日、10週のラット肺さらにN-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP)経口投与により誘発された肺腫瘍のパラフィン切片を作製し、in situハイブリダイゼーションを施行した。

[結果]

ディファレンシャルディスプレイ法により数個の遺伝子が発生段階に従い増減しており、ホモロジー検索の結果、漸増するものとしてナトリウム依存性無機リン共輸送(Na/Piコトランスポーター)に相同性を示す遺伝子の他にもarylsulfotransferase、adipocyte membrane protein (FAT)が同定され、漸減するものには明らかなホモロジーが検出されないcDNA断片が含まれていた。Na/Piコトランスポーター遺伝子は、妊娠16日から発現が認められ成体まで継続して発現しており、この断片を単離した後さらにcDNAライブラリーの作製とスクリーニングにより6個のクローンが得られた。シーケンシングを行い約4 kb

の全塩基配列を決定した。再び全長をホモロジー検索した結果、やはり最近マウスとヒトで相次いで報告されたNa/Pi コトランスポーターと高い相同性が認められた。マウスとヒトではアミノ酸レベルでそれぞれ93.7%、80.4%のホモロジーがあり、さらに構造の特徴からもType II b に属する遺伝子(rNaPi II b)であった。トータルRNAのノーザンブロット法による解析でもラット胎仔肺の発生後期(妊娠17日)から発現することが確かめられ、さらに成体ラットでは小腸や腎、大腸、特に肺で強い発現が認められた。in situハイブリダイゼーション法により、胎仔期では未熟な気管支の先端に局在する発現がみられ、出生後の肺ではサーファクタントプロテインC遺伝子との比較によりII型肺胞上皮にのみ発現していることが判明した。また、BHP誘発肺増殖性病変部では、肺胞上皮過形成や腺腫に陽性所見が認められた。

[結論ならびに考察]

マウスやヒトのナトリウム依存性無機リン共輸送のラット相同遺伝子であるrNaPi II bを単離し、その胎生期の発現時期と局在を明らかにした。生理的にはサーファクタントの主成分であるリン脂質の生成に関与していることが示唆され、また肺腺癌発生母地ともいわれる腺腫様過形成さらに肺腺癌のマーカーとなる可能性があり、肺胞の発生、分化の新しい指標になるのではないかと考えられた。

論文審査の結果の要旨

肺は胎生初期に気管支が間質内に侵入し、途中で分枝を繰り返しながら、細気管支を形成し、その末端が肺胞を形づくる。近位気管支には、繊毛細胞が多く、遠位の細気管支ではクララ細胞が主要細胞であり、肺胞ではII型肺胞細胞とI型肺胞細胞が主な構成細胞である。肺はこれ以外にも、気管支をとりまく平滑筋細胞、間質をうめる線維芽細胞そして血管内皮細胞、神経細胞など約40種の細胞からなる極めて複雑な組織である。これら細胞系譜を決定する遺伝子や系譜に特異的なマーカーが近年少しずつ明らかにされつつあるが、まだまだ十分とはいえない状況にある。

申請者は、ラット胎生後期の肺および生後初期の肺から10種類のRNAを調製し、それを鋳型にして逆転写したものにdifferential display法を用いて、肺発生が進行すると共に出現増加する遺伝子や消失する遺伝子を同定することを試みた。differential display法自身、余り確実な方法ではないという経験則が集まりつつあるにも拘わらず、申請者は複数の出現あるいは消失する遺伝子を得た。これは、申請者が10種類のRNAを用いて解析するという工夫により、実験を成功に導いたと評価できる。

申請者は、妊娠16日から出現するHG80という遺伝子に注目した。ノーザンブロットで発現が16日目から増加することを確認した後、遺伝子全長のクローニングを試み、見事に成功した。そのアミノ酸配列から、この遺伝子はIIb型Na/Piコトランスポーターであることが明らかになった。しかし、研究途上でヒト遺伝子とマウス遺伝子が先に報告されたので、申請者はラットの肺発生過程における同遺伝子の発現局在に焦点を当てることになった。発生各時期のラット肺切片にジゴキシゲニンラベルしたプローブを用いてin situ hybridization法でこの遺伝子の発現細胞を検討した。胎生16.5日目から発生中の気管支細胞の一部に陽性シグナルが認められ始め、胎生18.5日では伸長している気管支遠位部に発現が認められたが、近位部細胞および間質細胞にはシグナルが陰性であった。出産後は、この遺伝子は細胞核の大きなII型肺胞細胞と思われる細胞にのみ発現していた。申請者は、II型肺胞細胞で発現していることが既に知られているsurfactant protein Cを用いた結果と対比することにより、発現細胞がII型肺胞細胞であることを証明した。また、化学発癌剤により誘導された肺腺腫がこの遺伝子を発現しているかどうかを同じ

く in situ hybridization法を用いて検討し、肺腺腫ではシグナル陽性であり、この遺伝子がⅡ型肺胞細胞の細胞系譜マーカーとして使用できる可能性を示唆した。

全体にわたり、申請者の研究の進め方は着実であり、得られた結果は信頼性の高いものであると評価できる。

審査の過程において、申請者に次のような質問がなされた。

- 1) 4 kb全長をプローブとして用いているが、特異性は問題ないのか。
- 2) 伸展している気管支の遠位部に発現が認められるというが、立体的にはどの部位に発現しているのか。
- 3) Ⅱ型肺胞細胞に発現している意味は何か。
- 4) Na/Pi cotransporterと surfactant protein Cの関係は何か。
- 5) Ⅱ型肺胞細胞とクララ細胞の細胞質内構造の違いは何か。

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 三浦直行
副査 寺川進 副査 千田金吾