

★307

絨毛癌抑制に関わる遺伝子の単離

九州大生医研

浅野間和夫, 松田貴雄, 近藤晴彦, 小川昌宣, 周 勇, 加藤秀則, 和氣徳夫

〔目的〕我々はヒト胎盤組織で発現を認め、絨毛癌細胞株にて発現を認めない遺伝子群のcDNAライブラリーを作成した。その中から絨毛癌抑制に関わる遺伝子を単離同定した。

〔方法〕1) 作成したcDNAライブラリーの各クローンについて胎盤特異的発現をノーザンブロットにより確認した。2) ライブラリーの各クローンは200~500bpの断片であるため、全長を得る目的でこれらをプローブとした胎盤cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。3) 胎盤cDNAライブラリーから得られた約1kbpのcDNAについて胎盤、胞状奇胎、絨毛癌の各組織及びヒト各臓器における発現をRT-PCR法を用いて検討した。4) cDNAを発現ベクターに組み込み、絨毛癌細胞株に遺伝子導入し、細胞形態、増殖特性の変化を検討した。

〔成績〕1) 胎盤cDNAライブラリーから得られたcDNA (SMAP 31) の発現をRT-PCRで検討したところ、ヒト胎盤、脳で高発現を認め、胞状奇胎、絨毛癌組織で発現を認めなかった。2) SMAP 31は妊娠子宮、歯肉で発現が報告されているcDNA断片に一致したが未解析遺伝子であった。3) 絨毛癌細胞株3株においてSMAP 31遺伝子の欠失を認めた。4) 絨毛癌細胞株 (Bewo) にSMAP 31遺伝子を導入したところ細胞形態の変化とともに細胞増殖が顕著に抑制された。増殖抑制が解除された復帰変異株では導入したSMAP 31発現が消失していた。

〔結論〕1) 胎盤組織で発現するが、絨毛癌化に伴い発現を消失する絨毛癌抑制遺伝子の候補SMAP 31遺伝子を同定した。2) SMAP 31は組織特異的発現を示した。

308

胎盤特異的発現を示す遺伝子群の単離

九州大生医研

松田貴雄, 浅野間和夫, 小川昌宣, 近藤晴彦, 周勇, 加藤秀則, 和氣徳夫

〔目的〕胎盤に発現し絨毛癌に発現しない遺伝子群は、胎盤の発生・分化或いは絨毛癌の抑制に関わると考えられる。本研究ではcDNAサブトラクション法を用いて胎盤特異的発現をする遺伝子群の単離を行った。〔方法〕1) PCR-cDNAサブトラクションにて胎盤特異的なcDNAクローンを単離した。得られたcDNA断片をプローブとしてノーザンブロット法により胎盤及び絨毛癌細胞における発現を解析した。2) 胎盤特異的cDNAライブラリーからサブクローニングを行い塩基配列を決定した。〔成績〕1) 胎盤特異的cDNA断片(約100~400bp)として15クローンを得た。ノーザンブロットにより胎盤特異的発現を示したのは7クローンであった。2) 胎盤特異的発現を示した7クローンをプローブとして胎盤cDNAライブラリーからサブクローニングを行った結果、それぞれ全長1kbp程度のcDNAを得た。3) それぞれのcDNAの塩基配列を決定した結果、4クローンは既知の遺伝子と高いホモロジーを有した。妊娠特異的β1糖蛋白、オステオポンチン、ウィルムス腫瘍関連蛋白、リボソーム蛋白L19であった。これらはいずれも胎盤での高発現が報告されているものであった。4) 未知の3クローンはいずれも胎盤での発現が報告されているESTと相同性を有した。〔結論〕1) 我々の行ったcDNAサブトラクションはいずれも胎盤において発現が報告されている遺伝子群を同定し本法の妥当性が示唆された。2) 本研究で胎盤特異的発現を示すことが明らかにされたcDNA7クローンの中に胎盤の発生・分化や絨毛癌抑制に機能する遺伝子が含まれることが示唆された。

309

ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の生物活性発現にダイマー形成は必須か？

神戸大 スタンフォード大# ワシントン大*

佐藤朝臣, 浅原彩子, 丸尾 猛, Aaron J.W. Hsueh#, Irving Boime*

〔目的〕hCGの生物活性発現には α , β 両サブユニットのダイマー形成が必要とされる。しかし前回我々は分子生物学的手法を用いて二つのサブユニットを単一分子として発現させたsingle chain hCGにおいて、ダイマー形成を阻害する変異を導入しても細胞外へ分泌され、また生物活性に有意な差を認めないことを報告した。このことより、hCGのダイマー形成は生物活性発現に必須でないことが示唆されたが、今回は別の視点からこの新たな知見につき検証した。〔方法〕single chain hCGの α 領域に存在する5本のS-S結合をアラニンに置換した各変異体(7-31, 10-60, 28-82, 32-84, 59-87)が、hCGダイマー構造を特異的に認識するモノクローナル抗体によって検出されるか否かをWestern blot法で検討した。〔成績〕hCG β とのダイマー形成を阻害する変異 α 10-60, 32-84を含むsingle chain hCGは、hCGダイマー構造に特異的なモノクローナル抗体A407により認識されなかった。またhCGダイマーに特異的なもう一つのモノクローナル抗体B109によっても、 α 10-60, 32-84変異体は検出されなかった。つまり、ダイマー形成を阻害する変異 α 10-60, 32-84を含むsingle chain hCGの立体構造は、hCGダイマーに特異的なモノクローナル抗体により認識されず、hCGダイマー構造をもたぬことが示された。しかし、変異体の生物活性には差が認められなかったことから、hCGの生物活性発現にダイマー形成は必ずしも必要でないことが確認された。〔結論〕ダイマー形態を持たぬsingle chain hCGが生物活性を有することより、hCGリガンド設計の可能性が広がり、今後分子レベルでのhCGの生物活性発現機構の解明に重要な役割を担うと考えられる。