

論文内容要旨

論文題目 MOLECULAR CLONING AND FUNCTIONAL EXPRESSION
ANALYSIS OF RAT AND HUMAN HEPASSOCIN, A LIVER-
SPECIFIC PROTEIN WITH DNA SYNTHESIS-STIMULATING
ACTIVITY

DNA合成促進活性をもつ肝特異的新規タンパク質ヘパソシンの
ラットおよびヒト肝臓からの分離と同定

氏名 原 寛

◆Introduction

ラット肝臓を部分切除すると肝臓が再生することが、HigginsとAndersonによって1931年に初めて実験的に証明された。その後、肝再生を司る因子の解明に向け多くの研究が行われ、中村らにより、肝非実質細胞から分泌され、肝実質細胞に作用する強力なDNA合成刺激因子HGFが見出された。また、TGF- α 、EGF、FGF-1も肝実質細胞に対し同様の作用がある。一方、肝再生の中期では肝実質細胞DNA合成抑制因子としてのTGF- β が発現し、肝再生を停止に向かわせていると考えられる。また、部分肝切除後、30分以内に活性化される遺伝子としてLRF-1等のいくつかの転写因子も報告されている。このように多くの報告がなされているにもかかわらず、肝再生の仕組みの詳細はまだ十分明らかになったとは言えない。

本研究では、Differential cDNA cloning技術と*Xenopus* oocyte expression screening法を用いて、ラットの肝再生に伴い活性化される新規の遺伝子を分離し、その遺伝子の産生する蛋白質（ヘパソシンと命名）が肝実質細胞のDNA合成を刺激する活性をもつことを見出した。本遺伝子は肝部分切除だけでなく、ガラクトサミンによる肝の傷害によっても活性化されることから、肝の再生に重要な役割を果たしていることが示唆された。次にこのラット遺伝子をプローブとしてヒト肝cDNAを得た。ヒト型組換え蛋白質を生産し、肝実質細胞のDNA合成を刺激する活性を検討したところ、ラット蛋白質と同様に活性をもっていた。

◆Results

①再生肝で活性化し、肝細胞のDNA合成を刺激する新規遺伝子の単離

肝部分切除12時間後のラット肝からcDNAライブラリーを作製した。次に、再生肝cDNAと擬手術肝cDNAをそれぞれアイソトープ標識したものをプローブとして、differential hybridization法によりcDNAライブラリー70,000クローンを分析した。その結果、擬手術肝cDNAプローブより再生肝cDNAプローブでより強く結合するものとして357クローンを選択した。さらに正確にクローンを選択するため、357クローンからDNAを抽出してフィルターにプロットし、同様に2種類のプローブを用いて2次スクリーニングを行い、再生肝で活性化されるcDNA38クローンを得た。

cDNAデータベースに基づく解析の結果、これらのクローンのうち、17クローンが新規遺伝子であった。これらの38クローンについて、それぞれcDNAをプローブに谷口らの方法により再生肝よりmRNAを抽出し、アフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションを行い、蛋白質を発現させた。ここで得られた蛋白質（培養液中に発現しているの、培養液を濃縮したもの）をラット初代培養肝実質細胞に与えた。38クローンのうち、クローン #41がDNA合成を刺激する活性をもっていた。得られたクローン#41は完全長でなかったため、5'RACE法によって完全長ラットcDNAを得た。これは5残基のシス

テインを含む314アミノ酸からなる蛋白質をコードしていた (Fig. 1)。

一方、このラット cDNA をプローブとして 312アミノ酸からなる蛋白質をコードするヒト肝 cDNA を得た。

②ヘパソシン組換え蛋白質の発現と解析

ラット・ヘパソシン cDNA を pCDL-SRα296 に組み込み、Verots S3細胞に導入し蛋白発現を行い、DEAE-Sephrose 及び Sephadex G-25 を用いて精製した。得られた蛋白質は、SDS-PAGE還元下で 34kDa、非還元下で 66kDa であった (Fig. 2)。精製蛋白質の N 末端アミノ酸配列を解析したところ、その配列は、Asp-Glu-Asn-Cys-Leu-Gln-Glu-Gln-Val-Arg-Leu-Arg-Ala-Gln-Val-Arg-Gln-Leu-Glu-Thr-Arg-Val-Lys-Gln-Gln-Gln-Val-Val-Ile-Ala であった。この配列は、cDNA から予想したアミノ酸配列 (Fig. 1) の 25 番目から 54 番目のアミノ酸に相当していた。精製した蛋白質をラット初代培養肝実質細胞に作用させたところ、EGF と同等な DNA 合成刺激活性をもつことが明らかになった (Fig. 3)。

ヒト・ヘパソシン cDNA を CHO 細胞を用いて蛋白発現したところ、N 末端アミノ酸配列の解析から 290アミノ酸からなることがわかった (Fig. 4)。即ち、cDNA の配列から予想した N 末端側 22アミノ酸はシグナルペプチドと考えられた。得られたヒト・ヘパソシン蛋白質をウサギ、イヌの初代培養肝実質細胞に作用させたところ DNA 合成促進活性を示した。ヒト・ヘパソシンは、ラット、マウスの肝実質細胞に対してラット・ヘパソシンより作用は弱い DNA 合成促進活性を有していた (Fig. 5)。

③ラット肝からのヘパソシンの精製と解析

ラット肝からヘパソシンを精製するにあたり、部分ペプチド 3 種を合成し、これをウサギに免疫し抗ペプチド抗体を作製した。うち 1 種の抗ペプチド抗体は高い抗体価を示したため、これを用いて抗体アフィニティー・カラムを作製し、肝部分切除 24 時間後のラット肝 (200頭:600g) homogenate からヘパソシンを精製した。精製蛋白質は組換え蛋白質と同様に、還元下 34kDa、非還元下 66 kDa であることがわかった。精製蛋白質をラット初代培養肝実質細胞に与えたところ、EGF と同等な DNA 合成刺激活性をもつことが改めて確認できた。また、精製蛋白質の N 末端アミノ酸配列を解析したところ、組換え蛋白質のアミノ酸配列と一致する結果を得た。

④ヘパソシン mRNA の組織特異的発現

ラット心、脳、胎盤、肺、筋、腎、睪丸でのヘパソシン mRNA の発現を Northern blot 解析した。その結果、ヘパソシン遺伝子は肝でのみ発現する組織特異性の高い遺伝子であった (Fig. 6)。また、肝組織内でのヘパソシン遺伝子の発現を調べると、発現部位は、肝実質細胞に限られており、内皮細胞等の非実質細胞には認められなかった。

ヒト・ヘパソシン mRNA を Dot blot 解析したところ、肝で発現が高く、脾で僅かに発現していた。

⑤ヘパソシン mRNA の肝切除及び肝傷害に伴う発現変化

ラット部分肝切除後のヘパソシン mRNA の発現を調べたところ、48 時間後に発現のピークが認められた (Fig. 7)。また、ガラクトサミン投与時には 8~12 時間に発現のピークが認められた。

◆Discussion

肝部分切除 12 時間後のラット肝 cDNA ライブラリー 70,000 クローンから擬手術肝に比し再生肝でより強く発現する新規 cDNA クローンを得、その遺伝子産物がラット初代培養肝実質細胞の DNA 合成活性を高めることを見出したので、この新規蛋白質をヘパソシンと名付けた。組換え蛋白質を調製したところ、314アミノ酸のうち 25 番目のアミノ酸から始まる 290アミノ酸から成り、ホモ 2 量体を形成していた。N 末端側 24アミノ酸はシグナル・ペプチドとして存在し、分泌型蛋白質であった。抗体カラムを用いてラット

肝から分離した天然型蛋白質を解析したところ組換え蛋白質と同様な結果を得た。よってヘパソシンは、TGF-βスーパー・ファミリー蛋白質のように2量体として機能する蛋白質と考えられる。

肝切除後活性化される即時反応型の遺伝子であるc-fos、c-myc等の発現が、切除30分後に認められている。HGFのmRNAは12時間後にピークを示すが、TGF-βのmRNAは72時間後にピークを示す。本遺伝子は肝切除後、40~50時間に発現のピークが認められる。我々は最近、ヘパソシンが、肝実質細胞DNA合成抑制作用をもつTGF-βに結合することを見出している。これらのことからヘパソシンは肝細胞の増殖に深く関わっていることが示唆される。物性面ではHGFやFGF-1がヘパリン・カラムに吸着する一方で、ヘパソシンは吸着しないことから化学的には異なる群に属すると考えられる。

また、ヘパソシンは肝特実質細胞で発現し、autocrineに作用すると思われる。一方、これに対してHGFは非実質細胞（内皮細胞、クッパー細胞）及び肺・腎の上皮細胞からparacrine、endocrineに作用している。このように肝細胞に作用する多くの因子が、個々に時間と場所を変えて発現している。これらのことから、生体内ではヘパソシンを含む多くの因子がクロスリンクして互いに協調的に働いていることが考えられる。

ヘパソシンの構造はフィブリノーゲン鎖とC末端側アミノ酸配列で37.5%の相同性(Fig. 8)をもち、2次構造もよく似ていることから細胞外基質として働いている可能性も考えられる。

また、ヒト・ヘパソシンが、ラットと同様の構造と活性を有していた。このことは肝細胞のDNA合成促進活性を有する同様の分子が種を越えて存在していることが明らかになった。しかしながら、また、この分子は活性面において若干の種特異性があることが明らかになった。進化多様性の面から興味深く、さらなる研究進展を図って行きたい。

◆ Figures

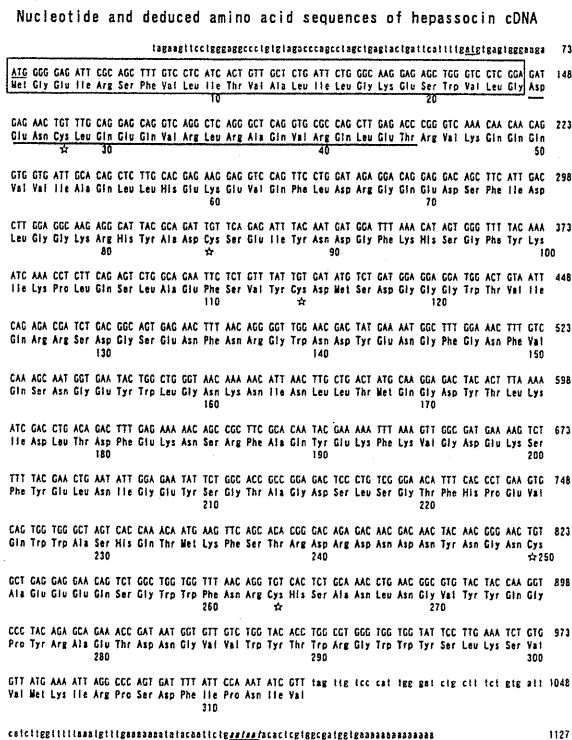
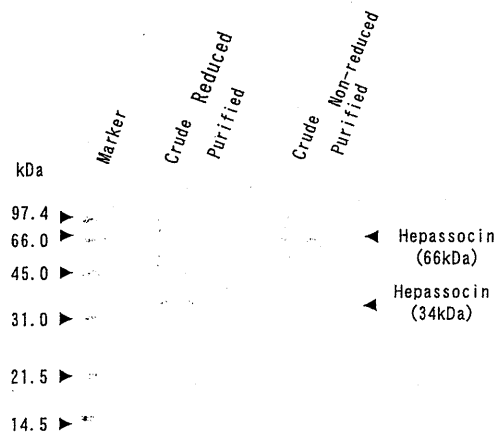


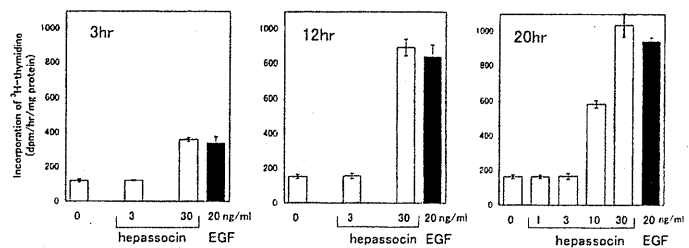
Fig. 1



The SDS-PAGE profile of proteins in the conditioned medium (crude extracts) and the fraction purified by column chromatography

Fig. 2

Stimulation of [³H]-thymidine incorporation into hepatocytes by hepassocin purified from Verolts cells



Hepassocin and EGF as a positive control were added to culture of parenchymal hepatocytes and 20hr later [³H]-thymidine (0.1 μCi) was added. Labeling was for 3hr (left), 12hr (center) or 20hr (right).

Fig. 3

Comparison of predicted amino acid sequences of human and rat hepassocin

```

Human MAKVFSFILVTTALIMGREISAL--EDCAEQMRLRAQVRLLETRVKQQ 48
Rat   GEIRVIVLIVLKLKSWVGDNLV.....Q..... 50

Human VKIKQLQENEVQFLDKGDENTVIDLGSKRQYADQSEIFNDGYKLSGFYK 98
Rat   VAVHKLK.....RQDSF.....GH.....YFH..... 100

Human IKPLQSLAEFSVYVQMSDGGGWTVIQRRSDGSENFRCWKDYENGFGNFV 148
Rat   .....N..... 150

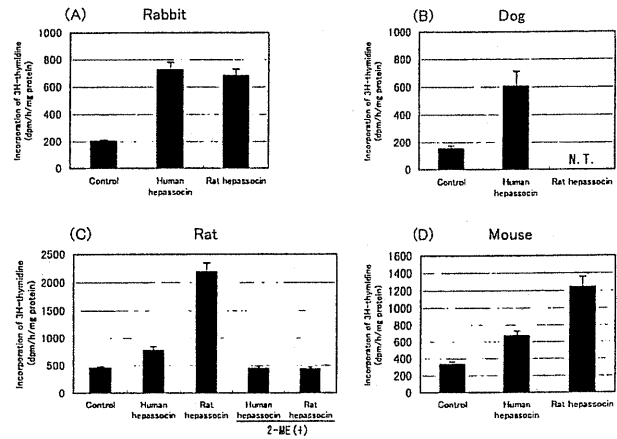
Human QKHGEYWLGNKNLHFLTQEDYTLKIDLADFEKNSRYAQYKFKVGDEN 198
Rat   SN.....INLMG.....T.....F.....EK.....S 200

Human FYELNIGEYSGTAGDSLGNFHPEVQWASHQRMKFSTWRDHDHNYEGNC 248
Rat   .....S.....T.....R.....N.....N..... 250

Human AEEDQSGWFFNRCHSANLNGVYYSPTYTAKTONGIVWYTWHGWWYSLKSV 298
Rat   .....D.....Q.....RE.....V.....R..... 300

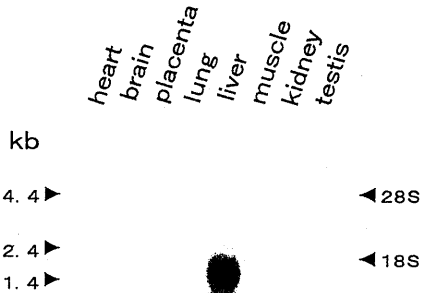
Human VMKIRPNDFIPNVI 312
Rat   .....S.....IV 314
  
```

Fig.4



Effects of human and rat hepassocin on DNA synthesis in cultured cells

Fig.5



Northern blot analysis of hepassocin expression in rat tissues

Fig.6

Comparison of amino acid sequences of human hepassocin (upper lines) and human fibrinogen- γ (lower lines)

```

Hu-hep  MAKVFSFI-----LVTALIMGR-EISALEDCAEQMRLRAQVRL 40
Hu-fib- $\gamma$  LIATLTYNPDESSKPNMIDA.TLKS.IMLEEIMRYEASILTHDSSI.Y. 110

Hu-hep  E---TRVKQQQVKIKQLQENEVQFLDKGDENTVIDLGSKRQYADQSEIF 87
Hu-fib- $\gamma$  QEIYNSNN.KI.NL.EKVAQL.A.CPEPKDQTVQ.H.ITG-----AD.A 157

Hu-hep  NDGYKLSGFYKIKPLQSLAEFSVYVQMSDGGGWTVIQRRSDGSENFRCW 137
Hu-fib- $\gamma$  .K.A.Q..L.F.....KANQQ.L..EIDGS.N....F.K.L...VD.KK.V. 208

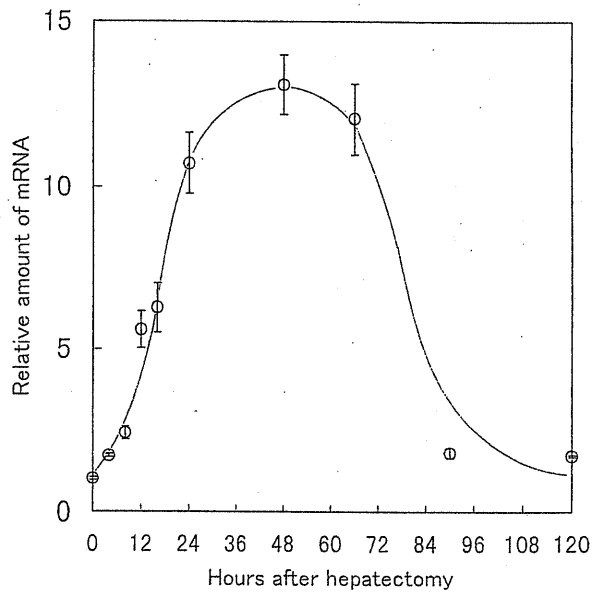
Hu-hep  KDYENGFGNFVQK-HGEYWLGNKNLHFLTQED--YTLKIDLADFEKNSRY 185
Hu-fib- $\gamma$  IQ.KE...HLSPTGTT.F.....EKI.LIS.SAIP.A.RVE.E.WNGRTST 259

Hu-hep  AQYKFKVGDENKFNELNIGEY-SCTAGDSLAG---NFHPEVQWASHQRM 232
Hu-fib- $\gamma$  .D.AM....P.ADK.R.TYAYFAG.D...AFD.FDFGDD.SDKFFT.NG. 310

Hu-hep  KFSTWRDHDHNYEGNC.AEEDQSGWFFNRCHSANLNGVYYSPTYTAKT---- 283
Hu-fib- $\gamma$  Q.....N.N.KF.....Q.G.....M.K..ACH.....Q.GTYS.ASTPN 361

Hu-hep  --DNGIVWYTWHGWWYSLKSVVMKIRPNDFIPNVI 312
Hu-fib- $\gamma$  CY....I.A..KTR...M.KTT...I.FNRLTIGE 396
  
```

Fig.8



Time-course of hepassocin mRNA expression during liver regeneration, as determined by scanning the autoradiograms with a densitometer.

Fig.7