

## 論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成12年度博士課程 進学

氏名 池田 佳代子

指導教官 東條 英昭

### 論文題目 *In vivo* 系及び *in vitro* 系による 乳清酸性タンパク質の生物学的機能に関する研究

乳汁中に分泌される各種のタンパク質は、主に乳腺胞で合成される。乳汁中のタンパク質には、カゼイン、 $\beta$ -ラクトグロブリン、 $\alpha$ -ラクトアルブミンなど各種のタンパク質が含まれている。そのうち乳清酸性タンパク質 (Whey Acidic Protein ; WAP) は、齧歯類、ウサギ、ラクダ、ブタ、ワラビー、レッドカンガルーの乳汁中に見出された乳清タンパク質である。

WAP は 19 個のアミノ酸残基から成るシグナルペプチドを持ち、アミノ酸配列はシステインに富んでおり、このことからある種のプロテアーゼインヒビターであろうと考えられている。また、WAP は 4 箇所の S-S 結合を中心とする立体構造を取ることが知られており、この構造を持つ ps20、WDNM1 等のタンパク質は、上皮細胞の増殖抑制作用を持つことが報告されている。このように、WAP は、タンパク質のアミノ酸配列やその構造から何らかの生物学的機能を有することが推測されるが、WAP の機能についてはほとんど研究されていない。

これまでに、WAP 遺伝子は乳腺で組織特異的に発現すると考えられていたことから、そのプロモーター領域が標的遺伝子をトランスジェニック (Tg) 動物の乳腺で発現させる目的で利用されている。しかし、その後の研究から、WAP 遺伝子は乳腺だけでなく他の組織

でも発現していることが見出され、WAP の構造と考え合わせると、WAP は乳汁中の一栄養成分としてだけではなく、生体内で何らかの生物学的役割を果たしていることが示唆される。

以上のような背景から、本研究において、WAP の生物学的機能を調べる目的で生体内における WAP の発現部位を詳細に解析し、また、WAP を全身性に過剰発現する Tg マウスを作出しその表現型を解析した。さらに、乳腺上皮細胞由来の培養細胞を用いた *in vitro* 系の実験により、WAP の細胞増殖に及ぼす影響について検討した。

## 第一章 WAP を全身性に過剰発現するトランスジェニックマウスの作出および解析

生体内における WAP の発現部位を詳細に調べるために、内因性 WAP の発現が最も高い時期であることが知られている泌乳 14 日目の通常マウスから各種組織を採取し、RT-PCR および抗 WAP 抗体による免疫染色を行った結果、乳腺以外に膣で WAP の高い発現が観察された。このことから、WAP が生体内で何らかの機能を果たしていることが強く示唆されたため、生体内の遺伝子の機能を探る有効な手段の一つである、異所性に目的の遺伝子を過剰発現する Tg マウスを作出し、それらの表現型を解析した。

本研究では、WAP 遺伝子を、全身性に強く発現させるために、pCX (CMV-IE enhancer, chicken  $\beta$ -actin promoter, rabbit  $\beta$ -globin poly-A signal) に挿入した融合遺伝子 (pCX/WAP) を構築した。ベクターより切り出し精製した CAG/WAP 融合遺伝子 (約 2.9kb) をマウス受精卵に顕微注射する方法により Tg マウスを作出した。その結果、得られた 73 匹のうち 10 匹が Tg マウスと判定され、各 Tg マウスの遺伝子の発現を解析したところ、WAP 遺伝子の転写産物が最も高い一系統において、その産仔に発育不良が見られた。この系統の母 Tg マウスの乳腺のホールマウント標本作製したところ、通常マウスに比べ、乳管の径は同程度に発達していたものの、乳腺胞の発達が著しく劣っていた。Tg マウスの解析から、産仔の発育不良は、WAP の過剰発現によって、乳腺組織特異的にその増殖及び分化が阻害され、その結果乳汁の生産及び分泌が異常になったことが推察された。なお、このマウスの妊娠、出産及び哺乳行動は正常であったこと、さらに、内因性 WAP の高い発現が観察された膣では形態的な異常が観察されなかったことから、WAP の過剰発現の増殖及び分化に対する作用は乳腺特異的なものであることが推察された。なお、泌乳期にある通常マウスの膣前庭腺で高い WAP の発現が観察されたことの生物学的意味については不明であるが、膣が外分泌腺であること、及び WAP がプロテアーゼインヒビターである可能性が高いことから、膣においては、微生物の感染防御に関与していることが推察される。

## 第二章 乳腺上皮由来培養細胞株 EpH4/K6 細胞を用いた WAP 機能の解析

第一章で得られた知見をもとに、WAP の機能を細胞レベルでより詳細に知るために、妊娠中期 BALB/c マウス乳腺上皮細胞由来の細胞株である EpH4/K6 細胞を用い、WAP の機能を調べた。Eph4/K6 細胞に WAP を強制発現させた細胞株を作製しその増殖能を調べたところ、対照に比べ、増殖が有意に抑制されていた。次に、増殖抑制の原因を知るために、BrdU 取り込み実験及びセルソーターを用いた解析を行った結果、WAP を高発現した細胞株では、細胞周期の S 期への進行が遅れていることが観察された。各種サイクリン D 群の遺伝子発現について RT-PCR により解析した結果、WAP 高発現細胞株において、サイクリン D1 の発現が有意に減少していることが認められ、このことが細胞周期の遅延の原因になっていることが明らかとなった。

本研究において、WAP が、乳腺の発達を制御する機構に重要な役割を果たしていることを初めて明らかにすることができ、乳腺発達の分子機構を知る上で非常に有用な知見が得られた。WAP は乳腺細胞から分泌された後、パラクラインあるいはオートクライン的に乳腺細胞に作用し、細胞内で何らかの経路を介してサイクリン D1 の発現を抑制することによって、乳腺細胞の過形成を抑制している可能性が考えられる。今後は、この点に注目した研究のアプローチが必要である。