

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 池田 佳代子

乳汁中には、各種のタンパク質が含まれているが、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。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。しかしながら、WAP の機能についてはほとんど研究されていない。

本研究では、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ている。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ている。

第一章 では、WAP を全身性に過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作出し、それらの表現型を解析している。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、乳腺以外に膈で WAP の高い発現を観察した。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。WAP 遺伝子を全身性に強く発現させるために、pCX (CMV-IE enhancer, chicken β -actin promoter, rabbit β -globin poly-A signal) に挿入した融合遺伝子 (pCX/WAP) を構築し、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入する方法により Tg マウスを作出した。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を認めた。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。以上、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を認めた。

第二章では、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 の機能を調べている。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ことを認めた。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を観察した。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を認め、このことが細胞周期の遅延の原因になっていることを明らかにした。

以上、本研究は、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し、乳腺発達の分子機構を知る上で重要な知見を示した。本論文の成果は学術上ならびに応用動物科学分野に貢献するところが少なくない。よって、審査員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。