

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	辻ひとみ
<p style="text-align: center;">学位論文題目</p> <p><i>SLURP-2</i>, a novel member of the human Ly-6 superfamily that is up-regulated in psoriasis vulgaris (ヒトLy-6スーパーファミリーの新規メンバーである<i>SLURP-2</i>は、尋常性乾癬で発現が亢進している。)</p> <p style="text-align: center;">共著者名</p> <p style="text-align: center;">岡本浩一、松坂恭成、飯塚 一、田宮 元、猪子英俊</p> <p style="text-align: center;">Genomics (81) : 26-33, 2003</p> <p style="text-align: center;">研究目的</p> <p>尋常性乾癬は表皮ケラチノサイトの増殖と炎症細胞浸潤を特徴とする原因不明の炎症性角化疾患であり、発症後、症状の軽減と再燃を繰り返す。尋常性乾癬発症に関連する遺伝子群の同定のために、乾癬患者病変部、非病変部および健常者皮膚組織を対象に、マイクロアレイによる発現遺伝子プロファイリングを行い、既知・未知遺伝子合わせて約60,000遺伝子のうち、約1,000遺伝子について乾癬病変部特異的な発現上昇を認めた。本研究では、乾癬皮膚部において特に強い発現上昇を認めた未知遺伝子の全長クローニングを行い、その遺伝子の特徴について解析した。</p> <p style="text-align: center;">材料・方法</p> <p>ヒト培養ケラチノサイトからAGPC法(Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform法)を用いてtotal RNAを抽出し、RACE法およびoligocapping法にてcDNAライブラリーを作製し、完全長クローニングを行い転写開始点を決定した。得られた配列を下にBLASTNおよびBLASTPを用いたホモロジー検索を行い、遺伝子のモチーフ、特徴等について調べた。ノザンハイブリダイゼーション、RT-PCRを用いて他組織におけるmRNAの発現を確認した。本遺伝子が単一遺伝子座にあるかどうか確認するため、ゲノミック・サザンハイブリダイゼーションを施行した。プロモーター予測プログラム(TEFSEARCH)を用いてプロモーターの検索を行い、また、Golden Path(December 2001)を用いて物理的地図を作製した。乾癬患者皮膚部、無疹部、および健常者</p>			

皮膚組織からtotal RNAを抽出し、TaqMan法による定量的RT-PCRを用いて本遺伝子の発現量について比較した。

成 績

- 1) マイクロアレイの結果から、尋常性乾癬皮疹部で発現亢進していた未知遺伝子(EST)の一つであるAI829641の全長クローニングを行い、oligocapping法を用いて転写開始点を決定し、DDBJに登録した。
- 2) 遺伝子は588個の塩基からなり、3つのexonと2つのintronから構成され、97個のアミノ酸からなる。
- 3) 遺伝子はLy-6/uPAR superfamilyの特徴的モチーフをもち、ホモロジー検索の結果、マウスLy-6/uPAR superfamilyが位置する15番染色体E bandとシンテニーをもつ8q24.3上にあった。物理的地図を作製したところ、本遺伝子はケラチノサイトで発現している他の2つのメンバーとともに小クラスターを形成していた。
- 4) 本遺伝子はシグナルペプチドをもち、GPIアンカーを有していなかった。
- 5) 哺乳類Ly-6/uPAR superfamilyの中で2番目に見つかった分泌タンパクであることから、SLURP-2(secreted Ly-6/uPAR related protein 2)と命名した。
- 6) プロモーター予測プログラムを用いてプロモーターの検索を行ったところ、SP-1, AP-1, E2F, GATA3といった転写因子が予測された。
- 7) 他組織を用いてRT-PCRを行った結果、本遺伝子は主に上皮系組織で発現が認められた。また、胸腺での発現は認められたが、骨髄および脾臓での発現は認められなかった。
- 8) ノザンハイブリダイゼーションで、食道で約600bpに、胃, 十二指腸で約1,600bpの位置にバンドが認められた。
- 9) ゲノミック・サザンハイブリダイゼーションで、バンドはそれぞれのレーンで1本しか認められなかった。このことは本遺伝子が1遺伝子座にあることを示す。
- 10) 尋常性乾癬患者皮疹部、無疹部、および健常者皮膚組織を用いて定量的RT-PCRを行い、それぞれを比較したところ、皮疹部/無疹部、皮疹部/健常者皮膚において3.8倍、2.8倍と有意に発現上昇を認めた。

考 案

今回、完全長クローニングに成功した未知遺伝子は、8q24.3上に位置し、10個のシステイン残基とその特徴的配列から、また、Ly-6 superfamilyのメンバーと34-28%のアミノ酸の相同性が認められたことから、Ly-6/uPAR superfamilyの新規メンバーであると同定した。Ly-6/uPAR superfamilyにはGPIアンカーをもつ膜タンパク型とGPIアンカーをもたない分泌タンパク型の2つのタイプがあるが、SLURP-2はシグナルペプチドを有することとGPIアンカーをもたないことから、後者の分泌タンパクで

あることが示唆された。SLURP-1(secreted Ly-6/uPAR related protein 1)に続き、哺乳類のLy-6 superfamilyで2番目に見つかったLy-6 superfamilyの分泌タンパクであることから、SLURP-2(secreted Ly-6/uPAR related protein 2)と命名した。SLURP-2は主に皮膚、食道などの上皮系組織で発現が認められ、血液器官では胸腺での発現は認められたが、骨髄、脾臓では認められなかった。マウスLy-6 superfamilyには、骨髄細胞やリンパ球の細胞表面分化マーカーとしての機能があり、中には末梢T cell活性化抗原としての働きをもつものもあるが、ヒトではその機能はまだよくわかっていない。SLURP-2が胸腺のみに発現していることから、胸腺において、成熟上皮細胞成分あるいは特異的T細胞抗原として自己-非自己認知のT細胞の教育過程に関与している可能性が示唆された。ノザンハイブリダイゼーションの結果より、SLURP-2がalternative splicing formをとることが明らかになった。8q24.3領域のLy-6 superfamilyの物理的地図では、SLURP-2はケラチノサイトに発現している他の2つのメンバー、頭頸部有棘細胞癌の原因遺伝子であるE48と遺伝性角化症疾患であるMal de Meleda病の原因遺伝子であるSLURP-1と小クラスターを形成していることが示された。これらの2つの遺伝子がケラチノサイトの増殖に何らかの関係があることが示唆されることから、SLURP-2も同様の機能をもつ可能性がある。定量的RT-PCRの結果、SLURP-2が尋常性乾癬患者皮疹部で有意に上昇していたこと、および、プロモーター予測検索の結果、AP-1, E2Fといった細胞増殖に関連する転写因子が予測されたことから、SLURP-2がケラチノサイトの増殖に関する何らかの役割をもつことが示唆された。

結 論

同定した未知遺伝子SLURP-2は、588個の塩基および97個のアミノ酸からなる、ヒトLy-6 superfamilyの新規メンバーに属する分泌タンパクである。主に上皮系で発現し、免疫系では骨髄および脾臓で発現されず胸腺のみに発現しているという特徴をもつ。乾癬患者皮疹部では無疹部および健常者皮膚と比べて約3.8倍および約2.8倍と有意に発現が上昇していた。これらの結果から、SLURP-2はケラチノサイトの増殖あるいはT cellの分化・活性という機能が推測され、尋常性乾癬の病態に関与している可能性が示唆された。

引 用 文 献

- 1) Palfree, R.G. (1996) *Tissue Antigens* **48**, 71-79
- 2) Kamiura, S., Nolan, C.M., Meruelo, D. (1992) *Genomics* **12**, 89-105
- 3) Adermann, K., Wattler, F., Wattler, S., Heine, G., Meyer, M., Forssmaan, W.G., Nehls, M. (1999) *Protein science* **8**, 810-819

参 考 文 献

- 1) Tsuji, H., Ishida-Yamamoto, A., Takahashi, H., Iizuka, H. (2001) *Journal of Dermatological Science* **27**, 170-177
- 2) Matsuzaka, Y., Okamoto, K., Tsuji, H., Mabuchi, T., Ozawa, A., Tamiya, G., Inoko, H. (2002) *Biochemical and Biophysical Research Communications* **297**, 1171-1180

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	辻 ひとみ
審査委員長 立野正敏 ㊟ 審査委員 飯塚 一 ㊟ 審査委員 鈴木 裕 ㊟ 審査委員 吉田成孝 ㊟			
<h3>学 位 論 文 題 目</h3> <p style="text-align: center;"><i>SLURP-2</i>, A Novel Member of Human Ly-6 Superfamily That Is Up-regulated in Psoriasis Vulgaris.</p> <p style="text-align: center;">(ヒト Ly-6 スーパーファミリーの新規メンバーである <i>SLURP-2</i> は、尋常性乾癬で発現が亢進している)</p>			
<p>尋常性乾癬は、表皮細胞の増殖亢進と炎症性細胞浸潤を特徴とする原因不明の難治性疾患である。欧米では遺伝関係が顕著な家系が確立しており、その解析の結果、HLA 遺伝子座近傍のものも含めいくつかの候補遺伝子があげられているが、現時点でその病因は不明である。本疾患の病因ならびに病態を解明するために、論文提出者らは尋常性乾癬患者皮疹部、無疹部および健常者皮膚を対象としたマイクロアレイによる発現遺伝子プロファイリングを行い、クローニングの結果、乾癬皮疹部で発現増強のみられる新規遺伝子の同定に成功した。</p> <p>論文提出者らは、まず皮疹部で特に強い発現上昇を認めた未知 EST を選択し、培養ケラチノサイトを用いて RACE 法によるクローニングを行い、oligocapping 法により転写開始点を決定し完全長配列を取得した。本遺伝子は今まで報告の無い新規遺伝子で 588 塩基からなり、97 個のアミノ酸からなる ORF を有していた。遺伝子構造の解析の結果、Ly-6 superfamily のモチーフを持ち、この遺伝子群がクラスターを形成している 8q24.3 上に本遺伝子が位置することから、Ly-6 superfamily の新規メンバーと同定された。また、Ly-6 superfamily の中で 2 番目に見出さ</p>			

れた分泌蛋白であることから、*SLURP-2* ; *secreted Ly-6/uPAR related protein 2* と命名した。

ついて RT-PCR を用いて発現の組織特異性を検討したところ、主に上皮系組織に発現していることが示された。さらに血液組織では骨髄、脾臓には発現せず、胸腺のみに発現を認めた。また、乾癬患者皮疹部、無疹部、健常者皮膚を用いて定量的 RT-PCR を行なったところ、皮疹部/無疹部および皮疹部/健常者皮膚で 3.2 倍、2.8 倍の有意差をもった発現の差を認めた。プロモーター検索の結果では、細胞増殖関連転写因子である AP-1, E2F が、T 細胞分化関連転写因子である GATA3 が認められた。

以上、論文提出者らの結果は、乾癬皮疹部で発現増強のみられる新規遺伝子 *SLURP-2* の同定に初めて成功したものであり、極めて重要な価値ある仕事と考えられる。プロモーター検索の結果からも *SLURP-2* は表皮細胞の増殖ないし分化に関与している可能性が考えられ、乾癬の病態を考える上でも興味ある知見となっている。

なお、論文提出者に対する本論文の内容ならびに関連分野に関する諮問に対し、適切かつ明瞭な解答が得られ、本審査委員会は本論文が十分学位に値するものと判定した。