



遺伝子解析による補体D因子産生組織の解析(自然科学系)

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2009-08-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 北野, 悦子, 北村, 肇 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00010817

報 告

遺伝子解析による補体 D 因子産生組織の解析

北野悦子, 北村 肇

(大阪府立看護大学医療技術短期大学部臨床検査学科)

Study on Factor D mRNA in Normal Human Hepatocytes

Etsuko Kitano and Hajime Kitamura

(Department of Clinical Laboratory Science, Osaka Prefecture College of Health Sciences)

Key words: 補体 D 因子; factor D mRNA; RT-PCR; 補体産生

はじめに

補体成分の多くは肝臓で産生されるが、補体 D 因子は肝臓ではなく、脂肪組織で脂肪細胞によって作られると考えられ、このことが低分子量や血清中の低濃度と共に補体 D 因子の特徴であった¹⁾。これは、脂肪細胞が産生する adipsin が補体成分 D 因子と同一生化学的活性を有し、アミノ酸配列も相同性が高いことから、D 因子 = adipsin と見なされるようになり、この adipsin の mRNA が、ヒトの肝癌由来培養細胞 HepG2 やヒト肝組織に存在しなかった²⁾ことが主な根拠とされている。

しかし最近、われわれは、adipsin ではなく補体 D 因子の側から、*in vitro* での D 因子産生について研究を行った結果、ヒト胃上皮系細胞³⁾、ヒト乳腺上皮系細胞⁴⁾や正常ヒト肝細胞⁵⁾についても D 因子を産生していることを見出し、報告した。特に正常肝細胞によって産生された D 因子は多量であったことから、血清中の D 因子の主たる産生臓器は肝臓である可能性⁶⁾が考えられた。そこで、本研究は D 因子の産生組織を明らかにすることを目的として、これらの細胞における D 因子の mRNA およびその cDNA について解析した。

材料および方法

- 1) 細胞：正常ヒト肝細胞 (normal human hepatocyte) として Human Primary Hepatocyte Epithelial Cells (Cell Systems)、肝癌由来培養細胞として HepG2 (liver hepatoblastoma, human) (大日本製薬)、胃癌由来培養細胞として KATO-III, MKN-28, MKN-74 (JCRRB) を使用した。
- 2) 細胞培養：各細胞を 5% CO₂/95% air, 37°C 条件下で 1~3 日間培養し、その細胞培養上清および細胞を採取し、被検検体とした。
- 3) 培養上清中の補体成分定量：サンドイッチ ELISA にて培養上清中の補体成分量を定量した。
- 4) 培養上清および cell lysate 中の補体成分の解析：特異抗体を用いた immunoblotting で行った。
- 5) RT-PCR による細胞内 D 因子 mRNA の解析：各細胞より mRNA を抽出し、当方作成のプライマー、First-Strand cDNA Synthesis Kit (Amarsham Pharmacia)、Ampli Taq polymerase (Perkin Elmer) を用い RT-PCR を行った。PCR 産物の確認は、アガロース電気泳動後 ethidium bromide 染色で行った。
- 6) PCR 産物より得た DNA のシーケンス：RT-PCR より得た PCR 産物を full length sequencing - double strand sequence - 法で解析した。

結果および考察

- 1) 細胞の D 因子産生量：既に報告したように、正常肝細胞 (197.50 ± 32.27 ng/10⁶ cells/3 days) や胃癌由来細胞 (KATO-III : 2.47 ± 1.34, MKN-28 : 0.94 ± 0.49, MKN-74 : 2.10 ± 0.59 ng/10⁶ cells/3 days) の培養上清中に D 因

連絡者：北村 肇

本研究は、第38回補体シンポジウム (2001年) および第19回国際補体ワークショップ (2002年) で口頭発表し、また一部は International Immunopharmacology (2002) 2:843-848 に論文発表した。

紀要委員会注：本報告は、平成13年度大阪府立看護大学医療技術短期大学部学長指定研究補助金を用いてなされた研究成果の報告である。

(受付日 2002年9月9日, 受理日 2002年10月11日)

子が検出された。しかし、HepG2の培養上清中にはD因子は検出されなかった。

2) immunoblottingによる解析：培養上清中に分泌さ

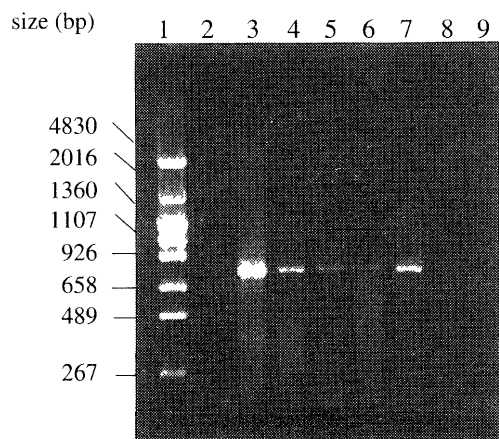


Fig. 1 Factor D mRNA in various cells.

A expression of Factor D mRNA in various cells was analyzed by PCR following reverse transcription. The RT-PCR products were applied to 1.2% agarose gel.

- lane 1 : DNA MW standard marker
- lane 2 : buffer control
- lane 3 : hepatocyte
- lane 4 : HepG2
- lane 5 : KATO III
- lane 6 : MKN-28
- lane 7 : MKN-74
- lane 8 : negative control <sample mRNA (-), primer (+)>
- lane 9 : negative control <hepatocyte mRNA (+), primer (-)>

```

1   gcagttctgg tcctcctagg agcggccgcc tgcgcggcgc ggccccgtgg tcggatcctg
61  ggcgagcagag aggcgagggc gcacgcgcgg ccctacatgg cgctcgggtgca gctgaacggc
121 gcgcacctgt gcgccggcgt cctggtggcg gagcagtggg tgctgagcgc ggcgcactgc
181 ctggaggacg cggccgacgg gaagggtgag gttctcctgg gcgcgcactc cctgtcgcag
241 ccggagccct ccaagcgctt gtacgacgtg ctccgcgcag tgccccaccc ggacagccag
301 cccgacacca tcgaccacga cctcctgctg ctacagctgt cggagaaggc cacactgggc
361 cctgtctgtc gccccctgcc ctggcagcgc gtggaccgcg acgtggcacc gggaaactctc
421 tgcgacgtgg cggctgggg catagtcaac cacgcggggc gccgcccggg cagcctgcag
481 cacgtgctct tgccagtgct ggaccgcgcc acctgcaacc ggcgcacgca ccacgacggc
541 gccatcacgg agcgcttgat gtgcgcggag agcaatcgcc gggacagctg caagggtgac
601 tccggggggc cgctggtgtg cgggggcgtg ctcgagggcg tggtcacctc gggctcgcgc
661 gtttgcggca accgcaagaa gcccgggatc tacaccgcg tggcgagcta tgccggcctgg
721 atcgacagcg tcctggccta ggggtgccgg gcctgaaggt cagggtcacc caagcaacaa
781 agtcccgagc aatgaagtca tccactcctg catctggttg gtctttattg agcacctact
841 atatgcagaa ggggaggccg aggtgggagg atcattggat ctgaggaggt ggagatcagc
901 atgggccacg tagcgcgact ccatctctac aaataaataa aaaattagct gggcaattgg
961 cgggcatgga ggtgggtgct tgtagtcca gctactcagg aggctgagggt gggaggatga
1021 ctggaacgca ggaggctgag gctgcagtga gttgtgattg caccactgcc ct

```

Fig. 2 cDNA sequence of factor D in normal hepatocytes, gastric cancer-derived cells and HepG2 cells.

PCR products from various cells were analyzed for cDNA sequence by a double strand sequence method.

れたD因子は、明らかな2本のバンドを示した。精製D因子や血清中のD因子と同一分子量24000付近のものに加え、それより少し大きな分子量のものと2本のバンドを形成した。

3) RT-PCRによるmRNAの解析：1992年にWhiteらによって報告されたD因子の塩基配列からプライマー(5'-GCAGTTCTGGTCCCTCCTAGGAGC-3'および5'-GCTTGGGTGACCCTGACCCTTCAG-3')を設定してRT-PCRを行い、得られた産物をアガロースゲル電気泳動した。その結果、正常肝細胞やKATO-III, MKN-28, MKN-74だけでなく、培養上清中にD因子の産生分泌が認められなかったHepG2にも同様の775bp付近に1本のバンドが検出された(Fig. 1)。

4) PCR産物のDNAシーケンス結果：今回、われわれが5種の細胞から抽出したD因子のDNAについてシーケンスを行った結果、5種すべて同一の塩基配列が得られた。それは、1-775番の範囲で1992年Whiteらによって報告されていたadipsin/factorD 'FD'のDNA配列(2000年10月31日現在NCBIのGenBankに再登録)とは4カ所(57, 134, 135, 155番)異なっていた(Fig. 2)。しかし、今回われわれが示したD因子の塩基配列は、2001年4月16日にNCBI Annotation Projectによって新しくGenBankに登録された'FD'の塩基配列に一致した(Fig. 2)。

結 論

RT-PCRにより得られたD因子のDNAシーケンスの結果は1992年に報告されたものとは異なったが、2001年4月に新たに報告されたものに一致したことから、D因子のmRNAが存在しないと従来言われていた正常ヒト肝細胞にD因子のmRNAが存在することが明らかになった。また、DNA配列の解析から、それらが血清中のD因子と同じものであることが示された。なお、その産生量から、肝細胞がD因子の主たる産生細胞の1つであることが示唆された。さらに、D因子タンパクを産生している正常肝細胞だけでなく、全くD因子タンパクを産生しないHepG2にもD因子mRNAが存在することが判明した。

文 献

- 1) Morgan, B.P. and Gasque, P. (1997) Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clin. Exp. Immunol.*, 107:1-7.
- 2) White, R.T., Damm, D., Hancock, N., Rosen, B.S., Lowell, B.B., et al. (1992) Human adipsin is identical to complement factor D and is expressed at high levels in adipose tissue. *Biol. Chem.*, 267: 9210-9213.
- 3) Kitano, E. and Kitamura, H. (2002) Synthesis of factor D by gastric cancer-derived cell lines. *Int. Immunopharmacol.*, 2: 843-848.
- 4) 北野悦子, 北村 肇 (1998) ヒト乳腺上皮細胞による補体D因子産生. 大阪府立看護大学医療技術短期大学部紀要, 4: 9-14.
- 5) Kitano, E. and Kitamura, H. (2000) Synthesis of factor D by normal human hepatocytes. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 122:299-302.