

日本財団補助金による  
1997年度日中医学協力事業助成報告書  
-在留中国人研究者研究助成-

10年3月12日

財團法人 日中医学協会  
理 事 長 中 島 章 殿

I. 研究者氏名 郭 繁

研究機関 大阪大学医学部形態機能研究指導者 遠山正彌 職名 教授  
所在地 〒565 大阪府吹田市山田丘2-2 電話 06-879-3221 内線

II. 過去の研究歴

肝線維化と関係ある遺伝子の解析

C型肝炎に関する分子構造及び臨床診断

III. 過去の研究実績

肝線維化で遺伝子表达の上昇するものとして軽連因子と翻訳調節因子の両者が"クーニング"されたものを破壊して GαiIR と TREF を解析をやっています。

IV. 本年度の研究業績

(1) 学会、研究会等においての口頭発表 (学会名・内容)

- ① 日本神経科学学会 ポスター ラート胎期におけるミオイシトールトランスポーターの遺伝子発現  
② 日本解剖学会 口演：ラート結腸におけるミオイシトールトランスポーター(SHMT)の高濃度左旋荷電による発現変化。③ 口演：高濃度左旋荷電に対する新規RNA helicaseのcDNAの単離と高濃度左旋荷電時の発現調節機構の解析

(2) 学会誌等に発表した論文 無・有

(雑誌名・論文名) 左旋荷電時の発現調節機構の解析

① MOLECULAR BRAIN RESEARCH

Developmental regulation of  $\text{Na}^+/\text{myo}-\text{inositol}$  cotransporter gene expression

V. 今後の研究計画及び希望

新規 RNA helicase の機能解析を継続し、研究 (P.) と進みます

VII. 研 究 報 告 (日本語、又は英語で書いて下さい。4,000字以上で記載して下さい。別紙可)

別紙



VIII. 指導教官の意見

郭薇氏は短期間で留学生という言語や生活体系の違いも克服し、多くの難しい実験手法を習得し、さらに自主的な考えで研究を発展させ、それらの研究成果を、国際誌や学会を通して発表し、教室に多大な貢献をしてまいりました。現在も我々の研究室の主要な研究プロジェクトの中心人物として研究を引っ張っております。申請者の研究に対する厳しい姿勢と最後までやり抜く態度には、常々感心しております。また一方では、性格は温厚で明るく、素直で、後輩の面倒見も良く、研究室の皆に慕われております。

遠山 正彌

論文：

1. Guo, W., Shimada, S., Tajiri, H., Yamauchi, A., Yamashita, T., Okada, S., Tohyama, M. Developmental regulation of Na+/myo-inositol cotransporter gene expression

Mol Brain Res 51(1997) 91-96

2. Yamashita, T., Shimada, S., Yamaguchi, A., Guo, W., Kohmura, E., Hayakawa, T., and Tohyama, M. Induction of Na+/myo-inositol contranporter mRNA after rat cryogenic injury.

Mol Brain Res 56(1997) 128-134

3. Yamashita, T., Shimada, S., Guo, W., Kohmura, E., Hayakawa, T., Takagi, T. and Tohyama, M. Cloning and functional expression of a brain peptide/histidine transporter.

J Biol Chem 272, 10205-10211, 1997.

4. Tada, K., Tajiri, H., Kozaiwa, K., Sawada, A., Guo, W., and Okada, S. Role of screen for hepatitis Cvirs in children with malignabt disease and who undergo bone marrow transplantation

Transfusion Volume 37, June 1997.

5. Etani, Y., Guo, W., Tajiri, H., Okada, S., Shimada, S., Tohyama, M. Analysis of glucose transporter gene in a case of fructose malabsorption with chronic Diarrhea

Digestion & Absorption 1995, 18, 40-4( Japanese)

6. Tada, K., Tajiri, H., Sawada, A., Guo, W., Etani, Y., Kozaiwa, K., Ozaki, Y., Okada, S. HCV Infection in Children with Primary Malignant Diseases

The Journal of the Japan Pediatric Society (Japanese)

7. Guo, W., Shimada, S., Mushiage, S., Tajiri, H., Yamauchi, A., Yamashita, T., Okada, S., Tohyama, M.

Differential localization and induction of Na+/myo-inositol cotransporter mRNA in the large intestine.

投稿中

8. Guo, W., Shimada, S., Yamashita, T., Yamauchi, A., Okada, S., Tohyama, M.

Purification and Characterization of a new member of DEAD box of RNA helicase

投稿中

## 研究報告書

私は小児の消化器系の疾患に興味を持ち、最初に、肝線維症で同一患者の正常な肝組織と線維症の起こっている肝組織の間で differential display 法を用いることにより、プロトオンコジーンのRETと結合するGrb10と、RNA結合蛋白であるiron-responsive element-binding protein (IRE-BP)が肝線維症で遺伝子発現が上昇していることを明らかにした。肝線維症で遺伝子発現の上昇するものとして転写調節因子と翻訳調節因子の両者がクローニングされたのは興味深い。この二つの遺伝子については症例を増やし、肝線維症との関係を検討中である。このようなヒトの剖検組織を用いた疾患関連遺伝子の検索を進める一方、基礎的な研究として、消化管での浸透圧変化に対する細胞保護機構を解析している。グリセロール注腸動物や脱水モデル動物を用いて、大腸の吸収上皮細胞や杯細胞でミオイノシトールトランスポーターのmRNAが管腔内の浸透圧が上昇した際や、血清浸透圧が上昇した際に顕著に上昇することを明らかにし、大腸の上皮細胞が細胞外の浸透圧変化から細胞を保護するためにミオイノシトールの取り込みを増加させていることを示した。さらに、ミオイノシトールトランスポーターの発達段階での遺伝子発現及び蛋白発現の変化を解析し、中枢神経系で胎生期に一過性の非常に強い発現が神経系に認められることを明かとした。最近、Differential Display法により浸透圧調整に関係する新規のRNAAhelicaseのcDNAを単離して、現在その機能解析を行っています。

消化管は管腔内に様々な摂取物、水分、分泌液が存在し、これらの濃度や量が吸収や分泌によって複雑に調整されている。このことは消化管上皮が絶えず浸透圧の変化に曝されていることを意味する。さらに大腸上皮では浸透圧勾配を利用し、水分の吸収を行うために、この部位の細胞には極端に高い浸透圧負荷が、常時かかっている。またこれらの浸透圧変化及び調節に異常を来すと下痢等の様々な消化器症状を来す。細胞外の浸透圧変化は細胞内の体積や電解質組成に、大きな影響を与えるため、浸透圧変化から細胞を保護する機構が存在すると考えられる。このような浸透圧変化からの細胞保護機構の研究は主に腎臓で行われてきた。浸透圧物質（オスモライト）のトラ

ンスポーターは細胞外の高浸透圧に対抗して、オスモライトを細胞内に蓄積することによって、細胞内外の浸透圧バランスを保つという有効浸透圧作用と、同時に細胞内の蛋白質や核酸の高次構造が高浸透圧により変化するのを防ぐ細胞機能保護作用を示すと考えられている。私たちのグループはオスモライトトランスポーターの発現調節について、多くの解析を進めてきた。しかし、浸透圧の変化する刺激からオスモライトトランスポーターの発現誘導までの経路はほとんど明らかにされていない。そこで本研究では大腸上皮由来のCaco-2細胞を用いて、Differential Display法によって、浸透圧負荷時に必要となる新規の遺伝子を解析する。

消化器系において高浸透圧刺激からオスモライトのトランスポーターの遺伝子発現誘導がおこるまでの経路に関与している遺伝子を検討するため、CACO-2培養細胞を、高張、等張、低張の培養液下で、培養しmRNA抽出後、differential display法を用いて浸透圧負荷時に新たに発現する遺伝子を同定する。これらのin vitro系を用いて differential display法で得られた浸透圧応答候補遺伝子を、ノーザンプロット解析により実際にCACO-2培養細胞で浸透圧負荷時に、発現誘導がかかるかどうかスクリーニングする。浸透圧負荷時に発現が上昇する遺伝子については、蛍光プライマー法を用いて塩基配列を決定する。その中で新規遺伝子についてはそのcDNAの全長を獲得するために、高浸透圧下で培養したCACO-2細胞から、cDNAライブラリーを作製し、スクリーニングする。このスクリーニングでも全長が得られない場合は、5'や3'race法を用いてcDNAを延長する。

これらの浸透圧応答遺伝子は、その相同性から機能が推測できるものに関しては、cDNAを適切な発現ベクターに組み替えて、HEK細胞発現系やアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて適切な解析を行い、浸透圧変化時におけるこの遺伝子の役割を検討する。また大腸菌の発現系を用いて、浸透圧応答遺伝子の蛋白を単離し、抗体を作製し、結合蛋白を作製しました。

これらの機能解析により浸透圧応答遺伝子の特性を明らかにするとともに、in

vivoでの浸透圧負荷モデル、虚血、浮腫等の動物モデルを用いてその発現調節を解析する。さらにCACO-2細胞を用いて、antisense法により、浸透圧負荷時にこれらの浸透圧遺伝子の発現が抑制されると°Cのような細胞傷害が起こるか検討する。

最近、私はこの実験計画をスタートし、Differential Display法の系から、浸透圧負荷により遺伝子発現が上昇するRNAAhelicase遺伝子ファミリーに属する新しい遺伝子を単離しました。現在大腸菌BL21細胞を用いて、融合蛋白を合成し、2本鎖のDNAやRNAのhelicase活性があるかどうか検討中です。

2部  
1/2

98.3.11.