

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文名：膵分泌性トリプシンインヒビター (*PSTI*) 遺伝子の変異を伴う膵炎家系の同定とその発症機構の解析
(Mutations in pancreatic secretory trypsin inhibitor (*PSTI*) gene in hereditary and sporadic pancreatitis patients and their relevance to pathogenesis)

著者名： 桑田 絹子
Kinuko Kuwata

指導教官名：外科学第二講座教授 小川 道雄

審査員名	腫瘍医学担当教授	佐谷 秀行
	分子遺伝学担当教授	森 正敬
	内科学担当教授	富田 公夫
	救急医学担当教授	木下 順弘

2003 年 3 月

目 次

目次	1
要旨	5
発表論文リスト	8
謝辞	10
略号	11
第1章 研究の背景と目的	12
1-1. 急性膵炎とは	12
1-2. 慢性膵炎とは	14
1) 形態診断	15
2) 膵機能検査	15
3) 病型分類	15
1-3. 遺伝子変異によって生じる膵炎	15
1) HLA 抗原の連鎖不均衡	16
2) トリプシノーゲン遺伝子とトリプシンインヒビター遺伝子の 点突然変異	16
3) <i>CFTR</i> 遺伝子の点突然変異	17
4) 高脂血症を伴う遺伝子変異	17
5) ミトコンドリア遺伝子の変異	18
6) その他の遺伝子変異	18
1-4. カチオニックトリプシノーゲンの遺伝子変異による膵炎の 発症機構	18
1-5. PSTI とは	20
1-6. トリプシンの活性化量と PSTI 活性のバランスと膵炎の発症	21
1-7. PSTI の遺伝子変異による膵炎発症の可能性	23
第2章 膵炎患者における <i>PSTI</i> 遺伝子の変異解析	24
2-1. 序論	24
2-2. 対象	24

2-3. 方法	24
1) イントロン領域のシーケンス解析	24
2) エクソン領域のシーケンス解析	25
3) PCR-Restriction Enzyme Fragment Length Polymorphism (RFLP)	26
2-4. 結果	27
1) <i>PSTI</i> 遺伝子のシーケンス解析	27
2) RFLP 解析	30
3) 変異を有する患者の臨床像	31
2-5. 小括	33

第3章 本邦における家族性膵炎、若年性膵炎における *PSTI* 遺伝子の 変異解析

3-1. 序論	35
3-2. 対象と方法	35
1) 対象	35
2) 方法	35
3-3. 結果	35
3-4. 小括	38

第4章 変異リコンビナント *PSTI* 蛋白の作成

4-1. 序論	39
4-2. 方法	39
1) 使用菌株およびプラスミド	39
2) 使用培地	40
3) 部位特異的変異の導入	40
4) 酵母の形質転換	41
5) <i>PSTI</i> の発現	41
6) イオン交換クロマトグラフィー	42
7) 逆相クロマトグラフィー	42
8) 活性中心滴定	42
9) <i>PSTI</i> 活性の測定	43
10) HPLC による <i>PSTI</i> 定量	43

11) アミノ酸分析	44
4-3. 結果	44
1) アミノ酸置換変異の導入	44
2) 酵母の形質転換	46
3) PSTI の調製	46
4) 変異リコンビナント蛋白の濃度測定	47
4-4. 小活	48
第 5 章 N34S 変異 PSTI のトリプシン阻害活性の酵素反応学的解析	50
5-1. 序論	50
5-2. 方法	50
1) トリプシン阻害活性の測定	50
2) PSTI のトリプシンに対する安定性の解析	50
5-3. 結果	51
1) リコンビナント蛋白のトリプシン阻害活性の解析	51
2) PSTI のトリプシンに対する安定性の解析	53
5-4. 小活	54
第 6 章 N34S 変異 PSTI のトリプシンとのアフィニティーの解析	55
6-1. 序論	55
6-2. 方法	55
6-3. 結果	56
6-4. 小活	57
第 7 章 R67C 変異 PSTI の活性解析	58
7-1. 序論	58
7-2. 方法	58
7-3. 結果	58
7-4. 小活	61
第 8 章 全体を通しての考察	63
8-1. N34S 変異と膵炎発症との関連性について	63

8-2. R67C 変異と膵炎発症との関連性について 64

参考文献 65

要旨

[目的]

トリプシノーゲン遺伝子の点突然変異により遺伝性膵炎を発症する機構が報告されている。しかし、未だ約半数の遺伝性膵炎の患者の原因遺伝子は明らかにはされていない。膵内のトリプシンインヒビターである膵分泌性トリプシンインヒビター(pancreatic secretory trypsin inhibitor : PSTI)の分子変異により、活性化トリプシンへの結合能が低下する可能性があることから、*PSTI* 遺伝子の変異によってトリプシン活性の制御ができなくなり、膵炎を発症する機構が想定される。そこで、膵炎発症における *PSTI* 遺伝子変異の意義を研究した。

[方法]

(1)先進医療審議会及びヒトゲノム・遺伝子解析研究に係る倫理審査委員会の承認を得て、当科で診療した急性膵炎 15 例、慢性膵炎 8 例における *PSTI* 遺伝子を解析し、健康ボランティア 33 人と比較した。

(2)本邦の家族性膵炎患者 37 例 (24 家系) および若年性膵炎 15 例の *PSTI* 遺伝子を解析した。

(3)見いだされた遺伝子変異のうち、膵炎と密接に関係があると考えられる変異について、リコンビナント *PSTI* を作成し、実際にトリプシンの阻害機能が失われているのか、検索を行った。

[結果]

(1)3 つの点突然変異を *PSTI* 遺伝子のエクソン領域において認めた。一つの変異はエクソン 3 の 34 番目のアミノ酸に Asn(AAT)から Ser(AGT)への置換を伴うもの (N34S) で、もう一つはエクソン 4 の 67 番目のアミノ酸に Arg(CGC)から Cys(TGC)への置換を伴うもの (R67C) であった。さらにアミノ酸置換を伴うものではないが、エクソン 4 の 3'非翻訳領域の 272 番目の塩基に T から C への変異(272T>C)を認めたが、これは健常ボランティアにおいても高頻度に認められたことから、正常多型と考えられた。N34S 変異は 6 名の家族性膵炎患者(3 家系)および 1 名の若年性膵炎患者において認め、R67C 変異は 1 名の家族性膵炎患者および 1 名の若年性膵炎患者において認めた。健康ボランティアにおいてはアミノ酸置換を伴う遺伝子変異は認めなかった。

(2)2 つのイントロン領域の変異、IVS1-37T>C および IVS3-69insTTTT を認めた。この 2 つの変異は例外なく同時に存在し、しかも代表的なエクソン領域の変異

である N34S 変異を必ず伴っていた。イントロン領域の変異によりスプライシングの異常をきたし、活性を持った PSTI 蛋白が産生されない可能性が示唆された。

(3)N34S 変異に伴うアミノ酸置換を有するリコンビナント PSTI を作成し、トリプシンに対する阻害活性およびトリプシンへの結合能を野生型と比較した。その結果、N34S PSTI のトリプシンに対する阻害活性および、トリプシンへの結合能は保たれていた。

(4)R67C PSTI については、システイン残基数が 6 から 7 へと増加することから、新たな分子内 s-s 結合や分子間の s-s 結合の形成により、高次構造が変化したいくつかのアイソフォーム生成の可能性が考えられた。実際、作製したリコンビナント蛋白は抗 PSTI 抗体との反応性が大きく低下しており、このことは R67C 変異により PSTI の高次構造が大きく変化することを示唆する。このため、R67C リコンビナント蛋白を作製することはできたが、精製過程でトリプシン阻害活性を指標とせざるを得なかったため、活性の保たれた R67C アイソタイプしか精製できなかった。

[考察]

我々の解析とほぼ同時期に、欧米でも慢性膵炎症例における *PSTI* 遺伝子の変異解析が行われた。結果を集計すると、N34S 変異に関しては、いくつかの膵炎発症への関与を支持する事項がある。1)この変異は非膵炎発症患者に比して、明らかに膵炎症例に高頻度に認めること、2)N34S の変異を両アレルに持つ場合の発症率が非常に高いことが予想されること、などである。

ヒト PSTI は 23 のアミノ酸残基のシグナルペプチドを含む 79 のアミノ酸残基から成り、シグナルペプチドが切断されることにより 56 アミノ酸残基から成る分子量 6.5kD の成熟型が生成する。成熟型 PSTI は 3 つの分子内ジスルフィド結合(C32-C61、C39-C58、C47-C79)を有する。これらの 6 つのシステイン残基をはじめとして、PSTI のアミノ酸配列は種を越えて高度に保存されている。R67C 変異では、システイン残基数が 6 から 7 へと増加することによって、変異 PSTI 同志のダイマーの形成、他の蛋白との混合ジスルフィド形成などによって、多くの分子型が形成されうると考えられる。R67C 変異によって PSTI の高次構造が大きく変わり、トリプシンとの結合力が低下することが十分に予想される。R67C リコンビナント変異 PSTI 蛋白は抗 PSTI 抗体との反応性が大きく低下しており、R67C リコンビナント蛋白は、高次構造が著しく変化している

ものと考えられる。実際、精製過程で用いた HPLC 上には多くのピークが出現していることからこれが示唆される。ただ、今回の精製系では、トリプシン阻害活性を指標として R67C 蛋白を精製したため、精製蛋白がトリプシン阻害活性を保持していた。多くの R67C アイソタイプのうちのトリプシン阻害活性を保持した一種だけを解析したにすぎないと言える。

N34S 変異は、必ずエクソン近傍のイントロン領域に IVS3-69insTTTT 変異(T5 が T9 となる)と IVS1-37T>C 変異を伴っており、単純なアミノ酸置換の影響ではなく、スプライシングの異常によって PSTI 蛋白の機能低下をきたす可能性もある。特にイントロンの polypyrimidine tract は、nuclear pre-mRNA のスプライシングに重要であることが報告されており、IVS3-69insTTTT 変異などのイントロンの変異により、エクソンの一部がアミノ酸へ翻訳されなければ(splice out) PSTI 蛋白の高次構造が変化し、膵炎発症形質へとつながる可能性がある。

以上のように、R67C、N34S (IVS1-37T>C+N34S+IVS3-69insTTTT 変異)の両者とも、PSTI の高次構造を変化させ、活性を低下させる可能性がある。Witt が報告している 5'UTR の-53C>T 変異 (新たな start codon と stop codon を生じる) や MIT 変異 (start codon が消失する) の場合も、そのアレルからは PSTI 蛋白は産生されない。したがって、PSTI の遺伝子変異は PSTI 蛋白の loss of function によって、トリプシン活性の制御に異常をきたし、膵炎を発症する可能性があるといえる。今後、トリプシン阻害活性が消失した R67C 変異リコンビナント蛋白の精製、N34S 変異 PSTI mRNA の発現解析、PSTI 遺伝子のノックアウトマウスを用いた解析、などによる確認が必要である。

カチオニックトリプシノーゲンの遺伝子変異が dominant trait で発症するという事は、カチオニックトリプシノーゲンの autoactivation と PSTI function とのバランスは、正常状態では、おそらく PSTI function の方がある程度大きいものの、大きな差 (余裕) が無いために、カチオニックトリプシノーゲンの autoactivation の亢進や PSTI 活性の低下の影響によって、膵炎の易発症形質が発現されるものと考えられる。PSTI N34S (IVS1-37T>C+N34S+IVS3-69insTTTT) homozygote における高い発症率は、膵炎発症への閾値が homozygous な N34S (IVS1-37T>C+N34S+IVS3-69insTTTT)変異によって大きく低下していることを意味する。すなわち、PSTI 蛋白の機能低下の程度に応じて膵炎発症のしやすさが決まると考えられる。

発表論文リスト

主論文

Kinuko Kuwata, Masahiko Hirota, Hiroki Sugita, Mikio Kai, Naoko Hayashi, Masaaki Nakamura, Toshinobu Matsuura, Isao Nishimori, and Michio Ogawa.

Gene Mutations in Exons 3 and 4 of the Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor in Patients with Pancreatitis.

Journal of Gastroenterology 36: 612-618, 2001.

Kinuko Kuwata, Masahiko Hirota, Hiroyuki Shimizu, Masanori Nakae, Shoji Nishihara, Akio Takimoto, Kenji Mitsushima, Norihisa Kikuchi, Kazuaki Endo, Masayasu Inoue, Michio Ogawa.

Functional analysis of recombinant pancreatic secretory trypsin inhibitor protein with amino acid substitution.

Journal of Gastroenterology, 2002 (In press).

参考論文

- 1) Ogawa M, Hirota M, Nozawa F, Okabe A, Shibata M, Kuwata K. Relationship between plasma concentrations of cytokine modulators and multiple organ failure in acute pancreatitis. 5th world congress on trauma, shock, inflammation and sepsis; pathophysiology, immune consequences and therapy. Ed-by Faist E. Monduzzi Editore (Bologna), pp. 203-207, 2000.
- 2) 桑田絹子, 広田昌彦, 小川道雄. 膵疾患とプロテアーゼ・プロテアーゼインヒビター. Molecular Medicine 39: 68-75, 2002.
- 3) 桑田絹子, 広田昌彦, 小川道雄. Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS) と MOD score. 消化器外科 25: 557-561, 2002.
- 4) 桑田絹子, 広田昌彦, 小川道雄. サイトカインによる SIRS の臨床評価. 臨床検査 45: 77-80, 2001.
- 5) 広田昌彦, 桑田絹子, 木村有, 井上耕太郎, 大村谷昌樹, 小川道雄. 急性膵炎の予後. 消化器科 31: 637-641, 2000.

- 6) 広田昌彦、桑田絹子、柴田宗征、小川道雄. 臓器不全. 集中治療 12: 1279-1288, 2000.
- 7) 広田昌彦、柴田宗征、桑田絹子、木村有、井上耕太郎、大村谷昌樹、小川道雄. 重症急性膵炎の重症度評価と予後予測. 侵襲と免疫 9: 100-105, 2000.
- 8) 広田昌彦、野澤文昭、岡部明宏、柴田宗征、桑田絹子、小川道雄. SIRS と CARS 急性膵炎の病態からの考察. 侵襲と免疫 9: 14-19, 2000.
- 9) 広田昌彦、杉田裕樹、野澤文昭、岡部明宏、柴田宗征、桑田絹子、住田直子、小川道雄. わが国の重症急性膵炎の実態. 外科治療 80: 139-146, 1999.
- 10) 柴田宗征、広田昌彦、杉田裕樹、野澤文昭、岡部明宏、桑田絹子、小川道雄. 急性膵炎の病態と好中球エラスターゼによるサイトカイン反応の増強機構. 侵襲と免疫 7: 111-116, 1998.

謝辞

本研究は熊本大学大学院医学研究科外科学第二講座において小川道雄教授の御指導の下に行われました。研究並びに多面の御指導を賜りました小川道雄教授に深甚なる謝意を捧げます。

また、論文作成並びに研究に直接御指導、御助言頂いた外科学第二講座講師 広田昌彦博士に深く感謝します。

更に、研究に御協力下さった教室員諸兄に感謝の意を捧げます。

また、リコンビナント蛋白作成に御尽力頂きました塩野義製薬株式会社の遠藤三朗、菊池典久、光島健二、瀧本明生、清水洋行、中江雅典、西原祥二、各博士に厚く御礼申し上げます。

略号

PSTI; pancreatic secretory trypsin inhibitor

PFD; pancreatic functioning diognostant

PCR; polymerase chain reaction

ERCP; endoscopic retrograde cholangiopancreatography

HPLC; high performance liquid chromatography

RFLP; restriction fragment length polymorphism

BPTI; bovine pancreatic trypsin inhibitor

SPINK1; serine protease inhibitor Kazal type 1

UTR; untranslated resion

WT; wild type

PB maljunction; pancreatobilliary maljunction

MPD; main pancreatic duct

PpPD; pylorus preserving pancreatoduodenectomy

CT; cationic trypsinogen

P-J; pancreatojejunostomy

ESWL; extra corporeal shock wave lithotripsy

DP; distal pancreatectomy

L-BAPA; benzoyl-L-arginine P-nitroanilide hydrochloride

SPR; surface plasmon resonance

CFTR; cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

gDNA; genomic DNA

第 1 章

研究の背景と目的

1-1. 急性膵炎とは

膵臓には、消化酵素を大量に合成し、その消化酵素を膵液として膵管を通り十二指腸へと分泌する外分泌機能がある。そのため、膵臓に何らかの原因で炎症がおこったり、消化酵素が膵内で活性化されると、膵臓の自己消化がおこる。それにより、膵臓局所に急性の炎症が起きた状態を急性膵炎という。その炎症が膵臓局所にとどまらず、全身へ波及すると、多臓器不全などを起こし死の転帰をたどる。重篤化する危険をはらんだ疾患である。

膵臓の炎症であるから、主に上腹部痛で発症する。主な原因としては、アルコール（46%）、胆石（18%）、特発性（19%）がある。胆石性膵炎は胆道系の炎症の膵臓への波及や胆石による膵管の閉塞が原因と考えられているが、アルコール性膵炎や、特発性膵炎における発生机序はいまだ明らかではない。

急性膵炎では、診断基準（表 1）に示されているように、上腹部痛に加え、血中、尿中の膵酵素の上昇、及び、画像（CT など）における膵臓の炎症所見（浮腫、壊死など）が認められる。また、急性膵炎はその重症度から、軽症、中等症、重症の3つにわけられる。軽症と中等症の死亡率が 1~3%であるのに対し、重症例の死亡率は約 30%という予後不良の疾患であるため、重症であるか否かは非常に重要な問題となってくる。それは、炎症が膵臓の周囲組織にとどまっているか、あるいは全身に及んでいるのか、といいかえることもできる。

ではなぜ、膵臓局所の炎症が全身へと波及するのであろうか。それは高サイトカイン血症を引き起こすためといわれているが、その詳しい機序については、いまだ研究段階である。また、なぜ重症化する人と、しない人がいるのかなどの疑問については未だ未知の分野であり、今回我々が膵炎へのなりやすさにつ

いて、研究を始めようと考えた理由でもある。

このように、急性膵炎、なかでも重症急性膵炎は非常に重篤な疾患であるが、重症であるかどうかを判定するための、重症度スコアを用いた重症度判定基準を表2に、またさらに重症度を5段階に層別化した Stage 分類と、Stage 別の致死率について、表3に示す。

表1. 急性膵炎の臨床診断基準

1)上腹部に急性腹痛発作と圧痛がある。
2)血中、尿中あるいは腹水中に膵酵素の上昇がある。
3)画像で膵に急性膵炎に伴う異常がある。
上記3項目中2項目以上を満たし、他の膵疾患及び急性腹症を除外したものを急性膵炎とする。ただし、慢性膵炎の急性発症は急性膵炎に含める。

表2. 急性膵炎の重症度判定基準と重症度スコア

予後因子1	ショック、呼吸困難、神経症状、重症感染症、出血傾向、 Ht \leq 30%、BE \leq -3mEq/l、BUN \geq 40mg/dl (or Cr \geq 2.0mg/dl)	各2点
予後因子2	Ca \leq 7.5mg/dl、FBS \geq 200mg/dl、PaO ₂ \leq 60mmHg、 LDH \geq 700IU/l、総蛋白 \leq 6.0g/dl、プロトロンビン時間 \geq 15秒、 血小板 \leq 10万/mm ³ 、CT Grade IV/V	各1点
予後因子3	SIRS 診断基準における陽性項目 \geq 3	2点
	年齢 \geq 70才	1点

1) 原則として入院48時間以内に判定し、以後経時的に検索する。

2) 臨床徴候、及びCT Gradeの診断は以下の基準とする。

ショック：収縮期血圧が80mmHg以下、及び80mmHg以上でもショック症状を認めるもの

呼吸困難：人工呼吸を必要とするもの

神経症状：中枢神経症状で意識障害（痛みによるのみ反応）を伴うもの

重症感染症：白血球増多を伴う38℃以上の発熱に、血液細菌培養陽性やエンドトキシンの証明、あるいは腹腔内膿瘍を認めるもの

出血傾向：消化管出血、腹腔内出血（Cullen 徴候、Grey-Turner 徴候を含む）、あるいはDICを認めるもの

SIRS 診断基準項目：1. 体温 $>$ 38℃あるいは $<$ 36℃、2. 脈拍 $>$ 90回/分、3. 呼吸数 $>$ 20回/分あるいはPaCO₂ $<$ 32torr、4. 白血球 $>$ 12000/mm³または $<$ 4000/mm³ また

は 10%以上の幼若球出現

CT Grade IV/V : Grade IV は膵内部不均一が膵全体にみられるか、あるいは炎症の波及が膵周囲を越えるもの、Grade V は膵内部不均一が全体にみられ、かつ炎症の波及が膵周囲を越えるもの

- 3) 全身状態が良好で、予後因子 1 及び予後因子 2 をいずれも認めず、血液検査成績も正常に近いものを軽症と判定する。
- 4) 予後因子 1 を認めず、予後因子 2 が 1 項目のみ陽性のものを中等症と判定する。
- 5) 予後因子 1 が 1 項目以上、あるいは予後因子 2 が 2 項目以上陽性のものを重症と判定する。
- 6) 重症急性膵炎では、予後因子 3 を含めた各予後因子の陽性項目の点数の合計を計算し、それを重症度スコアとする。

表 3. 急性膵炎の Stage 分類

Stage	重症度スコア	重症度分類	致死率
Stage 0	0 点	軽症	1%
Stage 1	1 点	中等症	3%
Stage 2	2~8 点	重症 I	8%
Stage 3	9~14 点	重症 II	46%
Stage 4	15~27 点	最重症	80%

1-2. 慢性膵炎とは

慢性膵炎は膵実質の破壊、脱落を伴って、膵の線維化や石灰化をきたす疾患である。臨床的には持続あるいは反復する腹痛や食欲不振など、慢性の愁訴を認め、実質障害が進行すると、膵内外分泌機能が低下し、糖尿病、消化不良、脂肪便などを併発してくる疾患である。成因にはアルコール多飲、胆石などがあるが、原因不明のもの（特発性）も多く、厚生労働省の特定疾患の一つで、難治性の疾患である。

1995 年に日本膵臓学会からだされた慢性膵炎臨床診断基準によると、膵全体に分布する不規則な線維化、実質の脱落などの非可逆的変化の病理組織学的な所見と、膵臓の外分泌、内分泌機能の低下を疾患概念としている。慢性膵炎は

臨床症状や臨床症候を有する症例で診断することが原則とされるが、実際は無症状でありながら、血清膵酵素の異常を契機に受診する場合もあり、慎重に臨床診断基準を適用しなければならない。慢性膵炎診断の検査法は、形態診断と膵機能検査に大別され、各種検査を組み合わせて判断する。

1) 形態診断

US 所見では膵石像のみが確診の診断基準にあげられている。慢性膵炎の準確診の US 所見としての膵内の粗大高エコー、膵管の不整拡張や辺縁の不規則な凹凸は、比較的容易に描出できる所見である。また、ERCP 上、分枝膵管の不規則かつ不均一な拡張像があれば確診所見である。また、膵組織検査は、慢性膵炎の診断の最終的な検査であり、準確診所見が得られなかった場合に施行する。確診例の所見は、膵実質の減少と小葉間の不規則な線維化である。

2) 膵機能検査

膵機能検査には、血中、尿中の膵酵素濃度の測定、有管法のセクレチン試験、無管法の PFD (pancreatic functioning diognostant)試験、便中キモトリプシンテストなどがある。

3) 病型分類

慢性膵炎は膵の炎症を繰り返しながら、あるいは持続的に膵障害が進行し、膵外、内分泌機能が進行性に低下していく疾患であり、膵機能障害の程度から、代償期と非代償期、および移行期に分けられる。代償期は慢性膵炎の発症後数年から 10 年に及び、しばしば血中、尿中の膵酵素の上昇を伴う腹痛発作を反復する急性再燃期と、膵炎症状をほとんど認めない間欠期とに分けられる。非代償期は膵の線維化が進行し、疼痛は軽減することが多いが、消化障害や下痢などの膵外分泌不全による症状や糖尿病等の膵内分泌機能不全が生じてくる。代償期と非代償期のあいだの移行期では両期の症状が混在している。

このように慢性膵炎は持続性、進行性の膵の炎症のため、膵内外分泌機能の低下、膵管の変化、膵内外の合併症、疼痛などにより、日常生活にさまざまな障害をきたす疾患である。

1-3. 遺伝子変異によって生じる膵炎

膵炎（急性膵炎、慢性膵炎）は、临床上、成因別に分類されることが多いが、いろいろな検索にもかかわらず現時点では原因がはっきりしない症例も数多く存在し、これら成因不明の症例を特発性膵炎と区分している。

特発性膵炎の中には、疑われる原因は存在するものの、それが明らかな原因としては断定できない症例が含まれることもある。例えば、アルコール膵炎として分類されないほどの飲酒量であっても膵炎を発症する場合もあり、その場合特発性に分類される可能性もあり、明確に特発性膵炎を定義するのは難しい場合もある。しかし、できるだけ成因を除外したうえで、特発性と定義する必要がある。

一方、遺伝子変異による膵炎として、最近トリプシノーゲン遺伝子の変異により膵炎を発症する遺伝性膵炎が報告されている。また、高脂血症や高 Ca 血症の結果、二次性に膵炎を生じる遺伝性疾患や、膵嚢胞線維症の場合のように、遺伝子変異が膵炎の直接の原因ではあるが、全身疾患の部分症状として膵炎を生じる場合もある。その他、トリプシノーゲン以外の膵酵素や、膵酵素インヒビターの遺伝子変異による膵炎、あるいは、膵炎に対する感受性、抵抗性を修飾する遺伝子変異も存在すると考えられる。以下に遺伝子変化が膵炎の発症に関与すると思われる疾患、病態について記す。

1) HLA 抗原の連鎖不均衡

膵炎と連鎖不均衡を示す特定の HLA locus は確定されていないが、Anderson ら¹⁾は、アルコール性慢性膵炎においては B21 が有意な頻度で認められるのに対して、特発性（非アルコール性）慢性膵炎では A1 と B8 が多い傾向にあると報告している。一方、Homma ら²⁾は本邦の慢性膵炎症例において HLA 抗原を解析した。アルコール性慢性膵炎では BW54 が低頻度であるのに対し、特発性慢性膵炎では B5 が高頻度であり、膵炎を発症しやすい体質的に類似した素因の存在が指摘されている。

2) トリプシノーゲン遺伝子とトリプシンインヒビター遺伝子の点突然変異

1996 年、Whitcomb ら³⁾により、遺伝性膵炎家系において、カチオニックトリプシノーゲン遺伝子に点突然変異を生じていることが報告された。以来、現

在までに6種類のカチオントリプシノーゲン遺伝子の変異が報告され、膵炎発症におけるトリプシンとそのインヒビターである膵分泌性トリプシンインヒビター (pancreatic secretory trypsin inhibitor: PSTI)の意義が再認識されている。カチオントリプシノーゲンの遺伝子変異によるトリプシノーゲン分子の高次構造の変化に伴って、トリプシンへの活性化の促進、PSTIとの結合能の低下、あるいはトリプシン自身による自己分解に対する感受性の低下などを生じ、その結果、膵内のトリプシン活性の増大をもたらすと考えられている。また、PSTIの遺伝子変異にも、PSTI分子の高次構造の変化に伴い、トリプシン活性の阻害能が減弱する可能性がある。膵炎発症におけるカチオントリプシノーゲンとPSTIの遺伝子変異の意義については後述する。

3) *CFTR* 遺伝子の点突然変異

先天性に気道や膵臓などの外分泌腺からの粘ちような分泌液の排出、汗の塩濃度の異常上昇で特徴づけられる膵嚢胞線維症の責任遺伝子である *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)遺伝子の点突然変異が遺伝性膵炎家系で発見されている。膵嚢胞線維症と慢性膵炎の間には、発症早期における膵液中酵素濃度の上昇と重炭酸濃度の低下、膵液 Ca 濃度の上昇、膵管分枝内の protein plug 形成、などいくつかの共通点が存在する。膵嚢胞線維症は劣性遺伝疾患で変異遺伝子が homozygous にそろわなければ発症しないが、報告された膵炎家系での *CFTR* 遺伝子の変異は heterozygous であり、優性遺伝形式と考えられる。370 の非膵嚢胞線維症染色体をスクリーニングし、正常多型 (population polymorphism) ではないことが確認されているが、発症機序などを含めて今後の検討が必要である。

4) 高脂血症を伴う遺伝子変異

高脂血症に膵炎が合併することはよく知られている。脂質代謝に関する遺伝子の変異で高脂血症を伴う場合は膵炎合併の可能性がある。実際、lipoprotein lipase 遺伝子や apolipoprotein 遺伝子の変異した症例や glycogen storage disease type Ia に膵炎の発症が報告されている。血中にトリグリセリドが増加すると、トリグリセリドが膵組織内の毛細血管やリンパ管内の膵リパーゼによって加水分解され、多量の遊離脂肪酸を生じる。遊離脂肪酸が毛細血管壁の障害や微小血栓の形成から、膵の虚血をきたし膵炎を生じる機構、あるいは遊離脂肪酸が

膵腺房細胞に直接毒性を示すという機構が考えられている。

5) ミトコンドリア遺伝子の変異

遺伝性疾患である MELAS (mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes) 症候群、carnitine palmitoyltransferase II 欠損症、3-hydroxy-3-methylglutaric-CoA lyase 欠損症、cytochrome c oxidase 欠損症など、ミトコンドリア酵素の遺伝子変異でも膵炎合併の報告がある。これら遺伝子変異に基づく低栄養、血管障害、フリーラジカルの産生、あるいは膵細胞におけるエネルギー産生障害などが膵炎合併の機構と考えられている。膵臓が非常に蛋白合成が盛んで、多量のエネルギーを必要とする臓器であることもミトコンドリアの遺伝子変異で膵炎を生じる一要因である可能性がある。

6) その他の遺伝性変異

Ca-sensing receptor の遺伝子変異による高 Ca 血症から再発性膵炎を生じる家系、多発性内分泌腺腫症 1 型における副甲状腺機能亢進症に基づく膵炎、および、有機酸血症に発症する膵炎が報告されている。また、Johanson-Blizzard 症候群、Schwachman-Diamond 症候群などの奇形症候群にみられる膵外分泌不全も家族集積性を示す。

1-4. カチオニックトリプシノーゲンの遺伝子変異による膵炎の発症機構

1996 年、遺伝性膵炎家系のマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析により、遺伝性膵炎の疾患遺伝子が第 7 染色体長腕 (7q35) に存在することが明らかとなった⁴⁵⁾。さらにこれらとほぼ同時期に 7q35 の遺伝子座位にある T 細胞レセプター β 鎖のゲノム DNA シークエンス (685 kb) が報告され、この多重遺伝子ファミリーのクラスターの中の偽遺伝子を含む 8 つのトリプシノーゲンの遺伝子が含まれることが明らかとなった⁶⁾。8 つのトリプシノーゲン遺伝子のうち、機能を持った蛋白を合成するのは、カチオニックトリプシノーゲン遺伝子、アニオニックトリプシノーゲン遺伝子、メソトリプシノーゲン遺伝子の 3 つである(表 4)。その中でカチオニックトリプシノーゲンはヒトでは最も高濃度存在し、活性化されやすく、また分解されにくいという性質がある。

この報告に基づいて Whitcomb ら³⁾は家族性膵炎患者のゲノム DNA よりカチ

オニックトリプシノーゲンの各々5つのエクソンのシークエンスを解析し、カチオニックトリプシノーゲンのエクソン3における点突然変異 (365 G>A R122H: R122H) を発見した³⁾ (図1)。さらに Whitcomb ら³⁾は、カチオニックトリプシノーゲンの結晶解析から同遺伝子のエクソン3の R122H 変異によりトリプシンが自己消化に抵抗性を獲得し、持続的なトリプシン活性化を生じるとの膵炎の発生機序に分子レベルでの仮説を提唱した。また、他の家族性膵炎でカチオニックトリプシノーゲンのエクソン2における変異 (86 A>T N29I: N29I) も発見された⁵⁾ (図1)。その後も遺伝性膵炎に関係する変異として、68 A>G K23R (K23R)、47C>T A16V (A16V)、65A>G D22G (D22G)、-28del TCC が発見された^{7,8,9)} (図1)。またわが国においても R122H と N29I の変異を有する遺伝性膵炎家系の存在が認められている¹⁰⁾。一方、アニオニックトリプシノーゲン、メソトリプシノーゲンについては、膵炎と関連する遺伝子変異は認められていない。

カチオニックトリプシノーゲン遺伝子の変異に伴う遺伝性膵炎は常染色体優性遺伝でその浸透率は80%といわれている。少なくとも5つの異なるトリプシン活性を増強させるメカニズムがあると考えられている。R122H は、活性化されたトリプシンの不活化に障害があると想定されたが、この機構はラット及びヒトの変異カチオニックトリプシノーゲンを用いた実験で証明されている^{11,12,13)}。D22G や K23R は activation peptide cleavage site の変異で、トリプシノーゲンの活性化(autoactivation) の促進が想定される。この機構は、カチオニックトリプシノーゲンの N 末端側のペプチドを合成し、その分解率、つまりトリプシンへの活性化率が促進されていることにより証明された。A16V は signal peptide cleavage site の変異で、これもトリプシノーゲンの活性化(autoactivation)の亢進をきたすと考えられる。また-28del TCC は、転写の亢進が原因といわれ、N29I は、高次構造の変化に伴う PSTI 結合能の低下や、酸性域での安定性の上昇が、トリプシン活性の上昇の原因と考えられている。すなわち、いずれの遺伝子変異も膵内トリプシン活性の上昇を惹起する、あるいは惹起しうるものである。

プシンインヒビター(bovine pancreatic secretory trypsin inhibitor: BPTI)と PSTI である。ヒト膵内には PSTI のみが存在する。BPTI はウシ、ヒツジ等の反芻動物の膵臓、肺、耳下腺等に局在している。最初に Kunitz と Northrop¹⁴⁾によりウシ膵臓から単離され、Kassel ら¹⁵⁾によってその一次構造が決定された。一方、PSTI は、最初に Kazal ら¹⁶⁾によりウシ膵臓から単離され、Green ら¹⁷⁾によりその一次構造が決定された。ヒト PSTI のアミノ酸配列は 1976 年に決定された^{18,19)} (図 2)。1987 年に Horii ら²⁰⁾は、ヒト膵臓細胞より PSTI の cDNA をクローニングし、これによりヒト PSTI をコードするエクソン領域が明らかとなった。PSTI は 23 個のシグナルペプチドを有する 79 個のアミノ酸からなる蛋白である。PSTI は膵臓内で活性化したトリプシンを阻害することにより、トリプシンによって引き起こされる様々な酵素前駆体の連鎖的活性化を抑え、膵臓を自己消化から守る役割を負っていると考えられている。

また PSTI は、細胞が壊されるようなイベントがあると、肝臓から分泌されて、急性反応物質として endocrine、内分泌的作用を持つともいわれている²¹⁾。

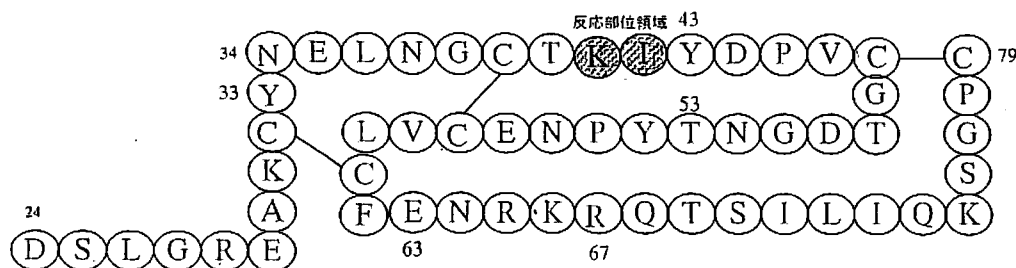


図 2. PSTI (mature type) の構造

1-6. トリプシンの活性化量と PSTI 活性のバランスと膵炎の発症

トリプシンをはじめとする膵プロテアーゼは、膵内においてはトリプシノーゲンなどの不活性型としてチモーゲン顆粒内に区画されているため、膵内においては通常、自己消化はおきない (表 5)。しかし十二指腸液や胆汁の逆流など

なんらかの原因によって、膵内においてトリプシノーゲンがトリプシンに活性化されると、膵の自己消化から膵炎が惹起されると考えられる。

活性化されるトリプシンの量が総トリプシノーゲン量の 1/5 程度までであれば、即座に PSTI が結合することによって、トリプシンは不活化され、膵臓は自己消化から守られる。しかし、膵内においてトリプシンの活性化量が多かったり、PSTI のトリプシン結合能が低下していると、膵炎を惹起しやすい状況が起こりうると想定される。このように、トリプシンと PSTI は矛と盾のような関係にある(図 3)。

表 5. 膵プロテアーゼの活性に対する防御機構

1. プロエンザイムとしての産生
2. 産生・貯蔵部位（膵）と活性部位（十二指腸）の分離
3. チモーゲン顆粒内への分画化（compartmentalization）
4. 膵腺房細胞内の低 Ca 濃度化
5. PSTI との共存
6. トリプシンによる自己分解機構(autodigestion)
7. 肝でのトリプシンインヒビター(α_1 -アンチトリプシン、 α_2 -マクログロブリン)の産生
8. 膵管上皮の粘液による被覆

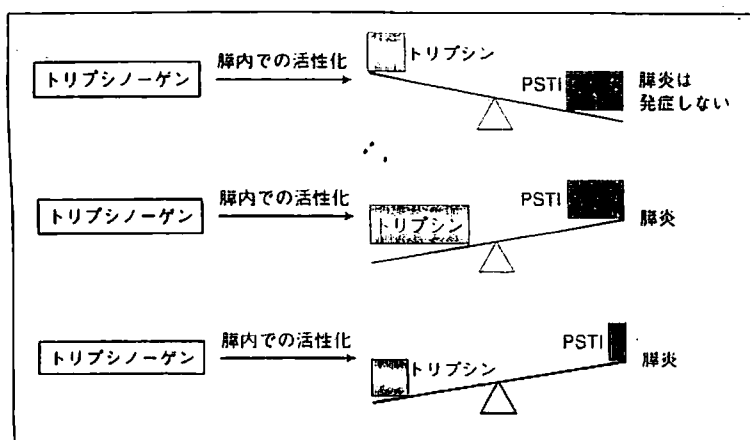


図 3. トリプシン活性化と PSTI 機能のバランスと膵炎の発症

1-7. PSTI の遺伝子変異による膵炎発症の可能性

PSTI は活性化されたトリプシンの活性基に瞬時に結合して、トリプシンの活性を抑える働きがある。それゆえ、膵炎発症の制御に重要な因子であるといえる。つまり、1-4 項で述べたようなトリプシン分子の異常のみではなく、PSTI 分子に異常があって、活性型トリプシンに PSTI が結合できず、膵炎を発症するという機構が存在すると考えられる。

そこで我々は、膵炎発症における *PSTI* 遺伝子変異の意義についての検討をおこなった。*PSTI* は最近、serine protease inhibitor, Kazal type 1 (SPINK 1)とも呼ばれているが、これまでの研究が *PSTI* という名称を用いて行われてきている関係上、本研究においても *PSTI* という用語を用いた。

第 2 章

膵炎患者における *PSTI* 遺伝子の変異解析

2-1. 序論

PSTI 遺伝子の変異により、産生される *PSTI* 蛋白の構造が変化すると、*PSTI* 本来の働きであるトリプシン阻害活性が低下し、膵炎が惹起されやすくなる可能性がある。そこで、膵炎患者において *PSTI* 遺伝子の変異についてスクリーニングを行った。

2-2. 対象

熊本大学第二外科において診療した急性または慢性膵炎と診断された 17 才から 75 才までの日本人患者 23 名（男 14 名、女 9 名、急性膵炎 15 名、慢性膵炎 8 名、平均年齢 50.7 才）を対象に末梢血を採取し、白血球より genomic DNA (gDNA) を採取した。また健常ボランティア 33 名（男 26 名、女 7 名、23 才から 72 才までの平均年齢 44.7 才）においても同様に末梢血を採取し、gDNA を採取した。それを用いて、*PSTI* 遺伝子のエクソン 1 から 4 までの変異検索を行った。

2-3. 方法

1) イントロン領域のシーケンス解析

研究を始めた当初、イントロンを含めた *PSTI* の全遺伝子配列は不明であったため、まずイントロン領域のシーケンスを行った。既知のエクソン領域の配列をもとに作製した表 6 に示すプライマーをもとに、イントロン 1 から 3 までをそれぞれ PCR キット (Takara, Kyoto, Japan) を使用し、シーケンスを行った。

表 6. イントロン領域のシーケンス解析のためのプライマー

イントロン 1	5'-GAAGGTAACAGGCATCTTTCTTCTC-3' 5'-ATCTCTTTACCTCTCTTCCCAGGG-3'
イントロン 2	5'-TTCTAGGTAACACTGGAGCTGACTC-3' 5'-CCACAGACAGGGTCATATATCTTGG-3'
イントロン 3	5'-ACTGATGGAAATACTTATCCCAATGA-3' 5'-TTGAATGAGGATAGAAGTCTGGCGT-3'

PCR の条件は、94℃ 5分、(94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分)35 cycle、72℃ 1分とした。

2) エクソン領域のシーケンス解析

上記解析で明らかにしたイントロン領域のシーケンスをもとに、エクソン 1 から 4 までのプライマーを作製し (表 7)、それぞれ PCR にて増幅を行った。それぞれの PCR 産物を、2%アガロースゲルにて電気泳動をおこない、目的とするバンドを切り出し、gel extraction kit (QIAGEN、Chatsworth、CA) を用いて、DNA を抽出した。さらに ABI PRISM dye termination cycle sequencing kit (Perkin Elmer、Foster city、CA) を用いて、PCR を行った後、ABI DNA sequencer を用いて、DNA シーケンスを決定した。

表 7. エクソン領域のシーケンス解析のためのプライマー

エクソン 1	5'-GCTATGACACAGAGTCAATCAATAA-3' 5'-AGTCTAGAAGATAATGTGCTTCACA-3'
エクソン 2	5'-AGCAGAGAATTCTGATGAAGAATAG-3' 5'-CCTCTTAACTTCAGGCATAAACTGAA-3'
エクソン 3	5'-TTCAGAGATTTTGCTATGAACTCAA-3' 5'-GGTGAGATTCATATTATCAGTACAC-3'
エクソン 4	5'-CACTTTTTTCATCAGTGAAGTTTAAG-3' 5'-GGTGAGATTCATATTATCAGTACAC-3'

PCR の条件はイントロン領域のシーケンス時と同様で、PCR の条件は、96℃ 5分、(96℃ 10秒、50℃ 5秒、60℃ 4分)25cycle、4℃ 7分とした。

3) PCR-Restriction Enzyme Fragment Length Polymorphism (RFLP)

一塩基置換をさらに確かめるために、RFLP 解析を行った。今回明らかとなった 2 つの一塩基置換には固有の制限酵素が存在しなかったため、実際に塩基置換があれば切断されるようなミスマッチプライマーをそれぞれ作製した (図 4)。それぞれ増幅したエクソン 3 と 4 をさらにこのミスマッチプライマーで増幅し、その PCR 産物を PCR purification kit (QIAGEN、 Chatsworth、 CA) にて精製し、それぞれエクソン 3 は制限酵素 *DdeI*、およびエクソン 4 は *NlaIII*(Biolabs、 Beverly、 MA)で 37°C、overnight で反応させた。その産物を 15%アクリルアミドゲルで電気泳動し、切断されているかを確認した。

A. 101A>G N34S (AAT : AGT、 exon3)の同定のためのプライマーと PCR 産物

5' -TAATTCCATTTTTAGGGCAAATGTCTCA- 3'

5'-GGTGAGATTCATATTATCAGTACAC-3'

		101	
N34S	creation of <i>DdeI</i> site :	-TGT <u>CTC</u> <u>AGT</u> GGA-	
Wild type	no <i>DdeI</i> site :	-TGT <u>CTC</u> <u>AAT</u> GGA-	

B. 199C>T R67C (CGC :TGC、 exon 4)の同定のためのプライマーと PCR 産物

5' -TTAATCTCTACTGCAGGACA- 3'

5'-GGTGAGATTCATATTATCAGTACAC-3'

		199	
R67C	creation of <i>NlaIII</i> site :	-AGG <u>ACA</u> <u>TGC</u> CAG -	
Wild type	no <i>NlaIII</i> site :	-AGG <u>ACA</u> <u>CGC</u> CAG -	

白抜き文字：制限酵素反応構造、下線：ミスマッチ部位

図 4. ミスマッチプライマーを用いた N34S と R67C の RFLP 解析法

2-4. 結果

1) PSTI 遺伝子のシーケンス解析

イントロン 1 は 1.9 kb、イントロン 2 は 1.5 kb、イントロン 3 は 3.3 kb であり、PSTI の全長は 7.5kb であった (図 5)。

23 名の膵炎患者と 33 名の健常ボランティアについてエクソン 1 から 4 まで調べたところ、2 つの一塩基置換を 1 人の慢性膵炎患者(case number 16)において認めた。その他の患者においては、アミノ酸変異を伴うような塩基置換は認めなかった (表 8)。

1 つは、エクソン 3 のコドン 34 がアスパラギン Asn(AAT)からセリン Ser(AGT)に変化するような A から G への 1 塩基置換 (N34S) であった (図 6a)。

もうひとつは、エクソン 4 のコドン 67 のアルギニン Arg(CGC)がシステイン Cys(TGC) に変異するような C から T への一塩基置換であった(R67C)(図 6b)。いずれも heterozygous な変化であったが、家系解析の結果から、compound heterozygous と判明した。

同様にこの患者の家族についても分析をおこなったところ、図 7 のように計 5 人に PSTI の遺伝子変異を認めた。父と弟は、当該患者と同様に N34S と R67C の変異を有していた。母と母方の伯父は homozygous な N34S の変異を有していた (図 6c)。

またエクソン 4 の 3'非翻訳領域に C から T への一塩基置換 (272T>C) を認めたが、これは 6 人の膵炎患者の他、5 人の健常ボランティアにも認められ、正常多型と考えられた。

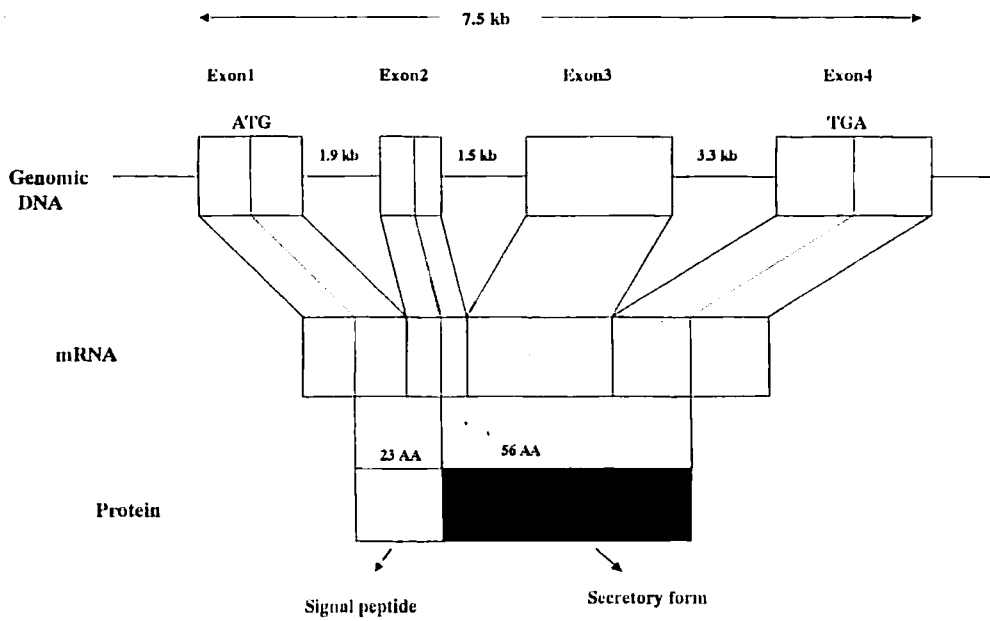


図5 ヒト *PSTI* 遺伝子構造と *PSTI* タンパク質

a) Exon 3 Codon 34

Tyr Asn/Ser Glu
TAC AAT GAA
AGT



b) Exon 4 Codon 67

Lys Arg/Cys Gln
AAA CGC CAG
TGC



c) Exon 3 Codon 34

Tyr Ser Glu
TACA GT GAA

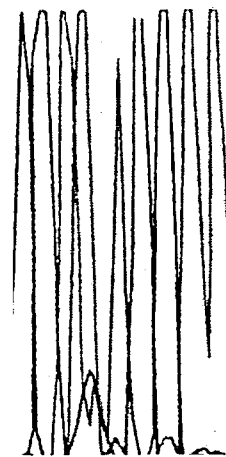


図6 *PSTI* 遺伝子変異

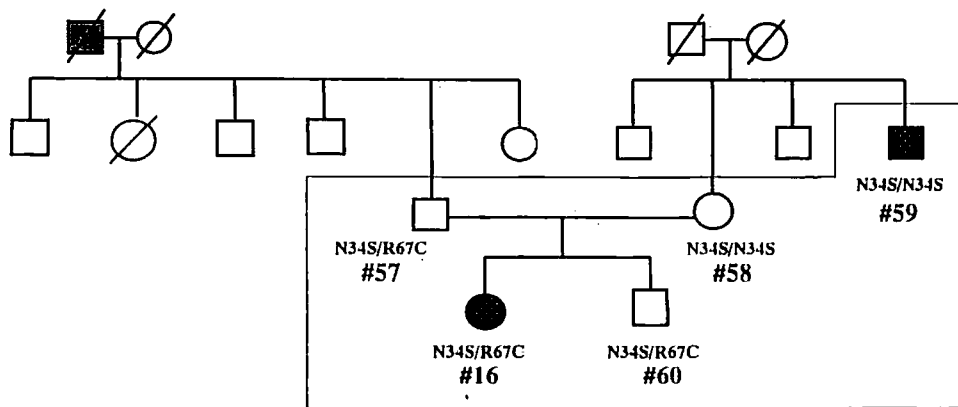


図7 PSTI 遺伝子変異を有する家系の家系図

#は表7における case number を表す。

● ■ : 膵炎発症者 ■ : 膵炎疑い

表 8. Summary of *PSTI* Gene Analysis

Case no.	Pancreatic disease	Etiology	Current age (years)	Age at onset	sex	Exon1	Exon2	Exon 3	Exon4
Pancreatitis Patients									
1	Acute	Alcoholic	57	55	M	wt	wt	wt	wt
2	Acute	Idiopathic	42	39	M	wt	wt	wt	wt
3	Acute	Drug-induced	37	35	F	wt	wt	wt	wt
4	Acute	Biliary	42	40	F	wt	wt	wt	wt
5	Acute	ERCP-induced	68	64	M	wt	wt	wt	wt
6	Acute	Drug-induced	51	49	F	wt	wt	wt	wt
7	Acute	Alcoholic	70	69	M	wt	wt	wt	wt
8	Acute	Idiopathic	57	55	F	wt	wt	wt	wt
9	Acute	Biliary	69	67	F	wt	wt	wt	3UTR/wt
10	Acute	Alcoholic	75	74	M	wt	wt	wt	wt
11	Acute	Idiopathic	60	59	F	wt	wt	wt	3UTR/wt
12	Acute	Idiopathic	17	11	M	wt	wt	wt	wt
13	Acute	Idiopathic	38	38	F	wt	wt	wt	wt
14	Acute	Idiopathic	45	45	M	wt	wt	wt	wt
15	Acute	Alcoholic	28	28	M	wt	wt	wt	3UTR/wt
16	Chronic	Idiopathic	32	25	F	wt	wt	N34S/wt	R67C/wt
17	Chronic	Alcoholic	68	65	M	wt	wt	wt	wt
18	Chronic	Idiopathic	56	54	M	wt	wt	wt	wt
19	Chronic	Alcoholic	49	47	M	wt	wt	wt	3UTR/wt
20	Chronic	Hyperlipidemic	43	36	M	wt	wt	wt	wt
21	Chronic	PB maljunction	72	38	F	wt	wt	wt	wt
22	Chronic	Alcoholic	46	30	M	wt	wt	wt	3UTR/wt
23	Chronic	Alcoholic	61	55	M	wt	wt	wt	3UTR/wt
Healthy Volunteers									
24-45	None	NA	23-40	NA	M	wt	wt	wt	wt
46-51	None	NA	23-40	NA	F	wt	wt	wt	wt
52	None	NA	32	NA	M	wt	wt	wt	3UTR/wt
53	None	NA	31	NA	M	wt	wt	wt	3UTR/wt
54	None	NA	28	NA	M	wt	wt	wt	3UTR/wt
55	None	NA	33	NA	M	wt	wt	wt	3UTR/wt
56	None	NA	40	NA	F	wt	wt	wt	3UTR/wt
Family Members of Case 16									
57	None	NA	62	NA	M	wt	wt	N34S/wt	R67C/wt
58	None	NA	54	NA	F	wt	wt	N34S/N34S	wt
59	Chronic	Idiopathic	50	46	M	wt	wt	N34S/N34S	wt
60	None	NA	29	NA	M	wt	wt	N34S/wt	R67C/wt

wt: wild type, ERCP: endoscopic retrograde cholangiopancreatography, 3UTR: mutation in 3' untranslated region, NA: not applicable, PB maljunction: pancreatobiliary maljunction.

2) RFLP 解析

N34S *PSTI* を図 4 に示した mismatch プライマーを用いて PCR 増幅した後、*DdeI* で切断した結果を図 8a に示す。健常ボランティアでは、切断されない 204 bp のバンドのみが認められた。一方、患者および父と弟においては、切断された 176 bp のバンドと切断されていない 204 bp のバンドと 2 本認められた。また N34S

を homozygous で有する母と伯父は切断されたバンドのみ認められた。

また R67C *PSTI* を同様に PCR 増幅した後、*Nla*III で切断すると、切断されない 205 bp と切断された 183 bp の 2 本のバンドが患者と父と弟において認められた (図 8b)。

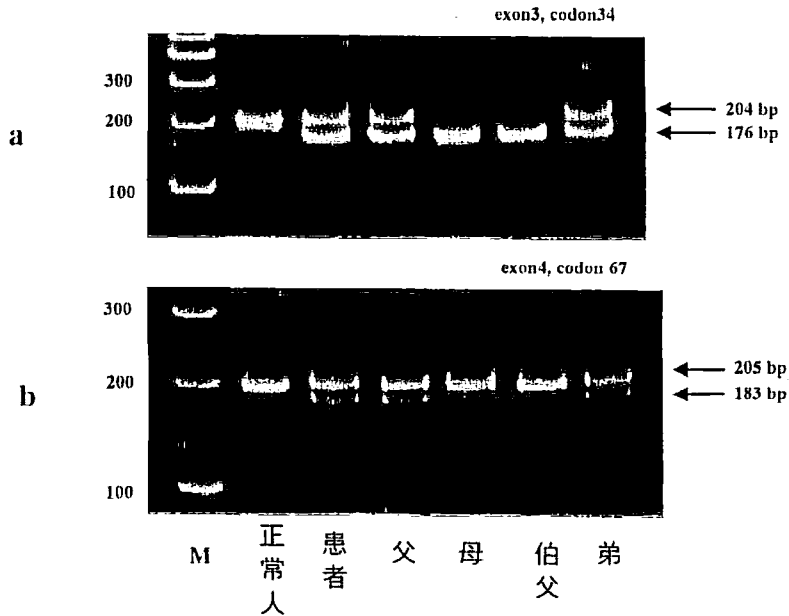


図 8 *PSTI* 遺伝子変異における RFLP 解析

3) 変異を有する患者の臨床像

この変異を有する患者(case number 16)は、25 才時に上腹部痛にて膵炎を発症し、以後 1 年に 1 回程度膵炎発作を繰り返していた。31 才時に膵臓の石灰化などを認めたことから、慢性膵炎と診断された (図 9、10)。飲酒歴はなく、特に膵炎の原因となる要因は認められなかった。正常時の血清の *PSTI* 濃度は 4.4ng/ml と低値であった (正常値 4.6-12.2ng/ml)。この患者はカチオニックトリプシノーゲンには遺伝子異常を認めなかった。

母方の伯父は、homozygous な N34S 変異を有していたが、伯父もまた慢性膵炎にて他の医療機関にて加療中であった。伯父は特に症状はなかったが、41 才時にうけた検診にて、膵管の拡張を指摘され、その後うけた ERCP にて、膵管の部分的な狭窄とその末梢側の拡張を認めたため、膵癌を疑われ手術を施行された。切除された膵組織から、慢性膵炎と診断された。

その他の家族には、膵炎をうたがわせるエピソードはなかった。



図 9. 当該患者の腹部 CT 像



図 10. 当該患者のバルーン ERCP 像

2-4 小括

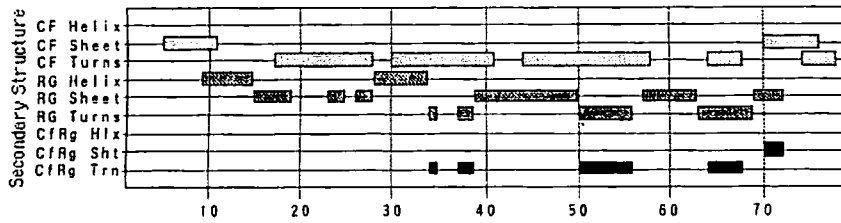
本解析により、慢性膵炎患者において、N34S と R67C の 2 つの変異を認めた。*PSTI* 遺伝子に変異を認めただけでは、この変異が膵炎を惹起するかどうかは定かではない。しかし N34S が膵炎に関連していることを示す要因がいくつかある。それは、1)この変異は他の患者および健常ボランティアにおいては認められなかったこと、2)同じ N34S を有する伯父もまた慢性膵炎であったこと、3)当該患者が特に誘因なく若年で膵炎を発症していること、4)ヒト *PSTI* と 70%一致するブタ *PSTI* はこの 34 位がもともと Ser であるが、このブタ *PSTI* はヒトトリプシンに対する阻害活性が減弱していることなどである²²⁾。しかし、家系内の N34S を有する他の 3 人には膵炎の発症はないことから、この変異による膵炎発症の浸透率は低いといえる。

また、Chou-Fasman²³⁾や Robson-Garnier ら²⁴⁾の 2 次構造のコンピューター解析プログラム (MacVector 3.5, International Biotechnologies, Rochester, NY) を用いて解析すると、N34S では³⁴Asn-³⁵Glu の native turn structure が消失していることが示された (図 11)。*PSTI* の reactive site は⁴⁰Thr-⁴⁴Asp であり、⁴¹Lys がセリンプロテアーゼと結合する部位である。そのため N34S はこの reactive site に近い部位の変異であり、*PSTI* の活性に影響を与えるものと考えられる。これはあくまでも理論上のコンピューター解析の結果ではあるが、N34S 変異は活性部位近傍の高次構造を変化させ、*PSTI* 活性を低下させる可能性は十分ありうると考えられる。

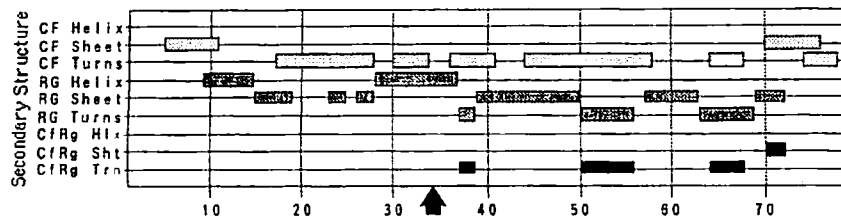
R67C もまた、トリプシン阻害活性が減弱している可能性がある。*PSTI* は最終的に 56 個のアミノ酸からなるが、分子内に 3 つの S-S 結合を有する²⁵⁾。³²C-⁶¹C, ³⁹C-⁵⁸C, ⁴⁷C-⁷⁹C である。R67C ではシステイン残基がもう 1 つ増えることになる。システイン残基数が 6 から 7 へと増加することから、新たな分子内 s-s 結合や分子間の s-s 結合の形成により、高次構造が変化したいくつかのアイソフォーム生成の可能性が考えられた。

最近、我々の報告とほぼ時期を同じくして、各国から慢性膵炎患者と *PSTI* 遺伝子の変異、N34S との関連の報告があいついでいる。

Wild type PSTI



N34S PSTI



R67C PSTI

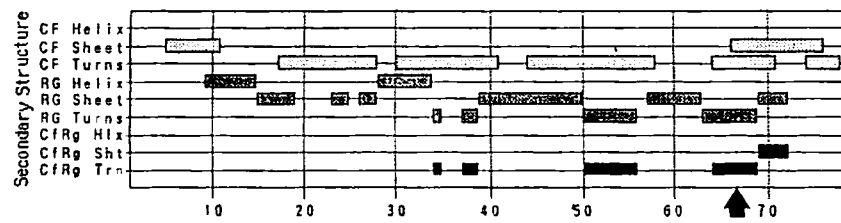


図 11. 変異 PSTI の 2 次構造のコンピューター解析

CF, Chou-Fosman prediction; RG, Robson-Garnier prediction; CfRg, Chou-Fasman and Robson-Garnier combined prediction; Helix or Hlx, ヘリックス構造; Sheet or Sht, シート構造; Turns or Trn, ターン構造; 矢印, 変異部位.

第 3 章

本邦における家族性膵炎、若年性膵炎における *PSTI* 遺伝子の変異解析

3-1 序論

熊本大学第二外科における急性膵炎および慢性膵炎の患者を対象とした *PSTI* 遺伝子の変異検索にて、1名の慢性膵炎患者において、アミノ酸置換を伴う2種類の遺伝子変異を認めた。そこで、本邦における家族性膵炎及び若年性膵炎患者における *PSTI* 遺伝子の変異を解析した。

3-2. 対象と方法

1) 対象

厚生労働省特定疾患対策研究事業「難治性膵疾患に関する調査研究班」が集計した家族性膵炎患者37名(24家系)および若年性膵炎患者15名を対象とした。この家族性膵炎患者のなかに熊本大学症例に含まれる2名(1家系)も含まれている。

なお、家族性膵炎とは家族内に2人以上の膵炎発症者がいるもの、若年性膵炎とは20才未満で発症した膵炎を意味する。

2) 方法

PSTI 遺伝子のエクソン1から4まで、及びエクソン近傍のイントロンのシーケンズを行った。

3-3 結果

表 9 に示すように 6 名の家族性膵炎患者(3 家系)および 1 名の若年性膵炎患者において N34S 変異を、1 名の家族性膵炎患者および 1 名の若年性膵炎患者において R67C 変異を、2 名の家族性膵炎患者および 4 名の若年性膵炎患者においてエクソン 4 の 3'非翻訳領域に 272C>T 変異を認めた。N34S は、イントロン 1 に IVS1-37T>C、イントロン 3 に IVS3-69insTTTT 変異 (T5 が T9 となる) を必ず伴っていた。この N34S 変異とイントロン領域の 2 つの変異は、他国からの報告でも必ず共存しており (cosegregation)、興味深い。結果を表 10 にまとめた。

表 11 に示すように他の報告と合わせると、N34S 変異は非膵炎患者における頻度は 0.7% であるのに対し、膵炎患者における頻度は 9.7% であった。N34S (IVS1-37T>C + N34S + IVS3-69insTTTT) は明らかに膵炎発症者において高頻度であった。

表 9. PSTI 遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異を認めた症例の臨床所見

A. Familial pancreatitis

Subject number	Family number	Gender	Identified mutation	Age of onset	Dilatation of MPD	Pancreatic calcification	Diabetes mellitus	Remarks on clinical course	Mutation in CT
98	9	M	N34S/wt	43	+	+	-	P-J at 46 yrs	-
99	9	F	N34S/wt	37	+	+	+	P-J at 39 yrs	-
102	11	F	N34S/N34S	36	+	+	+		-
103	11	M	N34S/wt	8	?	?	?		-
K16	15	F	N34S/R67C	25	+	+	-	ESWL at 33 yrs	-
K59	15	M	N34S/N34S	46	+	-	+	PpPD at 48 yrs	-

B. Juvenile pancreatitis

Subject number	Family number	Gender	Identified mutation	Age of onset	Dilatation of MPD	Pancreatic calcification	Diabetes mellitus	Remarks on clinical course	Mutation in CT
106	-	M	R67C/wt	16	-	+	+	DP at 21 yrs	-
K61	-	M	N34S/wt	19	-	-	-		-

MPD, main pancreatic duct; CT, cationic trypsinogen; wt, wild-type; P-J, pancreatojejunostomy; ESWL, extracorporeal shock wave lithotripsy; PpPD, pylorus preserving pancreatoduodenectomy; DP, distal pancreatectomy.

表 10. 遺伝子変異の頻度

Location	Mutation	Distribution (expressed as allele frequency)	
		Familial Pancreatitis	Juvenile Pancreatitis
5'UTR	-	n.a.	n.a.
Exon 1	-	n.a.	n.a.
Intron 1	IVS1-37T>C*	8/74	1/30
Exon 2	-	n.a.	n.a.
Intron 2	-	n.a.	n.a.
Exon 3	N34S	8/74	1/30
Intron 3	IVS3-69insTTTT*	8/74	1/30
Exon 4	R67C	1/74	1/30
3'UTR	272C>T	2/74	4/30

#, found in all alleles with N34S; n.a.. not applicable.

表 11. *PSTI* 遺伝子変異のまとめ

A. Pancreatitis patients

	29)	26)	28)	27)	30)	31)	32)	33)	Total
	Kuwata Japan	Witt Germany	Pfützer USA	Chen France	Kaneko Japan	Rossi Bangl- adesh	Plendl Germa- ny	Ockenga Germany	
Exonic Mutations									
-53C>T	0/104	1/192	0/224	0/374	0/64	0/24	n.d.	0/40	1/1022(0.1%)
M1T	0/104	1/192	0/224	0/374	0/64	0/24	n.d.	0/40	1/1022(0.1%)
L14P	0/104	1/192	0/224	0/374	0/64	0/24	n.d.	0/40	1/1022(0.1%)
N34S	9/104	1/192	36/224	17/374	3/64	5/24	7/42	2/40	103/1064(9.7%)
E50E	0/104	24/192	1/224	0/374	0/64	0/24	n.d.	0/40	1/1022(0.1%)
P55S	0/104	0/192	2/224	1/374	0/64	0/24	n.d.	0/40	3/1022(0.3%)
R65Q	0/104	0/192	0/224	0/374	0/64	0/24	n.d.	1/40	1/1022(0.1%)
R67C	2/104	0/192	0/224	0/374	0/64	0/24	n.d.	0/40	2/1022(0.1%)
272C>T	5/104	6/192	9/224	0/374	5/64	4/24	n.d.	0/40	29/1022(2.8%)
Intronic Mutations									
-253T>C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6/64	n.d.	n.d.	n.d.	6/64(9.4%)
-215G>A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4/64	n.d.	n.d.	n.d.	4/64(6.3)
IVS1 -37T>C	9/104	24/192	n.d.	17/374	n.d.	5/24	n.d.	n.d.	55/694(7.9%)
IVS3 +2T>C	0/104	1/192	3/224	0/374	n.d.	1/24	n.d.	n.d.	5/928(0.5%)
IVS3 +125C>A	n.d.	n.d.	1/224	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1/224(0.5%)
IVS3 +184T>A	n.d.	n.d.	5/224	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5/224(2.2%)
IVS3 -69insTTTT	9/104	24/192	n.d.	17/374	n.d.	5/24	n.d.	n.d.	55/694(7.9%)

B. Non-pancreatitis subjects

Exonic Mutations	Total
-53C>T	0/838(0%)
M1T	0/838(0%)
L14P	0/838(0%)
N34S	11/1522(0.7%)
E50E	0/1028(0%)
P55S	5/1028(0.5%)
R65Q	0/1028(0%)
R67C	2/838(0.2%)
272C>T	28/838(3.3%)
Intronic Mutations	
-253T>C	10/64(15.6%)
-215G>A	0/234(0%)
IVS1	8/1038(0.8%)
-37T>C	
IVS3	0/590(0%)
+2T>C	
IVS3	0/380(0%)
+125C>A	
IVS3	0/380(0%)
+184T>A	
IVS3	8/1038(0.8%)
-69insTTTT	

Fractions in the table express the frequency of mutated alleles per examined alleles. n.d., not determined.

3-4. 小活

今回 52 例の家族性膵炎および若年性膵炎患者について *PSTI* 遺伝子変異の検索を行った。N34S 変異は明らかに膵炎発症者に高頻度であり、2-4 で述べたようにいくつかの N34S が膵炎発症と関連することを支持するデータが存在する。

一方、R67C 変異は他の論文ではこれまで報告されていない。R67C 変異は日本に特有のものかもしれない。*PSTI* 蛋白には 3 つのジスルフィド結合が存在するため、2-4 項で述べたような R67C が *PSTI* 活性を低下させる機構が想定される。その他にも他の論文で示されている、-53C>T (5'-UTR)や M1T 変異は *PSTI* 蛋白が産生されない変異であり、これらも *PSTI* の機能を低下させる原因となりうる。

第 4 章

変異リコンビナント PSTI 蛋白の作成

4-1. 序論

我々は、*PSTI* 遺伝子に変異 (N34S および R67C) を有する慢性膵炎患者を発見した。これらの変異が慢性膵炎の発症と何らかの関連があるかどうかを明らかにするため、同変異を有するリコンビナント *PSTI* 蛋白を作成し、野生型 *PSTI* とのトリプシン阻害活性の違いについて比較検討を行った。

塩野義製薬会社に、Arg44 (CGC)が Ser (AGC) に置換された持続型 *PSTI* を発現する酵母用プラスミド pRS5402 があり、これを用いてアミノ酸置換変異を導入することにより目的の変異型 *PSTI* を調整することとした。同時に野生型 *PSTI* を産生する酵母用発現プラスミドの構築を行い野生型 *PSTI* も調整することとした。

4-2. 方法

1) 使用菌株およびプラスミド

PSTI 遺伝子の供与体および酵母における発現プラスミドとして持続型 *PSTI* (Arg67→Ser)発現プラスミド pRS5402 (図 12)を用いた。部位特異的変異を導入するためのサブクローニングベクターとして pUC118 (宝酒造) を用いた。大腸菌宿主としては *Escherichia coli* (*E. coli*) JM109 株 (宝酒造) を、酵母宿主としては *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) BJ1991 株を使用した。

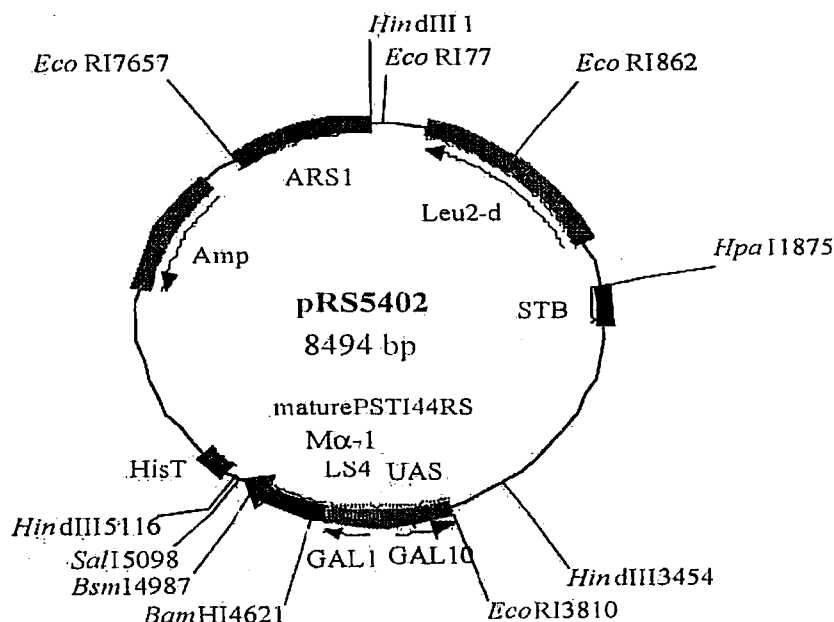


図 12. 持続型 PSTI (R67S) を発現する酵母用プラスミド pRS540

2) 使用培地

大腸菌の培地として LB 培地 (0.5% yeast extract, 1% Bacto-peptone, 1% NaCl, pH 7.4) を用い、選択培地には終濃度 50 μ g/ml の ampicillin を添加した。寒天培地には 1.5% agar を添加した。酵母の栄養培地として YPD 培地 (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% glucose) を使用した。ロイシン欠乏培地として YNB (-Leu) 培地 (2% glucose, 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 10 ml/l amino acids (1% without leucine), 5ml/l adenine (0.5%), 5ml/l uracil (0.5%), pH5.8) を使用した。また、PSTI 発現培地として YP Gal (2:4:4) 培地 (2% yeast extract, 4% bacto-peptone, 4% galactose) を使用した。寒天培地の時は 2% agar を添加した。

3) 部位特異的変異の導入

部位特異的変異は Quik Change site-directed mutagenesis kit (Staratagene) を使用した。方法はキットのプロトコールに従った。まず、5 μ l の 10 \times reaction buffer、5~50 ng の鑄型プラスミド、各 125 ng の sense primer と antisense primer、1 μ l の 2.5 mM dNTP をサーマルサイクラー用チューブに添加し、蒸留水で全量を 50 μ l に合わせた後、1 μ l の *PfuTurbo* DNA polymerase (2.5U/ μ l) を添加、30 μ l のミネラルオイルを重層してサーマルサイクラー (Perkin-Elmer) にセットした。反応条件は 95 $^{\circ}$ C、30 sec 加熱後、95 $^{\circ}$ C、30sec \rightarrow 55 $^{\circ}$ C、60sec \rightarrow 68 $^{\circ}$ C、7.5 min (=2 min/kb \times 3.6 kb) を 12 回繰

り返したあと 37℃以下に冷却し反応を止めた。10 μ l の反応液を 1%アガロースゲル電気泳動でチェックした後、1 μ l の *DpnI* (10 U/ μ l) を添加し 37℃、1 h 反応させメチル化されている鋳型側のプラスミドを切断した。この反応液を用いて *E. coli* JM109 株を形質転換した。出現したコロニーからプラスミドを抽出し、塩基配列を調べることで変異の有無を確認した。

4) 酵母の形質転換

酵母 *S. cerevisiae* の形質転換は酢酸リチウム法に従った。まず、試験管中の 10 ml YPD 培地 (1% yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% glucose) に YPD 寒天培地上で新しく生育させた菌体を 1 白金耳植菌し、30℃、20 h 前培養後、10 ml YPD 培地に 2.5%植菌し、30℃、5 h 培養した。培養液をプラスチックチューブに移した後、2,000 rpm で 5 min 遠心し、5 ml solution A (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH7.6) を添加し穏やかに懸濁した。再度 2,000 rpm で 5 min 遠心し、4 ml solution B (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH7.6, 0.1 M lithium acetate) を添加し穏やかに懸濁後、110 stroke/min で振盪しながら 30℃、1 h インキュベーションした。2,000 rpm で 5 min 遠心し、0.8 ml solution C (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH7.6, 0.1 M lithium acetate, 15% glycerol) を添加、懸濁して competent cell とした。次に、予め 10~20 ml DNA (10~20 mg) を入れたマイクロチューブに 0.3 ml ずつ competent cell を添加し、室温で 5 min 静置した後、0.7 ml solution D (50% PEG4000) を添加し、30℃、1 h インキュベーションした。12,000 rpm で 1 min 遠心後、完全に PEG を除去し、0.3 ml YPD 培地に懸濁後、30℃、1 h インキュベーションした。12,000 rpm で 1 min 遠心後、菌体を 0.5 ml 蒸留水に懸濁し、12,000 rpm で 1 min 遠心して上清を除いた後、0.2 ml 蒸留水に懸濁して 0.1 ml ずつ YNB (-Leu) 寒天平板に塗布し、30℃で 3~4 日間培養し、形質転換体を得た。

5) PSTI の発現

YPD 培地プレートに生育させた PSTI 発現プラスミドを保持する *S. cerevisiae* BJ1991 株を 20 ml YNB (-Leu) 培地に植菌し、30℃、24 h 前

培養後、80 ml の YPGal (2:4:4) の入った 10 本の 500 ml の坂口フラスコに前培養液を 2.5% 移植した。30℃、72 h 培養後、遠心 (500 ml の遠心管、5,000 rpm, 30 min) により培養上清を回収し、マイクロフィルター (0.22 μ m) で濾過し、カラムクロマトグラフィーのロードサンプルとした。

6) イオン交換クロマトグラフィー

20 mM 酢酸緩衝液 (pH3.0) で平衡化した 50 ml の SP-sepharose fast flow (ファルマシア) をカラムに充填し、pH3.0 に調整した培養上清をロードした。2~3 bed volume の 20 mM 酢酸緩衝液 (pH3.0)、および 50 mM 酢酸緩衝液 (pH4.0) で洗浄後、0 から 0.5 M NaCl / 50 mM 酢酸緩衝液 (pH4.0) のリニアグラジエントで塩濃度を上げ吸着分を溶出させ、フラクションコレクターにて分画回収した。活性測定にて活性画分を回収し、75% 飽和硫酸塩析にて濃縮を行った。

7) 逆相クロマトグラフィー

上記で得た画分をまず、ODS-A (20×250mm) (YMC 社製) カラムによる逆相クロマトグラフィーに供した。A 液 (0.05% trifluoroacetic acid, 20% acetonitrile) : 100%→92%、B 液 (0.05% trifluoroacetic acid, 60% acetonitrile) : 0→8%、60 min の linear gradient mode にてメインピークを粗分画した。この溶液を減圧濃縮した後、溶離液を 0.05% trifluoroacetic acid, 21% acetonitrile、流速 10 ml/min、isocratic mode に変更して同カラムで再クロマトグラフィーを行い活性画分を分画回収した。

8) 活性中心滴定

活性のあるトリプシン濃度を調べるための活性中心滴定は以下の方法で行った。まず、A 液 : 1% トリプシン (TPCK 処理済み)、1 mM HCl, 20 mM CaCl₂、B 液 : 0.1 M veronal (barbital) buffer pH8.3, 20 mM CaCl₂、C 液 : 10 mM *p*-nitrophenyl-*p'*-guanidinobenzoate-HCl (NPGb)、*N,N*-dimethylformamide を調製した。次に 1 ml 容石英セルに B 液を 990 ml、C 液を 10 ml を加え、直ちに攪拌後、10 sec 毎 3 分まで A₄₁₀ を測定し、ブランクの測定を行った。次に 1 ml 容石英セルに A 液を 50 ml、B 液を 940

ml、C液 10 ml を加え、直ちに攪拌後、10 sec 毎 3 分まで A_{410} を測定し、サンプルの測定を行った。それぞれの zero time における吸光値を最小自乗法で求めたあと、 DA_{410} を計算し、次式によりトリプシン濃度を求めた。

$$\text{Active trypsin conc. (M)} = DA_{410} \times 6.025 \times 10^{-5} \times 1000 \div 50$$

9) PSTI 活性の測定

適宜希釈したサンプル 10~100 ml (blank として水 100 ml) の濃度系列を用意し蒸留水で 100 ml に調整した後、650 ml の Buffer A (0.1 M Tris-HCl pH8.0, 20 mM $CaCl_2$, 0.002% Triton X-100) と 50 ml の約 2 mM トリプシン (1) の A 液を Buffer A で 1/125 希釈) を加え、37°C、15 min インキュベートした。200 ml の 5 mM benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide (L-BAPA) (100 mM L-BAPA in dimethylsulfoxide を Buffer A で 1/20 希釈) を添加して反応を開始した。37°C、15 min インキュベート後、500 ml の反応停止液 (30% 酢酸、20% 1,4-dioxane) で反応を停止させ、 A_{410} を測った。PSTI 活性はトリプシン活性が 0 となるサンプル中に含まれる PSTI の分子数が反応系に存在するトリプシンの存在数と一致することからこの時の液量 (V_0) をグラフの外挿から求め、次式で PSTI 量を求めた。

$$\text{PSTI conc. (mg/l)} = \text{Trypsin conc. (mmol/l)} / 125 \times 50 \times 10^{-6} (l) \times MW_{\text{PSTI}} \\ (\text{mg/mmol}) \div V_0 (\text{ml}) \times 1000$$

$$MW_{\text{PSTI}}=6246.94, MW_{\text{PSTI-R67S}}=6177.83$$

$$MW_{\text{PSTI-R67C}}=6193.89, MW_{\text{PSTI-N34S}}=6219.92$$

10) HPLC による PSTI 定量

HPLC による PSTI の定量は以下のような条件で行った。Cosmosil 5C₁₈ AR-300 (ナカライテスク) を用いた。溶出条件は A 液 (0.05% trifluoroacetic acid, 10% acetonitrile) : 84% → 64%、B 液 (0.05% trifluoroacetic acid, 60% acetonitrile) : 16% → 36%、流速 1 ml/min、30 min の linear gradient mode にて行い、検出は 220 nm で行った。PSTI-R67S の標品を標準として面積比で PSTI 量を定量した。

11) アミノ酸分析

サンプルを 20% HCl で 24 時間、110℃ で加水分解した後、アミノ酸分析を日立アミノ酸アナライザー (Model L-8500) を用いて行った。自動エドマン分解によるアミノ酸シーケンスには、Model 140C microgradiation system と Model 785 A programmable detector を持つ Applied Biosystems protein sequencer (Model 492) を使用した。

4-3. 結果

1) アミノ酸置換変異の導入

Arg67 [CGC] → Ser [AGC] に置換されている持続型 PSTI を発現する酵母用プラスミド pRS5402 を用いてアミノ酸置換変異を導入することを計画した (図 13)。

(A) PSTI-R67S → S67R (正常型)

Ser67 [AGC] を Arg [CGC] へ復帰変異させた。

5'-GAAAATCGGAAACCGCCCAGACTTCTATCC-3' (sense)

5'-GGATAGAAGTCTGGCGTTTCCGATTTTC-3' (antisense)

(B) PSTI-R67S → R67C 変異

Ser67 [AGC] を Cys [TGC] に置換した。

5'-GAAAATCGGAAATTGCCCAGACTTCTATCC-3' (sense)

5'-GGATAGAAGTCTGGGCATTTCCGATTTTC-3' (antisense)

(C) PSTI-R67S → N34S 変異

Asn34 [AAT] → Ser [AGT] に置換した。

5'-GGCCAAATGTTACAGTGAACTTAATGG-3' (sense)

5'-CCATTAAGTTCACTGTAACATTTGGCC-3' (antisense)

N34S 変異はこのアミノ酸置換と (A) の復帰変異との二重変異で得た。二重変異は *BsmI* 切断部位を利用して断片交換により作成した (図 13)。

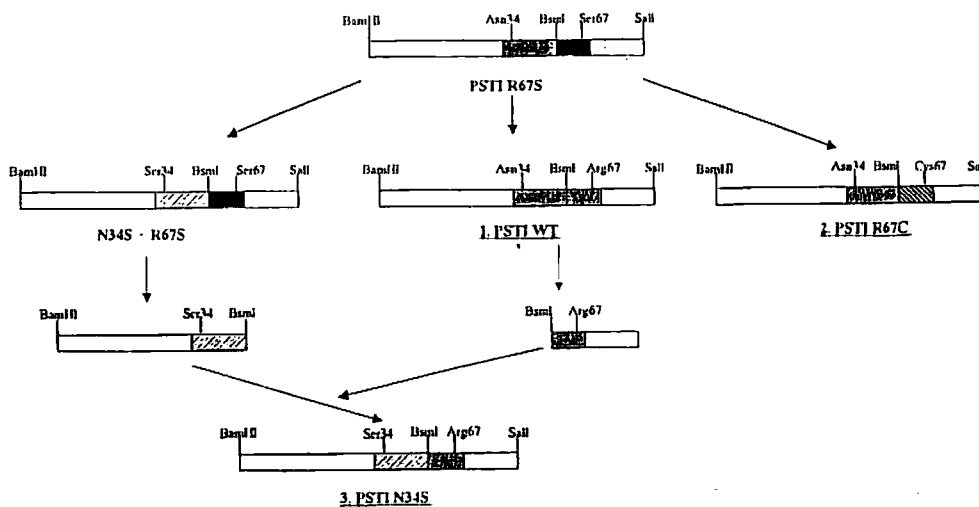


図 13.3 種類のリコンビナント蛋白の作成

pRS5402 を *Bam*HI と *Sal*I で切断し、1.4% アガロース電気泳動により 0.5 kb *Bam*HI-*Sal*I 断片を抽出した。この断片を pUC118 の *Bam*HI, *Sal*I 間に連結し、変異導入の鋳型 (*Bam*-*Sal*/pUC118) とした。

上記のプライマーセットを用いて QuikChange site-directed mutagenesis kit により変異を導入した結果、PSTI-WT/pUC (=S67R 復帰変異)、PSTI-R67C/pUC (=R67C 変異)、PSTI-N34S+R67S/pUC (=N34S 変異+R67S 変異残存) を得た。さらに、PSTI-N34S+R67S/pUC と PSTI-WT/pUC を *Bsm*I と *Xmn*I を用いて断片交換し、目的の N34S/pUC を得た。

次に、PSTI-WT /pUC、R67C/pUC および N34S/pUC を *Bam*HI と *Sal*I で切断後、1.4% アガロース電気泳動よりそれぞれ 0.5 kb *Bam*HI-*Sal*I 断片を抽出した。pRS5402 の *Bam*HI-*Sal*I 断片と交換後、*E. coli* JM109 を形質転換し、得られらたプラスミドを各々、pST5401、p5401R467C、pST5401N34S とした。

2) 酵母の形質転換

酢酸リチウム法により酵母をそれぞれ pST5401、pST5401N34S および pST5401R67C により形質転換した。YNB (-Leu) 寒天平板に塗布後、30℃ で培養したところ、4 ~7 日後にコロニーが出現した。適当なコロニーを選択し、活性が高い株を以降の実験に使用した。

3) PSTI の調製

YPD 寒天培地に生育した *S. cerevisiae* BJ1991 (pST5401)、*S. cerevisiae* BJ1991 (pST5401N11S)、*S. cerevisiae* BJ1991 (pST5401R44C) をそれぞれ 20 ml YNB (-Leu) に植菌し、30℃、24 h 前培養後、計 800 ml の YPGal (2:4:4) に前培養液を 2.5% 移植して 30℃、72 h 培養を行った。遠心により培養上清を回収し、マイクロフィルター (0.22 μ m) で濾過した。20 mM 酢酸緩衝液 (pH3.0) で平衡化した 50 ml の SP-Sepharose Fast Flow に pH3.0 に調整した培養上清 (約 650~700 ml) をロードした。20 mM 酢酸緩衝液 (pH3.0)、ついで 50 mM 酢酸緩衝液 (pH4.0) で洗浄し非吸着分を溶出させた後、0→0.5 M NaCl のリニアグラジエントで溶出させフラクションコレクターにて分画回収した。活性測定により活性画分を集め、75%飽和硫酸塩析にて濃縮した。

次に上記で得た画分を逆相クロマトグラフィーに供した。まず、ODS-A カラムによる 1 回目のクロマトグラフィーを、メインピークを粗分画した。この溶液を減圧濃縮した後、同カラムで 2 回目のクロマトグラフィーを行い、活性画分を分画回収した。その結果、PSTI-N34S は 13.6 mg (純度 >99%)、PSTI-R67C は 3.5 mg (純度 >99%)、野生型 PSTI は 13.2 mg (純度 >99%) を得ることができた。以上の結果を表 12 に示す。

表 12. PSTI 精製過程における回収量

野生型 PSTI	PSTI (mg/ml)	Volume (ml)	PSTI (mg)	Recovery (%)
培養上清	0.12	680.0	78.4	100.0
SP-Sepharose FF	1.71	34.0	58.2	74.2
硫安塩析(75%飽和)	11.90	4.6	54.8	69.8
RP-HPLC	0.97	13.6	13.2	16.8
N34S PSTI	PSTI (mg/ml)	Volume (ml)	PSTI (mg)	Recovery (%)
培養上清	0.12	1370.0	163.3	100.0
SP-Sepharose FF	0.78	144.0	112.4	68.8
硫安塩析(75%飽和)	9.13	10.7	97.7	59.8
RP-HPLC	0.80	17.0	13.6	8.3
R67C PSTI	PSTI (mg/ml)	Volume (ml)	PSTI (mg)	Recovery (%)
培養上清	0.086	1325.0	114.6	100.0
SP-Sepharose FF	0.343	178.5	61.3	53.5
硫安塩析(75%飽和)	2.869	20.2	57.9	50.6
RP-HPLC	0.410	8.5	3.5	3.0

FF; fast flow.

4)変異リコンビナント蛋白の濃度測定

表 13 のような濃度の精製蛋白が 3 種類得られた。3 種類の変異リコンビナント蛋白のアミノ酸分析の結果を、表 14 に示した。また、エドマン法によるアミノ酸シーケンスにより、N34S、R67C の変異を有する PSTI 蛋白であること、野生型 PSTI 蛋白であることを確認した。

表 13 リコンビナント蛋白の濃度

	RIA 法	HPLC	アミノ酸解析
	conc. (μ g/ml)	conc. (μ g/ml)	conc. (μ g/ml)
WT	881.7	970	981
N34S	733.5	800	844
R67C	測定不能	410	365

WT; wild type、野生型。

表 14 変異リコンビナント蛋白のアミノ酸分析

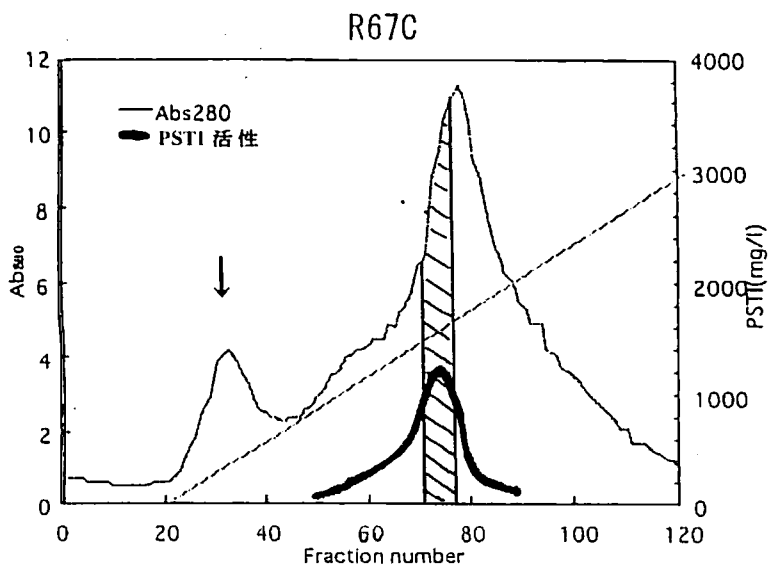
Amino acid	野生型	N34S	R67C
Asp	7.8 (8)	6.9 (7)	7.9 (8)
Thr	3.5 (4)	3.6 (4)	3.5 (4)
Ser	2.3 (3)	3.1 (4)	2.3 (3)
Glu	6.0 (6)	6.1 (6)	6.4 (6)
Pro	2.7 (3)	2.7 (3)	2.6 (3)
Gly	5.0 (5)	5.0 (5)	5.3 (5)
Ala	0.9 (1)	1.0 (1)	0.9 (1)
1/2Cys	5.5 (6)	5.4 (6)	6.9 (7)
Val	1.9 (2)	1.9 (2)	1.9 (2)
Met	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Ile	2.8 (3)	2.8 (3)	2.8 (3)
Leu	4.0 (4)	4.0 (4)	4.0 (4)
Tyr	1.7 (3)	1.8 (3)	1.4 (3)
Phe	1.0 (1)	1.0 (1)	1.1 (1)
Lys	3.8 (4)	3.7 (4)	3.8 (4)
His	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Trp	0.0 (0)	0.0 (0)	0.0 (0)
Arg	2.8 (3)	2.8 (3)	1.8 (2)
Total	56	56	56

4-4. 小活

肺炎患者の *PSTI* 遺伝子変異に基づき、3種類のリコンビナント *PSTI* を作成した（野生型、N34S、R67C）。本実験における1つの問題点は、このR67C蛋白でシステイン残基が1つ加わるため、システイン残基数が6から7へと増加することから、新たな分子内 s-s 結合や分子間の s-s 結合の形成により、高次構造が変化していくつかのアイソフォーム生成される可能性がある。そのため、R67C を作成した酵母の培養上清中には野生型 *PSTI*、N34S *PSTI* と比して、数多くの HPLC 上のピークを生じた（図 14）。今回の解析はそのうちの1つのピークのみを精製した。また、R67C は RIA で測定できないため、R67C の精製はトリプシ

ン阻害活性をマーカーとして行った。そのために、活性の保たれた R67C アイソタイプのみが精製された可能性がある。

Cation Exchange Chromatography



Reversed Phase-HPLC

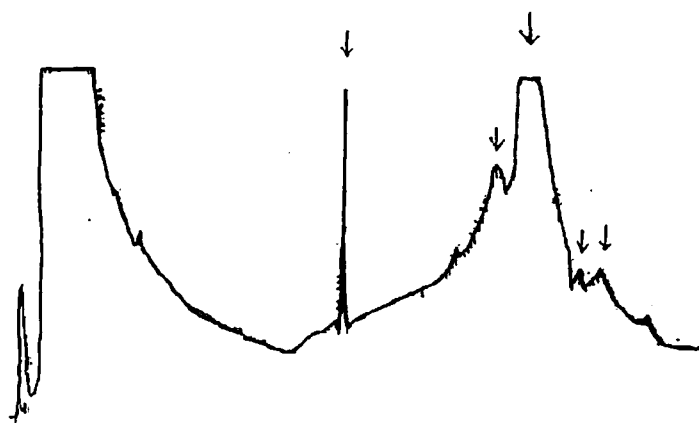


図 14. R67C 蛋白精製過程における Cation Exchange Chromatography (SP-Sepharose FF) 及び RP-HPLC 上の吸光度パターン

第 5 章

N34S 変異 PSTI のトリプシン阻害活性の酵素反応学的解析

5-1. 序論

第 4 章に記載した方法で作成した N34S リコンビナント PSTI 蛋白と野生型リコンビナント PSTI 蛋白を用いてトリプシン活性に対する阻害活性についての解析を行った。

5-2. 方法

1) トリプシン阻害活性の測定

トリプシン阻害活性は、トリプシンとリコンビナント PSTI とを混合させたあとの残ったトリプシン活性を測定することで、分析した。バッファーとして、0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)、0.02 M CaCl₂、0.01% Triton X-100 を使用し、基質としては benzoyl-L-Arginine p-nitroanilide hydrochloride (L-BAPA) を使用した。37°C で 10 分間インキュベートした後に、500 μl の 30% 酢酸を加え反応を止め、410 nm で吸光度を測定した。pH が変化した場合のトリプシン阻害活性の違いをみるために、pH 5.0-6.0 の条件では、0.1M MES buffer を使用し、pH 7.0-8.0 では 0.1 M Tris buffer、pH 9.0 では 0.1M CHES buffer を使用して同様の解析を行った。また、Ca²⁺存在下または非存在下での反応の違いをみるため、0.02 M CaCl₂ または 0.01 M EDTA 存在下で同様の実験を行った。またトリプシンはウシとヒトの 2 種類を使用した。

2) PSTI のトリプシンに対する安定性の解析

終濃度が PSTI:トリプシン=2 μM:1 μM となるように 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)、0.02

M CaCl_2 , 0.01% Triton X-100 Buffer を用いてトリプシンと PSTI の mixture を作製し、120 時間後まで時間ごとに 20 μl を取り出し、L-BAPA と混合し、10 分間反応させ、30% 酢酸にて反応を止め、410 nm にて吸光度を測定した。

5-3. 結果

1) リコンビナント蛋白のトリプシン阻害活性の解析

野生型と N34S の 2 種類についてヒトトリプシンに対する阻害活性を調べたところ、図 15 に示すように 2 つとも同程度の活性を有していた。またウシトリプシンにも反応させたが、図 16 に示すように 2 つとも同程度の活性を有していた。また、PSTI との反応の条件を pH を 5 から 9 まで 1.0 きざみで変えて解析を行ったが、野生型と比較して活性の低下は認めなかった。また Ca の存在下、非存在下のいずれにおいても 2 つの分子型の間には差異は認めなかった (図 17、18)。

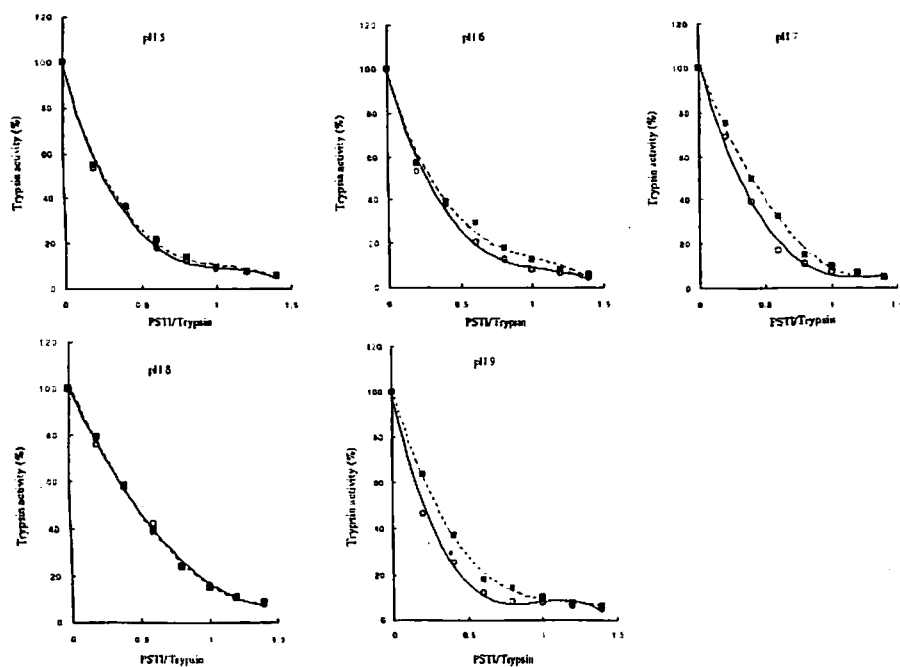


図 15. ヒトトリプシンに対するリコンビナント PSTI の阻害活性

Open circles with solid line: 野生型、closed squares with dotted line: N34S

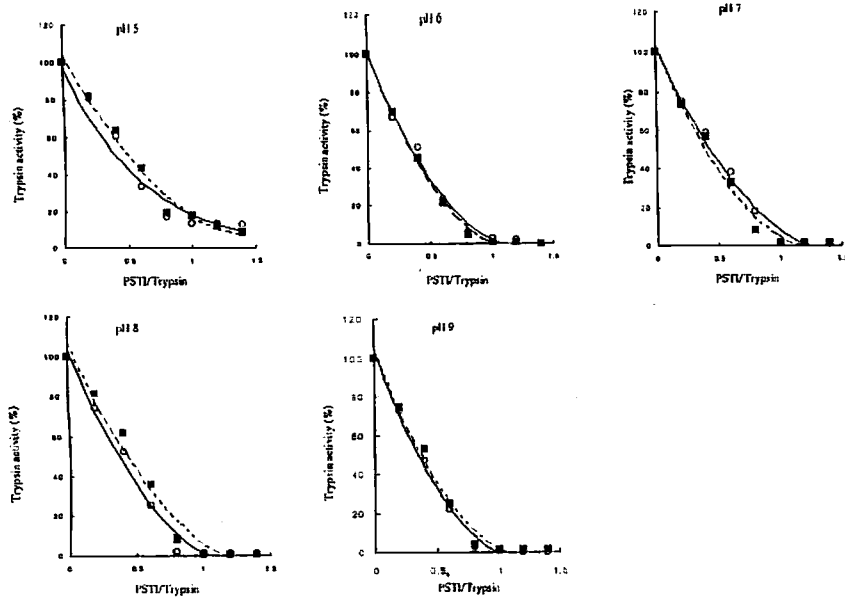


図 16. ウシトリプシンに対するリコンビナント PSTI の阻害活性
 Open circles with solid line: 野生型、closed squares with dotted line: N34S

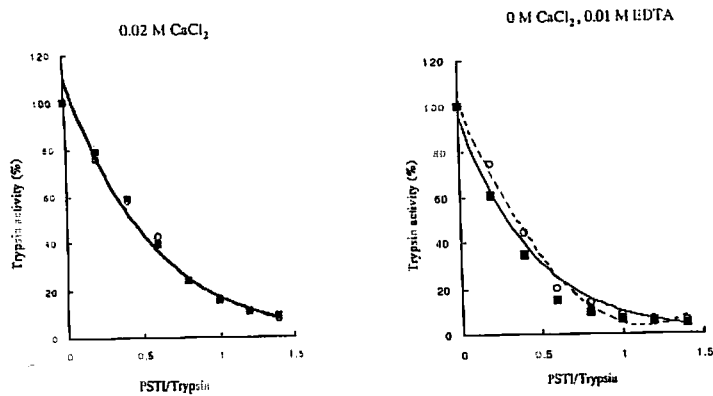


図 17. ヒトトリプシンに対するリコンビナント PSTI の阻害活性(Ca 濃度の影響の解析)
 Open circles with solid line: 野生型、closed squares with dotted line: N34S

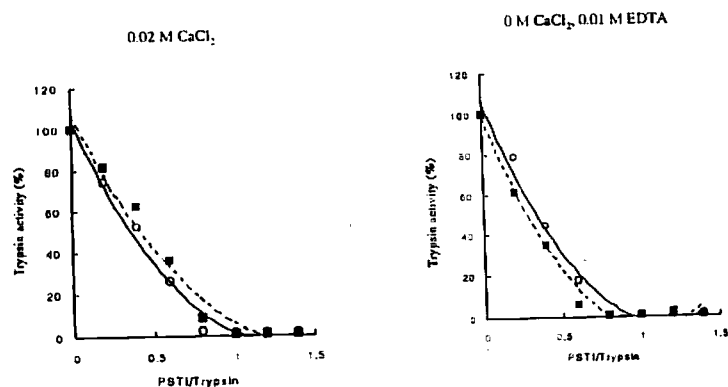


図 18. ウシトリプシンに対するリコンビナント PSTI の阻害活性(Ca 濃度の影響の解析)

Open circles with solid line: 野生型、closed squares with dotted line: N34S

2) PSTI のトリプシンに対する安定性の解析

N34SPSTI のウシおよびヒトトリプシンに対する阻害活性は野生型 PSTI と何ら変わりなかった。そこで、PSTI とトリプシンとを反応基質を混合する前にブレインキュベーションし、PSTI の活性がどれくらいの間保たれているか、すなわち PSTI のトリプシンに対する安定性をみた。N34S は野生型と安定性に差異を認めなかった (図 19) 。

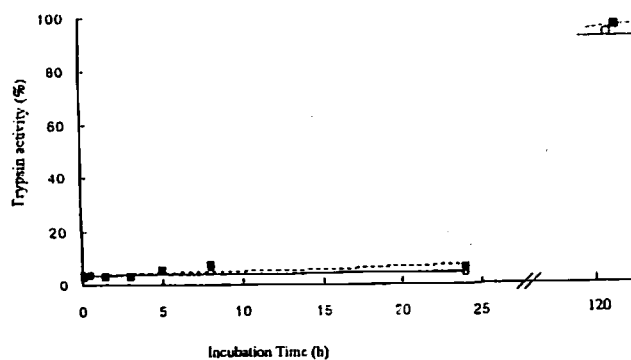


図 19. リコンビナント PSTI のヒトトリプシンに対する安定性の解析

5-4.小活

今回の実験で、N34S PSTI 蛋白はトリプシンに対する阻害活性の低下を認めなかった。このことから、アミノ酸変異によるもの以外の原因がこの変異の膵炎発症の原因になっている可能性が示唆された。N34S 変異は常にイントロンの変異である IVS1-37T>C と IVS3-69insTTTT と共存していることから、これらのイントロンの変異がスプライシングの異常を引き起こす可能性が考えられる。

第 6 章

N34S 変異 PSTI のトリプシンとのアフィニティーの解析

6-1. 序論

第 5 章で述べたように、酵素反応学的に N34S 蛋白と野生型蛋白との違いを証明することはできなかった。そこで、surface-plasmon-resonance (SPR) biosensor を用いて、N34S 蛋白、及び野生型蛋白のトリプシンへのアフィニティーを解析した。

6-2. 方法

SPR biosensor 用いて、2 つの物質間のアフィニティーの解析を行うことができる。この機械には、センサーチップ、マイクロ流路系、SPR 光学検出系の 3 つの装置がある。まず、このセンサーチップに相互作用を測定する分子のうちで、どちらか一方の分子を固定化をする。そして、このセンサーチップを機械にセットし、マイクロ流路系から正確な量のもう一方の分子溶液を流すと、センサーチップのフローセル部分にもう一方の分子が流れ、センサーチップに固定化していた分子に結合する。SPR 検出系とは、表面プラズモンが金属/液体界面で励起した場合に起こる、いわゆる表面プラズモン共鳴の光学現象を利用したもので、2 分子間の結合と解離に伴って、センサーチップ表面で生じる微量な質量変化を検出することができ、それをセンサーグラムとして表すことができる。この機械を用いて、今回、トリプシンとリコンビナント PSTI とのアフィニティー解析をおこなった。

まず、アミンカップリング法を用いて、センサーチップにトリプシンを固定化した。100 nM の N34S PSTI および野生型 PSTI をそれぞれ流し、アフィニティーを解析した。

6-3. 結果

図 20 に示すようにセンサーグラム上では、N34S PSTI と野生型 PSTI とでヒトトリプシンに対するアフィニティーに大きな違いを認めなかったが、結合および解離定数を算出すると、表 15 に示すように、野生型の KD 値が 2.8×10^{-7} 、N34S PSTI の KD 値が 7.1×10^{-8} と N34S PSTI のほうで若干アフィニティーが強い傾向がみられた。また、同様にウシトリプシンに対しても同様の結果であった (図 21、表 16)。

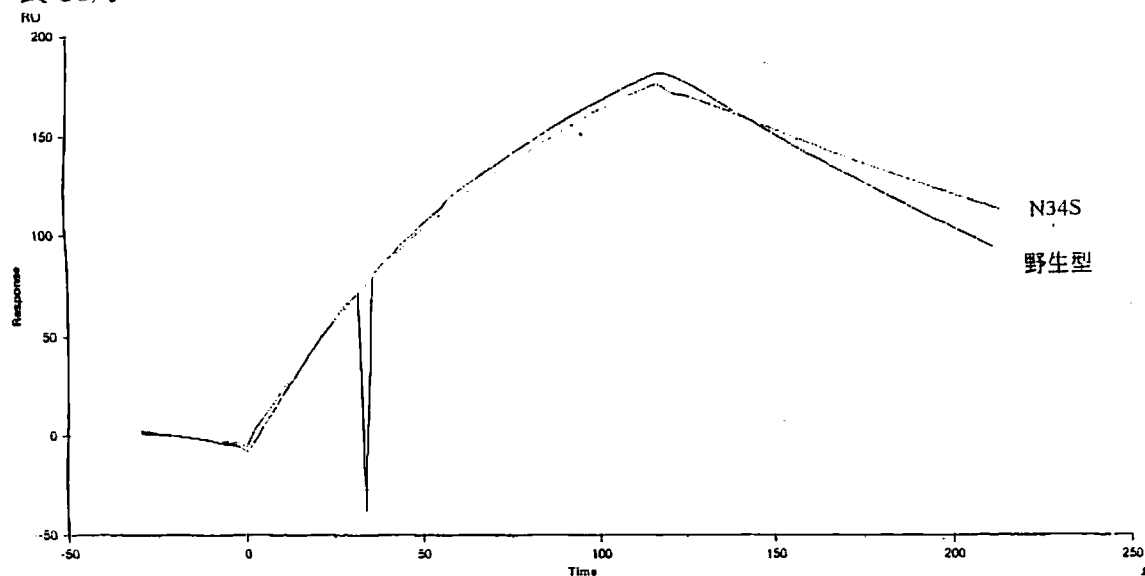


図 20. ヒトトリプシンに対するリコンビナント PSTI のアフィニティー解析

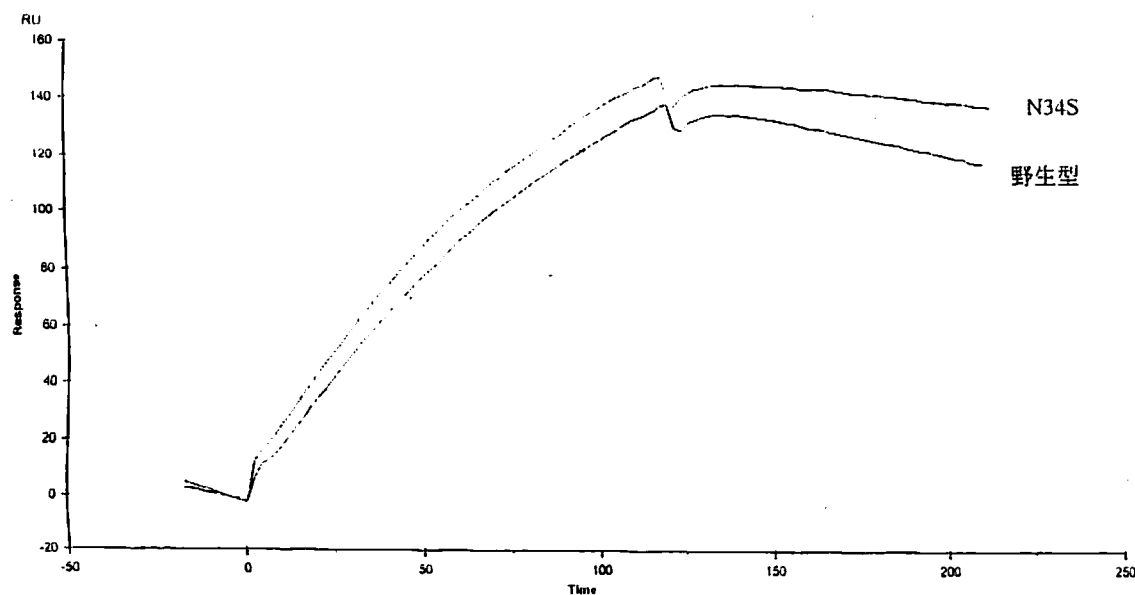


図 21. ウシトリプシンに対するリコンビナント PSTI のアフィニティー解析

表 15. ヒトトリプシンに対するリコンビナント PSTI の結合及び解離定数

	Ka (1/Ms)	Kd (1/S)	Rmax (RU)	KA (1/M)	KD (M)
WT	2.6×10^4	7.3×10^{-3}	1040	3.6×10^6	2.8×10^{-7}
N34S	6.6×10^4	4.7×10^{-3}	416	1.4×10^7	7.1×10^{-8}

WT: wild type、野生型。

表 16. ウシトリプシンに対するリコンビナント PSTI の結合及び解離定数

	Ka (1/Ms)	Kd (1/S)	Rmax (RU)	KA (1/M)	KD (M)
WT	7.6×10^4	1.9×10^{-3}	255	4.0×10^7	2.5×10^{-8}
N34S	1.0×10^5	5.8×10^{-4}	212	1.8×10^8	5.6×10^{-9}

WT: wild type、野生型。

6-4. 小活

酵素学的解析の結果と同様に N34S PSTI のトリプシンに対する結合能は保たれていた。第 5 章および本章の結果は、N34S 変異において、アミノ酸の置換による影響よりむしろイントロンの変異によるスプライシングの異常が、膵炎発症の原因である可能性を示唆する。

第 7 章

R67C 変異 PSTI の活性解析

7-1. 序論

各国の膵炎患者における *PSTI* 遺伝子解析の結果から、N34S 変異が膵炎発症の危険因子であることはほぼ確定的といえる。しかし、R67C 変異に関しては、本邦の 2 症例のみの報告しかない。しかし、健常ボランティアにおいては全く認められていないことから、膵炎の関連変異である可能性は十分あり、また、本邦特有のものである可能性もある。そこで、第 4 章で述べたように R67C リコンビナント蛋白を作製し活性について解析をおこなった。

7-2. 方法

R67C 蛋白の作製は第 4 章で述べた方法で行い、酵素反応学的解析は第 5 章で述べた方法を用いた。また、トリプシンとの結合能の解析については、第 6 章で述べた SPR biosensor を用いておこなった。

7-3. 結果

酵素反応学的解析の結果、野生型と R67C 蛋白との間で、ヒトトリプシンに対する活性阻害能に明らかな違いを認めなかった (図 22)。また、ウシトリプシンに対しても同様であった (図 23)。また、pH や Ca^{++} 濃度による影響もなかった (data not shown)。また、SPR biosensor を用いたトリプシンとのアフィニティーの解析においても野生型と R67C 蛋白との間に明らかな差を認めなかった (図 24、25、表 17、18)。

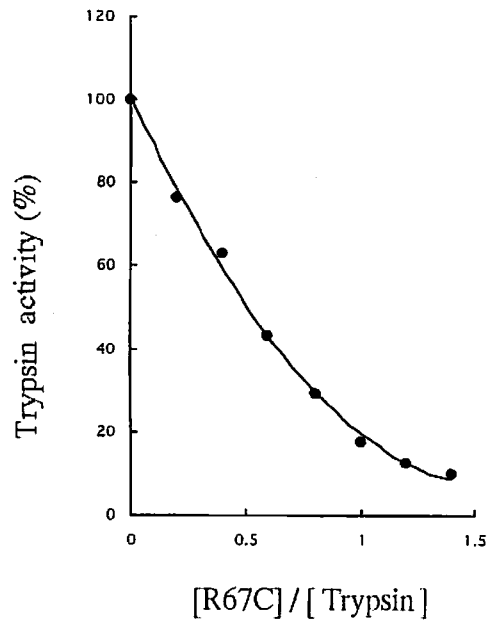
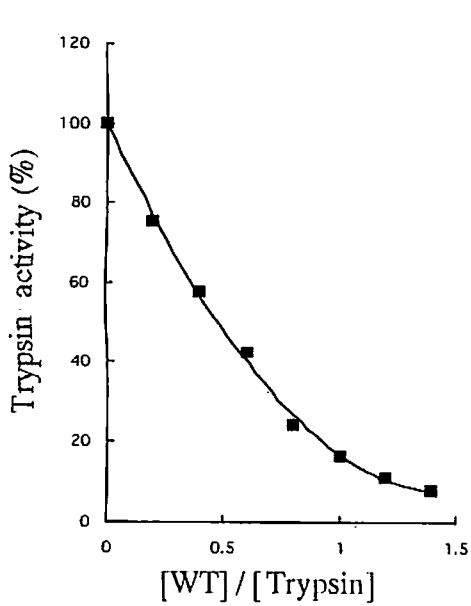


図 22. ヒトトリプシンに対するリコンビナント PSTI の阻害活性(pH8 の条件下で)

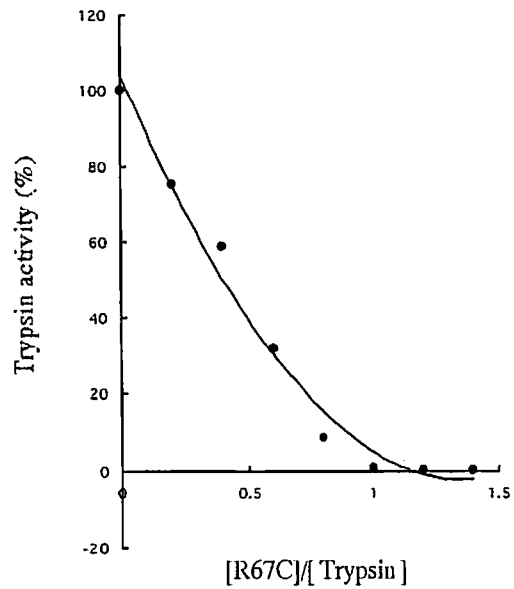
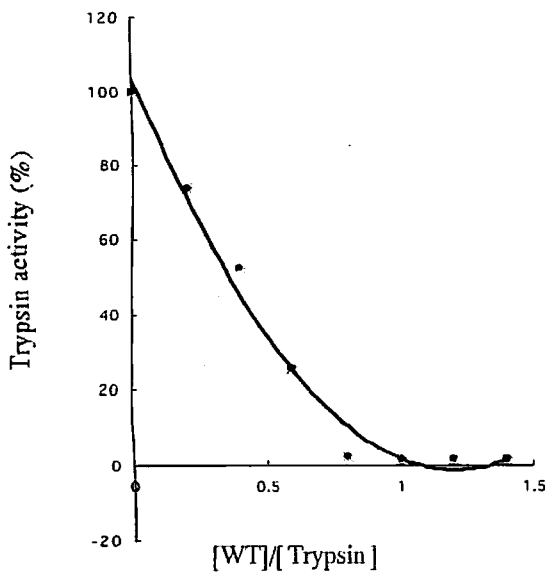


図 23. ウシトリプシンに対するリコンビナント PSTI の阻害活性(pH8 の条件下で)

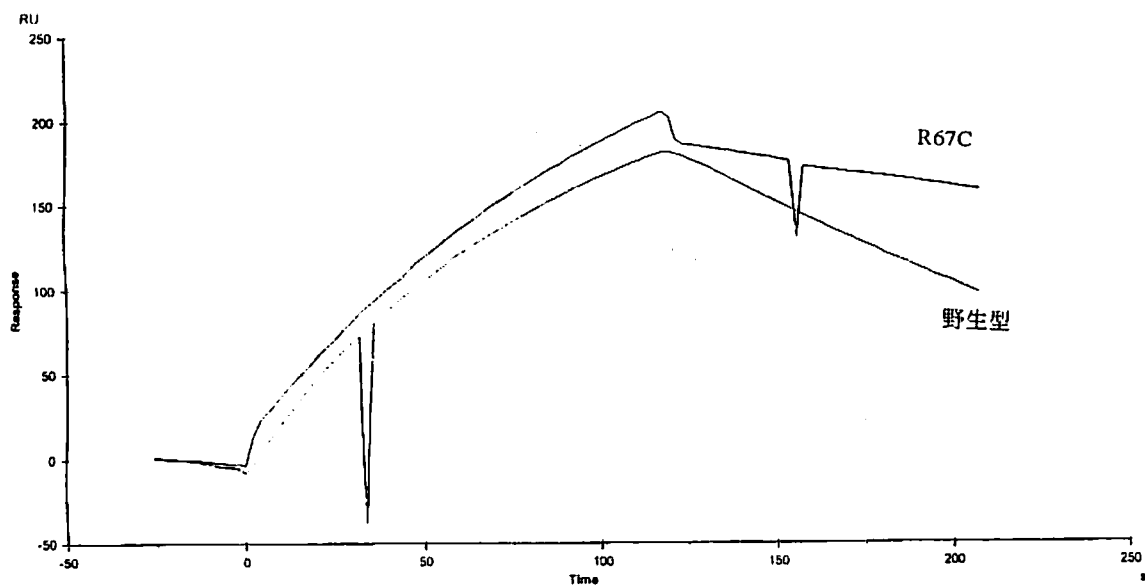


図 24. ヒトトリプシンに対するリコンビナント PSTI のアフィニティーの解析

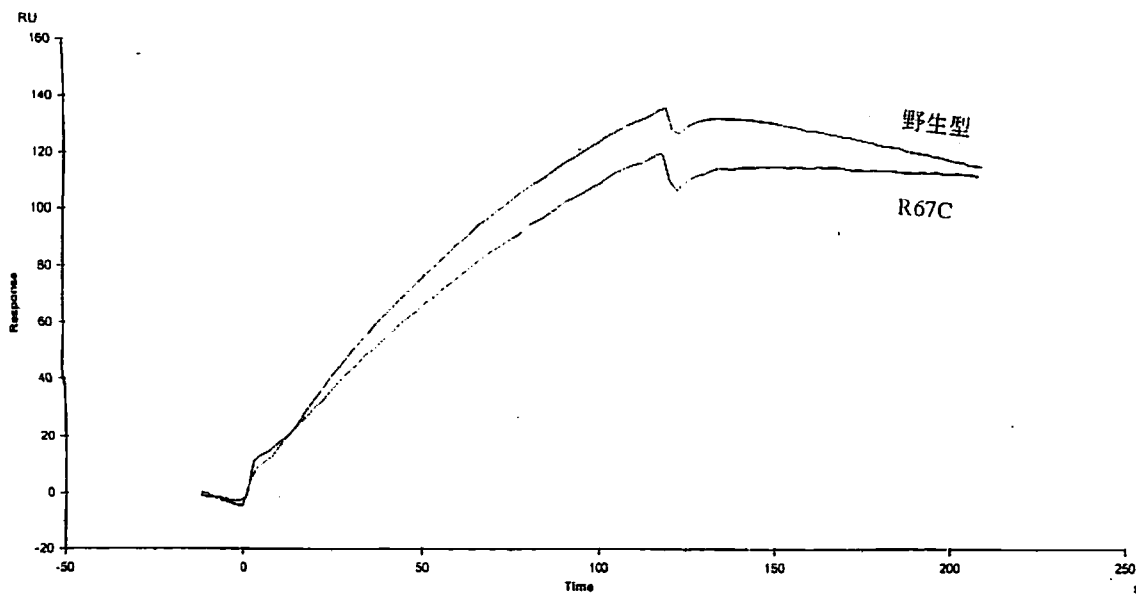


図 25. ウシトリプシンに対するリコンビナント PSTI のアフィニティーの解析

表 17. ヒトトリプシンに対するリコンビナント PSTI の結合及び解離定数

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	Rmax (RU)	KA (1/M)	KD (M)
WT	2.6×10^4	7.3×10^{-3}	1040	3.6×10^6	2.8×10^{-7}
R67C	6.6×10^4	2.1×10^{-3}	388	3.2×10^7	3.1×10^{-8}

WT: wild type、野生型。

表 18. ウシトリプシンに対するリコンビナント PSTI の結合及び解離定数

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	Rmax (RU)	KA (1/M)	KD (M)
WT	7.6×10^4	1.9×10^{-3}	255	4.0×10^7	2.5×10^{-8}
R67C	6.6×10^4	3.7×10^{-4}	219	1.8×10^8	5.6×10^{-9}

WT: wild type、野生型。

7-4. 小活

今回の実験では R67C 変異体においてトリプシン阻害活性の低下は認めなかった。しかし、この結果だけでは肺炎とこの変異との関連を否定することはできない。R67C リコンビナント蛋白は、抗野生型 PSTI 抗体との反応性が著しく低下していたことから、R67C リコンビナント蛋白は、その高次構造が大きく変化しているものと考えられる。また、今回の精製系では、トリプシン機能の阻害活性を指標として R67C リコンビナント蛋白を精製したため、精製蛋白がトリプシン阻害活性を保持していたことは当然とも考えられる。R67C 変異に伴うシステイン残基の 6 から 7 への増加によって多くの分子型が産生されると考えられるが、これらのアイソタイプのうちの一つを解析したにすぎないと言える (表 19)。実際、精製過程で行った HPLC 上には、多くの移動度の異なったピークが出現していることからこの可能性が示唆される。その他、1) 変異蛋白の存在が、小胞体ストレスとなって、腺房細胞にアポトーシスを誘導する、2) トランスクリプションの異常をきたす、3) 細胞外へのトランスポートの異常を生じている、などの可能性についても、検討する必要がある。

表 19. R67C 変異蛋白の予想される分子型

1. PSTI- ⁶⁷ Cys -SH	
2. PSTI- ⁶⁷ Cys -S-S- ⁶⁷ Cys -PSTI	: ホモダイマー
3. PSTI- ⁶⁷ Cys -S-S-蛋白	: 他の蛋白 (アルブミンなど) との混合 ジスルフィド形成
4. PSTI- ⁶⁷ Cys -S-S- X	: 低分子チオール (グルタチオンなど) との 混合ジスルフィド形成
5. PSTI- ⁶⁷ Cys -SO _x	
6. PSTI- ⁶⁷ Cys -S-X	
7. $\begin{array}{c} \text{S} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{PSTI-}^{67}\text{Cys-S} \\ \\ \text{SH} \end{array}$: 分子内 S-S 結合の再構成

第 8 章

全体を通しての考察

8-1. N34S 変異と膵炎発症との関連性について

N34S 変異は、非膵炎における頻度が 0.7%であるのに対し、膵炎患者では 9.7%と高率であり、膵炎発症に関与していると考えられる（第 3 章、表 11）。しかし、リコンビナント蛋白を用いた活性解析では、野生型と同様の活性を有しており、アミノ酸置換が PSTI の機能低下の原因でない可能性が示唆された。N34S に必ず共存しているイントロンの変異である IVS1-37T>C または IVS3-37insTTTT のいずれかが mRNA のスプライシングの異常を惹起する可能性もあり、今後さらなる解明が必要である。

Witt らの報告²⁰⁾で算出された、N34S homozygotes の膵炎発症率を下に示す。

特発性慢性膵炎患者の頻度：1/16,000

特発性慢性膵炎患者における N34S homozygote の頻度：10%

特発性慢性膵炎患者でかつ N34S homozygote である頻度：1/160,000

健常人における N34S homozygote の頻度：1/40,000

N34S homozygotes の膵炎発症率：25%

本邦（今回の研究）より算出した N34S homozygotes の膵炎発症率を下に示す。

特発性慢性膵炎患者の頻度：1/12,500

特発性慢性膵炎患者における N34S homozygote の頻度：4%

特発性慢性膵炎患者でかつ N34S homozygote である頻度：1/312,500

健常人における N34S homozygote の頻度：1/80,000

N34S homozygotes の膵炎発症率：25%

N34S homozygotes における膵炎発症率を計算すると、欧米および本邦においても、約 25%と非常に近い値となった。このことは N34S 変異の存在が 100%膵炎の発症に結びつく訳ではないが、易膵炎発症形質が発現されるといえる。

カチオニックトリプシノーゲンの遺伝子変異が dominant trait で発症するということは、カチオニックトリプシノーゲンの autoactivation と PSTI function とのバランスは、正常状態ではおそらく PSTI function の方がある程度は大きいものの、大きな差（余裕）がないために、カチオニックトリプシノーゲンの autoactivation の亢進や PSTI 活性の低下の影響によって、膵炎の易発症形質が発現されるものと考えられる。PSTI N34S homozygotes における高い膵炎発症率は、膵炎発症への閾値が homozygous な N34S (IVS1-73T>C+N34S+IVS3-69insTTTT)変異によって大きく低下していることを意味する。すなわち、PSTI 蛋白の機能低下の程度によって膵炎の発症のしやすさが決まると考えられる。

8-2. R67C 変異と膵炎発症との関連性について

R67C 変異は、これまで、膵炎患者 2 症例の報告しかなく、非膵炎での頻度が 0%であるのに対し、膵炎患者での頻度は 1.9%である。これのみをもって膵炎との関連を断定することはできない。リコンビナント蛋白を用いた活性解析では、野生型と同様の活性を有していた。しかし、今回の蛋白精製法ではトリプシン阻害活性を有するアイソタイプしか精製されていない。この結果だけでは膵炎とこの変異との関連を否定することはできない。1)R67C では、トリプシン阻害活性が低下した アイソタイプを精製できていない、2)もっと sensitive に活性の低下を感知できる実験系では差異がある、3)変異蛋白の存在が、小胞体ストレスとなって、腺房細胞にアポトーシスを誘導する、4)トランスクリプションの異常をきたす、5)細胞外へのトランスポートの異常を生じている、などの可能性について、検討する必要がある。

参考文献

- (1) Anderson RJ, Dyer PA, Donnai D, Klouda PT, Jennison R, Braganza JM. Chronic pancreatitis, HLA and autoimmunity. *Int J pancreatol* 3, 83-90, 1988.
- (2) Homma T, Aizawa T, Nagata A, Oguchi H. HLA antigens in chronic idiopathic pancreatitis compared with chronic alcoholic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 26, 449-452, 1981.
- (3) Whitcomb DC, Gorry MC, Preston RA, Furey W, Sossenheimer MJ, Ulrich CD, Martin SP, Gates LK Jr, Aman ST, Tosekes PP, Liddle R, Mcgrath K, Uomo G, Post JC, Ehrlich GD. Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nature Genet* 14, 141-145, 1996.
- (4) Whitcomb DC, Preston RA, Aston CE. A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35. *Gastroenterology* 110, 1975-1980, 1996.
- (5) Bodic LL, Bignon JD, Reguenes O. The hereditary pancreatitis gene maps to long arm of chromosome 7. *Hum Molec Genet* 5, 549-554, 1996.
- (6) Rowen L, Koop BF, Hood L : The complete 68-kilobase DNA sequence of the human β T cell receptor locus. *Science* 272 : 1755-1762, 1996.
- (7) Gorry MC, Gabbai D, Furey W. Mutations in the cationic trypsinogen gene are associated with recurrent acute and chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 113, 1063-1068, 1997.
- (8) Heiko W, Werner L, Michael B. A signal peptide cleavage site mutation in the cationic trypsinogen gene is strongly associated with chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 117, 7-10, 1999.
- (9) Niels T, Johann O, Volker K. Chronic pancreatitis associated with activation peptide mutation that facilitates trypsin activation. *Gastroenterology* 119, 461-465, 2000.
- (10) Nishimori I, Kamakura M, Fujikawa-Adachi K, Ogawa M. Mutation in exon 2 and 3 of the cationic trypsinogen gene in Japanese families with hereditary pancreatitis. *Gut* 44, 259-263, 1999.
- (11) Varallyay E, Pal G, Patthy A, Szilagyi L, Graf L. Two mutations in rat trypsin confer resistance against autolysis. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 56-60, 1998.
- (12) Sahin-Toth M, Graf L, Toth M. Trypsinogen stabilization by mutation Arg117→His: a unifying pathomechanism for hereditary pancreatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 505-508, 1999.

- (13) Sahin-Toth M. Hereditary pancreatitis-associated mutation Asn (21) →Ile stabilizes rat trypsinogen *in vitro*. *J Biol Chem* 274, 29699-29704, 1999.
- (14) Kunitz M, Northrop IH. Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. *J Gen Physiol* 19, 991-1007, 1936.
- (15) Kassel B, Radicevic M, Ansfield MJ, Laskowski M. The basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. IV. The linear sequence of the 58 amino acids. *Biochem Biophys Res Commun* 18, 225-258, 1965.
- (16) Kazal LA, Spicer DS, Brahinski RA. Isolation of crystalline trypsin inhibitor-anti-coagulant protein from pancreas. *J Am Chem Soc* 70, 3034-3040, 1948.
- (17) Greene LJ, Bartelt DC. The structure of the bovine pancreatic secretory trypsin-inhibitor-Kazal's inhibitor. *J Biol Chem* 244, 2646-2657, 1969.
- (18) Green LJ, Publos MH, Bartelt DC. Human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Methods Enzymol* 45, 813-825, 1976.
- (19) Bartelt DC, Shapanka R, Greene LJ. The primary structure of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor, Amino acid sequence of the reduced S-amino ethylated protein. *Arch Biochem Biophys* 179, 189-199, 1977.
- (20) Horii A, Kobayashi T, Tomita N, Yamamoto T, Fukushige S, Murotsu T, Ogawa M, Mori T, Matsubara K. Primary structure of human pancreatic secretory trypsin inhibitor (PSTI) gene. *Biochemical and biophysical research communications* 149, 635-641, 1987.
- (21) Ogawa M. Pancreatic secretory trypsin inhibitor as an acute phase reactant. *Clin Biochem* 21, 19-25, 1988.
- (22) Rinderknecht H. Pancreatic secretory enzymes. In: Go VLW, editor. *The pancreas: biology, pathobiology, and disease*. New York: Raven, 219-251, 1993.
- (23) Chou PY, Fasman GD. Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13, 222-245, 1974.
- (24) Garnier J, Gibrat JF, Robson B. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol* 266, 540-553, 1996.
- (25) Kikuchi N, Nagata K, Yoshida N, Ogawa M. The multiplicity of human pancreatic secretory trypsin inhibitor. *J Biochem* 98, 687-694, 1985.
- (26) Witt H, Luck W, Hennies HC, Claben M, Kage A, Lab U. Mutations in the encoding the serine protease inhibitor, Kazal type I are associated with chronic pancreatitis.

- Nature Genet 25, 213-216, 2000.
- (27) Chen JM, Mercier B, Audrezet MP, Ferec C. Mutational analysis of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor (*PSTI*) gene in hereditary and sporadic chronic pancreatitis. *J Med Genet* 37, 67-69, 2000.
- (28) Pfützer RH, Barmada MM, Brunskill Ap, Finch R, Hart PS. *SPINK/PSTI* polymorphisms act as disease modifiers in familial and idiopathic chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 119, 615-623, 2000.
- (29) Kuwata K, Hirota M, Sugita H, Kai M, Hayashi N, Nakamura M, Matsuura T, Adachi N, Nishimori I, Ogawa M. Genetic mutations in exon 3 and 4 of the pancreatic secretory trypsin inhibitor in patients with pancreatitis. *J Gastroenterol* 36, 612-618, 2001.
- (30) Kaneko K, Nagasaki Y, Furukawa T, Mizutamari H, Masamune A, Shimosegawa T, Horii A. Analysis of the human pancreatic secretory trypsin inhibitor (*PSTI*) gene mutations in Japanese patients with chronic pancreatitis. *J Hum Genet* 46, 193-197, 2001.
- (31) Rossi L. *SPINK1/PSTI* mutations are associated with tropical pancreatitis in Bangladesh. *Pancreatology* 1, 242-245, 2001.
- (32) Plendl H, Siebert R, Steinemann D, Grote W. High frequency of the N34S mutation in the *SPINK1* gene in chronic pancreatitis detected by a new PCR-RFLP assay. *Am J Med Genet* 100, 252-253, 2001.
- (33) Ockenga J, Dork T, Stuhmann M. Low prevalence of *SPINK1* gene mutations in adults patients with chronic idiopathic pancreatitis. *J Med Genet* 38, 243-244, 2001.