OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Novel Isoforms of Mouse Myelin Basic Protein Predominantly Expressed in Embryonic Stage
Author(s)	仲嶋, 一範
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38917
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名	仲嶋一範（なかじまかずのり）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 11243 号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学位論文名	Novel Isoforms of Mouse Myelin Basic Protein Predominantly Expressed in Embryonic Stage （胎生期に優位に発現するマウスミエリン塩基性蛋白質の新しいアイソフォーム）
論文審査委員	（主査） 教授 福田 淳 （副査） 教授 三木 直正　教授 祖父江憲治

論文内容の要旨

【目的】

ミエリン塩基性蛋白質（MBP）はミエリンの主要な構成成分の一つである。マウスMBP遺伝子は7つの主なエキソンから成り，alternative splicingにより21.5kd，18.5kd，17kd-1，17kd-2，14kdの5種の蛋白質をコードするmRNAが産生されることが知られている。これらはいずれも生後18日（P18）頃に最も盛んなミエリン形成に重要と考えられ，これまでその発現は主に生後について調べられてきた。我々は，最近我々が開発したレトロウイルスを用いたプロモーター活性測定系により，胎生期の脳細胞の一部で既にMBPプロモーターが活性化されていることを見い出したので，実際にMBP転写産物が胎生期脳に存在するかを検討しその詳細を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

1）脳初代培養系におけるレトロウイルスを用いたプロモーター活性測定系により，少なくとも胎生16日（E16）相当から，MBPプロモーターが活性化された細胞が存在することを見いだした。

2）次に，MBP-mRNAが実際に脳内に存在していることを確認するため，各ステージの脳からRNAを調製し，逆転写後PCR（RT-PCR）を行った。その結果，確かに胎生期しかもE12から，従来から知られている5種のMBPの全てがmRNAとして既に産生されていることがわかった。しかも興味深いことに，このうち17kd-2をコードするものは，P18にピークを示す他の4種（TypeⅠと命名した）と異なりむしろ胎生期（E15-18）にピークを持つことが明らかになった。同様な挙動を示すアイソフォームが他に3種検出されたため，これらのクローニングを試みた。

3）E16脳のRNAからRT-PCRを行い，プラスミドに挿入後，目的の断片を持ったクローンをdot-blot法によってスクリーニングし塩基配列を決定した。その結果，エキソン1-2-3-4-6-7，エキソン1-3-4-7の構造を持つアイソフォームを新たに見い出した。第4エキソン－第6エキソン結合部，第4エキソン－第7エキソン結合部に特異的なプローブで解析した結果，これらはE15-18にピークを持つアイソフォームのうちの2種と判明し，残りの一種はエキソン1-2-3-4-7の構造を持つものと考えられた。これら胎生期にピークを持つもの（17kd-2を含めTypeⅡと命名した）は，いずれも従来から知られている他の4種のアイソフォーム（TypeⅠ）からそれぞれ第5エキソンの領域を欠失したものであった。

4）他にP8にピークを持つアイソフォームも2種検出され，別の一群を形成するものと考えられた（TypeⅢとした）。

5）E15-18にピークを持つTypeⅡのアイソフォームと，この時期におこる未分化オリゴデンドロサイト（ODC）の

分化・増殖との関係の有無を調べるため，P 18 でも殆どの ODC が未分化であることが知られているジンピーマウスで同様の解析を行った。その結果，P 18 では正常マウスでは TypeⅡアイソフォームは著減するが，ジンピーマウスではかなり残っていることがわかり，TypeⅡは未分化 ODC と関係があることが示唆された。

6）次に，TypeⅡアイソフォームが ODC の細胞系譜の細胞そのもので産生されているか，または未分化 ODC の分化・増殖に影響を与える別の細胞で産生されているのかを調べるため，ODC のマーカーである GalC 陽性及び陰性の細胞を FACS で分離し，同様に解析した。その結果，TypeⅠ，TypeⅡのいずれも GalC 陽性の細胞で主に産生されていることがわかった。以上より，TypeⅡは ODC 及びその前駆細胞そのもので産生されていることが示唆された。

7）MBP-mRNA は，脳での以上の10種の他に成体坐骨神経等で更に 8 種認められ，少なくとも 18 種存在することがわかった。

【総括】

MBP 遺伝子は胎生期の脳で既に発現していることを見い出し，しかもその時期の優位なアイソフォームは第 5 エキソンの領域を欠損したもの（TypeⅡ）であることを明らかにした。これら TypeⅡアイソフォームは，ジンピーマウスや FACS を用いた解析から，ODC 及びその前駆細胞で発現していることが示唆された。第 5 エキソンは，各種キナーゼのリン酸化部位や，ミエリンのコンパクションに重要な唯一のメチル化アルギニン部位を含む他，糖鎖結合部位，脳炎起因領域とも関係があり，TypeⅡアイソフォームはTypeⅠとはその機能が全く異なるものと考えられる。また，MBP はこれまで 5 種の主なアイソフォームが知られていたが，mRNA レベルで少なくとも 18 種存在することも見い出した。MBP は従って，発生期の中枢神経系において従来知られていたよりはるかに複雑な制御を受け，種々の機能を担っている事が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は，レトロウイルスを用いた独自の新しいプロモーター活性測定系により，マウスミエリン塩基性蛋白質（MBP）の 1.3-kb のプロモーター領域が，MBP 遺伝子のオリゴデンドロサイト特異的な発現に十分であることを示した。また，従来生後にしか産生されないと考えられていた MBP の遺伝子が，ミエリン形成細胞の全く無い胎生期に既に発現していることを明らかにした。更に，胎生期に主として産生される複数の新しいアイソフォームを見いだすことにも成功した。これらがいずれも第 5 エキソンの領域を欠失していることから，幼若期特異的なスプライシングの存在を明らかにし，更にミエリン形成障害マウスや FACS を用いた解析により，これらを産生しているのはオリゴデンドロサイトの前駆細胞であることを示唆した。MBP には他にも多くの未知のアイソフォームが存在することも見いだし，mRNA レベルで少なくとも 18 種存在することを明らかにした。

MBP は従来，生後のミエリン形成に関わる分子として確認されてきたが，本研究により，胎生期にはミエリン形成と直接関係のない未知の機能を担っていることが示唆された。胎生期に主として産生されるアイソフォームが，代謝的に極めて重要な領域と考えられている第 5 エキソンの領域を共通して欠失していることから，機能発現の制御機構についても生後に主として産生されるアイソフォームとは異なっていることが示唆される。本研究は，胎生期神経系における MBP の機能及びその制御機構に関する研究の進展に大きく寄与したので，学位論文に値するものと評価される。