

Title	Novel Isoforms of Mouse Myelin Basic Protein Predominantly Expressed in Embryonic Stage
Author(s)	仲嶋, 一範
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38917">https://hdl.handle.net/11094/38917</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	なか じま かず のり 仲 嶋 一 範
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 1 2 4 3 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 (P 18) 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 (E 16) 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 E 12 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 をコードするのは, P 18 にピークを示す他の 4 種 (Type I と命名した) と異なりむしろ胎生期 (E 15-18) 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) E 16 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 E 15-18 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 Type II 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 (Type I) からそれぞれ第 5 エキシソンの領域を欠失したものであった。

4) 他に P 8 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 (Type III とした)。

5) E 15-18 にピークを持つ Type II 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、P18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、P18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出した。MBPは従って、発生期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出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。