



Title	A Novel Gene That is Induced by Demethylation Reagent. Isolation and Expression of the Gene, and Localization of the Encoded Protein.
Author(s)	青砥, 宏
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39924
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	青 砥 宏
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 3 2 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 8 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物化学専攻
学 位 論 文 名	A Novel Gene That is Induced by Demethylation Reagent. Isolation and Expression of the Gene, and Localization of the Encoded Protein. (DNA のメチル化により影響を受ける新規な遺伝子の単離とその発現)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 畠中 寛
	(副査) 教 授 二井 將光 助教授 田嶋 正二

論 文 内 容 の 要 旨

高等動物では染色体DNAのシトシンがしばしばメチル化をうけ、このDNAのメチル化が遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしていることが知られている。DNAのメチル化が遺伝子の発現制御に果たす役割、及びその機構を調べる事を目的として、メチル化が発現調節に関与している新規な遺伝子を単離し、その構造を調べた。

マウスの中胚葉由来の株細胞である C3H10T1/2 (10T1/2) をDNAの脱メチル化剤である 5-アザシチジン (5-AzaC) で処理すると骨格筋細胞、脂肪細胞、軟骨細胞へと分化が誘導されることが知られている。5-AzaC 処理した10T1/2 細胞から cDNA ライブラリーを作成し、遺伝子を単離すれば、メチル化により発現が制御される遺伝子を単離できることが期待される。この手法によって 5-AzaC により発現の誘導される遺伝子 AZ1 の cDNA 断片を単離した。AZ1 は10T1/2 細胞を 5-AzaC 処理すると発現が上昇した。また、成体マウスの臓器では精巣で特に強い発現が認められた。精巣の cDNA ライブラリーより 3.6kb の cDNA を得、全塩基配列を決定しアミノ酸配列を推定したところ、既知の遺伝子に類似のものは存在しなかった。未分化な精原細胞しか含まないことが知られている jsd/jsd 変異マウス精巣では、AZ1 mRNA の発現が認められないことから、AZ1 は精子細胞で発現していることが示された。精子細胞の分化段階を調べたところ減数分裂の起きる pachytene 期において発現が誘導され、以降高い発現を示した。

AZ1 蛋白質に対する特異抗体を作成し、精巣におけるAZ1 タンパク質の局在を組織染色により調べたところ、AZ1 蛋白質は elongated 精子細胞の特にアクロソーム前駆体領域に局在した。AZ1 蛋白質の局在をさらに免疫電顕により観察したところ、AZ1 蛋白質はアクロソーム前駆体の内側に存在する像が観察された。分化初期の精子細胞のアクロソーム前駆体にはAZ1 蛋白質は均一に分布するが、精子細胞が成熟するに従いアクロソーム内側のトランクス側の膜付近に並んで濃縮されてくる像が観察された。ほぼ分化の終了した精子細胞のアクロソームには組織染色による観察と同様免疫電顕による観察でもAZ1 蛋白質は検出できず消失していた。AZ1 蛋白質のアミノ酸配列には膜透過に必要なシグナル様配列は見当たらないことから、ゴルジ装置から形成されると考えられているアクロソーム内にどの様にしてAZ1 蛋白質が転送されるのか興味深い。

AZ1 蛋白質を培養細胞内で強制発現させると、細胞質領域に粒状に凝集して存在する像が観察される。このAZ1 蛋白質はプロテアーゼにより分解されることから培養細胞に発現させたAZ1 蛋白質は膜構造で囲まれていないことが示唆された。また、*in vitro* 転写系において粗面小胞体内へ転送されないことからAZ1 蛋白質のアクロソーム前

駆体内への移行には小胞体からゴルジ装置を経る通常の分泌蛋白質の輸送系とは異なる機構が関わっていると考えられる。

培養細胞内で AZ 1 を強制発現させると、細胞質領域に粒状に凝集して存在する像が観察されたが、その局在に関する領域を推定するために、N-末端 (76-543) または、C-末端領域 (512-922) を欠失させた変異 AZ 1 を培養細胞で発現させた。N-末端領域を欠失させた場合は全長 (1-947) の AZ 1 を発現させたときと同様の存在様式を示したが、C-末端領域を欠失させた場合には細胞質に拡散して存在する像が観察された。AZ 1 蛋白質が培養細胞内で凝集する性質には C-末端領域が必要であると考えられる。

AZ 1 遺伝子の発現制御の機構を明らかにする第一歩として、AZ 1 遺伝子のクローニングを行った。AZ 1 cDNA は染色体 DNA 上約 20kb に渡ってコードされ、25 個のエキソンと 24 個のイントロンから構成されていた。第 1 エキソンを含むプロモーター領域の塩基配列を決定し、primer extension 法により転写開始点を決定した。第 1 エキソン上流領域を chrolamphenicol acetyltransferase (CAT) 遺伝子の上流に挿入し、培養細胞を用いてプロモーター活性を調べたところ基本的なプロモーター活性は 5' 側転写開始点より -41bp という非常に短い領域に存在した。このプロモーターをメチル化したときプロモーター活性が抑制され、メチル化がこのプロモーターの調節に関与している可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

組織特異的な遺伝子が発現するためには遺伝子は脱メチル化される必要がある。青砥宏君は DNA のメチル化が遺伝子の発現制御に果たす役割と機構を明らかにすることを目的として、脱メチル化により発現が誘導される新規な遺伝子 AZ 1 を単離し構造を決定した。また、AZ 1 遺伝子はメチル化が重要な働きをするとされる減数分裂後の精子細胞で特異的に発現されることを明らかにした。本遺伝子の発見、単離は DNA のメチル化と遺伝子の発現調節について重要な貢献をするものであり、博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。