The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Cloning of a retinoic acid-induced gene, GT1, in the embryonal carcinoma cell line P19 : neuron-specific expression in the mouse brain.
Author(s)	今井, 祐二
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40878
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

【 10 】

氏　　名	今　井　祐　二（いま い ゆう じ）
博士の専攻分野の名称	博　　士（医　　学）
学 位 記 番 号	第　13286　号
学位授与年月日	平成 9 年 5 月 7 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Cloning of a retinoic acid-induced gene, GT1, in the embryonal carcinoma cell line P19 : neuron-specific expression in the mouse brain. （マウス胚性腫瘍細胞 P19 において，レチノイン酸で発現誘導される遺伝子 GT1 のクローニングとマウス脳における発現）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授　遠山　正彌 （副査） 教 授　三木　直正　　教 授　米田　悦啓

論 文 内 容 の 要 旨

〔目　的〕

神経細胞では，その分化や生存に関与する因子として神経成長因子（NGF）などいくつかのものは既に知られているが，これら既知の因子以外にも神経細胞の分化あるいは成長に関与する因子が数多く存在することが予想されている。マウス胚性腫瘍（EC）細胞 P19 は，レチノイン酸（RA）やジメチルスルホキシド（DMSO）で処理すると様々な細胞に分化することが知られている。そこで，神経細胞の分化を制御する分子機構を研究する目的で，神経細胞の分化モデルとして P19 細胞を用い，RA 誘導後発現量が変化する遺伝子をジーントラップ法で単離した。これらのうち，RA 誘導後一過性に発現誘導される遺伝子 GT1 について解析した。

〔方　法〕

ジーントラップ法：レポーター遺伝子（lacZ）および neo 耐性遺伝子を含むジーントラップベクター U2 を制限酵素 XbaI で線状化したのちエレクトロポレーション法で P19 細胞に導入し，neo 耐性クローンを選択した。得られたクローンを RA 処理し，lacZ の発現を X-gal 染色で調べた。

トラップ遺伝子の単離：トラップされた遺伝子の 5′ 側染色体 DNA をプラスミドレスキュー法で，また，トラップされた遺伝子と lacZ の融合転写産物から，トラップ遺伝子由来 cDNA の一部を lacZ をプライマーとした 5′-RACE 法でそれぞれ回収した。

In situ ハイブリダイゼーション：GT1 cDNA の一部（約500 bp）を pBluescript にサブクローニングし，DIG ラベルした cRNA プローブを作製した。ハイブリダイゼーションシグナルの検出はアルカリフォスファターゼ発色で行った。

免疫組織化学：GT1 タンパクの676～690番目に相当するペプチドを合成し，これを用いてウサギを免疫した。得られた抗血清からペプチドを用いたアフィニティークロマトグラフィーでペプチド抗体を精製した。免疫反応は一次抗体としてアフィニティー精製したペプチドを用い，FITC 標識した二次抗体で検出した。

〔成　績〕

neo耐性クローン300ケについてlacZの発現をX-gal染色で調べた結果，10クローンにlacZの発現が認められた。これら10クローンの発現パターンは，RA処理によってlacZの発現が減少するものが2つ，増大するものが3つ，変化しないものが5つであった。

RA処理によってlacZの発現が顕著に増大するクローンGT1について，ジーントラップベクター挿入先の染色体DNAおよびcDNAの一部をそれぞれプラスミドレスキュー法，5′-RACE法で回収した。回収した染色体DNAおよびcDNAの塩基配列を解析した結果，トラップベクターはGT1ゲノム遺伝子のイントロン内に挿入され，GT1ゲノム遺伝子内のsplice donorとトラップベクター内のsplice acceptorを使ってGT1-lacZ融合転写産物が生成することが明らかとなった。

回収したトラップ遺伝子の一部をプローブとして，マウス脳cDNAライブラリーから完全長のGT1 cDNAを単離した。GT1 cDNAは全長9 kbであり，1840アミノ酸からなるオープンリーディングフレームが存在した。GT1タンパクにはシグナルペプチドはなく，N-グリコシレーション部位とグリコサミノグリカン結合部位が存在した。

P19細胞におけるGT1 mRNAの発現をノーザンブロットで調べた結果，RA処理した神経系細胞での発現は未分化細胞に比べて顕著に増大していた。この増大はDMSO処理した筋肉系細胞では認められなかった。このことから，GT1 mRNAの発現誘導は神経系分化特異的であると考えられた。

ノーザンブロットにより，マウス組織および脳の発生過程におけるGT1 mRNAの発現を調べたところ，調べた組織では発現量に差はあるもののいずれにも発現が認められた。また，脳の発生過程での発現は一定であった。

マウス脳におけるGT1 mRNAの発現部位をin situハイブリダイゼーションによって調べた結果，GT1 mRNAの発現は神経細胞特異的であった。また，ペプチド抗体を用いた免疫組織化学的手法によりGT1タンパクの発現部位を調べたところ，タンパクの発現も神経細胞特異的であった。

以上のことから，GT1の発現は脳特異的ではないが，脳での発現は神経細胞特異的であることが判った。

〔総　括〕

一般的に，differentialな発現を示す遺伝子のクローニング法として，differential hybridization法やsubtraction法などが用いられてきた。近年ではdifferential display法やこれを応用した方法が開発され，容易に遺伝子をクローニングできるようになった。我々もこの系にdifferential display法を適用し，本方法がすぐれた方法であることを確認している。本研究でのジーントラップ法の成績は，neo耐性クローンの約3％が遺伝子トラップされたものであり，このうち半分がdifferentialに発現する遺伝子であった。このことは，培養細胞を使ってdiffrentialに発現する遺伝子をスクリーニングする方法としてジーントラップ法は有効な一手段となることを示唆している。

P19細胞を神経系細胞へと分化させた時に発現誘導される因子として，今回我々が見いだしたGT1タンパクはglycosaminoglycan結合部位を有しており，proteoglycan core proteinの仲間と考えられる。proteoglycanは細胞外matrix，細胞表面や細胞内分泌顆粒などに局在し，細胞接着や細胞間相互作用，migrationさらにcell proliferationなどに関与している。GT1タンパクは神経系の細胞では，神経細胞特異的に発現しており，その局在は細胞質や神経突起に認められる。このことから，GT1タンパクの機能として神経細胞の形態維持に関与していることが推察される。

論文審査の結果の要旨

本研究は神経細胞の分化や生存に関与する新規な因子を見いだすことを目的として，神経細胞の分化モデルであるP19細胞を用い，この細胞の未分化状態と神経系の細胞へ分化した状態で発現量に差のある遺伝子をスクリーニングし，その構造解析と発現局在を調べたものである。

スクリーニング法として用いたジーントラップ法は，調べた300クローンのうち5クローンで発現量に差が認められたことから，効率の良い方法であることを示している。これら5クローンのうち，神経系細胞に分化誘導した際に顕著な発現増大が認められたGT1に関してその遺伝子構造とマウス脳における発現を調べた。その結果，GT1タンパク

は1840アミノ酸からなる新規タンパクであり，その構造上の特徴から proteoglycan core protein の仲間であることが示唆された。また，マウス脳における GT1 タンパクの発現は神経細胞特異的であり，その局在が細胞質や突起で認められることから，本タンパクは神経細胞の形態維持に関与しているものと推察された。

以上のように，本研究は神経細胞の分化や生存を制御する分子機構を理解する１つの手がかりを与え得る点で学位に値するものと認める。