



Title	Transcriptional Repression by Neuronal Growth Suppressor Necdin
Author(s)	松本, 国治
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41576
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 >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	まつもとくに はる 松 本 国 治
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 1 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	Transcriptional Repression by Neuronal Growth Suppressor Necdin (ニューロン増殖抑制因子 necdin による転写抑制機構)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉川 和明 (副査) 教 授 田嶋 正二 教 授 近藤 寿人

論 文 内 容 の 要 旨

Necdin は神経系の発生分化に伴って発現誘導され、分裂終了ニューロンに特異的に発現している分子量 43 kDa の蛋白質である。既知の蛋白質との相同性や典型的なモチーフは存在しないが、necdin を分裂性細胞に強制発現させると細胞増殖が抑制される。また、necdin はウイルス由来のガン蛋白質である SV40 largeT 抗原やアデノウイルス E1A に結合し、その結合特異性はガン抑制遺伝子産物であるレチノブラストーマ蛋白質と類似している。さらに necdin はレチノブラストーマ蛋白質と同様に転写因子 E2F1 に結合する。最近では、視床下部ニューロンの発達異常を伴う遺伝病 Prader-Willi 症候群の原因候補遺伝子と考えられている。本研究では、E2F1 によって転写が促進される遺伝子 c-myc のプロモーター活性に対する necdin の作用と、その機構を調べた。

E2F1 によって活性化された c-myc の転写は necdin により抑制されることがわかった。しかし、c-myc プロモーターから E2F1 の結合配列を含む領域を欠失した変異プロモーターの活性も necdin により抑制された。したがって、necdin は E2F1 非依存性の転写抑制作用も持つことが示唆された。

Necdin が DNA 結合性の転写抑制因子ではないかと推定し、DNA 結合能および結合の塩基配列特異性を調べるため、necdin 蛋白質の発現系の構築及び精製を行った。necdin 蛋白質は大腸菌で発現させることが出来なかったため、baculovirus を利用した発現系を構築した。necdin 蛋白質は不溶性の会合体を形成しやすいため、通常の方法では精製出来なかった。そこで、高塩濃度、界面活性剤の存在下で、His tag を付加した necdin 蛋白質を Ni-キレートカラムにより精製した。得られた necdin 蛋白質は、largeT 抗原及び E2F1 に対する結合活性を持つことから、活性型として精製されたものと考えられた。

ランダム配列を含むオリゴヌクレオチドと精製した necdin 蛋白質を用いて、necdin に結合する DNA の PCR による選択的増幅を繰り返した結果、ゲルシフトアッセイにおいて複合体を形成する DNA が得られた。それらは 5'-GGG(G/A/T/C)GG(G/A)-3' を主とした長い G 残基に富んだ配列を含んでいた。このモチーフを GN box と名付けた。GN box は c-myc プロモーター内部に存在した。また、GN box を高密度に持つ SV40 プロモーターも necdin により抑制された。ゲルシフトアッセイにおいて、necdin は c-myc プロモーター及び SV40 プロモーターの

GN boxを含む領域に特異的に結合した。従って、necdin はプロモーター内部の GN box に結合することにより、転写を抑制すると考えられた。

c-myc プロモーター及び SV40 プロモーターの転写活性は 5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3'(GC box) に結合する転写因子 Sp1により上昇することが知られている。典型的な Sp1 結合配列を持つオリゴヌクレオチドを用いて、necdin の結合および Sp1 と necdin の結合競合阻害について調べたが、necdin は Sp1 結合配列には結合せず、Sp1 に対する結合競合阻害も見られなかった。これらの結果は、necdin と Sp1 は相互に類似した塩基配列を認識するものの、異なる様式で DNA に結合することを示唆した。

Necdin による GN box を含むプロモーターに対する転写抑制は、E2F1 により解除された。また、E2F1 は necdin-GN box 間の結合を阻害した。Necdin は分裂終了ニューロンにおいて高レベルに発現しており、E2F1 も分裂終了ニューロンにおいて発現が認められる。これらのことから、分裂終了ニューロンにおいて、necdin と E2F1 は相互に拮抗して機能しているものと考えられる。

Necdin は細胞増殖抑制作用を持つが、その分子機構の詳細は明らかではなかった。本研究では精製した necdin 蛋白質を用いて、necdin は塩基配列特異的 DNA 結合能を持った転写抑制因子であることを明らかにした。c-myc 遺伝子のプロモーター領域には E2F結合配列と necdin 結合配列 (GN box) の両者が存在する。Necdin 蛋白質は E2F1 に直接結合して E2F1 による c-myc 遺伝子の転写を抑制するのみならず、GN box を介して E2F1 非依存的に転写活性を抑制することが明らかになった。Necdin の発現は神経系の発生分化に伴って上昇し、c-myc の発現は低下する。従って、necdin は細胞周期促進因子として知られる c-myc の転写を二重の機構で抑制することによって、ニューロンを G0 期に停止させておく作用を持つことが推定される。

論文審査の結果の要旨

本論文は、神経細胞で発現している細胞分裂抑制蛋白質 necdin が特異的な DNA 配列を認識する転写抑制因子であることを記述したものである。融合 necdin 蛋白質は GGGNGGG (Nは ATGC のいずれか) が複数個連なった配列に特異的に結合し、この配列を含む遺伝子のプロモーター活性は necdin によって抑制されることが判明した。本論文は、necdin の新たな作用機構を明らかにしたものであり、博士 (理学) の学位論文として十分価値のあるものと認める。