

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"〉 大阪大学の博士論文について <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	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 14413 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'(GN 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GO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GGNGGG(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。