The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Isolation and expression analysis of a novel human homologue of the Drosophila glial cells missing (gcm) gene
Author(s)	金村, 米博
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41817
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

【119】

氏　　名	金村米博（かねむらよねひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　15324　号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Isolation and expression analysis of a novel human homologue of the *Drosophila glial cells missing* (*gcm*) gene （ヒト新規 *Drosophila glial cells missing* (*gcm*) 遺伝子ホモログの単離とその発現の検討）
論文審査委員	（主査） 教　授　吉峰　俊樹 （副査） 教　授　岡野　栄之　　教　授　辻本　賀英

論文内容の要旨

【目的】

中枢神経系を構成する神経細胞とグリア細胞は共通の神経幹細胞に由来する。神経幹細胞から神経細胞が発生する分子メカニズムの研究と比較し、グリア細胞が発生する分子メカニズムはほとんど不明であったが、近年 *Drosophila* においてグリア細胞への分化を誘導する新規の転写調節因子 *gcm* が単離され、そのヒトホモログ（hGCMa）も胎盤より単離された。しかし hGCMa は構造的に *Drosophila gcm* の特徴の一つである核移行シグナルが存在せず、マウスでは胎盤および脳から構造の異なる2種類の *gcm* ホモログ（mGCMa、mGCMb）が単離されていることなどから、*Drosophila gcm* に類似する構造をもった、未知のヒト *gcm* ホモログが存在することが予測された。そこで本研究では、ヒト胎児脳 cDNA ライブラリーから未知のヒト *gcm* ホモログの単離を試み、その発現様式の検討を行った。

【方法ならびに結果】

1．ヒト胎児脳 cDNA ライブラリーより RACE 法（rapid amplification of cDNA ends）にて GCMB の単離を試みた。2種類のマウス *gcm* ホモログ（mGCMa、mGCMb）と hGCMa の間で保存されている gcm-motif 領域部分の塩基配列を元に RACE primer を作成し、3'－RACE、5'－RACE をおのおの行い GCMB の塩基配列を決定した。その後、完全長の ORF を含む断片を PCR 法にて単離した。単離された GCMB は構造的にすべての *gcm* ホモログに共通な gcm-motif と PEST-like sequence を持つ以外に、*Drosophila gcm* とマウス脳より同定されたホモログ（mGCMb）にのみ存在する核移行シグナルを持つ点で構造上 *Drosophila gcm* に類似した。

2．GCMBの3'側74%の配列は6番染色体短腕24.2の配列を含むことが判明しているPACと99.8%のホモロジーを示した。正常ヒト末梢白血球から抽出した genomic DNA を4種類の制限酵素（*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ、*Hind*Ⅲ、*Kpn*Ⅰ）で処理したサンプルを用いて行った Genomic Southern blot 法では、4種類の制限酵素で切った DNA 断片の全てで単一のシグナルを呈した。そのうち2種類は前述の PAC の制限酵素地図の断片長と一致した。以上より GCMB の遺伝子座は6p24.2と断定した。

3．GCMB の mRNA の発現は、ヒト成人及び胎児各種臓器においてまず Northern blot 法を用いて確認することを試みた。しかし GCMB の発現量は極めて低く、Northern blot 法の検出感度以下のレベルであった。しかし RT－PCR 法では正常組織で成人腎臓、胎児脳にその発現を認めた。

4．GCMBの遺伝子のある6番染色体はヒトの癌で4番目に変異の多い染色体といわれており、またGCMBとほぼ同じ配列をもつESTが腫瘍細胞（副甲状腺腫）で発現していたことから、GCMBの発現を15種類の培養細胞株で調べた。神経上皮系7種［グリオーマ3株（U251、T98G、U−373MG)、髄芽腫3株（Daoy、D283Med、D341Med)、神経芽細胞腫（KP−N−SILA−2B4)]、非神経上皮系8種の培養腫瘍細胞より全RNAを抽出し、GCMBの発現を正常組織同様、RT−PCR法にてスクリーニングした。グリオーマ細胞1株（T98G)、髄芽腫細胞（3株すべて)、非神経上皮細胞4株（奇形腫、変異胎児腎上皮細胞、白血病、膵臓癌）にその発現を見た。

【総括】

RACE法を用いてヒト胎児cDNAライブラリーから核移行シグナルを持つ新規のヒト*gcm*ホモログ、GCMBを単離した。このことより、ヒトにおいてもマウス同様、複数の*gcm*ホモログが存在し、それは核移行シグナルのないタイプ（A isoform）とあるタイプ（B isoform）の2種類に分類できた。したがってヒトの*gcm*ホモログは新規の遺伝子ファミリーを形成している可能性が強く示唆された。またGCMB遺伝子座は精神分裂病、口蓋裂等の責任遺伝子の存在が示唆されている6番染色体短腕24.2と考えられた。また未分化腫瘍、小児腫瘍においてGCMBの発現が見られた。これら疾患とGCMBとの関連性を探ることが、ヒト*gcm*ホモログの今後の研究のテーマの1つになると考えられ、その必要性が強く示唆された。

論文審査の結果の要旨

ショウジョウバエのグリア細胞発生に重要な役割を担っている*gcm*遺伝子（dGCM）のヒト相同遺伝子は従来、ヒトGCMa（hGCMa）のみが知られていたが、本研究では新規のヒト*gcm*遺伝子（GCMB）の単離に成功した。

新たに単離されたヒトの2番目の*gcm*遺伝子、GCMBは、1）*gcm*遺伝子の機能ドメインとして他の*gcm*ホモログ遺伝子すべてに存在するgcm−motif、ならびにdGCMとマウスGCMb（mGCMb）にのみ存在する核移行シグナルを有する。2）gcm−motifを含むGCMB蛋白N末端172アミノ酸はmGCMbと86%、hGCMaと68.2%、dGCMと62%の高い相同性を有するが、残りの部分はmGCMbと59.3%の相同性を示すのみであり、GCMB蛋白全体ではmGCMbと最も高い相同性（68.4%）を示す。3）ゲノム構造の解析より遺伝子座は6番染色体単腕24.2であると推測される。4）RT−PCR法を用いた発現組織、発現細胞の検討の結果、GCMBは正常の成人腎臓、胎児脳組織のほかに、髄芽腫、奇形腫、変異胎児腎上皮細胞などの腫瘍あるいは変異細胞で発現する、といった特徴を有することが明らかになった。

上記結果より、ヒトでは核移行シグナルなし（A isoform)、あり（B isoform）の最低2種類の*gcm*ホモログが存在しており、ヒト*gcm*遺伝子は新規の遺伝子ファミリーを形成していることが証明された。ヒトにおけるグリア細胞発生のメカニズムとの関係は現段階では明らかではないが、神経細胞の発生を含め、発生学的に重要な機能を持つ遺伝子群は進化の過程でその機能ドメインが高度に保存されている傾向があることから考え、ヒト*gcm*ホモログはヒトのグリア細胞発生において何らかの重要な機能を担っている可能性がある。またGCMBの遺伝子座、発現組織の検討結果は、GCMBが神経変性疾患や脳腫瘍のような難治性の神経系疾患の発生、病態に関与する可能性を示唆するものであり、GCMBの機能解析は、これら神経疾患の遺伝子レベルでの病態解明に貢献し、新たな診断と治療法の確立へと発展するものと期待できる。

以上より、新規ヒト*gcm*遺伝子、GCMBの単離に成功した本研究は医学、神経科学の発展に大きく寄与するものと思われ、博士（医学）の学位授与に値する研究であると考えられる。