



Title	ゲノムインプリンティングによるnecdin遺伝子の発現制御機構
Author(s)	中田, 祐二
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41898
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 ^{なか} 中 ^だ 田 ^{ゆう} 祐 ^じ 二

博士の専攻分野の名称 博 士 (理 学)

学 位 記 番 号 第 1 5 1 8 2 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

理学研究科生物科学専攻

学 位 論 文 名 ゲノムインプリンティングによる necdin 遺伝子の発現制御機構

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 吉川 和明

(副査)
教 授 永井 克也 教 授 田嶋 正二

論 文 内 容 の 要 旨

はじめに

Necdin はレチノイン酸処理を行ったマウス胚性がん P19細胞のサブトラクション cDNA ライブラリーから神経分化に特異的な cDNA がコードする蛋白質として見いだされた。その mRNA は殆どの中枢・末梢神経系のニューロンに分化直後から発現しており、特に中枢神経系では視床下部や中脳に豊富に存在する。Necdin を培養細胞に強制発現すると増殖が停止する。また、DNA がんウイルス由来のがん蛋白質 SV40 large T 抗原やアデノウイルス E1 A、細胞周期制御に関わる転写因子 E2F1、p53 と結合する。これらの necdin の性質はがん抑制遺伝子産物の性質と類似している。したがって、necdin は細胞分化に伴う分裂終了機構に重要な役割を果たしているものと考えられる。一方、細胞増殖や抑制の制御機構の研究はヒトの疾患の解析によって著しく進展した。そこで、本研究では necdin の生物機能に関する情報を得るためにヒト染色体遺伝子の単離と解析を行った。

結果

1) ヒト necdin 遺伝子の構造と発現制御

ヒト末梢白血球由来の染色体 DNA ライブラリーよりヒト necdin 遺伝子を単離した。ヒト necdin 遺伝子はマウスより 4 アミノ酸少ない 321 個の蛋白質をコードし、イントロンを欠いていた。また、プロモーター領域には典型的な TATA や CAAT ボックスがなく、神経分化刺激を行ったマウス胚性がん P19細胞でプロモーター活性を保持していた。ヒト necdin 遺伝子はプロモーター領域からコーディング領域にかけて CpG アイランドを形成していた。そこでプロモーター領域の HhaI 制限酵素部位中の CpG 配列をメチル化したところ、その転写活性が抑制された。さらに、necdin 遺伝子を発現している培養細胞では、プロモーター領域の脱メチル化が起こっていることがわかった。蛍光 in situ ハイブリッド (FISH) 法により necdin は15番染色体長腕部11.2-12に存在することが判明した。この領域はゲノムインプリンティングが関与するヒトの神経行動異常症である Prader-Willi 症候群の責任領域として知られている。ゲノムインプリンティングの機構として CpG アイランドのメチル化が重要視されており、necdin 遺伝子がインプリントによる発現制御を受けていることが示唆された。

2) ヒト necdin 相同遺伝子の解析

次に、ヒト necdin 遺伝子と相同性のある遺伝子の探索を行った。ゲノミックサザンプロット解析により necdin 遺伝子に相同な遺伝子が存在したため、ヒト染色体 DNA ライブラリーから単離し、構造解析を行った。その結果、ヒ

ト necdin 遺伝子と83%の相同性をもつが、どのアミノ酸読枠でも頻繁に終止コドンが出現し、翻訳開始点も欠損していた。さらにこの遺伝子は necdin 遺伝子同様イントロンがなく、ヒト necdin 遺伝子の転写開始点から上流は相同性がなく、3'側にポリ A 配列が存在し、5'、3'隣接領域に6塩基の繰り返し配列が存在した。FISH 法によって相同遺伝子は12番染色体長腕部14-21.1に局在することがわかった。以上の結果より、この遺伝子はヒト necdin 遺伝子の mRNA から逆転写によって染色体に取り込まれた偽遺伝子 (processed pseudogene) であることが推定される。

3) メチル化による necdin 遺伝子発現の制御

マウス necdin 遺伝子のプロモーターを含む5'末端領域は CpG アイランドを形成している。そこでマウス由来の培養細胞を用いて necdin のメチル化による発現制御を検討した。NIH 3 T 3 細胞を脱メチル化剤である 5-azacytidine の存在下で培養したところ necdin 遺伝子の発現上昇がみられた。また、5-azacytidine を除くとメチル化が回復し、necdin の発現が低下した。さらに、necdin のゲノムインプリンティングによる発現機構を necdin 遺伝子の制限断片長多型性を示す129マウスと C 3 H マウスの F 1 マウスを用いて検討した。F 1 マウスの脳では necdin mRNA は父方の対立遺伝子のみから転写されていたが、母方の対立遺伝子ではこの領域がメチル化を受けていることが明らかになった。

4) necdin 遺伝子欠損マウスを用いたゲノムインプリンティングの解析

本研究室で樹立された necdin 遺伝子欠損マウスの発育や生殖能力は正常であった。そこで、この necdin 遺伝子変異マウスを用いてゲノムインプリンティングによって necdin 遺伝子が発現制御を受けているかを mRNA と蛋白質レベルで調べた。母方から necdin 欠損遺伝子が伝わった場合は necdin の発現は正常であったが、父方から欠損遺伝子が伝わった場合は mRNA、蛋白質共に全く発現が認められなかった。したがって、necdin は母方の遺伝子からは全く転写されていないことが確認できた。さらに初代培養細胞を用いた実験では、ニューロンや線維芽細胞でもゲノムインプリンティングが維持されていることがわかった。これらの培養系は necdin 遺伝子欠損マウスの表現型を調べるうえで今後有用な実験系になるものと考えられる。

考察

本研究によって、ヒト necdin 遺伝子はメチル化が関与したゲノムインプリンティングによって制御を受けることが明らかになった。マウスを用いた実験によって、母方の necdin 遺伝子はプロモーター領域を含む CpG アイランドのメチル化によって転写抑制を受けていること、さらに父方の necdin 遺伝子のみの欠損によって necdin は全く発現しなくなることを証明した。本研究で用いた necdin ノックアウトマウスでは形質発現の異常が認められなかったが、最近、米国の研究グループから父方に由来する necdin 対立遺伝子の欠損マウスは新生仔期に死亡することが報告され、マウスの遺伝的背景の違いによる形質発現の差が示唆されている。この現象がヒトで起こった場合が Prader-Willi 症候群である。Prader-Willi 症候群は視床下部のニューロンの異常による神経行動異常症であり、necdin が特に視床下部で発現が多いことを考え合わせると necdin 遺伝子が同症候群の主な原因遺伝子である可能性もある。本研究で necdin の偽遺伝子が存在することが明らかになったが、最近、Prader-Willi 症候群責任領域内の necdin 遺伝子のごく近傍に necdin とアミノ酸レベルで31%の相同性をもつ新規遺伝子 MAGEL 2 が存在することが報告された。したがって、necdin は ortholog、paralog 型の遺伝子重複や mRNA からの逆転写などの機構で祖先遺伝子から進化してきたものと考えられる。ゲノムインプリンティングは哺乳類に特有の現象であり、necdin 遺伝子の発現制御機構はゲノムインプリンティングが関与する哺乳類脳進化の分子機構を考える上でも興味深い。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ヒト necdin 遺伝子と偽遺伝子をクローン化し、それらの構造と染色体上の局在部位、さらに両者の発現調節機構について記述したものである。Necdin 遺伝子は神経細胞においてゲノムインプリンティングによって発現調節を受けていることを明らかにした本論文は、脳発生制御機構の解明に貢献するものであり、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。