The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

【50】

氏　　名	中田祐二（なかだ ゆうじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　15182　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E1A、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。ゲノミックサザンブロット解析により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C3Hマウスの F1マウスを用いて検討した。F1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。