



Title	Expression of mouse igf2 mRNA-binding protein 3 and its implications for the developing central nervous system
Author(s)	森, 裕
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42625
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	森 裕
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16083 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学位論文名	Expression of mouse <i>igf2</i> mRNA-binding protein 3 and its implications for the developing central nervous system (新規 RNA 結合蛋白質 mIMP 3 の中枢神経系発生過程における発現解析)
論文審査委員	(主査) 教授 武田 雅俊
	(副査) 教授 岡野 栄之 教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

【目的】

mRNA の局在化、翻訳調節などの転写後調節は神経細胞にとって重要な遺伝子発現の調節機構と予想される。神経細胞において局在化する mRNA が幾つか知られているが、どのような分子によってそれらの mRNA の転写後調節が行われているかは殆ど明らかにされていない。遺伝子発現の転写後調節機構の解明は神経細胞を含めた中枢神経系の発生や分化などの機構解明に大きく寄与することが考えられる。本研究ではニワトリ胎仔の纖維芽細胞で β -actin mRNA の局在化に関与しているとされる ZBP-1、および、アフリカツメガエルの受精卵で *Vgl* mRNA の局在化に関与しているとされる *Vgl*-RBP のマウス中枢神経系における相同分子の単離を行い、発現解析および機能解析を行った。

【方法ならびに成績】

ZBP-1 と *Vgl*-RBP は RNA Recognition Motif (RRM) を 1 つ、K Homology domain (KH domain) を 4 つもつ RNA 結合蛋白質である。この RRM と KH domain 以外でアミノ酸の相同性の高い C 末側の約 180bp の領域に対して degenerated primer を作成し、胎生 18 日、生後 0 日、生後 5 日の頭部の total RNA より RT-PCR を行い、目的の cDNA 断片を得た。更に、胎生 10.5 日のマウス胎仔の whole brain の cDNA ファージライブラリーをスクリーニングし、翻訳領域を含む約 1800bp の cDNA を得ることができた。この cDNA をアミノ酸に翻訳すると 1 つの RRM と 4 つの KH domain を持っており目的の新規の分子であることが明らかになった。また、この新規の分子の相同性検索を行ったところ、ZBP-1 family のうちヒトにおいて既に単離され、*igf2* mRNA の翻訳を抑制するとされている *igf2* mRNA-binding protein 3 とアミノ酸レベルで最も高い相同性を示した。そこで、この新規の分子を mouse *igf2* mRNA-binding protein 3 (mIMP 3) と命名した。ノーザン解析では胎生 10.5 日で最も強く発現しており、その後急速に発現が減少した。*in situ* hybridization では胎生 10.5 日頃より神経管の未分化な神経上皮細胞で発現しており、その後、分化したばかりの神経細胞でも発現が見られることが明らかとなった。以上の結果より発表者が単離した新規分子はマウス中枢神経系の発生過程に関与していることが示唆された。蛋白質レベルの解析を行う為に mIMP 3 のポリクロナール抗体を作成し、マウスの種々の発生ステージで免疫組織染色とウエスタン解析を行ったところ、mIMP 3 蛋白質の発現は mRNA の発現とほぼ一致することが明らかとなった。また、免疫組織染色では *in situ* hybridization の発現パターンと酷似しており、中枢神経系だけでなく、間葉由来の組織でも発現が見

られた。

mIMP 3 は RNA 結合蛋白質としての機能が予想されるが、結合が予想される mRNA との結合実験を UV-cross linking 法によって検証した。mIMP 3 の相同分子は ZBP-1 と Vg1-RBP 以外にも明らかとなってきており、上述のようにヒトで IGF II の mRNA に結合するとされる IMP 1、IMP 2、IMP 3 とマウスで c-Myc の mRNA に結合するとされる CRD-BP などが知られている。いずれも発表者が単離した mIMP 3 とアミノ酸レベルで 90 パーセント前後の高い相同性を持っていることから、これらの標的 RNA が mIMP 3 の標的 RNA である可能性が予想された。その結果、胎生 11 日から 12 日頃まで発現が見られる mouse *igf2* leader 3 mRNA と特異的に結合することが明らかとなった。そして、マウス teratocarcinoma 由来の神経系細胞株 P19 に mIMP 3 を一過性に発現させ、レチノイン酸を添加して神経細胞へ分化誘導させたところ、対照と比較して明らかに神経細胞への分化が抑制された。更に、同様の一過性発現の系において培地内に組換え IGF II 蛋白質を添加したところ、対照と比較して部分的ではあるが、mIMP 3 による神経細胞への分化抑制が押さえられた。この結果は mIMP 3 が転写後レベルにおいて *igf2* mRNA に結合し P19 における神経分化を抑制しているものと示唆された。

【総括】

以上の結果から、単離した mIMP 3 はマウス中枢神経系発生過程において神経上皮細胞の神経細胞への分化を抑制し、未分化の状態を維持させる分子であることが予想された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、中枢神経系の発生過程において転写後調節を介して重要な遺伝子発現調節を行っていると予想される新規 RNA 結合蛋白質の単離、及び機能解析を目指したものであり、その中枢神経系での発現を明らかにした。マウス中枢神経系における ZBP-1 相同分子 mIMP 3 の単離に成功し、発生過程において未分化な神経上皮細胞と幼弱なニューロンで発現していることが示された。また、標的 RNA の同定を試み、mIMP 3 がヒトの IMP と同様に *igf2* leader 3 mRNA に特異的に結合することが示された。さらに、P19 細胞を用いた強制発現系の実験から、mIMP 3 は未分化な神経上皮細胞において、*igf2* leader 3 mRNA に結合し、その翻訳を抑制することによって、神経分化を抑制している可能性が示唆された。本論文により明らかとなったこれらの一連の事実は、中枢神経系において翻訳の調節などの転写後調節が神経発生過程において重要な意義を持つ可能性を示したものであり、学位を授与するに十分に値すると判断された。