

学 位 論 文 題 名

Identification, cloning and characterization of novel neuroblastoma-specific and nerve tissue-specific genes through compiled expression profiles

(脳, 神経系で特異的に発現する新規遺伝子の単離と解析)

学位論文内容の要旨

1 序論

脳、神経系で発現している遺伝子の数は、約3万と推定されているが、その大部分は未知である。これら未知遺伝子の中でも、脳、神経系で特異的に発現している遺伝子の中には、脳、神経系において重要な役割を担っている遺伝子が数多く存在していると考えられる。このような未知遺伝子を単離する材料としてcDNAは最良の素材である。cDNAからはアミノ酸配列やノーザンプロット、in situ 法により発現領域、染色体上の位置に関する情報を得ることができる。大阪大学の久保らのグループは、cDNAの部分塩基配列 (EST) の大規模解析を用いてヒト遺伝子発現データベース、BodyMap を作製している。体の各種組織のcDNAライブラリーを作製し、そこから無作為に選んだクローンの配列を決めていく。この際、ライブラリーがmRNA構成を反映するように、cDNAの3'末端断片のみクローニングし (3'末端 cDNA library)、センス方向にシーケンスしている。各種組織のデータを比較することで、組織特異的遺伝子を簡便に同定することができる。著者は、神経芽腫細胞株のESTを解析し、そのデータをBodyMapに加えることにより、神経系特異的新規遺伝子を同定することを試みた。

2 実験結果

神経芽腫細胞株 CHP134 の 3'末端 cDNA library を作製し、1222クローンのシーケンスデータを得た。このデータから CHP134 のデータベースを作製し、BodyMapに加えることにより、神経系特異的遺伝子を同定した。それらの中から、GenBankに登録されている遺伝子と相同性を示さず、発現頻度の高い順から15の遺伝子を選択した。これらの発現特異性をノーザンプロットにより確認したところ、5つの遺伝子が神経系特異的に発現していた。この5つの遺伝子の全長cDNAを単離し、塩基配列を決定した。その結果、GS05389はラットの機能未知遺伝子AMYのヒトホモログであることが分かり、残りの4つは新規遺伝子で、GS08703は細胞骨格蛋白質と相同性を示し、GS08886は転写因子ホメオドメインのモチーフを持ち、GS08740はチャンネルのモチーフを持ち、GS07656は転写因子basic helix-loop-helixのモチーフを持っていた。

GS08740については電気生理学的な実験を行ったが、残念ながらチャンネルとしてのシグナルを検出できなかった。相互作用する別の因子が必要と考えられた。GS07656について発現パターンを解析した結果、この遺伝子は胎児期でも脳特異的に発現しており、成体で

は、脳の中でも小脳の顆粒層において特異的に発現していた。GS07656は後になって、神経分化に関わる転写因子NeuroDであることが別グループより報告されたが、成体での小脳での発現より、NeuroDは神経分化だけでなく、別の機能も持っていると考えられる。

GS08886 (NBPhox と命名) については、詳細な解析を行った。NBPhoxは314のアミノ酸から成り、ヒトとマウスでは1個のアミノ酸だけが違っていた。ゲノムの構造はヒト、マウスともに3つのエクソンから成り、その構造はArix (Phox2とも呼ばれる)、CRX、OTX1、OTX2に極めて類似していた。CRXは網膜神経光受容体細胞の分化に、OTX1、OTX2は頭部形態形成に関与することが知られている。ヒト染色体上での位置は、NBPhox (5p12-13)、Arix (11q13)、CRX (19q13.3)、OTX1 (2p13)、OTX2 (14q21-q22)とそれぞれ離れており、クラスターを形成していないが、ホメオドメインとゲノムの構造の類似性より、これらの遺伝子は同一の遺伝子を祖先として進化の過程で分岐し、類似した転写制御機構を保持していると考えられる。興味あることに、NBPhoxはArixと同一のホメオドメインを持っていた。Arixはdopamine beta-hydroxylase (DBH) 遺伝子の正の転写調節因子であり、発生初期のカテコールアミン系神経細胞に一過性に発現し、成体では副腎に発現している。Arixのノックアウトマウスでは、通常DBHを一過性に発現する頭部神経節においてDBHの発現が消失し、青斑核と頭部の副交感神経節が欠失している。これらのことからArixはノルアドレナリン作動性神経細胞の運命決定に関与していると考えられている。NBPhoxの発現パターンはArixと類似しており、胎児期では一過性に強く発現し、成体では副腎髄質と脳に発現していた。NBPhoxはArixと同一のホメオドメインを持つことから、NBPhoxはArixと同様にDBHの遺伝子発現を調節し、ノルアドレナリン作動性神経細胞の運命決定に重要な役割を担っていることが推定された。培養細胞株を用いた実験系において、NBPhoxはDBHプロモーターの活性を増大させることがわかった。DBH遺伝子の転写活性はprotein kinase A (PKA) やprotein kinase C (PKC) のシグナル伝達経路を通じて誘導されることが知られている。そこで、PKAやPKCの伝達経路を通じてのDBH遺伝子の転写活性化へのNBPhoxの関与を次に解析した。PKAの活性化剤であるフォルスコリン (FSK)やPKCの活性化剤であるフォルボールエステル (PMA) で細胞を刺激させた時に、NBPhoxはDBHプロモーターの活性を大幅に増大させた。DBHプロモーターにはDB1と呼ばれるエンハンサーが存在するが、NBPhoxはこのDB1エンハンサーに作用することにより、DBHプロモーターの活性を増大させる機能があることを確認した。しかも、NBPhoxはDB1だけでなく、FSKやPMAで刺激した時に、CRE、SRE、AP1などのエンハンサーにも作用して、その活性を増大させた。ただし、NBPhoxによるCRE、SRE、AP1の活性の増大はDB1に比べると低かったので、NBPhoxはDB1のようなある種の神経細胞特異的エンハンサーにより優先的に作用すると考えられる。以上のことから、NBPhoxはカテコールアミン系神経細胞において、シグナル伝達経路を通じて誘導される遺伝子の転写活性化に関与している転写因子であり、胎児期では神経細胞の分化・運命決定に関与し、分化が終了した神経細胞ではシナプス刺激による遺伝子発現の活性化などの反応に関与していると考えられる。

3 結論

著者は神経芽腫細胞株の遺伝子発現データベースを作製し、5つの神経系特異的遺伝子をクローニングした。その中には神経分化に関与するNeuroDや、カテコールアミン系神経細胞においてシグナル伝達を通じて誘導される遺伝子発現に関与する転写因子NBPhoxが含まれていた。また最近GS08740は、てんかんの原因遺伝子であることが別グループより報告された。このように神経芽腫細胞株の遺伝子発現データベースは脳、神経系において重要な役割を担っている遺伝子、神経疾患の原因となる遺伝子などの単離に有用であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	有賀寛芳
副査	教授	横澤英良
副査	助教授	松岡一郎
副査	助教授	松本健一

学位論文題名

Identification, cloning and characterization of novel neuroblastoma-specific and nerve tissue-specific genes through compiled expression profiles

(脳, 神経系で特異的に発現する新規遺伝子の単離と解析)

脳, 神経系で発現している遺伝子の数は, 他の組織の倍以上であり, 約3万と推定されているが, その大部分は未同定である. これらの未知の遺伝子の中でも, 脳, 神経系で発現している遺伝子の中には, 神経疾患の原因である遺伝子の存在が予想され, これらを単離同定することは人類にとって極めて重要であると考えられる. 近年, いわゆるゲノムプロジェクトが, 全世界中で推進されており, 2001年にはヒト全ゲノム構造を明らかにすることを目標としている. 本学位論文においては, 神経培養細胞であるCHP134よりcDNAライブラリーを作製し, この中よりランダムに約1800のクローンを選択, その構造解析をおこない, 更に新規遺伝子を詳細に, その発現パターン, 機能解析を行った.

1. 新たな概念のcDNAライブラリーの作製

ゲノムプロジェクトは種々のcDNAライブラリーが作製されているが, 多くはランダムに3'端より逆転写酵素でのばしたcDNAライブラリーが使用されており, 問題点として, 逆転写酵素の基質の違いによるcDNAののび安さの違いがあり, 細胞中での遺伝子の発現頻度を必ずしも反映しない点が指摘されている. これは, 逆転写酵素は500塩基までは安定にcDNAを合成できるが, その後は基質の塩基配列に依存する性質に由来する. そこで, 多数の遺伝子とその発現頻度に比例したライブラリー作製のために, 神経芽腫細胞CHP134 cDNAを4塩基対認識制限酵素であるMboIで切断断片を挿入したcDNAライブラリーを作製した. MboIはゲノム上, 数百に一個の認識配列を有し, 発現頻度に比例したcDNAライブラリーが作製出来たと考えられる.

2. ライブラリーcDNAの解析

このライブラリーより無作為に1800個のcDNAクローンを抽出し, その3'端より塩基配列

を決定し、遺伝子地図を作製した。解析可能であった1222クローンは827の異なった遺伝子に分類され、10回以上出現した遺伝子は7種類、2～9回出現した遺伝子は160種類、1回のみ出現した遺伝子は660種類であった。その半数は新規遺伝子であった。このCHP134細胞の遺伝子発現地図を、同様な方法により作製した各種組織、細胞株の遺伝子地図とを編集することにより、CHP134細胞でのみ発現している遺伝子、CHP134と脳、神経系の組織で発現している遺伝子を同定した。これらの中より、発現頻度の高い順から15の遺伝子を選択し、発現特異性をノーザンプロットで確認したところ、2つの遺伝子が神経芽腫細胞株に特異的に発現しており、3つの遺伝子が神経芽腫細胞株と脳において特異的に発現していた。この5つの遺伝子の全長cDNAをクローニングしたところ、1つはラットAMYのヒトホモログ、4つは未知のものであった。特に新規遺伝子の1つがホメオドメインを有することから注目し、これをNBPhoxと名付け、以下集中的に解析した。

3. NBPhox 遺伝子の解析

NBPhoxは314のアミノ酸を有し、ヒト、マウスではアミノ酸が1個違うだけである。また、ゲノムDNAをクローニングし解析したところ、3個のエキソンを有していた。ホメオドメインはエキソン2、3にまたがって存在しており、ホメオドメインを有する転写因子であるArix, CRX, OTX1, OTX2 と類似しており、その面から、NBPhoxは転写因子である可能性が考えられた。その中でもNBPhoxはArixと同じホメオドメインを有する。Arixは神経伝達物質産生遺伝子の一つであるdopamine beta-hydroxylase (DBH) 遺伝子(アドレナリン、ノルアドレナリンの産生に必須な遺伝子)の正の転写調節因子であり、マウス発生初期のカテコールアミン系の中樞、末梢神経細胞に一過性に発現する頭部神経節においてのDBH遺伝子に発現調節を行っており、ノルアドレナリン作動性の神経細胞の運命決定に重要な機能を有している。NBPhoxのマウスホモログをまずクローニングし、マウスでの発現を解析した。NBPhoxはマウス11日目の胎児において一過性に発現し、成体では副腎髄質に発現しており、そのパターンはArixと類似していた。そこで、Arixの転写ターゲット遺伝子であるDBH遺伝子に対するNBPhoxの転写能を検討した。培養細胞株を用いた実験系より、NBPhoxはDBHプロモーターの活性を増大させることが明らかとなった。DBH遺伝子の転写活性は細胞外からの様々な刺激により、特にA-kinase, C-kinaseのシグナル伝達経路を通じて誘導されることが知られている。そこで、種々の阻害剤を使用した解析より、NBPhoxはA-kinase, C-kinaseのシグナル伝達経路を通じてDBH遺伝子の転写活性増大に寄与していることが明らかとなった。更に、神経系、特に交感神経系遺伝子を優先的に制御していることが同様な方法により明らかとなった。

以上の結果は神経疾患の原因遺伝子の発見、創薬に結びつく可能性を大いに占めており、学位論文にふさわしく、薬学博士として横山昌宏を推薦するものである。