

EC 細胞における神経分化因子

Nerve differentiation factor of EC cell

代表研究者 東京都精神医学総合研究所分子生物研究室主任研究員 丸山 敬
Senior Researcher, Dept. of Molecular Biology, Tokyo Institute of
Psychiatry
Kei MARUYAMA

To understand the molecular mechanism of nerve differentiation, a kind of embryonal cell lines, P19 was used as a model. This cell line differentiated into nerve cells by treating of retinoic acid. Retinoic acid treatment would probably induce the expression of nerve-differentiating factor(s).

For the molecular cloning of such factors, subtraction method was applied. The anti-sense single strand cDNA library was constructed from the retinoic acid-treated P19 cells and the subtraction was performed by photo-biotinylated mRNA of untreated P19 cells. The obtained library was further screened by +/- method to select the differentiation-specific clones.

One of retinoic acid-inducible clones, pRP4B, had 1.7 kb message on Northern blotting and specific to nerve tissues. The longest clone of pRP4B was 1.6 kb and had a 325 amino-acids open reading frame. Since data base search failed to find any homology with known sequence, this clone was named as "necdin" (Nerve Embryonal Carcinoma Differentiation). The antibody was raised against the synthetic peptide of the deduced amino acid sequence. The localization of necdin was immunohistochemically determined and necdin was localized in nuclei.

The physiological function of necdin was not yet known. However, necdin might be a regulatory protein of gene, because it was a nuclear protein and induced by retinoic acid. The further study of necdin and other inducible proteins would help for the research on the mechanism of nerve differentiation.

研究成果

1. 研究目的

卵が親へと成長していく、発生と分化の機構は生物学者を常に魅了してきた。古くは、1930年代の Spemann の実験により、カエル卵に別の卵の一部を移植することによってその臓器が形成される現象、誘導現象が発見された。したがって、発生・分化も何らかの細胞間の相互作用によることが明らかになった。しかし、その本体や詳しい制御機構は全く不明である。

1988年になり、ある化学物質を与えると筋肉に分化する培養細胞から、筋肉の分化を誘発する遺伝子がクローニングされた。発生・分化を制御する機構もついに分子生物学的な解明が開始された。

神経細胞も筋肉細胞と同様に、分化が完了するとその分裂能を失い、特異的な細胞間のネットワークを形成される。神経細胞の分化に関して、なんらかの遺伝子の活性化が関与されていると考えられる。

カナダの McBurney らによって樹立された P19 というマウス胎児性ガン由来の培養細胞は、レチノイン酸処理によって、神経系の細胞に分化する。通常は、未分化の線維芽細胞様な細胞として増殖し、継代されていく。ところが、レチノイン酸（いわゆるビタミン A）を投与すると、数日のうちに、神経組織系の細胞へと変貌する。神経組織には、神経のみならず、いく種類かのグリア細胞があるが、P19 細胞でも、レチノイン酸処理によって、神経細胞とグリア系の細胞が出現す

る。

実際の生体での神経の分化は、非常に複雑であり、解析が困難である。しかし、P19細胞では、レチノイン酸という刺激で、自由に神経系への分化を開始させることができる。そして、レチノイン酸刺激により、何らかの神経分化に関与する遺伝子が活性化されると考えられる。そこで、本研究では、レチノイン酸処理によって、出現してくる遺伝子の同定と解析を試みた。

P19のレチノイン酸刺激によって活性化される遺伝子のなかには、神経分化の制御している遺伝子の可能性がある。また、P19という特別な培養細胞のみならず、実際に動物での神経の形成に関与している可能性も期待される。

2. 研究経過

2.1 方法

ある状態と別の状態で発現している遺伝子を比較する方法にサブトラクション法がある。この方法は、共通のmRNAを取り除くものである。

2.1.1 ライブラリーの作製 サブトラクションを行うために、今回は、 λ ZAP法を用いた。この方法では、まずcDNAを、XhoI siteを含んだoligo dTをプライマーとして合成する。その後EcoRIアダプターを付加すれば、5'側にEcoRI、3'側にXhoIを持つようにcDNAを作ることができる。こうして、ベクターに一定方向に組み込まれたcDNAライブラリーを作製することができる。さらに、 λ ZAPベクターでは、ヘルパーファージによって、1本鎖プラスミッドのライブラリーに変換することができ、しかも、それは、通常のmRNAとは相補的なアンチセンス側のDNA鎖が得られる。

2.1.2 アンチセンス1本ライブラリーを用いるサブトラクション法 さて、P19細胞では、レチノイン酸によって分化関連遺伝子(mRNA)が誘導されると考えられる。そこで、レチノイン酸刺激直後の細胞よりmRNAを調製して、アンチセンスの1本鎖ライブラリーを作製した。のライブラリーと、レチノイン酸未処理の細胞由来のmRNAを混ぜると、レチノイン酸に関係なく共通に存在する1本鎖DNAには、mRNAがhybridizeし

て、DNAとRNAの二重鎖ができる。mRNAを予め、ビオチン化しておく、このDNAとRNAの二重鎖をフェノール・クロロフォルム抽出によって取り除くことができる。こうして、レチノイン酸によって出現した遺伝子(cDNA)のみからなる1本鎖ライブラリーを得ることができる。当然、このような操作を行っても、すべてがレチノイン酸誘発遺伝子というわけではない。このサブトラクトされたライブラリーから、さらに、スクリーニングする必要がある。

2.1.3 +/-法 本当に誘因された遺伝子であることを確認するために、+/-法を行った。これは、レチノイン酸処理を行ったもの(+)と未処理のもの(-)、それぞれの細胞のmRNAより、アイソトープ(P-32dCTP)の存在化でcDNAを合成して、プローブを作成する。先ほどのサブトラクトされたライブラリーより任意のクローン(約200)のプラスミッドDNAを調製し、+と-のプローブそれぞれでドットハイブリダイゼーションを行う。そのクローンがたしかに分化刺激によって誘導されるものであれば、+のプローブによる信号は、-によるものよりも著しく強いものになる。さらに、最終的な確認は、クローンをプローブとしてノーザンブロットングを行って確認した。

2.2 結果

このサブトラクション法、+/-法により、6個ほど、P19細胞のレチノイン酸刺激によって誘導されるクローンが得られた。その内一つ、pRP4Bは、マウス組織でも神経組織のみに特異的に発現されていた。このクローンのメッセージの大きさは1.6 kb程度であり、さらにスクリーニングを行い、完全長と思われるクローンが得られた。

この完全長のpRP4Bクローンを解析したところ、アミノ酸325個をコードすると推定された。核酸配列、推定されたアミノ酸配列をデータベースの検索を行ったが、類似の配列は見いだされず、新規の遺伝子と考えた。そこで、Necdin(Nerve Embryonal Carcinoma Differentiation)と命名した。マウスの発生におけるNecdinの発現を検討したところ、神経の発生が盛んになる誕

生前後に極大が示された。

推定されたアミノ酸配列をとに、ペプチドを合成してポリクロナール抗体を作成した。この抗体で、Necdin の分布を観察したところ、神経細胞の核に局在していた。

こうして、Necdin は、神経の発生にともなって発現が増大する、神経細胞の核に特異的なタンパク質であることが判明した。

3. 研究成果

マウス胎児ガン培養細胞より、未知の神経発生に関係し、神経細胞に特異的な核タンパク質 Necdin をクローニングすることができた。さらに、いまだ解析が終了していないが、同様に、P19 細胞でレチノイン酸によって誘因される遺伝子が数個得られた。

また、本研究で改良されたサブトラクション法は、何らかの刺激によって誘発される遺伝子のクローニングにも応用が可能であると考えられる。

今後の課題と発展

神経に特異的な核タンパク質 Necdin の機能については、現在、研究中である。いうまでもなく、遺伝子の発現の制御は核タンパク質が重要な役割

を演じている。したがって、Necdin が神経細胞に特異的な遺伝子の制御を行っている可能性が考えられる。

また、Necdin が神経細胞にのみ発現される機構も興味深いものである。これについては、今後、Necdin のゲノムを解析し、そのプロモーター領域の研究が待たれる。

神経の発生・分化についての研究は、いまだ初期の段階といえる。Necdin のような神経特異的な遺伝子についての知識が、その解明に役立つことを期待したい。

発表文献

K. Maruyama, M. Usami, T. Aizawa and K. Yoshikawa: A novel brain-specific mRNA encoding nuclear protein (Necdin) expressed in neurally differentiated embryonal carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **171**, 204~209 (1991).

学会報告

平成2年度 日本生化学会, 日本生物物理学会, 日本分子生物学会, 日本薬理学会 (各年会もしくは総会にて).