

平成22年 6月 3日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790266
 研究課題名（和文） 伴性劣性ジストニアパーキンソニズムの原因遺伝子 N-TAF1 に関する機能解析
 研究課題名（英文） Functional analysis of N-TAF1, the disease causative gene of X-linked recessive dystonia-parkinsonism
 研究代表者
 牧野 悟士（MAKINO SATOSHI）
 滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・非常勤研究員
 研究者番号：30423403

研究成果の概要（和文）：伴性劣性ジストニアパーキンソニズムの原因遺伝子 TAF1 の神経細胞特異的なアイソフォームに関して、神経細胞における役割を明らかにすることを目的として、マウス胚発生期における N-TAF1 の発現パターン解析と、N-TAF1 および TAF1 タンパク質を強制発現させた培養細胞株における細胞化学的な解析を行った。その結果、N-TAF1 と TAF1 との間に発現パターンおよび細胞増殖へ与える影響に関して差異がみられることがわかった。

研究成果の概要（英文）：We previously found a neuron-specific isoform of the TAF1, which is the disease causative gene of X-linked recessive dystonia-parkinsonism. To investigate the function of the neuron-specific isoform of the TAF1 gene, we carried out expression analysis in mouse brain and over-expression of N-TAF1 in cultured cell lines. We demonstrated that N-TAF1 varies from TAF1 gene in expression pattern, probably reflecting the difference in physiological roles between N-TAF1 and TAF1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：ゲノム医科学

1. 研究開始当初の背景

申請者らはゲノム解析によって伴性劣性ジストニアパーキンソニズム（XDP/DYT3）の原因遺伝子探索を行い、TAF1 のイントロンにおける XDP 患者特異的なレトロトランスポゾン挿入を見出した。さらに、新たに同定したヒト TAF1（TATA box binding

protein-associated factor 1) の神経細胞特異的なアイソフォーム（N-TAF1）について、XDP 患者脳の尾状核における発現量が著しく減少していることを報告した。この TAF1 遺伝子産物は基本転写因子 TFIID 複合体の最大のサブユニットとして知られており、幅広い生物種でその構造と機能が保存されて

いることがわかってきた。特に細胞周期や増殖にとって必須の転写因子のひとつであるとされ、哺乳類においても、培養細胞を用いた研究から TAF1 が細胞周期に関連したいくつかの遺伝子の発現を制御していることが示されている。また、様々なヒストン修飾活性をもつことなど、TAF1 が多様な発現制御を行う仕組みについても次第に明らかとなってきた。しかしながら、TAF1 はあくまでも様々な組織で普遍的な発現様式と機能を持つと考えられており、申請者らが見出したような組織特異的アイソフォームの存在や、TAF1 が組織特異的な遺伝子発現制御に関与することはこれまでまったく知られていなかった。よって、N-TAF1 が神経細胞においてどのような発現パターンを示し、どのような神経細胞特異的遺伝子群の発現を制御しているのか調べることを計画した。

2. 研究の目的

申請者らは、ヒト TAF1 (TATA box binding protein-associated factor 1) の神経細胞特異的なアイソフォーム (N-TAF1) を見出し、伴性劣性ジストニアパーキンソン症 (XDP/DYT3) の原因遺伝子であることを報告した。TAF1 が基本転写因子 TFIID 複合体の最大のサブユニットであり、多くの組織で普遍的な発現様式および機能を持つと考えられていたことに対して、N-TAF1 は組織特異的な調節を受け、神経細胞の生存に必須の機能を持つ可能性があることは興味深い。申請者らはまたこれまでの研究において、N-TAF1 はマウスからヒトまで生物種を越えて保存されていること、マウスでは生後まもなくの期間において N-TAF1 発現量が急激に増加し、かつ老齢マウス個体においても発現量が維持される傾向が認められた。これらのことから N-TAF1 は、神経細胞の発生・分化・維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで本研究では、この N-TAF1 が持つ神経細胞特異的な役割を明らかにすることを目的として、1) マウス胚発生期における N-TAF1 の発現パターンを分子組織学的手法によって詳細に調べ、2) N-TAF1 をノックダウンまたは過剰発現させた培養細胞株を用いたマイクロアレイ解析によって N-TAF1 が発現制御に関与する遺伝子を網羅的に同定することを計画した。具体的には、マウス胚や新生マウスの脳組織に対する免疫組織化学染色などの分子形態学的手法によって、発生の各過程における形態の変化にともなって N-TAF1 の発現パターンがどのように変化するかを調べる。次に、N-TAF1 の遺伝子ノックダウンおよび強制発現を行うコンストラクトを作製し、ヒトおよびマウス由来の培養細胞株に導入する。導入前後の細胞についてその形態を観察し、またそれぞ

れ RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行う。発現量が変動している遺伝子をリストアップし、最終的に N-TAF1 によってその発現が制御されている遺伝子を同定する。これらの実験によって、N-TAF1 がもつ脳神経系の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、マウス胚発生期における N-TAF1 の発現パターンを分子組織学的手法によって詳細に調べ、さらに N-TAF1 をノックダウンまたは過剰発現させた細胞を用いて、マイクロアレイ解析により N-TAF1 が発現制御に関与する遺伝子を網羅的に同定する。具体的には、マウス胚や新生マウスの脳組織に対する免疫組織化学染色などの分子形態学的手法によって、発生の各過程における形態の変化にともなって N-TAF1 の発現パターンがどのように変化するかを調べる。次に、N-TAF1 の遺伝子ノックダウンおよび強制発現を行うコンストラクトを作製し、ヒトおよびマウス由来の培養細胞株に導入する。導入前後における形態を詳細に観察するとともに、それぞれの細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行う。これにより、N-TAF1 によってその発現が制御されている遺伝子を同定する。

(1) 脳神経系の発生過程における N-TAF1 の発現パターンと機能を解析するために、マウスの発生ステージごとに初期胚から老齢個体を含む成体脳組織までを対象として、免疫組織化学染色および遺伝子発現定量解析を行う。TAF1 についても同様の実験を行い、結果を比較する。また特に、N-TAF1 の実験から得られた発現パターンを神経管形成以降の形態変化とつきあわせることによって関連を調べる。

(2) ヒトおよびマウスの培養細胞 (神経細胞由来だけでなく、複数の細胞株を使用) に対して、構築した N-TAF1 発現コンストラクトをトランスフェクションする。また、ヒト及びマウスの培養細胞 (N-TAF1 を発現している神経細胞由来の細胞株) に対して、N-TAF1 の発現を抑制可能な miR RNA 発現ベクター (調節発現ベクター) を導入する。薬剤選択によって導入遺伝子の安定株を作製し、誘導試薬によって N-TAF1 の高発現または発現抑制がおきていることを確認する。さらに、得られたそれぞれの細胞株について、N-TAF1 の過剰発現時および発現抑制時の形態変化を観察する。適時免疫組織化学染色や遺伝子発現定量解析を行う。N-TAF1 の過剰発現および発現抑制を行った細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析によって、N-TAF1 の発現と関連が考えられる遺伝子を

リストアップする。リアルタイム RT-PCR による発現定量解析による確認後、それらリストアップされた遺伝子の抗体やプローブを用いた二重染色などの方法によって、遺伝子間の相互作用を推測する。

4. 研究成果

(1) 脳神経系の発生過程における N-TAF1 の発現パターンと機能を解析するために、マウス N-TAF1 のクローニングを行った。その結果、マウス、ラットなどの齧歯類からヒトまで、脊椎動物において生物種を越えて N-TAF1 が保存されていることを明らかにした (図 1,2)。

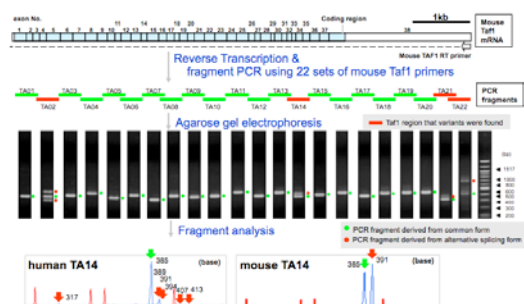


図 1 マウスおよびラット N-TAF1 ホモログのクローニング

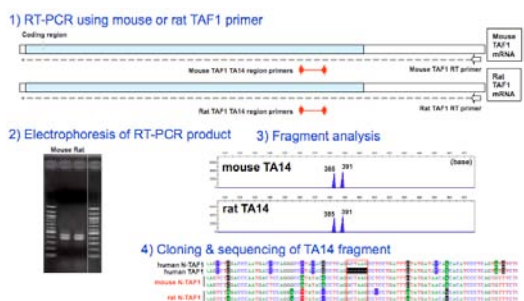


図 2 マウスおよびラット N-TAF1 の塩基配列および発現量の比較

マウス N-TAF1 に関して、各種組織や細胞株由来の RNA を使用して発現量の比較を行ったところ、ヒト N-TAF1 と同様に、脳組織およびニューロン系細胞株においてのみその発現が観察された (図 3)。さらに、マウス TAF1 が胚発生期から産後まもなくのステージにおいて高度に発現しているのに対して、N-TAF1 は産後急速に発現量が増加し、老齢に至るまで高い発現量を維持しているなど、分化後の神経細胞にとって重要な役割をもつ可能性を見出した。このように、基本転写に関連する遺伝子のなかで N-TAF1 は組織特異的な調節を受けており、かつ時期特異的

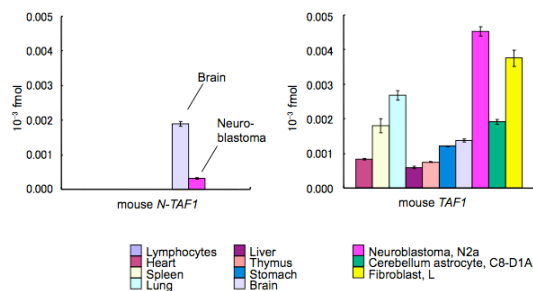


図 3 マウス組織、細胞株間における N-TAF1 mRNA 量の比較

な調節を受けていると考えられることから、N-TAF1 が神経細胞において特異的な役割、すなわち神経細胞特異的な遺伝子発現の制御を担っていることが示唆される。これは、TAF1 のような基本転写因子が、脳神経系の特定部位といった限定的な範囲にのみ影響を与えて疾患の原因遺伝子となることを説明する初めての例となる。

次に、N-TAF1 の強制発現を行うコンストラクトを作製し、ヒトおよびマウス由来の培養細胞株に導入した。この細胞株はリバース tTA (テトラサイクリン制御性トランスアクティベーター) を発現させる Tet-on 調節 vector をまずトランスフェクトして安定発現株とし、さらに TRE (テトラサイクリン応答性エレメント) の下流に N-TAF1 または TAF1 の配列を組み込んだコンストラクトを導入後再度スクリーニングしたものであり、培地へのドキシサイクリン添加によって目的遺伝子が発現する条件発現安定株とした。作製した安定株にドキシサイクリンを添加したところ、目的遺伝子である N-TAF1 または TAF1 の mRNA 量が増加することを確認した (図 4)。

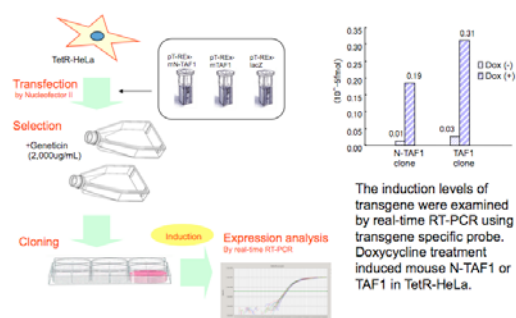


図 4 N-TAF1 および TAF1 の条件発現細胞株作製と誘導による目的遺伝子発現量の増加確認

発現誘導前後の細胞についてその形態を観察し、またそれぞれの細胞増殖速度を MTS

アッセイによって比較した。その結果、N-TAF1 を発現させた細胞株のみ、発現誘導後 7 日目から明確な増殖速度の低下が観察された (図 5)。

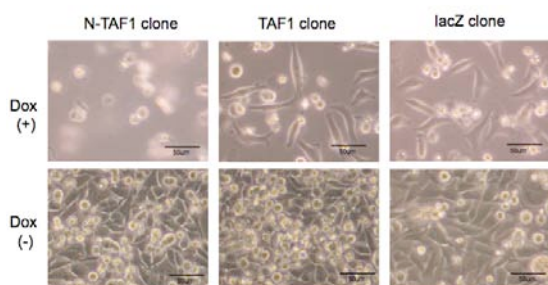


図 5 N-TAF1, TAF1, lacZ の各条件発現細胞株

これらの結果は、細胞内において TAF1 とは異なる機能を N-TAF1 がもつことを示すものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Oda K, Makino S, Masuda C, Yoshiki T, Kitamura Y, Takata K, Yanagisawa D, Taniguchi T, Tooyama I, The mRNA Distribution of C7orf24, a Gamma-glutamyl Cyclotransferase, in Rat Tissues, *J Histochem Cytochem.* 57 巻 12 号、pp.1121-1126、2009、査読有

[学会発表] (計 2 件)

① Makino S, Tamiya G, Tooyama I, Intracellular function of neuron-specific TAF1 and its isoform in Neuro-2a mouse neuroblastoma cells, The American Society of Human Genetics 2009 Annual Meeting, 2009.10.22、アメリカ・ホノルル

② Makino S, Maeda K, Jamiyansuren J, Yasuno K, Kaji R, Tamiya G, Genomic Sequence Analysis of the HMSN-P region on human chromosome 3q13, The American Society of Human Genetics 2008 Annual Meeting, 2008.11.13、アメリカ・フィラデルフィア

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牧野 悟士 (MAKINO SATOSHI)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・非常勤研究員

研究者番号：30423403

(2) 研究協力者

ジャミヤンスレン ジャンバルドルジ

(Jamiyansuren Jambaldorj)

徳島大学・医科学教育部・大学院生

研究者番号：なし