

氏名	にしがき りゅういち 西 垣 竜 一
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	甲第46号
学位授与年月日	平成17年 3月11日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	An extra human chromosome 21 reduces mlc-2a expression in chimeric mice and Down syndrome (ヒト 21 番染色体の過剰はキメラマウスおよびダウン症の mlc2a タンパク質の発現を低下させる)
学位論文審査委員	(主査) 佐藤 建三 (副査) 箸本 英吉 押村 光雄

## 学位論文の内容の要旨

ダウン症は先天性の染色体異常であり原因として 21 番染色体のトリソミーによる遺伝子量の過剰が挙げられる。臨床検体による核型解析などから責任領域は特定されているものの、21 番染色体上のどの遺伝子がダウン症の表現型と対応しているのか、また発症メカニズムなどは明らかにされていない。我々の実験では当研究室で作製されたダウン症のモデル動物である「21 番染色体を保持したキメラマウス」の組織を用いて、2 次元電気泳動によりタンパク質を分離・比較・同定し、ダウン症の原因タンパク質の検索を行った。

## 方 法

実験には鳥取大学医学部生命科学科分子細胞生物学講座細胞工学分野で作製されたヒト 21 番染色体を保持するキメラマウスの組織を用いた。このキメラマウスは行動解析により記憶・学習能力が正常マウスと比較して低下していることが明らかになっている。また病理解析からヒトダウン症症例でも見られる重篤な心奇形が確認されている。これらの所見からヒトダウン症患者に類似した表現型が見られる海馬と心臓を用いて解析を行った。この組織のからタンパク質を抽出し、2 次元電気泳動により分離して銀染色で検出を行った。キメラマウスと正常マウスの各タンパク質群の発現量を比較し大きく発現差があるものを候補とした。これらの候補タンパク質をアミノ酸シーケンサーを用いて同定を行った。またこれらの候補タンパク質のいくつかについてヒトダウン症新生児の組織を用いてウエスタンブロッティングによる発現の確認を行った。

## 結 果

海馬組織で約 1200 個、心臓組織で約 500 個のタンパク質を検出できた。そのうち海馬ではキメラマウスでのみ発現しているタンパク質が確認された。同定を行ったところ、ヒト 21 番染色体上にコードされている SOD1 であることが判った。また心臓では正常マウスでは発現しているがキメラマウスで大きく発現が低下しているタンパク質が確認された。同定を行ったところ、マウス由来の *mlc2a* であることが明らかとなった。この *mlc2a* についてヒトダウン症の新生児心房組織での発現をウエスタンブロッティングにより確認したところ、ヒトの場合でもマウスと同様に発現の低下が確認できた。また real time RT-PCR により発現差を調べたところ RNA レベルでは有意な差が得られなかった。

## 考 察

我々が得た *mlc2a* が今までのダウン症の原因遺伝子の報告と異なる点は、21 番染色体以外の領域にコードされた遺伝子であるという点である。今までにもダウン症の臨床症例を用いた解析で 21 番染色体以外の遺伝子の発現異常についての報告がいくつか存在する。だがそれらの実験はいくつかの要因によりはっきりとダウン症の表現型と相関しているとは言い切れない。その要因とは、1. コントロールが正常のヒト検体であり遺伝的背景が異なる、2. ヒトのダウン症症例は個体差・環境因子による症状の変化が大きい、である。だが我々が用いた動物モデルは環境因子や遺伝的背景による個体差の影響を揃えることができる。そのため 21 番染色体上の遺伝子量効果による表現型とそれに対応するタンパク質について調べることが可能である。

この *mlc2a* は心房特異的に発現する遺伝子であり、特に心発生初期である房室形成時に心臓全体、形成後は心房に局在して発現する。このことから発生時のこの遺伝子の発現異常がダウン症の心奇形の原因の一つである可能性がある。この *mlc2a* の発現低下はヒト 21 番上の遺伝子群の数的異常が招いたものであるが、どの遺伝子が調節しているのかはわかっていない。

## 結 論

二次元電気泳動を用いたダウン症の動物モデルのタンパク質解析から、今まで報告がないダウン症の心奇形の原因タンパク質の候補が見つかった。21 番染色体のトリソミーによる遺伝子量効果がこの *mlc2a* の発現低下を招いたと思われるが、どの遺伝子かはまだ分かっていない。二次元電気泳動はこのダウン症のように複数の遺伝子が関与している疾患の原因タンパク質の解析には有用である。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究はダウン症候群モデル動物であるヒト 21 番染色体を保持したキメラマウスを用いて、2

次元電気泳動とアミノ酸シークエンサーによる発現変化するタンパク質の解析を行ない、ダウン症候群の表現型の原因となる遺伝子の探索を検討したものである。その結果ダウン症候群の表現型である、心奇形の発生に関与する可能性があるタンパク質 *mlc2a* と PEBP を同定した。またこのタンパク質のうち *mlc2a* はダウン症新生児の心臓組織でも発現変化を確認した。本論文の内容は、プロテオームによる病態解析の分野で明らかに学術水準を高めたものと認める。