

うるといふ利点もある。

この DNA の多型は、いわゆるサザン・プロット法によって検出する。DNA を制限酵素で切断する時、制限酵素は特定の塩基配列を認識するがその認識部位に変異があると切断されなくなる。この差を RFLPs (restriction fragment length polymorphisms) と呼ぶが、これを検出するのである。最近、RFLPs の出現の仕方にもう1種あることが分かった。DNA 断片の中に反復して存在する配列があり、そのコピー数に個体差があるために、多型が生じる。

この講演では、この DNA レベルで検出される多型を利用した遺伝子の診断の原理について述べたが、その詳細については省略する。

司会 どうもありがとうございます。ただ今木南先生からは DNA の polymorphism を利用して、DNA の病因解析の他に親子鑑別できるというお話でしたが、質問ございますでしょうか。

質問者不明 一つ可能かどうか教えてくださいなのですが、ミニサテライトをプローブとして、例えば培養細胞を何年も経代しているものとかで、培養細胞の個体といえますか、細胞の識別に応用可能かどうかということなのですが。

木南 培養細胞の origin は区別できます。現在それは、細胞バンクができていて、その細胞バンクでこれを応用すべくやっています。だから例えば、我々がヒーラー cell だと思って維持している細胞は、この方法でその通りかどうか鑑定できます。一般にミニサテライトな減数分裂には recombination がよく起こって結構不安定なのですが、somatic cell では結構安定なのです。何年も別々に culture しているものを調べてみてもあまり変化が起こっていないので、そういう意味で安定に遺伝するものだと考えています。

司会 私共は骨髄移植をやっていますが、時には移植後でも白血病の再発という現象があります。それが donor 由来の細胞から再発したのか、あるいは recipient からの再発かの鑑別にそのテクニックが応用できるわけですね。

木南 もちろんそれはできます。

司会 この場合、crossing over の問題はありますか。

木南 先程申し上げたように、somatic cell では結構安定です。

司会 どうもありがとうございました。では次に、Myelin-associated glycoprotein 遺伝子の解析とその応用ということで、藤田先生お願い致します。

2) Myelin-associated glycoprotein (MAG) 遺伝子の解析とその応用

新潟大学脳研究所神経内科 藤田 信也・佐藤 修三
宮武 正
新潟大学脳研究所神経薬理 栗原 正・高橋 康夫

cDNA Cloning of MAG and its Application for Study on Myelination.

Nobuya FUJITA, Shuzo SATO, Tadashi KURIHARA,
Yasuo TAKAHASHI and Tadashi MIYATAKE

*Departments of Neurology and Neuropharmacology, Brain Research
Institute, Niigata University, Niigata 951, Japan*

The myelin-associated glycoprotein (MAG) is a quantitatively minor component

Reprint requests to: Nobuya FUJITA,
Department of Neurology Brain Research
Institute, Niigata University, Niigata
City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学脳研究所神経内科

藤田信也

of the myelin sheath, but it may play a regulatory role in myelinogenesis. We have isolated a cDNA clone for mouse MAG from an expression library using polyclonal antisera against mouse MAG. The clone was found to contain 1350nt cDNA, and the sequenced regions were homologous to the corresponding regions of the previously reported rat MAG cDNA.

Evidence is presented that expression of the two MAG mRNAs is developmentally regulated in mouse brain. In the quaking mouse, the mRNA without a 45nt exon portion was scarcely expressed throughout development. We conclude that the mechanism of splicing-out the 45nt exon portion is lacking in the quaking mouse.

Key words: myelin-associated glycoprotein, mRNA, alternative splicing, quaking mouse.

はじめに

中枢神経系のミエリンは、myelin basic protein (MBP), proteolipid protein (PLP), 2' 3' -cyclic-nucleotide 3' -phosphodiesterase (CNP), myelin-associated glycoprotein (MAG) などから成る。一方、ミエリン形成不全マウスがいくつか知られており、その病態を解析することは、ヒトのミエリン形成不全症を考えるうえでも重要である。近年、ミエリン蛋白の分子レベルでの解析が進み、ミエリン形成不全マウスについても遺伝子レベルでの病態の解析がなされるようになった。MBP 遺伝子の欠損による shiverer マウスや PLP 遺伝子の splicing 異常による jimpy マウスなどである。

MAG は、分子量約10万のミエリン糖蛋白で、含有量はミエリン蛋白の1%程度であるが、神経軸索周囲に集積しており軸索とミエリンの相互作用上重要であると考えられている。ラットの MAG の遺伝子は、13個のエクソンを含む約 16kb のもので、ひとつの遺伝子から alternative splicing による 45bp のエクソン12の有無により2種類の mRNA が生じることがわかった¹⁾。この 45bp のエクソンには終止コドンが含まれており、このエクソンの挿入により小さな分子量のポリペプチドが生じることが明らかになった。quaking マウスは、生後12日ごろより始まる体幹の振戦を主徴とするミエリン形成不全マウスである。常染色体劣性の遺伝形式をとり染色体17番にその異常があるとされている。quaking マウスではミエリンの compaction が不良であり、正常マウスより分子量の大きな MAG が存在することなどより MAG にその病態の原因があるのではないかと

考えられていた。今回我々は、マウス MAG の cDNA と2種の mRNA に特異的な合成プローブを用い、正常及び quaking マウスの成長に伴うそれぞれの mRNA の発現を検討した。

方 法

Clontech Laboratories のマウス脳 cDNA ライブラリーを、マウス MAG ポリクローナル抗体で、immuno screening を行った。ファージ DNA は Davis らの方法で調整し、EcoRI 切断し、Maxam-Gilbert 法で塩基配列を決定した。

各発育段階の正常及び Quaking マウス脳より RNA を調製し、得られたマウス MAG cDNA 及び、合成プローブを使って northern blotting と slot blotting により mRNA の発現を検索した。

結 果

得られたクローンは、EcoRI で 750bp と 600bp にわかれるもので、600bp 断片には、ポリAシグナルとポリAが存在しており、cDNA の3' 末端を含むものであった。決定した配列は、すべて既報のラット MAG の配列と高い相同性があり、このクローンがマウス MAG cDNA であることが判明した (Fig. 1 a, b)。ラットでは、coding region の中に終止コドンを含む 45bp の exon の挿入の有無により2種の mRNA が存在するが、我々のクローンは、この exon と全く同配列のものを含むものであった (Fig. 1 c)。

我々は、2種の mRNA が発育過程でどのような発現をするかを検索した。すなわち、2種の mRNA に

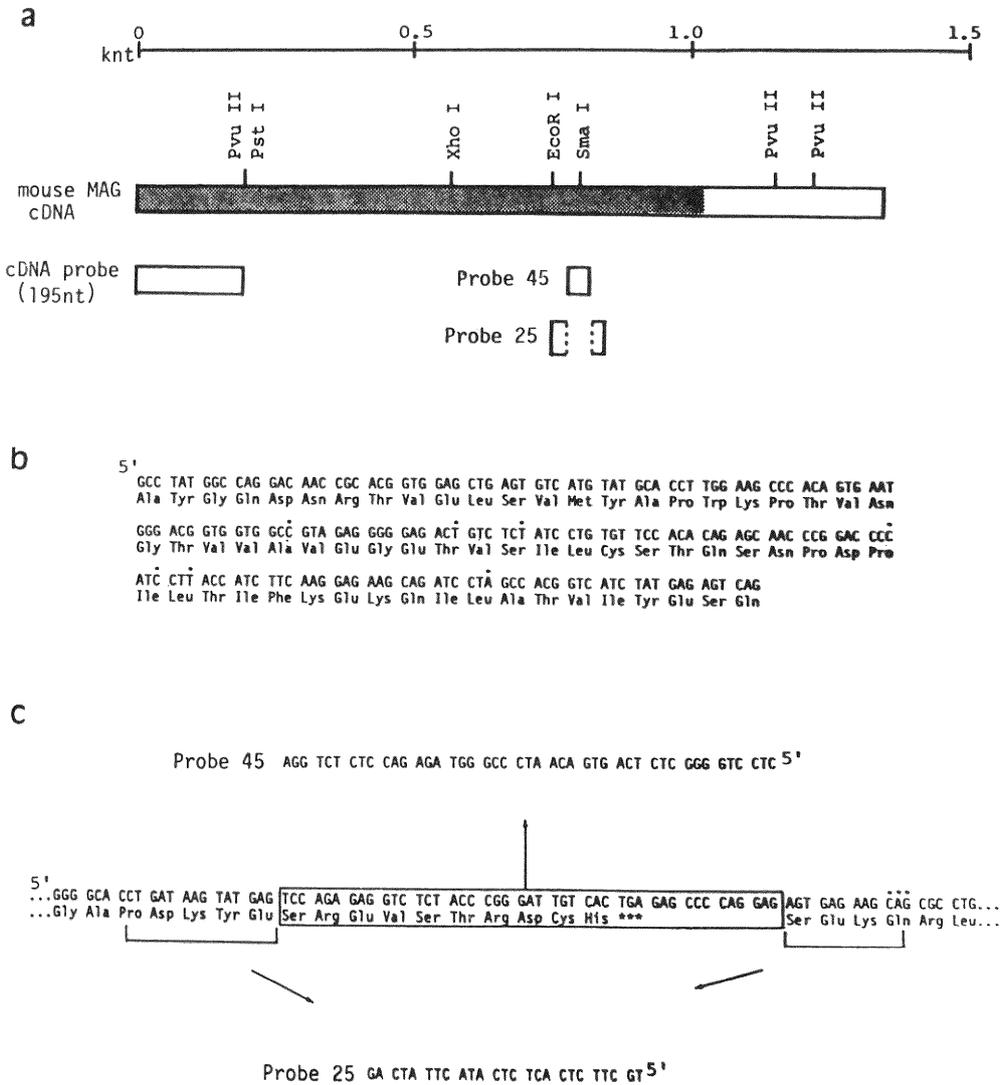


Fig. 1 Mouse MAG cDNA and probes
 a: Restriction map of mouse MAG cDNA. The coding region is shadowed. The positions of the probe sequences are indicated under the restriction map. b: Sequence of the 195-nt cDNA. The sequence is completely identical with that of rat MAG cDNA except for the 7 nucleotides indicated by dots. c: Sequence of the 45-nt exon and adjacent portions. The sequence is completely identical with that of rat MAG cDNA except for the 3 nucleotides indicated by dots. Probe 45 is complementary to the sequence of the 45-nt exon portion; Probe 25 is complementary to the sequences of both sides adjacent to the 45-nt exon portion.

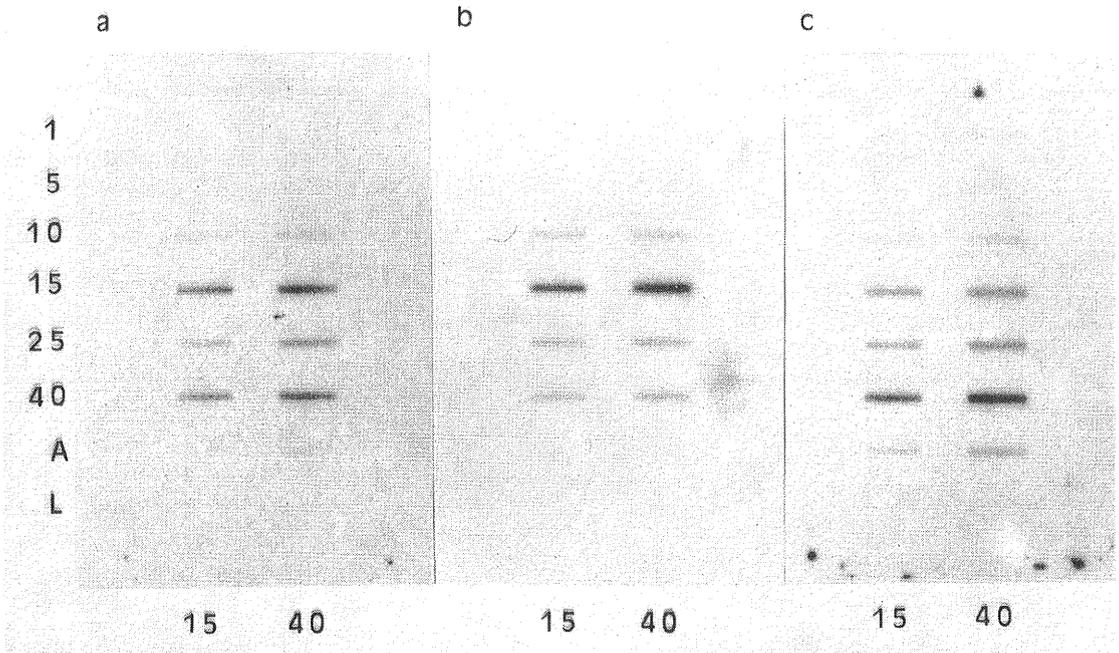


Fig. 2 Slot blot analysis of MAG mRNA in the normal mouse

Total RNA (15 μ g each in I and 40 μ g each in II) from 1, 5, 10, 15, 25, 40 days old and adult (A) ddY mouse brain was blotted; total RNA from adult ddY mouse liver (L) was also blotted. The filter was probed first with Probe 25 (b), second with Probe 45 (c), and finally with the 195-nt cDNA probe (a).

共通部分と考えられる上流域の約 200bp の cDNA を第1のプロープとし、45bp の exon と相補配列の合成プロープを作り第2のプロープとし (Probe 45), もう一つの型の mRNA は、この exon が splice out されている形なのでその両側を合わせた 25base の合成プロープを作り第3のプロープ (Probe 25) とした (Fig. 1 c). 各発育段階の正常マウス脳より total RNA を調製し slot blotting を行くと、Fig. 2 のごとく、Probe25 プロープでは幼若期 (生後15日) に、Probe45 ではより成熟期 (生後40日) に強い発現を認め、cDNA プロープでは、その両者を合わせた形のバンドを認めた。

次に quaking マウス脳から poly A⁺RNA を調製し、正常マウスと MAG の mRNA の発育に伴う発現のちがいを比較した。生後15日目より正常マウスに比較して過剰の mRNA の発現を認めるが、正常マウスで認められる Probe 25 によるバンドはほとんど認められず、quaking マウスの幼若期から発現されている MAG の mRNA のほとんどが、成熟型の mRNA によるもので

あった (Fig. 3)。

考 按

我々の得たマウス MAG の cDNA クローンには、ラット MAG で報告されている終止コドンを含む 45bp が含まれており、マウスにおいてもラットと同様の機構により 2種類の MAG のポリペプチドが生じると考えられた。更に各々の mRNA に特異に反応するプロープを使うことにより、各々の mRNA の発現を検索することが可能であった。今回の我々の結果により、45bp の exon が挿入されたものが成熟期に優位に、挿入されないものが幼若期に優位に発現されるという発育に伴う alternative splicing が証明された²⁾。

一方 quaking マウスでは、少なくとも発症時には、既に成熟型の mRNA が過剰に発現し、幼若型の mRNA が発現していないという異常があることが示された²⁾。最近、ラット MAG 遺伝子が染色体7番に存在することがあきらかにされた³⁾。quaking マウスに関しては、

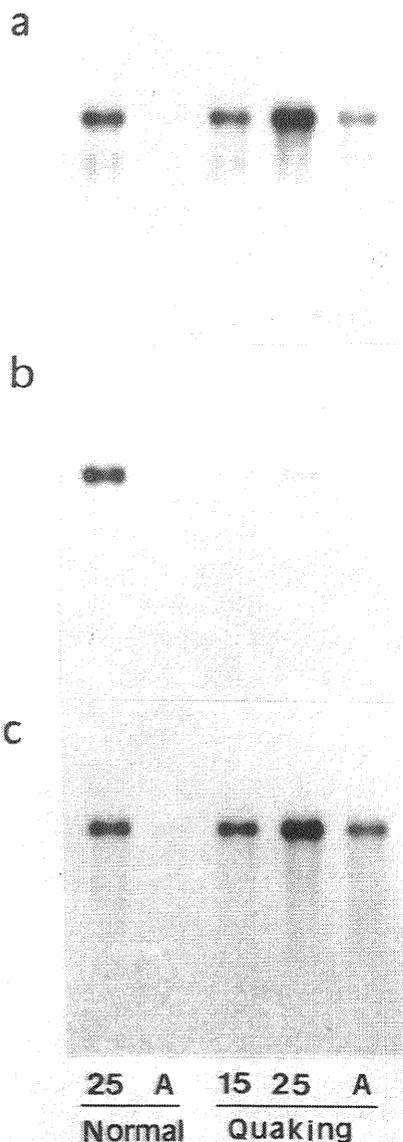


Fig. 3 Northern blot analysis of MAG mRNA in the quaking mouse

Poly(A)⁺ RNA (6 μ g each) from 15, 25 days old and adult (A) quaking mouse brain was electrophoresed. Poly(A)⁺ RNA (6 μ g each) from 25 days old and adult (A) ddY mouse brain was also electrophoresed. The filter was probed first with Probe 25 (b), second with Probe 45 (c), and finally with the 195-nt cDNA probe (a).

MAG 遺伝子との染色体上の座のちがいや、なぜ大きな分子量の MAG が作られるか、などの疑問は残されている。しかし少なくとも正常な発育過程においては、幼若期に 45bp の exon が splice out される機構がミエリンの形成になんらかの重要な役割を果たしている事は確かなようである。今後 MAG 遺伝子の解析や脱髄にひきつづく再生における発現などを検討し、MAG のミエリン形成における存在意義について研究を進めたいと考える。

参 考 文 献

- 1) Lai, C., Brow, A.B., Nave, K.A., Noronha, A.B., Quarles, R.H., Bloom, F.E., Milner, R.J. and Sutcliffe, J.G.: Two forms of 1B236/myelin-associated glycoprotein, a cell adhesion molecule for postnatal neural development are produced by alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 4337~4341, 1987.
- 2) Fujita, N., Sato, S., Kurihara, T., Inuzuka, T., Takahashi, Y. and Miyatake, T.: Developmentally regulated alternative splicing of brain myelin-associated glycoprotein mRNA is lacking in the quaking mouse. *FEBS Lett.*, 232: 323~327, 1988.
- 3) D' Eustachio, P., Colman, D.R. and Salzer, J.L.: Chromosomal location of the mouse gene that encodes the myelin-associated glycoproteins *J. Neurochem.*, 50: 589~593, 1988.

司会 以上ミエリン蛋白についてのお話でしたが、どなたか御質問ございますか。

お話の type 1, type 2 ですが、これはヒトでも確認されているのですか。

藤田 ヒトの MAG cDNA クローニングも現在試みています。ヒトでは、蛋白レベルでは、成長に伴う MAG の分子量の差はとらえてなくて、ラットでその2つの蛋白があるということです。ですからヒトに関して言えば、alternative splicing が起こっているかどうかわからない段階であります。

司会 どうもありがとうございました。それでは3番目の、双胎の卵性診断へのアプローチということで、高橋先生お願い致します。