

医論13)

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論文題目

Molecular cloning and characterization of two novel genes on chromosome 8p21.3

(8番染色体短腕 21.3領域の二つの未知の遺伝子の単離と特性解析)

氏名 金城 貴夫 (印)

目的：ヒトの8番染色体短腕22から21.3の領域は肝癌、肺癌、大腸癌や前立腺癌で loss of heterozygosity (LOH)が報告され、同領域に癌抑制遺伝子の存在が考えられたので、同領域の大規模DNA塩基配列決定により1.2 Mbの連続した塩基配列を得た (Isomura M. et al. DNA Res.6,387-400,1999)。それを利用して未知の遺伝子を単離するため、得られた塩基配列をコンピューターで解析し、さらにその遺伝子の発現臓器や細胞内局在を検討した。

方法：ゲノムDNA塩基配列を二つのエクソン予測プログラムで解析し、コンピューターで予測されたエクソンが実際に発現しているかをRT-PCRで確認した。得られたRT-PCR産物をプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングし、遺伝子の全長を得た。臓器での発現はノーザンハイブリダイゼーションを行い、細胞内での局在はGFP融合蛋白を発現させ検討した。

結果：我々は二つの未知の遺伝子を単離し、それぞれ G K 1 と G 5 と命名した。G K 1 と G 5 の塩基配列より予想されるアミノ酸の配列はデータベースで公開されている既知の蛋白とは有意な類似点を示さなかった。G K 1 は c D N A 塩基配列の解析から 1270 アミノ酸をコードする遺伝子であり、ゲノム D N A との比較から 15 のエクソンで構成され、約 113 k b の大きさをもつ遺伝子であることが明らかになった。ノーザンハイブリダイゼーションにより G K 1 の 7.0 と 4.4 k b の m R N A は ubiquitous (脳、心臓、骨格筋、大腸、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓、小腸、胎盤、肺、末梢血リンパ球) に発現しているが、5.0 k b の m R N A は骨格筋に特異的で 4.0 k b の m R N A は心臓と膵臓に特異的に発現していた。コンピューター解析と G F P を用いた解析から G K 1 の遺伝子産物はロイシンジッパードメインをもち、ミトコンドリアに局在すると考えられた。もう一つの未知の遺伝子で




ある G 5 は 4.2、2.2、1.7 と 1.0 k b の四種類の m R N A が ubiquitous に発現し、このなかの三つの大きな m R N A は 3' 側の非翻訳領域の塩基配列に違いがみられるのみでいずれも 397 アミノ酸のペプチドをコードしていた。

G 5 は 14 のエクソンからなり、約 52 k b の大きさの遺伝子であった。G 5 の遺伝子産物は coiled-coil ドメインとプロリンに富む領域をもち、細胞質に局在すると考えられた。

結語：8 番染色体短腕 22 から 21.3 領域をコンピュータで解析し二つの未知の遺伝子 G K 1 と G 5 を単離した。G K 1 は 1270 アミノ酸をコードする遺伝子でミトコンドリアに局在すると考えられた。G 5 は 397 アミノ酸をコードし、細胞質に局在すると考えられた。いずれも ubiquitous に発現しているが G K 1 のいくつかの転写産物は臓器特異的で 5.0 k b の m R N A は骨格筋のみに、4.0 k b の m R N A は心臓と膵臓に発現していた。

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	課程博 * 論文博 第 / 号	氏名	金城貴夫
論文審査委員	平成 14 年 2 月 7 日		
	主査教授	田中龍夫	 印
	副査教授	武藤良三	 印
副査教授	小川由英	 印	
(論文題目)			
Molecular cloning and characterization of two novel genes on chromosome 8p21.3			
(論文審査結果の要旨)			
上記論文に対し、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義、学術的水準について検討し、以下のような審査結果を得た。			
1. 研究の背景と目的			
ヒト8番染色体短腕22~21.3領域には肝細胞癌や肺癌、大腸癌、前立腺癌で loss of heterozygosity が約7~65%に見られると報告され、癌の発生に関与する癌抑制遺伝子の存在が示唆されている。著者らのグループはこの領域1.2Mbの塩基配列を決定し報告した。本研究は未知の癌抑制遺伝子を単離することを目的に、この配列をコンピューターで解析し、検出された遺伝子を実験的に確認するとともに、発現の臓器特異性や発現蛋白の細胞内局在を検討したものである。			
2. 研究内容			
二つのプログラム GRAIL2 と GENSCAN によってエクソンを予測し、EST データベースによって確かめた後、RT-PCR によって実際に発現していることを確認した。さらに遺伝子の全長を知るために cDNA ライブラリーのスクリーニングを行ない、二つの遺伝子 GK1 と G5 を単離した。			
GK1 は 1270 アミノ酸をコードし、15 のエクソンで構成され、約 113kb の大きさを持つ遺伝子であることが分かった。Northern blot analysis から GK1 の 7.0kb と 4.4kb の転写産物は普遍的に存在しているが、5.0kb の転写産物は骨格筋に特異的で 4.0kb の転写産物は心臓と膵臓に特異的に存在した。GK1-GFP 融合タンパクの強制発現の結果から GK1 蛋白はミトコンドリアに局在すると考えられた。GK1 蛋白のアミノ酸配列と高い			

- 備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。
3 *印は記入しないこと。

ホモロジーを示す蛋白は報告されていない。コンピューターによるアミノ酸配列の解析結果から、GK1 蛋白は二つの coiled-coil 構造を持ち、それぞれに leucine zipper pattern が含まれている事が予測された。

G5 は 397 アミノ酸をコードし、14 のエクソンで構成され、約 52kb の大きさの遺伝子であった。Northern blot analysis により 4.2kb, 2.2kb, 1.7kb 及び 1.0kb の G5 転写産物が全ての細胞で検出された。G5-GFP 融合蛋白は細胞質に局在した。G5 蛋白のアミノ酸配列も既知の蛋白と高いホモロジーを示さなかった。コンピューターによるアミノ酸配列の解析の結果から G5 蛋白は二つの coiled-coil 構造をもち、それぞれ疎水性のアミノ酸が 7 残基ごと 3 回と 4 回繰り返した配列をしており、さらに二つの coiled-coil domain の間に proline rich region がみられた。

3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究は 8 番染色体短腕 22~21.3 領域に存在し癌の発生に関与すると考えられる遺伝子を検索して、二つの未知の遺伝子を単離し解析したものである。これらの遺伝子の発癌への関与や生理的機能は不明ではあるが、特徴的な蛋白をコードする遺伝子を発見し解析した意義は大きく、DNA や蛋白のデータベースや分子生物学的手法を駆使し、1.2Mb にも及ぶ配列を解析して未知の遺伝子を解析した研究は高い水準にある。

以上により、本論文は学位授与に十分値するものであると判定した。