

図1. 解析した CDX1 のプロモータ領域

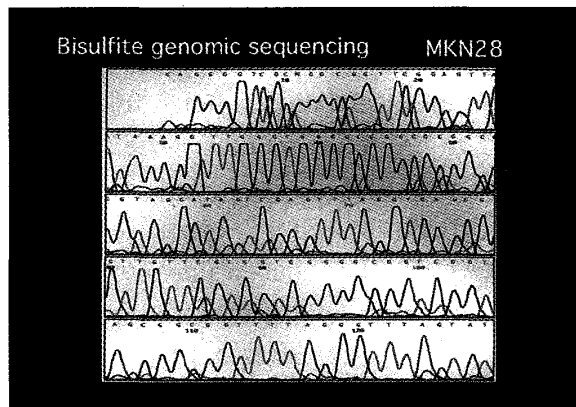


図4. MKN28における bisulfite sequencing の結果

The primer sequences used for primary and secondary PCR amplification of CDX1 were as follows:
 primary PCR forward,
 5'-TTTTGATT(C/T)G(C/T)GGTT(C/T)GGAGG-3';
 primary PCR reverse,
 5'-CC(C/T)AAATACAC(C/T)AAC(C/T)AATCCT-3';
 secondary PCR forward,
 5'-GAAATGTAAATT(C/T)GTTT(C/T)GGTT-3';
 secondary PCR reverse,
 5'-C(C/T)C(C/T)CATACTAAACCCTTAAAA-3'.

図2. nested PCR で用いた primer

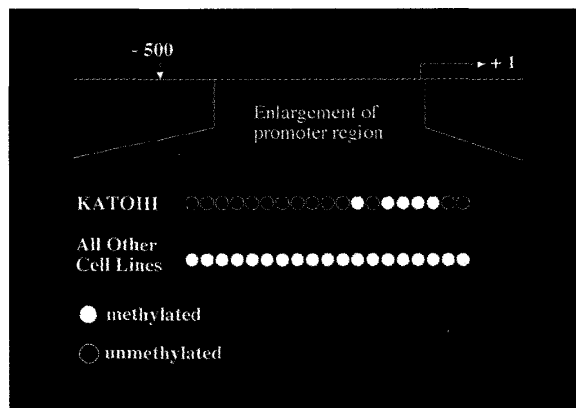


図5. プロモータ領域のメチル化解析の結果

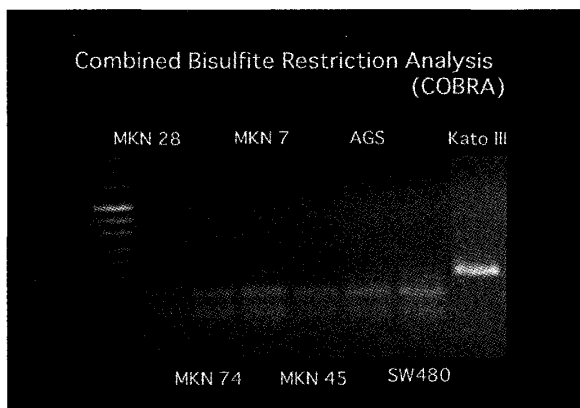


図3. COBRA の結果

AGS, SW480でメチル化陽性であった(図3)。さらに詳細な情報を得るため, bisulfite genomic sequencingを行った(図4)。

CDX1gene 転写開始部位の上流に5種類の胃癌細胞株でdense methylationを認めた。対照的にKATOIIIでは, sparse methylation(26%)を認めた(図5)。

【考察】以上より, 胃癌細胞株における CDX1

の発現の欠如は, CDX1の promoter 領域のメチル化の関与が示唆された。

遺伝性脊髄小脳変性症の原因蛋白 aprataxin の相互作用蛋白の単離と機能解析

内科学講座神経内科学部門 嶋崎 晴雄

背景・目的

常染色体劣性遺伝性の脊髄小脳変性症は, 欧米ではフリードライヒ失調症が最多であるが, 日本では低アルブミン血症を伴う早発型失調症が多いとされている。低アルブミン血症を伴う早発型失調症とヨーロッパに多い眼球運動失行を伴う早発型失調症は, ごく最近, aprataxin 遺伝子に共通の変異が見い出されたことより, 同じ疾患であると考えられるようになった。両疾患をまとめて, 眼球運動失行と低アルブミン血症を伴う早発型失調症 (early-onset ataxia

with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia: EAOH) という疾患名が提唱されている (Date H et al. Nature Genetics 2001)。我々は, EAOH 自験例 4 家系 6 症例の臨床像について, 遺伝子変異が見い出された後では初めて詳細に解析し, 遺伝子解析にて 1 家系 2 症例に新規の missense 変異を同定し, 他の家系にも既報と同じ insertion, missense 変異が存在することを報告した (Shimazaki H et al. Neurology 2002)。EAOH の病態解明のため, 原因蛋白 aprataxin と相互作用する蛋白の単離と, 遺伝子変異による aprataxin 蛋白の細胞内局在の変化を解明することを目的とした。

方法・結果

胎児脳 cDNA ライブラリーより, Bacterial Two-Hybrid system を用いて short form aprataxin と相互作用する蛋白の単離を試みた。その結果, 2 つの可能性のある蛋白が単離された。1 つは, Collapsin response mediated protein-2 (CRMP-2) で, これは発生時期の哺乳類の神経細胞に一過性に発現する細胞内タンパク質であり, 神経細胞の軸索形成に重要な役割を担う可能性がある。もう一つは, FLJ31106 というクローンで, CD34 陽性血液幹・前駆細胞に発現している HSPC166 にホモロジーのある蛋白である。これはそれ以上の機能等についてはまだ解明されていない。今後免疫沈降法を用いて相互作用を確認する予定である。

変異蛋白を培養細胞に発現させ, その発現パターンの変化を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。GFP, Myc と short-form aprataxin の融合蛋白を COS7 細胞に発現させたところ, 野生型は細胞質に多く局在し, 167 番塩基の T 挿入変異と, 80 番目の塩基の A から G への, また 95 番目の塩基の C から T へのミスセンス変異のある蛋白は, 核に多く局在した。また変異蛋白を発現させた細胞質には, 信号強度の高い点状の発現がよく見られた。

考察・結論

aprataxin は, 神経細胞の軸索形成に関係した CRMP-2 との相互作用が示唆されており, EAOH における末梢神経の軸索障害との関連

が推定された。aprataxin を培養細胞に発現させたところ, 野生型と変異型では局在が異なっており, 細胞内局在の変化が病態に関与していることが示唆された。T 挿入変異では, フレームシフトを起こし正常より短い蛋白が作られ, また, 2 種類のミスセンス変異は, ヒスチジン triad スーパーファミリーの保存されたアミノ酸残基に位置しているため蛋白の機能異常を来たし細胞内局在が変化すると考えられた。今後は, DNA 修復に関連しているとされる long-form aprataxin で, 変異により細胞内局在の変化がみられるか検討する予定である。

DNA チップを用いた骨髄間葉系幹細胞の分化制御機構の解明

自治医科大学内科学講座血液学部門
宮里 彰

骨髄間葉系幹細胞は中胚葉系の細胞である脂肪細胞, 骨芽細胞, 軟骨芽細胞, 筋細胞などに分化誘導されることが知られているが, 分化誘導や未分化維持に関する機序については不明な点が多い。マウス胎児由来の線維芽細胞株 C3 H10T1/2 (10T1/2) 細胞と 10T1/2 細胞をアザシチジンによって処理することにより得られた脂肪前駆細胞株 A54 細胞と筋芽細胞株 M1601 細胞は形態的には 10T1/2 細胞と区別することが困難であるが, 適当な培養条件によりそれぞれ脂肪細胞, 筋繊維へと分化誘導される。これに対して 10T1/2 は未分化の状態を維持する (Nishikawa ら, Blood 81: 1184-1192, 1993)。これらの細胞株は造血支持能も有しており, 骨髄間葉系幹細胞の分化機構やその生物学的役割を解析するための良いモデルと考えられる。我々は間葉系幹細胞の分化誘導, 未分化維持に関わる分子を探索する目的で, これらの細胞より mRNA を抽出し, GeneChip システムを用いて遺伝子発現プロファイリングを行った。10T1/2 細胞, A54 細胞, M1601 細胞は類似の形態を呈するが, クラスター解析を行ったところ, 明らかに異なる遺伝子発現パターンを示した。10T1/2 細胞では A54 細胞や M1601 細胞に比し, CD90,