

# 主 論 文 要 旨

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	宮 脇 慎 吾
主 論 文 題 名				
Molecular cloning and characterization of the INK4a and ARF genes in naked mole-rat (ハダカデバネズミINK4aおよびARF遺伝子のクローニングと機能解析)				
(内容の要旨)				
<p>ハダカデバネズミ (naked mole-rat, NMR) は、マウスと同等の大きさながら (体重約 35g)、異例の長寿動物 (平均生存期間31年) であり、未だ腫瘍形成が一例も確認されていない癌化耐性齧歯類である。</p> <p>INK4aとARF (Alternative reading frame) は同一のCDKN2a遺伝子座に存在する代表的な癌抑制遺伝子であり、細胞老化や個体老化の際に発現が上昇することが知られている。近年NMRのゲノム情報が解読され、INK4aとARF遺伝子に種特異的な配列変化が存在することが示された。しかしながら、これらの配列変化がもたらす遺伝子機能への影響は解明されていない。本研究では、NMR INK4aとARF遺伝子のクローニングを行い、抗体作製等の分子生物学的な解析基盤を確立した後に、発現様式と遺伝子機能に関して解析を行った。</p> <p>はじめに、NMRの皮膚線維芽細胞由来cDNAからINK4aとARFをクローニングし、mRNA・アミノ酸配列について、マウス、ヒトおよびモルモットとの種間比較を行った。ゲノム解析で予測されていた通り、INK4aとARFのmRNA配列の各々に早期終止コドンが存在し、他種と比較してアミノ酸配列が短くなっていることが判明した。NMR INK4aにおいてタンパク質分子間の結合に必要なankyrin repeatは保存されており、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子としての機能は保持されていることが示唆された。一方NMR ARFにおいては、p53の安定化に関わる配列部位は保存されていたが、マウスARFのC末端に存在するp53非依存的細胞死ドメインが欠損していた。</p> <p>次に、得られた配列情報をもとに、NMR INK4aとARFの抗体、レンチウイルス発現ベクター、定量PCR用のプライマーセットを作製し、遺伝子発現及び機能について解析を行った。NMR線維芽細胞において細胞老化を誘導したところ、mRNA・タンパク質レベルでINK4aとARFの発現は上昇した。また、NMR線維芽細胞にINK4aまたはARFを過剰発現させたところ、G1期およびG2期で細胞周期が停止した。一方、NIH3T3細胞における過剰発現の結果、NMR ARFは、マウスARFに比べて細胞死を誘導する活性が低いことが判明した。これはNMR ARFの種特異的な配列差によるものと考えられる。</p> <p>以上の結果から、NMR INK4aとARFの細胞老化ストレス時の発現上昇、細胞周期を停止させる機能については、マウスやヒトと同様に保存されていることが明らかとなった。今回確立した機能解析のための分子生物学的解析基盤を利用することにより、今後、INK4aおよびARFの種特異的な配列変化による詳細な機能差、個体の癌化耐性・老化耐性への寄与についての解明が期待される。</p>				