

ポドサイトの分化と機能維持を制御する 新規エピジェネティック分子NSD3の役割

倉山 亮太

杏林大学医学部小児科学教室

【背景と目的】

報告者の研究グループは、新規エピジェネティック分子NSD3が、ヒストンのメチル化を介して糸球体スリット膜分子ネフリンのプロモーター活性を促進することを明らかにしてきた。本研究は、マウスおよびzebrafishを用いた遺伝子改変モデルでNSD3の分子機能を詳細に解析することを目的とした。

【方法と結果】

1. NSD3ノックアウトマウスの作成と解析

C57BLマウスを用いて、NSD3のエキソン5を標的としたloxP-neo-loxPシステムを用いた全身ノックアウトマウスを樹立した。腎を材料にtotal RNAを採取し、cDNAに変換後、サンガー法による塩基配列決定を行った。目的としたNSD3のエキソン5は確かに欠失し、エキソン4以降のストップコドンが確認されたことから、DNA上での遺伝子破壊は成功したと考えた。しかし、本ノックアウトマウスは、正常に誕生し、生後5週現在、外表、成長に著変なく、タンパク尿も惹起されていない。腎切片を作成し、形態観察を行ったが、糸球体の発生に異常は見られていない。また、NSD3は脳にも強く発現することから、脳の形態観察を行った。しかし、神経細胞の数を含め、野生型との変化は観察されていない。さらに、いずれの臓器でも、免疫染色において、NSD3の核内局在が観察された。

本ノックアウトマウスが、実際にタンパクレベルでも発現が阻害されているかの更なる検証が必要である。破壊したエキソン5以降に、さらにATGが存在することから、そのタンパク産物が機能している可能性がある。これを確証させるためには、エキソン5以降の部位の特異抗体を作成し、さらなる検証が必要である。

2. ゼブラフィッシュ解析 (図)

NSD3のATG部位、エクソン1-3'側、エクソン3-5'側の翻訳を特異的に阻害するmorpholino antisense oligonucleotide (MO)を作成し各ノックダウンゼブラフィッシュを樹立した。受精4日後の変異体の出現率について、コントロールMOと比較した。エクソン1と3の変異については、NSD3の正常mRNAの共注入も行った。NSD3の蛋白発現とネフリンmRNAをwhole bodyを材料にWestern blotとRT-PCRで検討した。変異体の糸球体の形態変化を、PAS染色と電顕により観察した。FITC-dextranを用いた糸球体濾過アッセイにより糸球体濾過障壁の異常の有無を観察した。その結果、各変異体のcDNAの塩基配列の解析とWestern blotにより、MOによる各エクソンの変異の誘導とNSD3蛋白の合成阻害を確認した。浮腫などの変形率は、コントロール5.3%、ATG部位が89.9%、エクソン1が59.2%、エクソン3が65.5%であり、正常mRNAの共注入によりエクソン1と3の変形率は21.9%と23.6%に各々軽減した。各変異体の糸球体はいずれも矮小化が著明であり、電顕では著明な足突起形成とスリット膜の形成障害が観察された。また、各変異体のネフリンmRNAの有意な減少がみられ、FITC-dextranの尿細管への漏れが観察されたことから、糸球体濾過障壁の破綻が明らかになった。

ゼブラフィッシュの系では、ATGでのMOによる変形率が突出しており、NSD3のこの部位における機能破綻が、実際に糸球体発生に重要であることを示す必要がある。この為に、さらにATG MOに正常mRNAの共注入が必要である。

【今後の研究】

NSD3は生体に広く発現する分子である。そのヒスト

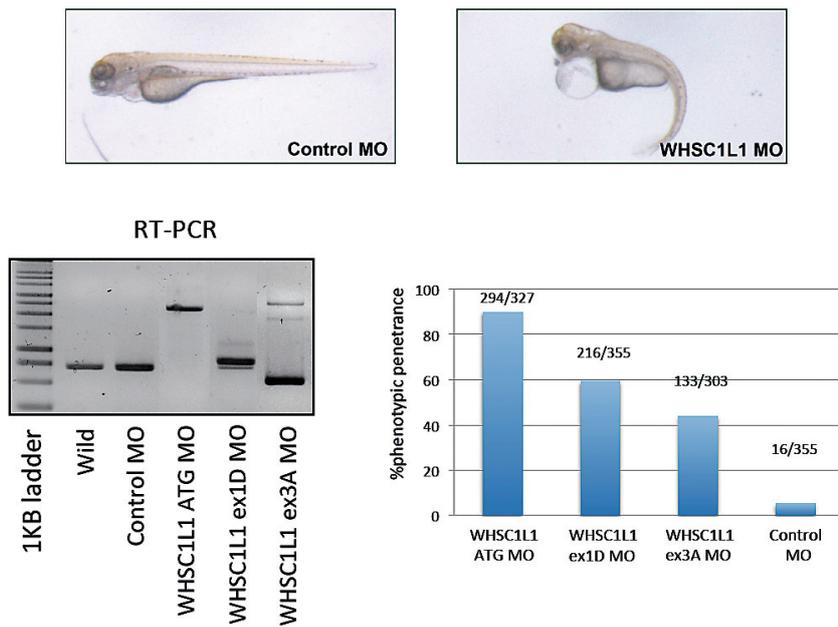


図 The phenotypic changes of the WHSC1L1 morphants using the antisense morpholino oligonucleotides

ンメチル化能を介した分子基盤は全く不明であるが、臓器発生や腫瘍の成り立ちの病態に深く関わる事が予想される。今後のノックアウトマウス解析については、新規抗体の作成後に、さらなる検証を行う。タンパクレベ

ルでの有意なノックアウトが無いことが確認された後には、更なる下流の機能ドメインのノックアウトマウスを改めて作成する。