

# 学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 柴田 章夫
論文題目  ヒト先天性永久歯欠損症に関連する MSX1 の核局在についての分子生物学的解析	

## I. 緒言

脊椎動物における胚発生期の形態形成は、多くの遺伝子により時間的、空間的に制御され、体幹の主要な骨組織は、ホメオボックス遺伝子の *HOX* 遺伝子群により頭尾方向に沿う繰り返し構造が決定する。顎顔面領域も同様で、歯胚の発生制御にホメオボックス遺伝子が関与している。近年、永久歯欠損と遺伝子変異の関連が報告されており、永久歯欠損の分子生物学的機序の解明が、歯胚発生、さらに形態形成の制御機序の解明に寄与するものと考えられる。

ヒト先天性永久歯欠損症は、先天性に永久歯欠損を認める、最も発生頻度の高い疾患の一つであり、責任遺伝子の一つとしてホメオボックス遺伝子の muscle segment homeobox 1 (*MSX1*) が報告されている。*MSX1* は歯胚形成初期に発現する転写因子で、ホメオドメイン (Homeodomain: HD) という機能領域が、歯胚形成に関わるとされる。さらに、本疾患で報告された HD の欠失する変異が、核局在化障害を起こすため、発症機序の一つとして考えられるが、その詳細は明らかでない。

*MSX1* をはじめとした転写因子は、核内で活性を示すため、核に局在することが本質的に必須である。分子の核への移行は拡散、もしくは核内輸送担体による能動輸送により核膜孔を通過することでなされる。*MSX1* は 31kDa のタンパクで、拡散し得るサイズであるが、HD の欠失により核局在を損なうため、核内輸送担体による核移行が存在しているものと考えられる。ま

た、核内輸送担体がタンパクを核内へ運ぶ際、核局在化シグナル (Nuclear localization signal: NLS) を認識する必要があるが、MSX1 の NLS の詳細は明らかになっていない。そこで今回われわれは、MSX1 の NLS を明らかにし、MSX1 遺伝子変異による永久歯欠損症の発症と核局在化障害の関連を検討した。

## II. 対象および方法

### 1. 対象遺伝子変異

先行研究でこれまでに報告されたヒト非症候性先天性永久歯欠損症の MSX1 遺伝子変異のうち、翻訳領域に存在する 15 種の変異を対象とした (表 1、図 1)。その内訳は、Missense 変異が 11 種、Nonsense 変異が 2 種、Frame shift 変異が 2 種であった。本研究は愛知学院大学歯学部ヒト細胞組織遺伝子疫学情報倫理委員会の承認を得て実施した。

Symbol	Type of mutation	Prediction of effected protein	Nucleotide change	Tooth phenotype	Inheritance	Affected Homeodomain
M61K	Missense	p.Met61Lys	c.182G>C	Oligo	AR	No
R151S	Missense	p.Arg151Ser	c.453G>T	Hypo	AD/IP	No
R170W	Missense	p.Arg170Trp	c.508C>T	Oligo	Unknown	Yes
T174I	Missense	p.Thr174Ile	c.521C>T	Hypo	Sporadic	Yes
A194V	Missense	p.Ala194Val	c.581C>T	Oligo	AD/IP	Yes
R196P	Missense	p.Arg196Pro	c.587G>C	Oligo	AD	Yes
L205R	Missense	p.Leu205Arg	c.614T>G	Oligo	AD	Yes
R217L	Missense	p.Arg217Leu	c.650G>T	Hypo	Unknown	Yes
A219T	Missense	p.Ala219Thr	c.655T>A	Oligo	AR	Yes
A221E	Missense	p.Ala221Glu	c.662C>A	Oligo	AD	Yes
L224P	Missense	p.Leu224Pro	c.671T>C	Hypo	AD	Yes
W139X	Nonsense	p.Trp139X	c.416G>A	Oligo	AD	Yes
Q187X	Nonsense	p.Gln187X	c.559C>T	Oligo	AD	Yes
G22RfsX168	Frameshift	p.Gly22ArgfsX168	c.62_63dupG	Oligo	AD	Yes
Q209QfsX125	Frameshift	p.Gln209GlnfsX125	c.625_626insA	Oligo	Unknown	Yes

Oligo: Oligodontia, Hypo: Hypodontia, AD: autosomal dominant, AR: autosomal recessive, AD/IP: autosomal dominant with incomplete penetrance

表 1. ヒト非症候群性先天性永久歯欠損症の MSX1 遺伝子変異の一覧

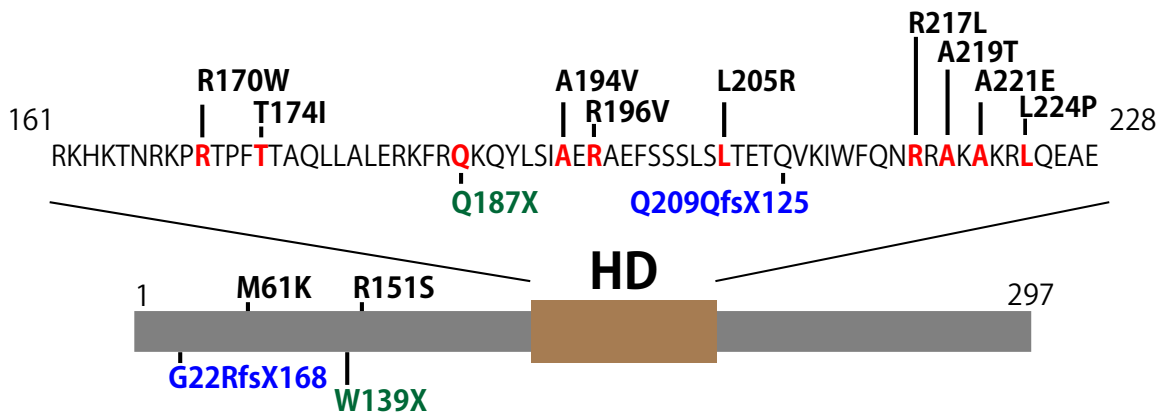


図 1. *MSX1* 遺伝子産物とホメオドメイン内のアミノ酸配列

## 2. 核局在化シグナル候補領域の決定

*MSX1* の NLS の候補領域を、予測ソフトを用い決定した。*MSX1* 遺伝子産物の全長アミノ酸配列から、HD 内に二つの候補領域が挙がり、それぞれ HD 内の N' 側に存在する領域を NLS1、C' 側に存在する領域を NLS2 とした。

## 3. *MSX1* 発現ベクターの作製

野生型、変異型 *MSX1* タンパクを発現させるため、発現ベクターを作製した。遺伝子変異は作製した発現ベクターをテンプレートとし、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) にて導入した。NLS 同定のため作製した *MSX1* の欠失変異体は、緑色蛍光タンパク融合タンパクを発現できる蛍光タンパク質ベクターに導入し、さらにグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) の配列を挿入した。ヒト先天性永久歯欠損症の遺伝子変異は、標識のため FLAG タグの配列を挿入した哺乳類細胞発現ベクターに導入した。

#### 4. 細胞内局在解析

それぞれの発現ベクターをヒト胎児腎細胞 (HEK293 細胞) に形質転換させ、MSX1 タンパクを一過性に発現させた。蛍光免疫染色は、抗 FLAG 抗体、抗 GFP 抗体を一次抗体として添加し、Cy3 標識ヤギ抗マウス抗体、または 488 標識ヤギ抗ラビット抗体および DAPI を反応させ、蛍光顕微鏡を用い細胞内局在を観察した。核局在性は、Nuclear localization signal score: NLS score を用いて点数化し評価した。点数化は、完全に核に局在するものを 4 点、優位に核に局在するものを 3 点、核と細胞質に同等に局在するものを 2 点、優位に細胞質に局在するものを 1 点、細胞質のみに局在するものを 0 点と評価し平均をスコアとした (図 2)。

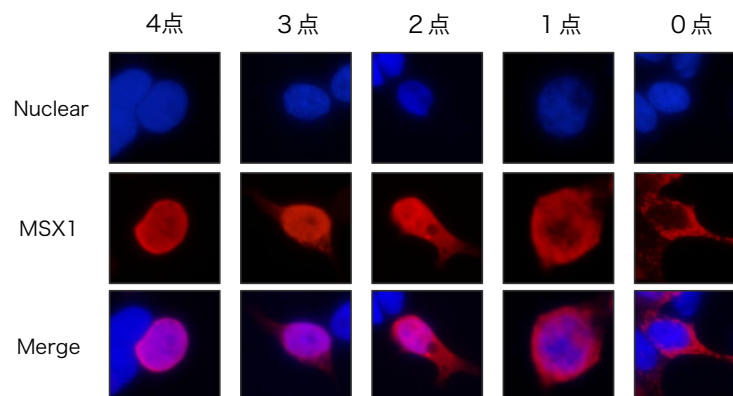


図 2. Nuclear localization signal score

### III. 結果

#### 1. MSX1 Homeodomain の核局在性

野生型 MSX1 (Wild)、MSX1 内の HD 単独 (HD) のシグナルは核に優位に局在し、HD の欠失体 ( $\Delta$ HD) のシグナルは細胞質に優位に局在した (投稿中論文

Figure. 1 に掲載)。Wild、HD は NLS score 3 点以上であったのに対し、 $\Delta$ HD は 1 点以下であり、Wild、HD が核に局在すること、HD の欠失によって核局在が障害されることが示された。(図 3)

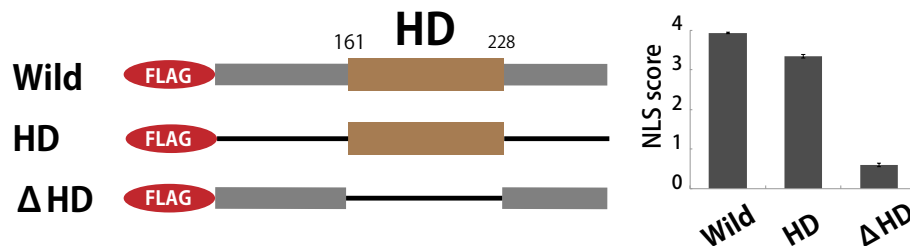


図 3. MSX1 Wild、HD、 $\Delta$ HD の細胞内局在観察

## 2. MSX1 核局在化シグナルの同定

### 1) NLS 候補領域欠失変異体の核局在性の検討

NLS1 を欠失させた変異体 ( $\Delta$ NLS1) のシグナルは細胞質に優位に局在し、NLS2 を欠失させた変異体 ( $\Delta$ NLS2) のシグナルは核に優位に局在した(投稿中論文 Figure. 2 に掲載)。 $\Delta$ NLS1 の NLS score は、 $\Delta$ NLS2 に比べ低く (図 4)、NLS1 の欠失は、NLS2 の欠失と比較し、核局在を強く障害した。

### 2) NLS1、NLS2 単独の核局在性の検討

HD を N' 側、C' 側に分割し、HDN'、HDC' として検討した。NLS1 を単独で含む HDN' のシグナルは核と細胞質に局在し、NLS2 を含む HDC' のシグナルは細胞質に優位に局在した(投稿中論文 Figure. 2 に掲載)。HDN'、HDC' の NLS score は低値であり、NLS1、NLS2 単独では十分な核局在を示さなかった (図 4)。

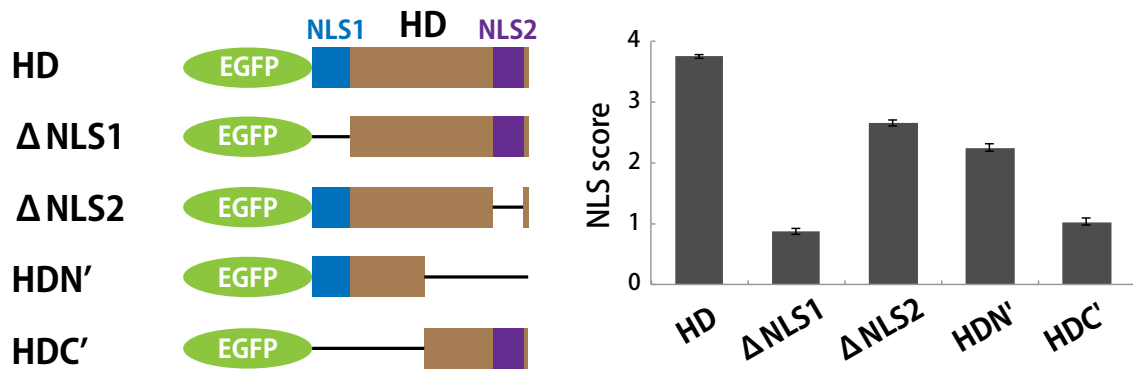


図 4. NLS1、NLS2 の NLS score

### 3) NLS1、NLS2 の協調による核局在性の検討

NLS1、NLS2 を結合させ核局在性を検討した(投稿中論文Figure. 3に掲載)。  
HD GST 融合タンパクのシグナルは核と細胞質にびまん性に局在したが、NLS1、NLS2 の結合体 (NLS1+2) GST 融合タンパクのシグナルは核に優位に局在した。HD GST の NLS score は 3 点以下だったが、NLS1+2GST は 3 点以上であった。以上の結果より、NLS1、NLS2 の 2 つの NLS により核に局在することが示された。

## 3. ヒト先天性永久歯欠損症の MSX1 遺伝子変異の核局在性の評価

### 1) Missense 変異の核局在性の評価

11 種すべての Missense 変異タンパクのシグナルが核局在を示し、NLS score が 3 点以上であった。さらに、NLS1 内の変異 R170W、NLS2 内の変異 R217L も核局在に影響を認めなかった。(図 5)

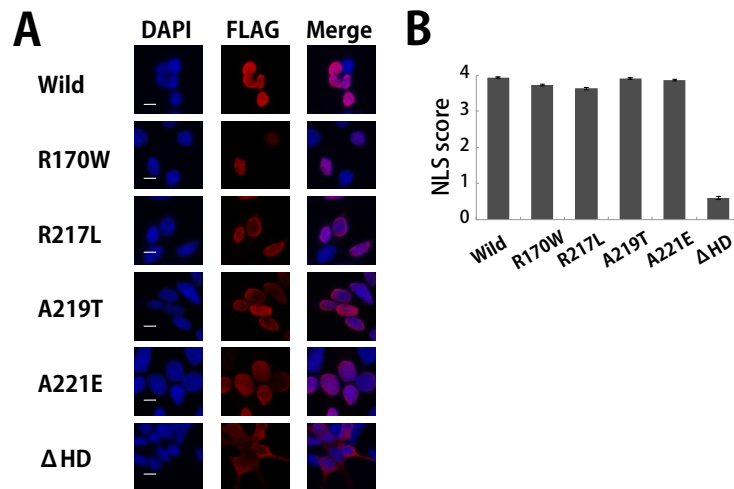


図 5. Missense 変異の細胞内局在観察

2) Nonsense 変異、Frame shift 変異の核局在性の評価

HD 構造を完全に失う W139X、G22RfsX168 のシグナルが、細胞質に優位に局在したのに対し、HD の C' 側を欠失した Q187X のシグナルは、核と細胞質に局在し、Q209QfsX125 のシグナルは、核に優位に局在した。W139X、G22RfsX168 の NLS score は 1 点以下であり、Q187X、Q209RfsX125 の NLS score の低下は軽度であった (図 6)。

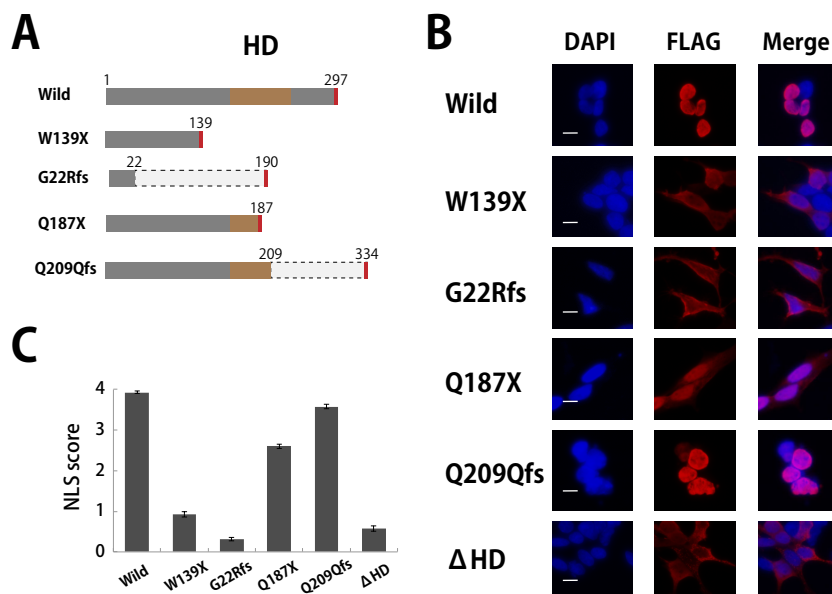


図 6. Nonsense 変異、Frame shift 変異の細胞内局在観察



#### IV. 考 察

##### 1. MSX1 核局在化シグナルについて

今回われわれは、MSX1 の HD 内に存在する NLS1 と NLS2 が協調することで核局在を示すことを明らかにした。NLS を有するタンパクは、importin  $\alpha$  /  $\beta$  複合体などの核内輸送担体に認識され核内へ移行するとされ、MSX1 も同様の機序によると考えられる。しかし、核局在を示していた HD に GST と GFP を融合させると、核局在が障害されており、これは融合タンパクのサイズが 60kDa を超え、拡散による核移行が障害されたためであると考えられる。一般的な NLS と核内輸送担体による能動輸送は、タンパクの分子量に影響を受け難いとされており、MSX1 が、拡散と能動輸送の両方により核局在していることを示唆するものと考えられる。

##### 2. 他のホメオボックス遺伝子の NLS との比較

一般的に HD は、3つの  $\alpha$  ヘリックス (helix I, II, III) が、ヘリックス-ターン-ヘリックス構造をとる。近年、様々なホメオボックス遺伝子で核局在化シグナルが同定され、monopartite NLS、bipartite NLS、two NLS として報告されている。MSX1 の NLS は helix I と helix III に独立して存在することから、two NLS に分類できる。また、MSX1 と他のホメオボックス遺伝子で、NLS の塩基性アミノ酸は他部位より高度に保存されていることから、NLS が HD の必須な構造であると考えられる。

### 3. ヒト先天性永久歯欠損症と核局在化障害の関連

MSX1 遺伝子の翻訳領域にある 11 種の Missense 変異は核局在化障害を認めないことから、核内へ移行した後の機能障害が病因として考えられる。また、NLS 内の塩基性アミノ酸置換でも核局在化障害を認めないことから、MSX1 の two NLS は、アミノ酸置換の影響を受け難い構造であることが示唆される。また、Nonsense 変異、Frame shift 変異では、HD を完全に失う W139X、G22RfsX168 の場合は NLS1、NLS2 が欠失するため核局在化障害が起き、Q187X の場合は NLS2 のみが欠失することから、軽度の障害が起きることが説明でき、先天性永久歯欠損症の発症と核局在化障害を関連づけられる。

### 4. まとめと今後の展望

本研究で、MSX1 の HD 内の二つの NLS が核局在化シグナルとして機能することが明らかになった。また、NLS を同定したことで、ヒト先天性永久歯欠損症の *MSX1* 遺伝子変異と核局在化障害の詳細な関連が明らかになった。今後、MSX1 の核局在化障害が引き起こす他の関連遺伝子への影響の検討が、発症機序の全容解明に必要である。

### V. 結 語

ホメオボックス遺伝子である MSX1 の NLS を同定し、ヒト先天性永久歯欠損症と核局在化障害との関連を明らかにした。