

微型述评

Neuronatin 基因研究进展*

余利红¹⁾ 周仁平^{1,2)} 张成岗¹⁾**⁽¹⁾ 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850;⁽²⁾ Department of Chemical Biology, College of Pharmacy, Rutgers University, Piscataway, NJ 08854 USA)

摘要 *Neuronatin (Nnat)* 是最近克隆的脑特异表达的新基因, 在大脑发育过程中被选择性地剪接. 人 *Nnat* 基因全长 3 973 bp, 含有 3 个外显子和 2 个内含子. *Nnat* mRNA 有 α 和 β 两种剪接形式, 分别编码 81 个和 54 个氨基酸, 两者具有同一相位的开放阅读框架, 差别在于 β 形式中间的外显子被剪切掉. 人 *Nnat* 是单拷贝基因, 定位于染色体 20q11.2~12. 小鼠 *Nnat* 基因定位于 2 号染色体末端. 该基因是印记基因 (imprinted gene), 仅在父本来源的等位基因表达, 而母本来源的等位基因则被甲基化不能表达. 该基因在胚胎期及出生后早期大量表达, 而在成年和衰老动物大脑中表达明显降低, 因此推测该基因与大脑的发育和分化密切相关. 成年动物中垂体前叶是 *Nnat* mRNA 唯一强表达的地方. 推测其蛋白质产物具有疏水 N 端和亲水 C 端, 是跨膜蛋白, 其确切功能尚属未知.

关键词 *Neuronatin*, 脑发育, 印记基因

学科分类号 Q523

大脑发育是一个连续的过程, 通过基因的选择性表达而得以精确控制. *Neuronatin (Nnat)* 是近年来被发现并克隆的脑特异的新基因, 仅在胚胎期和出生后脑发育最旺盛时高表达, 在成年和衰老脑中表达下调, 提示该基因的表达与大脑发育过程密切相关. *Nnat* 表达和结构特点提示其产物可能是重要的信号因子, 对脑的发育具有调节作用.

1 *Nnat* 基因的克隆及其组织表达谱

Nnat 是一个脑特异的、具有高度保守性的哺乳动物发育相关新基因. Joseph 等^[1]通过差异显示技术得到了一个在新生大鼠脑中选择性表达的全新 cDNA 片段. 以此为探针, 从相同 mRNA 样品制备的文库中筛选到阳性克隆并测序. 大鼠 *Nnat* cDNA 全长 1 195 bp, 有强转录起始位点, 编码 81 个氨基酸. 继 *Nnat* 首次在大鼠中克隆之后, Dou 等^[2]以大鼠 *Nnat*- α cDNA 为探针筛查人胎脑 cDNA 文库, 克隆了人 *Nnat* cDNA [GenBank Accession No. U25033 (α -form) 和 U25034 (β -form)], 之后又以人 *Nnat*- β cDNA 为探针, 筛查人的基因组文库, 通过 DNA 印迹、限制性酶切分析、引物步行测序得到了人 *Nnat* 基因的全长序列. 人 *Nnat* 基因全长 3 973 bp, 含有 3 个外显子和 2 个内含子.

Nnat mRNA 在哺乳动物神经发生过程中被选择性地表达. Joseph 等^[3]研究表明 *Nnat* mRNA 有 α 、 β 两种剪接形式, 两者具有相同的开放阅读框, α 形式包含 3 个外显子, 编码 81 个氨基酸, β 形式包含 2 个外显子, 编码 54 个氨基酸, 两者的差别在于 α 形式有一个额外的 81 bp 片段插入到编码区中. 除此之外, Kagitani 等^[4]报道其 mRNA 有另外一种剪接形式, 但通过 RT-PCR 却不能检测到表达. Joseph 等^[3]利用 RNA 印迹, 分析发现 *Nnat* 在新生大鼠脑中地被选择性地表达, 而在心、肾、肝等三种组织没有表达. 它最初出现在胚胎中期, 这时神经管闭合, 神经上皮细胞开始增殖. 在胚胎 16~19 天的神经发育高峰期时, *Nnat* mRNA 的表达显著增强. 随着神经系统发育的完成, 其表达下降到成年大脑的表达水平. U sui 等^[5]同样证实 *Nnat* 在胎脑中的表达高于成年大鼠大脑至少 5 倍, 且在大脑发育过程中表达下调. 在成年脑组织中, 垂体前叶是 *Nnat* mRNA 唯一强表达的地方^[6]. 有

* 国家海外青年学者合作研究基金项目 (30128010), 国家自然科学基金资助项目 (39900041, 30100049, 39900074), 北京市自然科学基金资助项目 (7002030) 和军事医学科学院科技创新启动基金资助项目 (0102001, 9905105).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66931590, E-mail: zhangcg@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2002-09-03, 接受日期: 2002-10-28

趣的是, 在成年小鼠胰 β 细胞中 *Nnat* 也有表达^[7].

Wijnholds 等^[8]通过消减杂交还证实小鼠 *Nnat* 在 P19 胚胎癌细胞中表达下调, 在后脑发育早期的菱脑节 3 和 5 及前肠口袋的底部瞬时表达. 胚胎发生后期, *Nnat* 基因在中枢和周围神经系统强表达. 这些结果表明, *Nnat* 参与了后脑和垂体发育过程中体节特征 (segment identity) 及神经系统结构的成熟或维持. 而在 Kikyo 等^[9]的研究中, 通过原位杂交分析表明在新生小鼠的嗅球、海马和小脑 *Nnat* mRNA 也有表达. *Nnat* 的表达除了与部位和时间有关外, 也受到一些外界因素的调节. Joseph 等^[10]研究发现神经生长因子 (NGF) 可导致 PC12 细胞增殖停止并转化成神经元表型, 与此同时 *Nnat* mRNA 的表达下调. 除去 NGF 后 *Nnat* mRNA 的表达恢复到本底水平. NGF 的作用并不依赖于蛋白质和 RNA 的合成. 两种剪接形式中仅 α 形式在 PC12 细胞中表达. 另外, Wood 等^[11]在用甲状腺激素处理的促甲状腺肿瘤 (thyrotropic tumor) 时, 也观察到了 *Nnat* mRNA 的表达上调.

2 *Nnat* 基因的结构特点及其染色体定位

Dou 等^[12]通过第 20 号染色体的缺失体构建和荧光原位杂交等技术将 *Nnat* 基因定位在人的 20 号染色体长臂 20q11.2~12, 并且确认该基因为单拷贝, 而在小鼠中则定位于第 2 号染色体末端 88 cM 处.

1997 年, Kagitani 等^[4]通过连锁分析将 *Peg5/Nnat* 定位到 2 号染色体末端, 在这个部位包括一个与形态异常和早期新生儿死亡相关的印记区. 进一步的详细绘图分析表明, *Nnat* 定位在 T26H 和 T2W_a 的易位断点之间, 该区域与已报道的 T28H 和 T2W_a 的易位断点之间的印记区很接近, 表明在小鼠的 2 号染色体末端有两个不同的印记区, 并已得到了证实^[13]. Kikyo 等^[9]比较发现, *Nnat* 在正常和具有来自父本 *Nnat* 的两个拷贝的胚胎中有表达, 而在具有来自母本的两个拷贝的胚胎中不能检测到基因的表达, 而且观察到新生小鼠小脑的折叠确实存在差异, 这种差异可能是由于 *Nnat* 的获得或缺失而导致了发育或行为方面的结果.

印记基因通过亲本等位基因甲基化的不同方式而与其他基因区分. *Nnat* 是印记基因^[14, 15], 特异地在父本来源的等位基因表达, 而母本的等位基因通过甲基化而沉默. 研究发现, 小鼠 *Nnat* 位于双

等位基因表达的 BLCAP (bladder cancer-associated protein) /Bc10 基因的 8 kb 内含子内部, 与 BLCAP/Bc10 基因的转录方向相反, 且不共享组织专一表达或等位基因专一表达的调节元件. 此印记基因表达需要区域上游或周围元件的共同参与^[16]. 人 20 号染色体的 *Nnat* 位点也有类似组成特点. Evans 等^[15]报道人 *Nnat* 在染色体 20q11.2 是印记基因, 专一地从父本等位基因转录. 因此, *Nnat* 位于一个小印记结构区域, 该位点尤其适合进行局部印记调节机制的研究.

3 *Nnat* 蛋白的结构特点及可能的功能

到目前为止对 *Nnat* 蛋白的结构和功能仍然没有确定的结论. 从 *Nnat* 的 cDNA 序列推导编码的 81 个氨基酸疏水性分析结果提示, 蛋白质的 N 端可能是与膜结合的, 而 C 端定位在细胞质里, 推测 *Nnat* 可能参与信号转导过程^[1]. *Nnat* mRNA 在哺乳动物大脑发育的胚胎后期和出生后表达丰富, 在成年和衰老期表达下调, 提示此基因下调参与大脑终末分化^[1]. 由 *Nnat* α 和 β 推断的基因产物大小分别是 9.2 ku 和 6.15 ku, 外显子 1 编码的是疏水 N 端, 外显子 3 编码的是亲水 C 端, 而仅在 β 形式中存在的中间外显子所编码的氨基酸序列既不是疏水也不是亲水的, 且与周质氢化酶 (periplasmic hydrogenase) 有 40% 的同源性^[3], 它的意义尚不明了. 疏水区包含有 23 个氨基酸位点, 这种大小非常适合形成 α 螺旋结构的跨膜区. 有实验结果支持它是一个跨膜蛋白, 当 *Nnat* cDNA 与 LacZ 融合后, 观察到表达的融合蛋白被锚定在大肠杆菌的细胞质膜. 人 *Nnat* 推测的氨基酸序列与两个已知的离子通道蛋白 PMP1 和受磷蛋白 (phospholamban) 有 50% 的同源性, 且二级结构也具有同源性. 这两个已知蛋白质是作为 H^+ -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 的亚单位起作用的, 属于蛋白脂质 (proteolipid). 推测 *Nnat* 的蛋白质产物也是蛋白脂质, 作为大脑发育过程中离子通道的调节因子起作用^[12].

由人和大鼠 *Nnat* cDNA 推测的蛋白质都具有高度的保守性, 除了 C 端附近两个位置的差异外, 其余的序列是一致的. 两个物种之间蛋白质的保守程度表明 *Nnat* 基因功能的重要性^[2]. *Nnat* 编码的假定跨膜蛋白可能是作为蛋白质配体、辅助因子、较小的细胞粘附分子等起作用, 参与神经系统成熟过程、后脑和垂体前叶发育或分化过程的信号

转导, 细胞-细胞间通讯或细胞粘附过程^[8]. 最新的研究结果表明, *Nnat* 在神经发育过程中的功能可能是保护发育的细胞不受有毒物质的刺激^[17].

4 *Nnat* 基因与肿瘤相关疾病

除了正常组织外, 在肿瘤组织中也检测到 *Nnat* 的表达. Thelir Jarnum 等^[18] 在 4 个脂肪瘤样品中有 3 个检测到 *Nnat* α 和 β 两种剪接形式的表达, 在肿瘤细胞系中同样检测到基因的表达, 而在培养的成纤维细胞和脂肪组织中没有表达. 在肿瘤研究中发现 *Nnat* 存在转录, 提示了这些肿瘤细胞的神经起源. 同样, 在几个患者的垂体腺瘤也观察到了 *Nnat* 的强表达, 但在其他脑瘤中很难检测到^[6]. 而在用甲状腺激素处理的促甲状腺肿瘤中 *Nnat* mRNA 的表达上调. 通过消减杂交分析证明 *Nnat* mRNA 在表达促甲状腺激素的细胞系中存在, 而在表达 α 亚单位的祖细胞系中没有. 其产物可能是调整钙依赖的促甲状腺特异的信号转导通路^[11].

最新的研究表明在人 *Nnat* 基因定位的区域、白血病细胞系和 20 个急性髓样淋巴样白血病样品 (共 29 个) 中的未甲基化 *Nnat* 等位基因完全缺失. Kuerbitz 等^[19] 通过甲基化分析发现在正常的造血祖细胞和白血病细胞中 *Nnat* mRNA 表现正常的甲基化方式, 但在超甲基化的白血病细胞中不能检测到基因的表达. 用氮脱氧胞嘧啶 (5'-azadeoxyctidine) 处理使超甲基化的白血病细胞再去甲基化后, 伴随着基因正常的甲基化方式的恢复, *Nnat* 的表达被再次激活. 这些结果表明, *Nnat* 基因座的超甲基化在小儿的急性髓样和淋巴样白血病中是一个常见事件. *Nnat* 基因座的异常甲基化是白血病人 20q11.2~q12 基因调节障碍的结果.

5 问题、前景和展望

基因的选择性表达控制着大脑发育的全过程. 新克隆基因 *Nnat* 仅在胚胎期大脑特异表达, 基因编码产物的确切功能未知, 推测与大脑的发育和分化有关, 可能参与了神经上皮干细胞的增殖或决定神经上皮干细胞有丝分裂后期的命运^[3]. 本实验室近期的研究结果也表明 *Nnat* 与神经系统发育相关因子存在强相互作用. 对于 *Nnat* 基因结构和功能的进一步研究将对脑发育及发育相关性疾病的研究有很大帮助. 同时, 由于 *Nnat* 是印记基因, 仅在父本来源的等位基因中表达, 因此, *Nnat* 基因

的错误修饰或表达将导致大脑发育及肿瘤相关疾病, 从而对其进行深入研究也具有重要的临床意义.

参 考 文 献

- 1 Joseph R, Dou D, Tsang W. Molecular cloning of a novel mRNA (neuronatin) that is highly expressed in neonatal mammalian brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **201** (3): 1227~1234
- 2 Dou D, Joseph R. Structure and organization of the human neuronatin gene. *Genomics*, 1996, **33** (2): 292~297
- 3 Joseph R, Dou D, Tsang W. Neuronatin mRNA: alternatively spliced forms of a novel brain-specific mammalian developmental gene. *Brain Res*, 1995, **690** (1): 92~98
- 4 Kagitani F, Kuroiwa Y, Wakana S, *et al.* Peg5/Neuronatin is an imprinted gene located on subdistal chromosome 2 in the mouse. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (17): 3428~3432
- 5 Usui H, Ichikawa T, Miyazaki Y, *et al.* Isolation of cDNA clones of the rat mRNAs expressed preferentially in the prenatal stages of brain development. *Brain Res Dev Brain Res*, 1996, **97** (2): 185~193
- 6 Usui H, Morii K, Tanaka R, *et al.* cDNA cloning and mRNA expression analysis of the human neuronatin. High level expression in human pituitary gland and pituitary adenomas. *J Mol Neurosci*, 1997, **9** (1): 55~60
- 7 Arava Y, Adamsky K, Ezerzer C, *et al.* Specific gene expression in pancreatic β cells: cloning and characterization of differentially expressed genes. *Diabetes*, 1999, **48** (3): 552~556
- 8 Wijnholds J, Chowdhury K, Wehr R, *et al.* Segment-specific expression of the neuronatin gene during early hindbrain development. *Dev Biol*, 1995, **171** (1): 73~84
- 9 Kikyo N, Williamson C M, John R M, *et al.* Genetic and functional analysis of neuronatin in mice with maternal or paternal duplication of distal Chr 2. *Dev Biol*, 1997, **190** (1): 66~77
- 10 Joseph R, Tsang W, Dou D, *et al.* Neuronatin mRNA in PC12 cells: downregulation by nerve growth factor. *Brain Res*, 1996, **738** (1): 32~38
- 11 Wood W M, Sarapura V D, Dowding J M, *et al.* Early gene expression changes preceding thyroid hormone-induced involution of a thyrotrope tumor. *Endocrinology*, 2002, **143** (2): 347~359
- 12 Dou D, Joseph R. Cloning of human neuronatin gene and its localization to chromosome 20q11.2~12: the deduced protein is a novel "proteolipid". *Brain Res*, 1996, **723** (1~2): 8~22
- 13 Williamson C M, Beechey C V, Ball S T, *et al.* Localisation of the imprinted gene neuronatin, *Nnat*, confirms and refines the location of a second imprinting region on mouse chromosome 2. *Cytogenet Cell Genet*, 1998, **81** (1): 73~78
- 14 Kelsey G, Bodle D, Miller H J, *et al.* Identification of imprinted loci by methylation-sensitive representational difference analysis: application to mouse distal chromosome 2. *Genomics*, 1999, **62** (2): 129~138
- 15 Evans H K, Wylie A A, Murphy S! K, *et al.* The neuronatin gene resides in a "micro-imprinted" domain on human chromosome 20q11.2. *Genomics*, 2001, **77** (1~2): 99~104
- 16 John R M, Aparicio S A, Ainscough J F, *et al.* Imprinted expression of neuronatin from modified BAC transgenes reveals regulation by distinct and distant enhancers. *Dev Biol*, 2001, **236** (2): 387~399
- 17 Zheng S, Chou A H, Jimenez A L, *et al.* The fetal and neonatal brain protein neuronatin protects PC12 cells against certain types of toxic insult. *Brain Res Dev Brain Res*, 2002, **136** (2): 101~110

- 18 Thelin-Jarnum S, Lassen C, Panagopoulos I, *et al.* Identification of genes differentially expressed in TLS-CHOP carrying myxoid liposarcomas. *Int J Cancer*, 1999, **83** (1): 30~ 33
- 19 Kuerbitz S J, Pahys J, Wilson A, *et al.* Hypermethylation of the imprinted NNAT locus occurs frequently in pediatric acute leukemia. *Carcinogenesis*, 2002, **23** (4): 559~ 564

Progress in The *Neuronatin* Gene*

YU Li-Hong¹⁾, ZHOU Ren-Ping^{1, 2)}, ZHANG Cheng-Gang¹⁾**

(¹⁾ *Department of Genomics and Proteomics, Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing, 100850, China;*

(²⁾ *Department of Chemical Biology, College of Pharmacy, Rutgers University, Piscataway, NJ 08854, USA)*

Abstract *Neuronatin (Nnat)* is a recently cloned brain-specific gene that is selectively expressed during brain development. Human *Nnat* gene spans 3 973 bases and contains three exons and two introns. *Nnat* mRNA has two different splice isoforms, α and β , the former encoding a protein of 81 amino acids and the latter 54 amino acids. These two isoforms share the same open reading frame, but the α -form contained an additional 81 bp sequence inserted in the middle of the coding region. The human *Nnat* is a single copy gene located at chromosome 20q11.2~ 12, while the rat gene is located on the distal region of chromosome 2, 2H1. *Nnat* is an imprinted gene and expressed from the paternal allele, while the maternal allele is methylated and silenced. As *Nnat* is highly expressed in the central nervous system from mid-gestation through early postnatal development and down-regulated in adulthood and senescence, *Nnat* may be involved in brain development and differentiation. The expression is also detected in the adult brain stem, suggesting roles in neuroplasticity. The deduced protein sequence contains a hydrophobic N-terminal and a hydrophilic C-terminal, and appears to code for a transmembrane protein. The biological function of *Nnat* remains to be elucidated.

Key words neuronatin, brain development, imprinted gene

* This work was supported by grants from The National Science Fund for Distinguished Young Scholars (30128010), The National Natural Science Foundation of China (39900041, 30100049 and 39900074), The Natural Science Foundation of Beijing (7002030), Initiative Foundation for Scientific and Technological Innovation of Academic Military Medical Science (0102001 and 9905105).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931590, E-mail: zhangcg@nic.bmi.ac.cn

Received: September 3, 2002 Accepted: October 28, 2002