

東京理科大学大学院

博士論文

神経への運命決定に関与する因子の探索

2014

小林 隆 信

目次

要旨	1
略語表	5
第1章 序論	6
第2章 atRA によって誘導される κ -カゼイン遺伝子(<i>Csn3</i>)の発現機構	12
第1節 背景	12
第2節 実験方法	13
第3節 結果	18
第4節 考察	32
第3章 P19 細胞における atRA による <i>Tal2</i> の発現	34
第1節 背景	34
第2節 実験方法	35
第3節 結果	38
第4節 考察	48
第4章 P19 細胞における atRA による <i>Tal2</i> の転写調節機構	50
第1節 背景	50
第2節 実験方法	52
第3節 結果	57
第4節 考察	72
第5章 総括	74
参考文献	77
謝辞	87

要旨

神経変性疾患の有効な治療法の一つは再生医療であり、ES 細胞や iPS 細胞の応用が期待されている。期待に応えるためには、幹細胞の神経細胞への分化の正確性が重要である。いくつもの可能性をもった胚が、神経分化の系譜へ入るための分子メカニズムは興味深い。本研究では、胚から神経への運命決定に関与する因子に注目しており、マウスの胚性腫瘍細胞株である P19 細胞の神経分化誘導直後に変動する遺伝子を探索し、その機能を明らかにすることを目的にしている。

P19 細胞は、多分化能をもつマウスの胚性腫瘍細胞株である。中枢神経系で見られる多くの特徴を示す細胞であり、神経分化や胚発生の初期に関与する遺伝子の同定や機能を分子レベルで研究するのに適したモデル細胞であると考えられている。P19 細胞の神経分化誘導では、*all-trans* レチノイン酸(atRA)と浮遊培養の両方が重要であると言われている。ここで用いられる atRA は、ビタミン A の活性型誘導体であり、神経分化に関与するシグナル分子である。核内に移行後、リガンドとして特異的な核内レセプターであるレチノイン酸レセプター(RAR)と結合し、標的遺伝子の発現を調節する。RAR は、標的遺伝子のプロモーター領域上に存在する特異的な配列、レチノイン酸応答配列(RARE)と結合し、atRA による遺伝子の転写制御に関与する。

胚から神経への運命決定に関与する遺伝子を見出すために、浮遊培養下での atRA 処理後 6 時間と 24 時間の P19 細胞のマイクロアレイ解析を行った。探索した遺伝子の中から、神経分化との関連性の報告の少ない遺伝子で、発現の変動が大きかった *Csn3* と *Tal2* に着目した。*Csn3* はミルクミセルの安定性に重要であり、分子シャペロン活性をもつことが知られている。*Tal2* は bHLH ファミリーに属する転写因子であり、脳の正常な発現に重要であることが明らかとなっている。*Csn3* と *Tal2* は、マイクロアレイ解析で神経分化初期の誘導後 6 時間で発現の上昇が確認された遺伝子であるが、その機能は解明されていない。そこで、*Csn3* と *Tal2* の神経への運命決定との関連性を明らかにするために、本論文では、P19 細胞の神経分化過程における *Csn3* と *Tal2* の発現およびその誘導機構に関する研究を行った。

P19 細胞の神経分化誘導後 0-48 時間の *Csn3* の発現を調べたところ、3 時間後には検出され、24 時間後まで発現は確認されたが、36 時間後にはほとんど見られなくなり、48 時間後には基底レベルまで減少した。一方、コントロールとして、atRA の代わりに DMSO を用いると、*Csn3* の発現は誘導されなかった。これらの結果から、P19 細胞の神経分化誘導の初期に *Csn3* は一過性に発現し、その発現は atRA によって誘導されることが示された。そこで次に、P19 細胞の神経分化過程

における RAR 遺伝子のサブタイプ (*Rara*, *Rarb*, *Rarg*) の発現を調べた。*Rara* と *Rarg* は未分化の P19 細胞で発現し、その後も発現が続いたが、*Rarb* は *Csn3* と同様に誘導された。この結果から、RAR α および RAR γ の特異的なアゴニストを atRA の代わりに用いて、*Csn3* が誘導されるかを調べた。その結果、RAR α のアゴニストである Am80 で、*Csn3* の発現が atRA を用いた時と同様に誘導された。これらの結果から、*Csn3* は atRA と結合した RAR α によって発現が誘導されることが明らかとなった。

続いて、*Csn3* の 5' 側上流域を含むレポーターベクターを作製し、*Csn3* の転写調節領域を調べた。この結果、*Csn3* の 5' 側上流域 -200 から -136 までに転写調節領域があり、さらに、そこに含まれる RARE が atRA シグナルに応答した。そこで、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) を用いて *Csn3* の 5' 側上流域に含まれる RARE と RAR α の結合を調べた。スーパーシフトアッセイにより、P19 細胞の核抽出タンパク質と *Csn3* の 5' 側上流域の RARE を含むオリゴヌクレオチドとの結合が示された。さらに、P19 細胞内で *Csn3* の 5' 側上流域に RAR α が結合することが ChIP アッセイにより確認された。これらの結果から、*Csn3* の発現は 5' 側上流域にある RARE が atRA シグナルに応答して誘導されると考えられる。

また、マウスの ES 細胞株である EB5 細胞に atRA を用いて誘導した神経分化過程や、胚発生過程の cDNA パネルを用いた PCR においても *Csn3* の発現が確認された。このことから、*Csn3* の発現は P19 細胞の神経分化過程特異的な現象では無いことが示された。

次に、P19 細胞での atRA による *Tal2* の発現について調べた。浮遊培養および atRA 処理後、0-48 時間の P19 細胞における *Tal2* の発現を調べたところ、神経分化誘導後 3 時間で確認され、24 時間後にはほぼ検出されなくなった。atRA の代わりに DMSO で同様の処理を行ったところ、*Tal2* の発現は誘導されなかった。これらの結果から、*Tal2* の発現は P19 細胞の神経分化を誘導する atRA と関連があると考えられ、その発現は 1 日間で変動した。また、マウスの胚発生過程において、11 日目の胚で発現が高く、7、15、17 日目の胚および脳ではほとんど検出されなかった。このことから、胚発生過程においても P19 細胞と同様に一過的な *Tal2* の発現があることが明らかとなった。

P19 細胞の神経分化過程において、*Tal2* の発現に atRA の関与が示されたので、*Rara*、*Rarb*、*Rarg* の発現に加えて、RAR とヘテロダイマーを形成する RXR 遺伝子のサブタイプ (*Rxra*、*Rxrb*、*Rxrg*) の発現も調べた。*Rarb* と *Rxrg* 以外、未分化の P19 細胞で発現し、その後も発現が続いた。*Rarb* は *Tal2* と同様に誘導され、*Rxrg* は分化過程で発現が減少した。そこで、それぞれのレセプ

ターに対するアゴニストを用いて、どのレセプターが関与するのか調べた。その結果、浮遊培養下で P19 細胞に Am80 を処理した時の *Tal2* の発現は、atRA 処理を行った時の発現と同等であった。加えて、RNAi により RAR α をノックダウンした P19 細胞での atRA による *Tal2* の発現を調べたところ、コントロールと比較して有意に発現が抑制された。以上から、P19 細胞における *Tal2* の発現には、RAR α が関与することが明らかとなった。

最後に、P19 細胞での atRA による *Tal2* の転写調節機構について調べた。*Tal2* のゲノム上を RARE のコアモチーフである(A/G)G(G/T)T(G/C)A を参照して探索したところ、RARE 様配列、DR5(*Tal2*)がイントロンに存在した。さらに、P19 細胞における *Tal2* の転写開始点の 30 bp 上流に TATA-box 様配列、TATA(*Tal2*)があった。

Tal2 の 5' 側上流域の TATA(*Tal2*)が転写シグナルに応答する配列であるのかをルシフェラーゼアッセイで調べたところ、TATA(*Tal2*) を変異させると転写が低下することから、コアプロモーターとして機能することが示された。次に、TATA-box に結合するタンパク質である TBP と結合するのかを調べた。P19 細胞から抽出した核タンパク質と TATA(*Tal2*)を含むオリゴヌクレオチドを用いて調べたところ、TBP と TATA(*Tal2*)の結合が確認された。さらに、P19 細胞内での TATA(*Tal2*)を含む領域をターゲットにした ChIP アッセイにより、TBP との結合が示された。これらの結果から、P19 細胞内で、*Tal2* の 5' 側上流域に存在する TATA(*Tal2*)は、TBP が結合してコアプロモーターとして機能すると考えられる。

続いて、*Tal2* のイントロンに存在する DR5(*Tal2*)が atRA に応答する配列であるかをルシフェラーゼアッセイにより調べた。DR5(*Tal2*)の変異により転写活性が減少したことから、DR5(*Tal2*)は RARE として機能する配列であることが示された。そこで、P19 細胞の核抽出タンパク質との結合を EMSA により調べた。スーパーシフトアッセイの結果、DR5(*Tal2*)と RAR α は結合した。さらに、P19 細胞内での結合が、DR5(*Tal2*)を含む領域をターゲットとした ChIP アッセイにより確認された。これらの結果から、*Tal2* のイントロン上にある DR5(*Tal2*)は、P19 細胞内で RAR α と結合し、atRA シグナルに応答する配列であると考えられる。

以上の結果から、*Tal2* の 5' 側上流域の TATA(*Tal2*)とイントロンの DR5(*Tal2*)は、協調的に *Tal2* の転写に関与すると考えられるので、この二つの領域の相互作用を ChIP アッセイにより調べた。その結果、TATA(*Tal2*)と RAR α および DR5(*Tal2*)と TBP の結合が確認された。このことから、この二つの領域は RAR α と TBP を介して相互作用し、協調的に機能することが示唆された。

以上の研究から、マウスの胚性腫瘍細胞株である P19 細胞の神経分化過程において、*Csn3* と *Tal2* は神経分化誘導後、3 時間で発現が観察され、この発現は atRA およびそのレセプターの $RAR\alpha$ により誘導されることが明らかとなった。atRA は P19 細胞の神経分化誘導において重要なシグナル分子であり、胚発生や神経細胞への運命決定でも重要な役割を果たしていると考えられている。これらから、atRA により転写制御を受ける *Csn3* と *Tal2* は共に、胚から神経への運命決定に関わる可能性のある遺伝子であり、得られる知見は、神経分化における働きやそのネットワークへの理解を深め、再生医療への分化研究の応用に有用であると考えている。

略語表

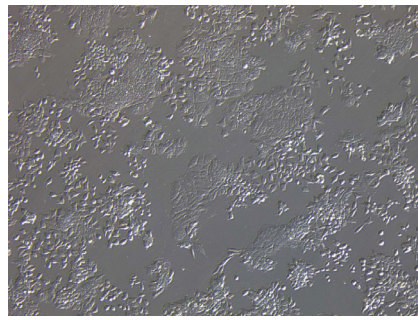
5'-RACE	5'-rapid amplification of cDNA ends
ANOVA	analysis of variance (分散分析)
atRA	all- <i>trans</i> retinoic acid (all- <i>trans</i> レチノイン酸)
bHLH	basic helix-loop-helix
ChIP アッセイ	Chromatin immunoprecipitation assay (クロマチン免疫沈降法)
DMSO	dimethyl sulfoxide
EC 細胞	embryonal carcinoma cells (胚性腫瘍細胞)
ES 細胞	embryonic stem cell (胚性幹細胞)
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
iPS 細胞	induced pluripotent stem cell (人工多能性幹細胞)
RAR	retinoic acid receptor (レチノイン酸レセプター)
RARE	retinoic acid response element (レチノイン酸応答配列)
RXR	retinoid X receptor (レチノイド X レセプター)
T-ALL	T-cell acute lymphoblastic leukemia (T 細胞性急性リンパ芽球性白血病)
TBP	TATA-box binding protein

第 1 章 序論

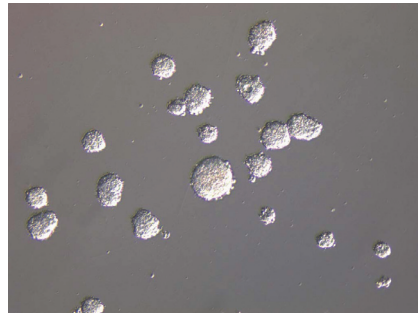
アルツハイマー病、パーキンソン病などに代表される神経変性疾患は、脳や脊髄にある神経細胞が徐々に障害を受け、脱落する疾患である。脱落した神経細胞の再生は有効な治療法の 1 つであり、分化させた胚性幹細胞(embryonic stem cell : ES 細胞)や人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell : iPS 細胞)等を用いた神経再生に期待が集まっている。再生医療への応用には、これら幹細胞の神経細胞への分化の正確性が重要である。

細胞の分化は、多数の分子が協調して広範なネットワークを形成し、調節している。その分子メカニズムは複雑であり、全容を解明することは困難であるが、分化の正確な進行には、関わる分子の情報が多いほど、良い結果を導くと考えられる。いくつもの可能性をもった胚が、神経分化の系譜へ入るための分子メカニズムは興味深く、分化の始まりを理解するために重要な研究テーマである。本研究では、胚から神経への運命決定に関与する因子に注目しており、マウスの胚性腫瘍細胞(embryonal carcinoma cells : EC 細胞)である P19 細胞の神経分化誘導直後に変動する遺伝子を探索し、その機能を明らかにすることを目的に研究を行っている。

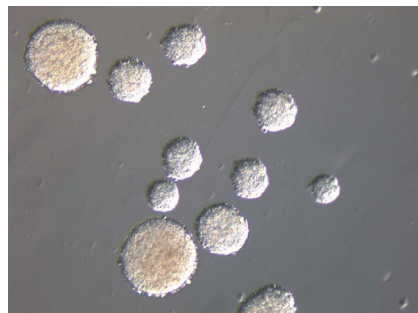
P19 細胞は、多分化能をもつマウスの EC 細胞株である[1]。胚の移植により発生した癌細胞からは、未分化状態の幹細胞を樹立できることが知られており、P19 細胞は、マウスの精巣に 7.5 日目の胚を移植することにより発生させたテラトカルシノーマ由来の細胞である[2]。適切な誘導剤と培地条件で処理した時、P19 細胞は、正常な胚性細胞と同様のメカニズムを使って、三胚葉(内胚葉、中胚葉、外胚葉)の細胞へ分化が誘導される[3-6]。P19 細胞の神経分化では、2 つの処理、*all-trans* レチノイン酸(*all-trans* retinoic acid : atRA)の添加と浮遊培養による細胞凝集が重要である[1,4-6]。まず、P19 細胞を浮遊培養させるために、細菌培養用の滅菌シャーレもしくは浮遊培養用のディッシュに播種し、そこに 1 μ M の atRA を加え 2 日間培養する。そして、培地を交換し、さらに 2 日間培養する。この過程で、細胞は次第に球形の凝集体を形成する(図 1-1)。その後、ポリ-D-リジンコートしたディッシュに播種し、N2 serum-free 培地に交換すると神経突起を伸ばし始め、神経細胞への分化が誘導される[3,4,6]。



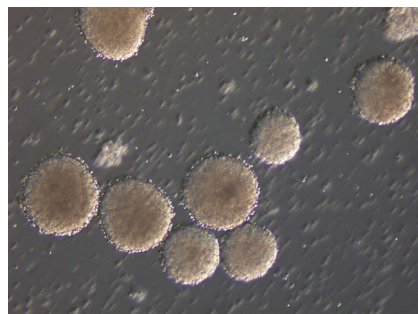
atRA 処理前



atRA 処理後 1 日目



atRA 処理後 2 日目



atRA 処理後 4 日目



神経細胞へ分化

図 1-1 atRA 処理および浮遊培養による P19 細胞の形態変化

倒立型顕微鏡 CKX41 と 3CCD カメラ FX380(共にオリンパス)を用いて 720 倍で撮影した。

atRA 処理と細胞凝集によって誘導される神経分化過程において、P19 細胞は特徴的な神経様形態をとり、中枢神経系の発生過程で観察される遺伝子やタンパク質を発現する[1,3,5,7,8]。神経の発生に関連する遺伝子である *Neurod*、*Neurog1* は atRA によって、*Fgf8* は細胞凝集によって誘導されることが明らかとなっている[9–11]。また、*Tuji1* や *NeuN* やニューロフィラメントといった中枢神経系で見られるタンパク質を発現し、神経細胞やグリア細胞に分化する[4,5,7,8]。さらに、P19 細胞は神経伝達物質とそのレセプターを発現しており[6]、それらは、興奮性シナプスや抑制性シナプスの発達および神経細胞の極性形成に関与する[12]。さらに、P19 細胞を使って、神経分化において重要な役割を果たす、いくつかの遺伝子が同定されている[13–17]。

加えて、P19 細胞を用いた細胞移植の可能性が考えられている。ラットの線条体に移植した P19 細胞が、移植部位にて神経やグリア細胞に分化し機能することが報告されている[18,19]。また、マウスの小脳に P19 細胞由来の神経前駆細胞を移植した実験では、定着し周囲に従って分化することが示されている[20]。これらの結果は、P19 細胞の医療への応用の可能性を示すが、P19 細胞はテラトカルシノーマ由来であり、中枢神経系の疾患、例えば神経変性疾患への細胞移植に適した細胞であるかは未だ議論の余地が残っている。

以上のことから、P19 細胞は、中枢神経系で見られる多くの特徴を示す細胞であり、神経分化や胚発生の初期、特に細胞運命や系譜の決定に関与する遺伝子の同定や機能を分子レベルで調べるのに適したモデル細胞であると考えられている。

P19 細胞の神経分化誘導に重要である atRA は、ビタミン A の活性型誘導体であり、神経分化に関与するシグナル分子である[21–25]。ビタミン A が酸化されて atRA になり、生成された atRA はシトクロム P450 により代謝される[26]。atRA は、初期の胚発生や脳のパターン形成、神経細胞の運命決定、神経突起伸長の刺激などの神経系の分化に重要な役割を果たしている[22,27]。また、P19 細胞のような EC 細胞や ES 細胞に神経系への分化を誘導する[25,28–30]。

atRA は核内に移行後、リガンドとして特異的な核内レセプターであるレチノイン酸レセプター (retinoic acid receptor : RAR) と結合し、500 以上の標的遺伝子の発現を調節する[23,25,31–33]。RAR は核内受容体スーパーファミリーの一員であり[34,35]、3 つのサブタイプ *RAR α* 、*RAR β* 、*RAR γ* が存在する。RAR は同じ核内受容体ファミリーに属するレチノイド X レセプター (retinoid X receptor : RXR; RAR と同じくサブタイプとして *RXR α* 、*RXR β* 、*RXR γ* が存在する) とヘテロダイマーを形成し、atRA の結合に依存する転写制御に参加する[31,36–41]。

RAR-RXR ヘテロダイマーは、標的遺伝子のプロモーター領域に存在する特異的な配列、レ

チノイン酸応答配列(retinoic acid response element : RARE)と結合し、atRA による遺伝子の転写制御に参与する[27,41]。RARE はダイレトリリピートとよばれる特徴的な配列をもつ[39,42-45]。ダイレトリリピートは、コアモチーフである (A/G)G(G/T)TCA の6塩基が同じ向きに2つ並び、これらのモチーフ間には、規則性の無い塩基が並ぶ。コアモチーフの間の塩基の数は様々あるが、1、2、5塩基であることが多く、それぞれを DR1、DR2、DR5 とよぶ。近年、RARE の配列の比較から、(A/G)G(G/T)TCA の5番目の C が G にかわった(A/G)G(G/T)TGA も RARE と考えられるとの報告がなされた[46]。

atRA 非存在下において、RAR-RXR ヘテロダイマーは恒常的に RARE と結合しており、コリプレッサーである NCoR や SMRT との相互作用により転写が抑制されている。これらのコリプレッサーはヒストン脱アセチル化酵素である HDAC3 と結合しており、HDAC はヒストンの N 末端のリジン残基を脱アセチル化して転写を抑制する。atRA が RAR-RXR ヘテロダイマーに結合すると、ヘテロダイマーの構造が変化し、コリプレッサーが遊離され、SRCs や CBP/p300 のようなコアクチベーターと相互作用する。これらのコアクチベーターはクロマチンのリモデリングと TBP を含む転写開始複合体の形成を促進する[23,33,34,41,47,48]。このように、atRA は、標的遺伝子上の RARE に結合している RAR-RXR ヘテロダイマーを介して転写を活性化する(図 1-2)。

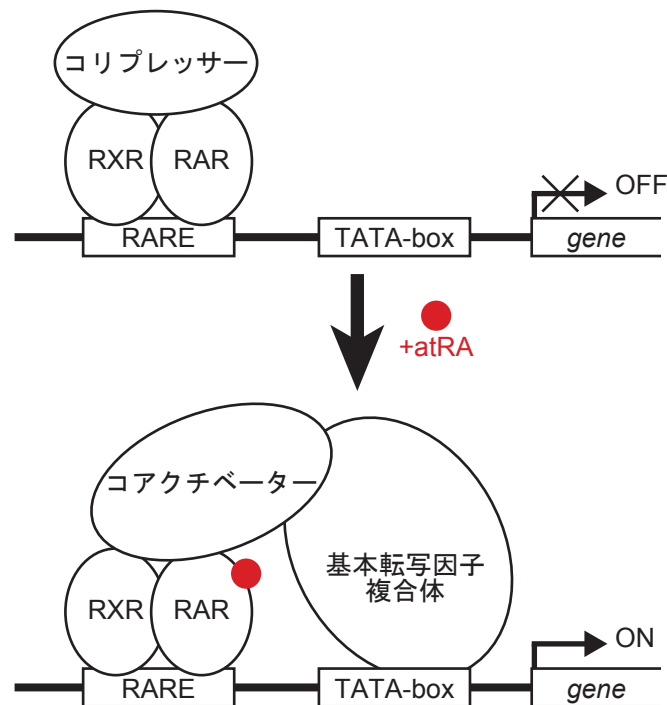


図 1-2 atRA-RAR による転写活性化機構

本研究は分化の始まりを解明するために、神経分化誘導の出発点である、胚から神経細胞系列への導入過程における遺伝子変化を調べ、その遺伝子が胚から神経への運命決定にどのように関与するのかを明らかにすることを目的としている。P19 細胞は多分化能を有する胚性腫瘍細胞株であり、胚から神経細胞への遺伝子の変遷を調べるのに用いられる細胞である。そこで、浮遊培養した P19 細胞に atRA を添加後 6 時間、24 時間で見られる遺伝子の変動をマイクロアレイにより網羅的に解析した。まず、発現が上昇する遺伝子に関して調べることを考え、これまでに神経分化との関連性の報告の少ない遺伝子で、発現の変動が大きい(FCAbsolute が大きい)ものを探索した。表 1-1 はその結果から抜粋したものである。*Rarb*、*Hoxa1*、*Cyp26a1* は P19 細胞の神経分化誘導過程において遺伝子発現が誘導されることが知られている遺伝子であり[25]、これらの FCAbsolute は高い値を示した。また、胚性マーカーである *Pou5f1*[49,50]は発現が減少し、神経分化マーカーである *Ascl1* [10,51]は発現が上昇した。これらから、P19 細胞に神経分化が誘導されていると判断した。そして、マイクロアレイにより探索した遺伝子の中から、神経分化との関連性の報告の少ない遺伝子で、より初期に変動すると考えられる 6 時間での FCAbsolute が高い値を示した遺伝子である *Csn3* と *Tal2* に注目した。

Csn3 はミルクミセルの主要なタンパク質であり、ミセル形成の安定性に重要であることが知られている[52,53]。*Tal2* は bHLH ファミリーに属する転写因子であり、ノックアウトマウスの解析から、脳の正常な発達に必要であることが示されている[54,55]。神経との関わりが未知である *Csn3* と、脳の発達には必要であるがその過程における機能が不明である *Tal2* が、胚から神経への運命決定に関与するのか、その場合、どのように関わるのかを明らかにすることを目的として、本論文では、P19 細胞の神経分化過程における *Csn3* と *Tal2* の発現およびその誘導過程を明らかにする研究を行った。

6 時間

Gene Symbol	FCAbsolute	p-value	regulation	experiment	control
<i>Rarb</i>	11.232999	1.60199E-05	up	8.8153715	5.3257003
<i>Hoxa1</i>	23.104643	0.000299808	up	9.429809	4.899698
<i>Cyp26a1</i>	16.3934	1.88924E-05	up	11.176384	7.1413407
<i>Pou5f1</i>	1.0300417	0.670774	down	12.19926	12.241962
<i>Ascl1</i>	1.1517795	0.23569229	up	4.5534763	4.3496118
<i>Csn3</i>	12.466624	0.000465262	up	9.735367	6.095368
<i>Tal2</i>	13.721856	0.000270234	up	9.35905	5.580646

24 時間

Gene Symbol	FCAbsolute	p-value	regulation	experiment	control
<i>Rarb</i>	10.718031	0.000412063	up	9.74075	6.3187823
<i>Hoxa1</i>	51.621902	7.00652E-07	up	11.98915	6.2992387
<i>Cyp26a1</i>	8.248246	3.23577E-06	up	10.364837	7.3207493
<i>Pou5f1</i>	2.1402345	0.014795362	down	11.59645	12.694219
<i>Ascl1</i>	3.0023148	0.045893718	up	6.0584106	4.4723353
<i>Csn3</i>	30.55874	0.000706327	up	10.616086	5.682573
<i>Tal2</i>	2.3491807	0.005916564	up	7.4957166	6.263559

表 1-1 P19 細胞の神経分化過程における転写産物の解析(抜粋)

浮遊培養と atRA 処理により神経分化を誘導した P19 細胞(6 時間後と 24 時間後の転写産物)を用いて、マイクロアレイ解析を行った。上が 6 時間、下が 24 時間の結果である。*Rarb*、*Hoxa1*、*Cyp26a1* はこの過程で atRA によって、誘導されることが明らかとなっている遺伝子である。*Pou5f1* は胚性マーカー遺伝子であり、*Ascl1* は神経分化マーカー遺伝子である。FCAbsolute が遺伝子発現の変動の大きさをあらわす。regulation の up は上昇を down は減少を示す。

第 2 章 atRA によって誘導される κ-カゼイン遺伝子(*Csn3*)の発現機構

第 1 節 背景

正常な脳の機能や神経細胞の分化において、シャペロン活性の重要性が指摘されている[56]。タンパク質の凝集やミスフォールディングは、多くの神経変性疾患、アルツハイマー病やパーキンソン病などに関連があると言われており、いくつかの研究より、分子シャペロンがタンパク質の凝集を妨げ、これらの病気を防止に重要な役割を担うことが示されている[57]。κ-カゼイン(CSN3)は、多くの哺乳類生物におけるミルクミセルの主要なタンパク質であり、ミセルの表面に主に存在する。CSN3 はミセル形成の安定性に重要であることが知られている[52,53]。ウシのミルク由来の CSN3 は分子シャペロン活性をもち、標的としたタンパク質の沈降を阻害する[58]。

マイクロアレイ解析により、P19 細胞内で *Csn3* の発現が上昇することを見出した。浮遊培養と atRA 処理により神経分化を P19 細胞に誘導したところ、6 時間後には *Csn3* の発現が確認された。P19 細胞の神経分化過程で *Csn3* の発現が上昇することは網羅的解析により既に示されている[32,59]。しかし、この現象を支配する分子メカニズムは解析されておらず、また、神経分化における CSN3 の生理学的な機能はよくわかっていない。ミルクタンパク質である CSN3 は、神経分化と一見、無関係に思える。しかし、分子シャペロン機能をもつクラスタリンが神経細胞のモジュレーターとして働くという報告[60]から、神経の分化過程で CSN3 が分子シャペロンとして機能するかもしれないと考えた。そこで、まず、P19 細胞の神経分化過程を利用して、この過程における *Csn3* の発現とその誘導過程を調べた。

最初に、P19 細胞の神経分化過程において、*Csn3* の発現を経時的に調べた。次に、その過程における発現調節メカニズムを明らかにする実験を行った。さらに、ES 細胞の神経分化過程や胚発生過程における *Csn3* の発現を調べた。これらの研究によって、神経分化のごく初期、胚から神経へと細胞が変遷する過程と *Csn3* の発現には関連性があることが明らかとなった。

第2節 実験方法

2-1. P19 細胞の神経分化誘導

本実験で用いたマウス胚性腫瘍細胞株 P19 細胞はサブクローンの P19C6 である[61]。P19C6 は文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して、理研 BRC から提供された。P19 細胞は 10% FBS (Life Technologies, CA)、2 mM L-グルタミン(KANTO CHEMICAL, Tokyo, Japan)、100 units/ml ペニシリン(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)、100 mg/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, MO)を加えた α -MEM 培地(Sigma-Aldrich)で培養した。神経分化は細菌培養用の滅菌シャーレ(IWAKI, Tokyo, Japan)に 2×10^5 cells/ml で播種し、dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich)で溶解した 1 μ M atRA (Sigma-Aldrich)を加え誘導した。

また、本実験で用いた EB5 細胞はマウスの ES 細胞株であり、理化学研究所発生・再生科学総合研究センターの丹羽博士より提供を受けた。未分化状態の EB5 細胞は、ゼラチンコート(0.1%)したディッシュ上で、1 \times MEM Non-Essential Amino Acids (Life Technologies)、1 mM ピルビン酸ナトリウム、0.1 mM 2-メルカプトエタノール(Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)、1000 U/ml ESGRO (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)、10 μ g/ml ブラストサイジン S (KAKEN PHARMACEUTICAL, Tokyo, Japan)を加えた G-MEM (Sigma-Aldrich)で培養した。分化誘導は細菌培養用の滅菌シャーレに播種し、DMSO に溶解した 1 μ M atRA を加え行った。2 日間培養した後、培地を交換しさらに 2 日間培養した。

Csn3 の発現に関与する RAR のサブタイプを調べるために、RAR α アゴニストである Am80 (Sigma-Aldrich)[62,63]および RAR γ アゴニストである AC-41848 (Sigma-Aldrich)[64]を本研究では用いた。これらはすべて DMSO に溶解し、atRA の代わりに 100 nM で培地に加え、神経分化を誘導した。

2-2. 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析には RT-PCR とリアルタイム PCR を用いた。そのために、まず、P19 細胞および EB5 細胞から、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)を使用して、トータル RNA 抽出した。抽出したトータル RNA 1 μ g から RT-PCR では、SuperScript III 逆転写酵素(Life Technologies)とランダムプライマー (Takara Bio, Shiga, Japan)を、リアルタイム PCR では、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies)をそれぞれ用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

RT-PCR において、標的遺伝子の増幅には AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Life Technologies)と遺伝子特異的プライマーを用いた。用いたプライマーの配列は、表 2-1 に示す。PCR 産物は 1.5%のアガロースゲル電気泳動により解析した。マウスの胚発生過程(E7、E11、E15、E17)における *Csn3* の発現解析には、組織または細胞株に由来する first-strand cDNA がセットされた MTC Multiple Tissue cDNA Panels (TAKARA BIO, Japan)内のマウス由来の 7-, 11-, 15-, 17- Embryo cDNA を使用した。

リアルタイム PCR における *Csn3* の発現解析では、SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies)と遺伝子特異的プライマーを使用した。用いたプライマーの配列は、表 2-2 に示す。標的遺伝子の増幅および検出には 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies)を用いた。*hydroxymethylbilane synthase (Hmbs)* 遺伝子をリファレンス遺伝子として用い、*Csn3* の発現レベルを補正した。

Genes	Forward primer	Reverse primer
<i>Csn3</i>	5' - CAAACCTACTGCCAAGCAAG -3'	5' - TTGTAGGCATGGCAAGAAAGG -3'
<i>Oct3/4</i>	5' - GTTGGAGAAGGTGGAACCAAC -3'	5' - GGACTGAGTAGAGTGTGGTGA -3'
<i>Mash1</i>	5' - CAACCGGGTCAAGTTGGTCAA -3'	5' - CCAGTTGGTAAAGTCCAGCAG -3'
<i>Neurog1</i>	5' - CCTTTGGAGACCTGCATCTCT -3'	5' - CAGGGCCCAGATGTAGTTGTA -3'
<i>Neurod1</i>	5' - CTGATCTGGTCTCCTTCGTAC -3'	5' - GCACTCATGACTCGCTCATGA -3'
<i>Rara</i>	5' - CGACGAAGCATCCAGAAGAAC -3'	5' - CGCAGAATCAGGATATCCAGG -3'
<i>Rarb</i>	5' - AAGCCTGCCTCAGTGGATTCA -3'	5' - GCGCTGGAATTCGTGGTGTAT -3'
<i>Rarg</i>	5' - GGAAGCTGTAAGGAACGATCG -3'	5' - TCCATTCCGGTCTCCACAGATG -3'
<i>Gapdh</i>	5' - ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'	5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'

表 2-1 RT-PCR で用いたプライマーの配列

Genes	Forward primer	Reverse primer
<i>Csn3</i>	5' - GGCATTAACCTCTGCCCTTTTTG -3'	5' - TCACCACGGCAGTTTGAATC -3'
<i>Hmbs</i>	5' - ACTCTGCTTCGCTGCATTG -3'	5' - AGTTGCCCATCTTTCATCACTG -3'

表 2-2 リアルタイム PCR で用いたプライマーの配列

2-3. ルシフェラーゼアッセイ

Csn3 のプロモーター領域の解析のために、*Csn3* の 5'側上流域、-500~+39 の領域を PCR により増幅し、ホタルルシフェラーゼを発現するレポーターベクターである pGL4.10[*luc2*] ベクター (Promega, Madison, WI) に組み込んだ。同様の方法により、-400/+39、-300/+39、-200/+39、-135/+39、-100/+39 の領域をもつレポーターベクターを作製した。さらに、*Csn3* の 5'側上流域にあると予測された DR5(*Csn3*) (-152~-136, TGACCTGCAGGTGACCC) を調べるために、PCR を利用して、この領域の欠損(DR5d)および 5'側の 2 塩基、TG を AA に変更(DR5m)したレポーターベクターを作製した。これらの配列はシーケンシングにより確認した。

P19 細胞を 24 ウェルプレートに 2×10^4 cells/well で播種し、作製したベクターをリポフェクトアミン 2000 (Life Technologies) を用いて導入した。24 時間後、浮遊培養用の 24 ウェルプレートに再播種し、1 μ M atRA を加え、さらに 48 時間培養した。培養した P19 細胞を回収し、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。作製したベクターと一緒に、リファレンスとしてウミシイタケルシフェラーゼを発現するレポーターベクター、pGL4.74[*hRluc*/TK]ベクター(Promega)も P19 細胞に導入した。そのルシフェラーゼの発光量から、それぞれ作製したベクター由来のホタルルシフェラーゼによる発光量を補正した。

2-4. 核タンパク質抽出と Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)

以前に報告されている方法[65]を参照して、P19 細胞から核タンパク質を抽出した。浮遊培養下で 3 時間 atRA 処理を行った P19 細胞(1×10^7 cells)を遠心分離により回収、沈殿にし、バッファ A (10 mM HEPES-KOH [pH 7.9], 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, Complete Mini EDTA-free protease inhibitors [Roche Diagnostics, Basel, Switzerland]) に再溶解した。氷上に 10 分静置した後、核を回収するために、1000 \times g、4°C で 5 分間、遠心した。回収した沈殿を、再びバッファ C (20 mM HEPES [pH 7.9], 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol, 0.5 mM DTT, Complete Mini EDTA-free protease inhibitors) に溶解し、氷上に 30 分間置いた。その後、20,000 \times g、4°C で二分間遠心し、核タンパク質を含む上清を回収した。回収した核タンパク質濃度は Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad, CA) を用いて測定した。その後、小分けにし、-80°C に保存した。

Csn3 のプロモーター領域にあると予測された RARE を含む 5'末端を Alexa680 で標識されたオリ

ゴヌクレオチド(5'-Alexa680-ACTAAGACTGACCTGCAGGTGACCCTGGTG-3', *Csn3* の 5'側上流域、-160 から-131 までの領域)を EMSA のプローブとして使用した。核タンパク質(10 μ g)を反応バッファー(10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1 mM MgCl₂, and 2 mg poly(dI-dC)·poly(dI-dC))に加え 10 分間静置した。その後、標識プローブを加え室温で 30 分間、核タンパク質とプローブを反応させた。これらのサンプルは、5%ポリアクリルミドゲルと 0.5× TBE バッファーを用いて、170V、4°C で 165 分間、電気泳動を行い分離した。電気泳動後、分離したゲルは Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE)を使用して解析した。コンペティションアッセイでは、Alexa680 で標識したプローブと同じ配列をもつ未標識のオリゴヌクレオチドを 5 倍量、20 倍量使用した。核タンパク質を反応バッファーに加え、10 分間静置後、それぞれの量の未標識オリゴヌクレオチドを加え、30 分間、室温で反応させた。その後、Alexa680 標識プローブを加え、30 分間室温で反応させた。スーパーシフトアッセイでは、anti-RAR α antibody (ActiveMotif, CA)を用いた。核タンパク質を反応バッファーに加え、10 分間静置後、抗 RAR α 抗体を加え、60 分間、室温で反応させた。その後、Alexa680 標識プローブを加え、30 分間室温で反応させた。

2-5. クロマチン免疫沈降法(Chromatin immunoprecipitation assay : ChIP アッセイ)

浮遊培養下で 3 時間 atRA 処理を行った P19 細胞(4×10^6 cells)を 1% ホルムアルデヒド溶液で処理し、遠心して回収した。回収した沈殿を SDS lysis バッファー(50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA [pH 8.0], 1% SDS, Complete Mini EDTA-free protease inhibitors)に溶解し、超音波処理を行い、DNA を断片化した。上清を回収し、ChIP 希釈バッファー(50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 167 mM NaCl, 1.1% Triton X-100, 1.1% デオキシコール酸ナトリウム, Complete Mini EDTA-free protease inhibitors)で希釈後分注し、抗 RAR α 抗体もしくはコントロールとして normal IgG (Santa Cruz Biotechnology, CA)を加え、4°C で 1 晩、ローテーターで攪拌した。DNA-タンパク質複合体を免疫沈降するために、Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, NJ)を加え、4°C で 2 時間、ローテーターで攪拌した。遠心してセファロースビーズを回収、洗浄後、ChIP 溶出バッファー(10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 300 mM NaCl, 5 mM EDTA [pH 8.0], 0.5% SDS)を加え、65°C で脱クロスリンクを行った。その後、RNase A 処理と Proteinase K 処理を行い、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)を用いて DNA を精製した。精製した DNA を用いて PCR を行い、*Csn3* のプロモータ領域と RAR α の結合を確認した。ここで用

いたプライマーの配列は表 2-3 に示す。DNA ポリメラーゼには AmpliTaq Gold 360 Master Mix を使用した。PCR 産物は、2%アガロースゲル電気泳動を用いて解析した。

Target	Forward primer	Reverse primer
DR5(Csn3)	5' - CCTGCATGCTTATGACTCACA -3'	5' - CTCTTAGCTGCAGAGAAGACC -3'
negative control	5' - GTTTTGCAATCCATGCGCTAA -3'	5' - TTGCTTCAGCGTGTATTCCTC -3'

表 2-3 ChIP で用いたプライマーの配列

2-6. 統計解析法

リアルタイム PCR とルシフェラーゼアッセイの結果は、独立した実験を 3 回行い、平均値±標準誤差で示した。一元配置分散分析(one-way analysis of variance : one-way ANOVA)の後、Tukey-kramer 法により多重比較を行った。有意水準は 5%未満とした。全ての検定は、Microsoft Excel for Mac 2011 およびそのアドオンソフトである StatPlus:mac LE を用いた。

第3節 結果

3-1. P19 細胞の神経分化過程における atRA-RAR α による *Csn3* の発現

P19 細胞の浮遊培養および atRA 処理による神経分化過程の初期に、*Csn3* の発現が上昇することがマイクロアレイにより示唆された。そこで最初に、この過程における *Csn3* の経時的な発現を RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法により調べた。

atRA 処理および浮遊培養を開始して 0、3、6、12、24、36、48 時間後の P19 細胞からトータル RNA を抽出、逆転写して cDNA を作製した。その後、この cDNA と遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR を行い、遺伝子変動を調べた。コントロールとして atRA の代わりに溶媒である DMSO を用いて処理をした P19 細胞を用意し、トータル RNA の抽出、逆転写、PCR を同様に行った(図 2-1)。また、同様に atRA で処理した P19 から抽出したトータル RNA を用いて、リアルタイム PCR を行った(図 2-2)。

幹細胞の胚性マーカーとして用いられる *Oct3/4* (*Pou5f1* としても知られている)は、以前に報告されている通り[49,50]、未分化状態(0 時間)の P19 細胞で発現していた。atRA 処理により分化が誘導されると 36 時間後には減少し、48 時間後にはほとんど確認できなくなった。一方、DMSO で処理をした P19 細胞では 48 時間後まで、その発現は変化しなかった。また、神経分化に関与する basic helix-loop-helix (bHLH)ファミリーの一つで神経分化のマーカーとして用いられる *Mash1* (*Ascl1* としても知られている)は、atRA 処理 12 時間後から発現の上昇が見られた。その一方、*Oct3/4* と同様に、DMSO では、発現に変化は見られなかった[10,51]。さらに、おなじ神経分化に関わりの深い bHLH ファミリーである *neurogenin1* (*Neurog1*)、*neurogenic differentiation 1* (*NeuroD1*)は、atRA 処理 3-5 日後に発現が変動することが明らかとなっており[10]、実際に、atRA 処理後 36 時間から *Neurog1* はわずかに発現が上昇したが、48 時間の間、*NeuroD1* はほとんど変化がなかった。これらの結果から、本論文が目的通り、P19 細胞の神経分化のごく初期段階を解析していることが示された。

分化マーカーが上述のような変動を示す中、*Csn3* は atRA 処理により、一過性の遺伝子発現を示した。その発現は、atRA 処理 3 時間後から検出され、24 時間後までは発現が確認できるが、36 時間後には発現が弱くなり、48 時間後には基底レベルまで減少した(図 2-1A)。コントロールとして、atRA の代わりに DMSO を用いた P19 細胞では、*Csn3* の発現はほとんど確認されなかった(図 2-1B)。

さらに、*Csn3* の発現をリアルタイム PCR で定量的に解析したところ、atRA 処理後 3 時間から 24

時間まで発現することが確認され、RT-PCR とほぼ同様の結果が得られた(図 2-2)。これらの結果から、P19 細胞の神経分化誘導の初期に *Csn3* は一過性に誘導され、その発現は atRA によって制御されていることが示された。

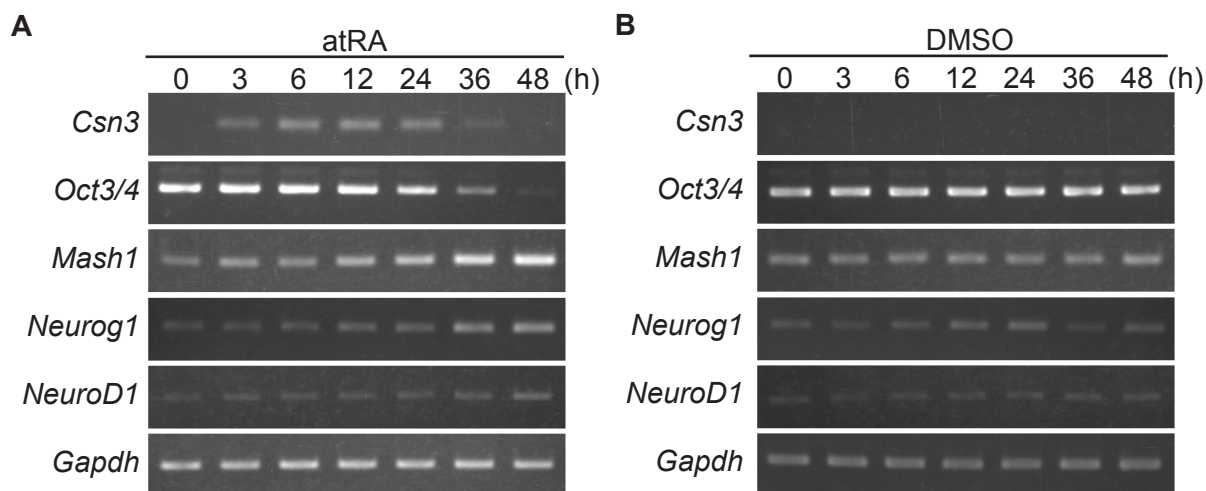


図 2-1 P19 細胞の神経分化過程における *Csn3* の発現

A. 浮遊培養下、atRA 処理後の P19 細胞における *Csn3* の発現の経時的変動を RT-PCR 法により調べた。*Oct3/4* は胚性マーカーとして、*Mash1*、*Neurog1*、*NeuroD1* は神経分化マーカーとして、*Gapdh* は内部コントロールとして用いた。B. 浮遊培養下、DMSO 処理後の P19 細胞における *Csn3* の発現の経時的変動を atRA と同様に RT-PCR 法により調べた。

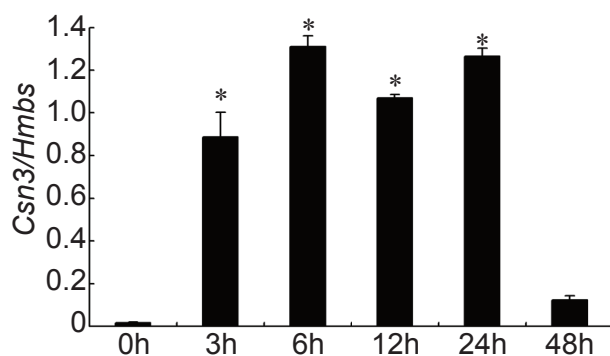


図 2-2 P19 細胞の神経分化過程における *Csn3* の定量的発現

リアルタイム PCR 法を用いて、浮遊培養下、atRA 処理後の P19 細胞における *Csn3* の発現の経時的変動を調べた。独立した実験を 3 回行い、平均値±標準誤差を算出した。one-way ANOVA の後、Tukey-Kramer 法により多重比較を行った(* : $p < 0.05$)。0h の発現と比較して 3h、6h、12h、24h の発現が有意であった。

atRA はレセプターである RAR と結合して、標的遺伝子の転写を制御することが知られている [37-40]。RAR は 3 つのサブタイプ(α , β , γ)からなり[31,66,67]、P19 細胞における *Csn3* の発現には、RAR のこれらのサブタイプの関与が疑われる。そこで、P19 細胞の神経分化過程における RAR のサブタイプの遺伝子(*Rara*, *Rarb*, *Rarg*)の発現を RT-PCR 法により調べた(図 2-3)。

浮遊培養と atRA 処理した P19 細胞から、同様の方法により cDNA を合成した。その後、この cDNA とそれぞれの遺伝子特異的プライマーを用いて PCR を行った。その結果、RAR の 3 つのサブタイプはそれぞれ異なった発現パターンを示した。*Rara* は、atRA 処理後 48 時間まで遺伝子発現に変動は見られなかった。*Rarb* は、atRA 処理前(0 時間)では、遺伝子発現が検出されなかったが、その後、atRA 処理後 3 時間から発現し、そのまま 48 時間まで遺伝子発現がほぼ同レベルで続いた。*Rarg* は、*Rara* と同様に atRA 処理前(0 時間)から発現していたが、24 時間で発現の減少が見られ、48 時間でほぼ確認できなくなった。*Rarb* は P19 細胞で atRA によって遺伝子発現が誘導されるとの報告が既にある[68]、また、P19 細胞における浮遊培養下での atRA 処理による *Csn3* の発現と同時期の 3 時間後から遺伝子発現が検出される。この結果から、*Rarb* は *Csn3* の発現誘導には関与せず、*Rara* もしくは *Rarg* が *Csn3* の発現を誘導に関与すると考えた。

そこで、*Rara* と *Rarg* のどちらが、P19 細胞における atRA による *Csn3* の発現を誘導に関与するのかを調べるために、それぞれのレセプターに対する特異的なアゴニストを用いて、P19 細胞に神経分化を誘導し、*Csn3* 及び 3 つのサブタイプの発現を調べた(図 2-4)。Am80 は RAR α のアゴニストであり[62,63]、AC-41848 は RAR γ のアゴニストである[64]。浮遊培養下で P19 細胞に Am80 を処理した時の *Rarb* の発現は、atRA 処理を行った時の発現と同等であった。一方、AC-41848 で処理した P19 細胞では、*Rarb* の発現が誘導されなかった。この結果は、*Rara* 依存的経路により誘導されるという以前の報告と矛盾しない[68-70]。また、*Rarg* は、atRA 処理では 36 時間後からその遺伝子発現の減少が確認されたが、AC-41848 では遺伝子発現は同レベルのまま 48 時間まで続いた。そして、*Csn3* は RAR α のアゴニストである Am80 で、atRA と同様に発現が誘導され、RAR γ のアゴニストである AC-41848 では誘導されなかった。この結果から、*Csn3* は atRA-RAR α によって発現が制御されていることが明らかとなった。

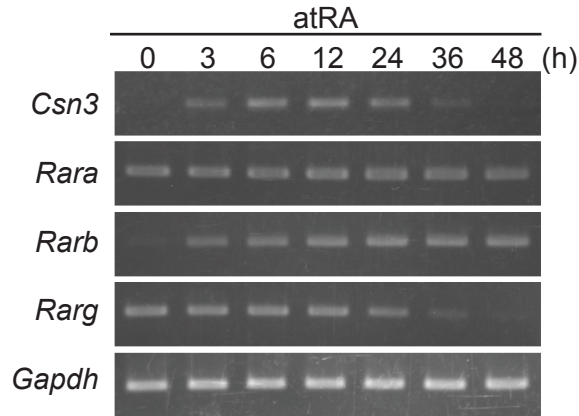


図 2-3 P19 細胞の神経分化過程における *Csn3*、*Rara*、*Rarb*、*Rarg* の発現

Csn3、*Rara*、*Rarb*、*Rarg* の P19 細胞の神経分化過程における発現を RT-PCR 法により調べた。
Gapdh は内部コントロールとして用いた。

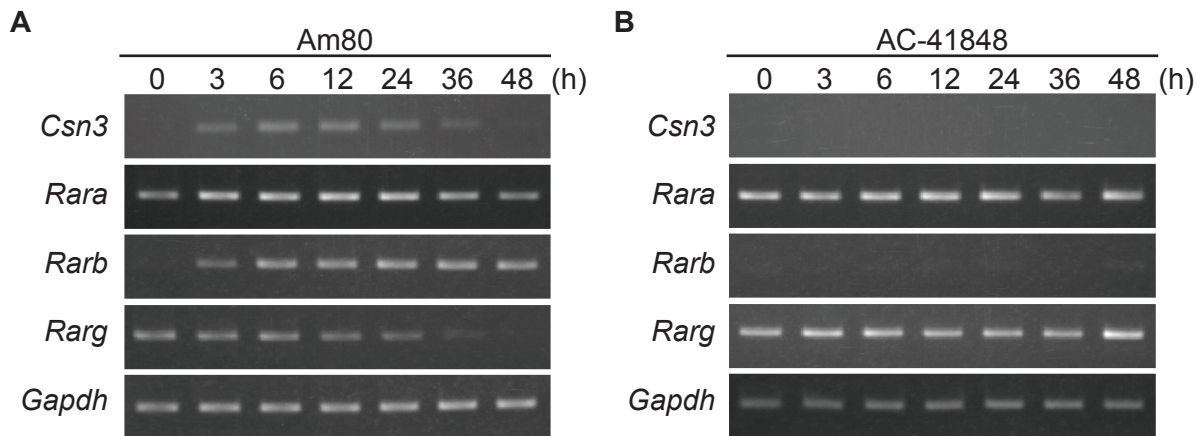


図 2-4 RAR α および RAR γ アゴニストによる *Csn3*、*Rara*、*Rarb*、*Rarg* の発現

A. RAR α のアゴニストである Am80 で P19 細胞を処理した時の *Csn3*、*Rara*、*Rarb*、*Rarg* の発現を RT-PCR 法により調べた。B. RAR γ のアゴニストである AC-41848 で P19 細胞を処理した時の *Csn3*、*Rara*、*Rarb*、*Rarg* の発現を RT-PCR 法により調べた。

3-2. atRA-RAR α 複合体による *Csn3* 転写調節

atRA による転写は、プロモーター領域に RAR-RXR ヘテロダイマーが結合して調節される。そこで、マウス *Csn3* の 5'側上流域を含むレポーターベクターを作製し、atRA 処理した P19 細胞における *Csn3* の転写調節領域をルシフェラーゼアッセイにより調べた。ここで用いたレポーターベクターには、*Csn3* の-5'側上流域、500 から+39 の間で様々な長さで欠損させた DNA 断片のシリーズを組み込んだ(図 2-5A)。これらのベクターを P19 細胞に導入し、24 時間後、細胞を浮遊し、atRA を加え、さらに 48 時間細胞を培養した。その後、細胞を回収しルシフェラーゼ活性を測定した。

Csn3 の 5'側上流域-200 から+39 までの領域のあるレポーターベクター(-500/+39、-400/+39、-300/+39 および-200/+39)のルシフェラーゼ活性は緩やかに減少した。一方、*Csn3* の 5'側上流域-200 から-136 までの領域を含まないレポーターベクター(-135/+39、-100/+39)のルシフェラーゼ活性はほとんど測定されなかった(図 2-5A)。-200 から-136 を境に劇的に活性が変わることから、*Csn3* の 5'側上流域の-200 から-136 の間に、転写に関わる領域があると考えた。

そこで、*Csn3* の 5'側上流域の-200 から-136 の間の配列を調べたところ、RAR α が結合すると予測される配列、DR5(*Csn3*) (TGACCTgcaggTGACCC)が-152 から-136 の間にいることが判明した(図 2-5B)。この DR5(*Csn3*)が P19 細胞の atRA による転写制御に関与するのかを確かめるために、DR5(*Csn3*)を欠損させた DR5dと-152、-151 番目の TG を AA に変更した DR5m を作製した。これらのレポーターベクターを P19 細胞に導入し、同様に atRA 処理した後、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、DR5d もしくは DR5m それぞれを含むレポーターベクターを導入した P19 細胞のルシフェラーゼ活性は、DR5(*Csn3*)を含むレポーターベクターを導入した P19 細胞のルシフェラーゼ活性と比較して、有意に減少した(図 2-5C)。

以上の結果から、*Csn3* の 5'側上流域、-152 から-136 の間にいる DR5(*Csn3*)は、機能的な RARE 配列であり、atRA シグナルに介在して、転写を活性化することが示された。

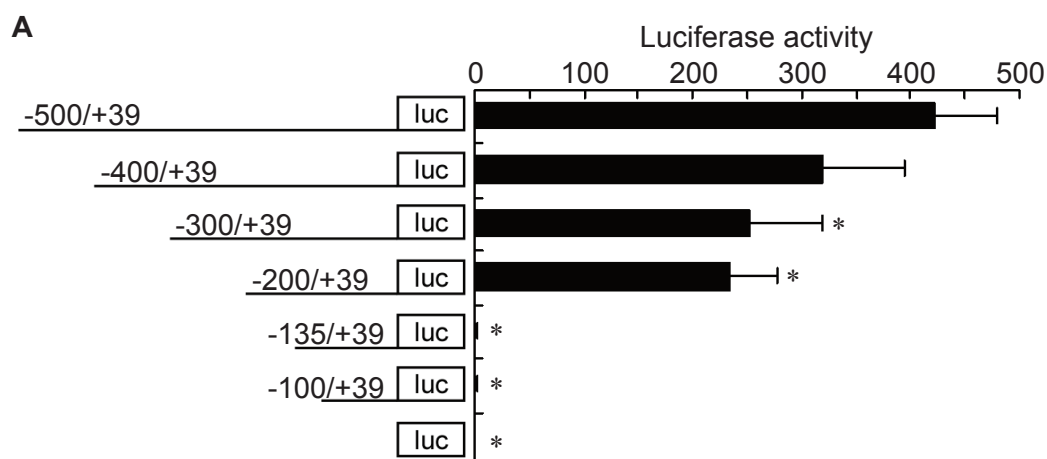


図 2-5 *Csn3* の 5'側上流域の転写活性領域

A. -500/+39、-400/+39、-300/+39、-200/+39、-135/+39、-100/+39 の 5'側上流域を含むレポーターベクターをそれぞれ P19 細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。独立した実験を 3 回行い、平均値±標準誤差を算出した。one-way ANOVA の後、Tukey-Kramer 法により多重比較を行った(* : $p < 0.05$)。-500/+39 の活性と比較して、-300/+39、-200/+39、-135/+39、-100/+39、luc のみの活性が有意に減少した。

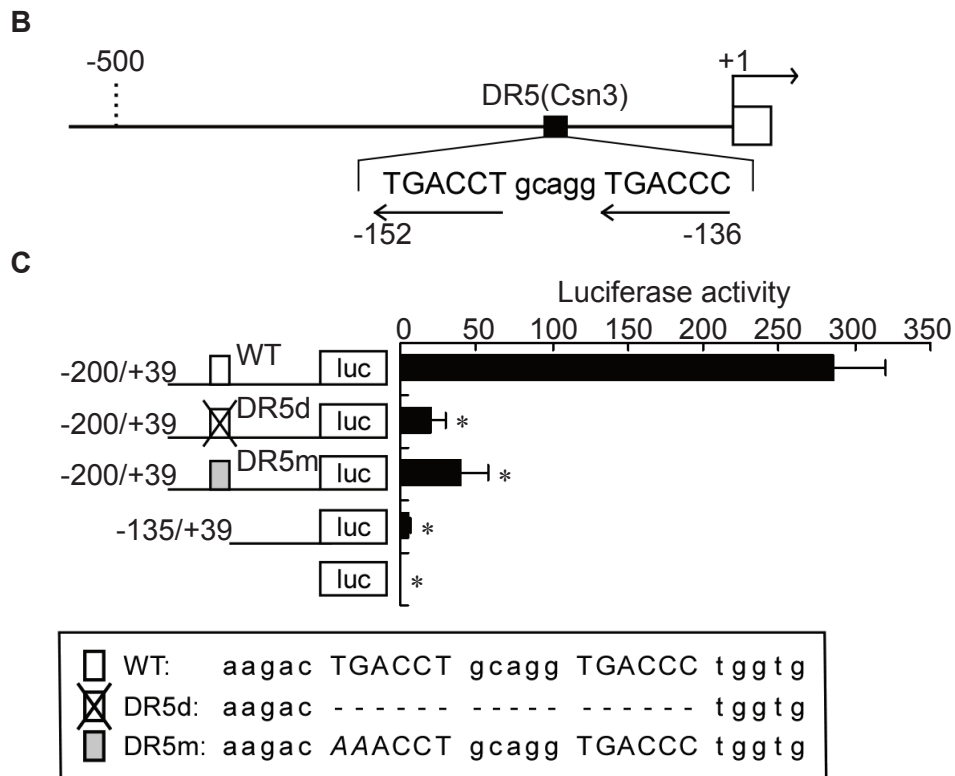


図 2-5 *Csn3* の 5'側上流域の転写活性領域(つづき)

B. *Csn3* の 5'側上流域。予測された結合領域 DR5(*Csn3*)のは黒四角で示し、その下に、配列を示した。矢印はコアモチーフを示し、数字は両端の位置を示す。白四角は第 1 エキソンを示す。C. DR5(*Csn3*)を欠損 (DR5d) もしくは変異 (DR5m) させたレポーターベクターを作製しルシフェラーゼ活性を測定した。下の四角内にその配列を示す。欠損は配列全部を除き、変異は 5'側 2 塩基 TG を AA (イタリック体で示してある) に変更した。独立した実験を 3 回行い、平均値±標準誤差を算出した。one-way ANOVA の後、Tukey-Kramer 法により多重比較を行った (* : $p < 0.05$)。-200/+39 の活性と比較して DR5d、DR5m、-135/+39、luc のみの活性が有意に減少した。

P19 細胞において、*Csn3* の 5'側上流域に機能的な DR5(*Csn3*)がみつかった。すでに atRA による *Csn3* の発現には RAR α が関与することを示しており(図 2-4)、これらの結果から、P19 細胞内で RAR α は DR5(*Csn3*)に結合し、*Csn3* の転写を活性化させると予測した。そこで、EMSA を行い、DR5(*Csn3*)と RAR α の結合を解析した(図 2-6)。

核タンパク質は、浮遊培養下、atRA 処理を 3 時間した P19 細胞から抽出した。その後、Alexa680 で標識された DR5(*Csn3*)を含む 5'側上流域、-160 から-131 のオリゴヌクレオチドを用いて、P19 細胞の核タンパク質と DR5(*Csn3*)との結合を調べた。図 2-6A の Lane 2 に示されたように、DR5(*Csn3*)を含む Alexa680 標識オリゴヌクレオチドと P19 細胞の核タンパク質との結合が確認された。次に、DR5(*Csn3*)を含む未標識オリゴヌクレオチドを 5 倍量、20 倍量加えて、コンペティション実験を行い、この反応の特異性を調べた。その結果、Lane 2 で検出された結合が未標識オリゴヌクレオチドの量に比例して減少し、この結合がオリゴヌクレオチド特異的であることが明らかとなった。

続いて、抗 RAR α 抗体を用いたスーパーシフトアッセイにより、DR5(*Csn3*)を含む Alexa680 標識オリゴヌクレオチドに結合しているタンパク質が RAR α であるかを調べた(図 2-6B)。P19 細胞から抽出した核タンパク質に抗 RAR α 抗体を加え、その後 DR5(*Csn3*)を含む Alexa680 で標識されたオリゴヌクレオチドを加えた。Lane 3 に示されたように、抗 RAR α 抗体を加えると、さらに上にシフトしたバンドが検出された。以上の結果から、DR5(*Csn3*)と RAR α が結合することが示唆された。

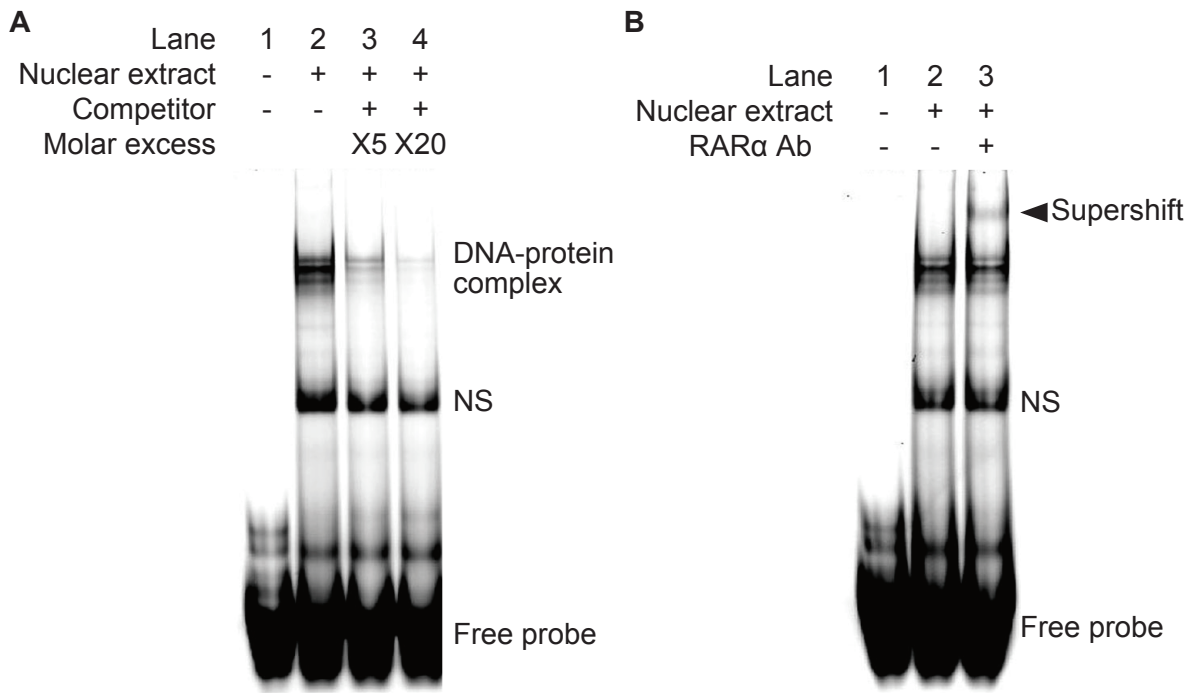


図 2-6 DR5(Csn3)と RAR α の結合

A. atRA 処理 3 時間後の P19 細胞から抽出した核タンパクと Alexa68 標識した *Csn3* の 5'側上流域の-160 から-131 含むオリゴヌクレオチドを用いた EMSA を行った。Lane 1 は核タンパクを加えなかったサンプルであり、Lane 2 は核タンパクを加えたサンプルを示す。コンペティターとして、未標識の同オリゴヌクレオチドを加えて、コンペティターアッセイを行った。コンペティターは 5 倍量 (Lane 3)と 20 倍量 (Lane 4)を加えた。NS は非特異的な反応を示す。B. 抗 RAR α 抗体を用いたスーパーシフトアッセイを行った。Lane 1 は核タンパクを加えなかったサンプル、Lane 2 は核タンパクを加えたサンプル、Lane 3 は核タンパクと抗 RAR α 抗体を加えたサンプルである。矢頭がスーパーシフトを示す。

さらに、P19 細胞内で *Csn3* の 5'側上流域に RAR α が結合するかを、ChIP アッセイを用いて調べた(図 2-7)。浮遊培養下、3 時間 atRA 処理をした P19 細胞から抽出したサンプルを抗 RAR α 抗体もしくはマウス IgG で免疫沈降し、図 2-6A に示した領域、DR5(*Csn3*) ChIP もしくは negative control ChIP の 2 つのプライマーを用いた PCR を行った。免疫沈降前の Input ではそれぞれの領域が増幅された(Lane 1)。DR5(*Csn3*)を含む領域のプライマーを用いた解析では、抗 RAR α 抗体を用いて免疫沈降したサンプルは増幅された(Lane 2、上)が、ネガティブコントロールの領域はほとんど増幅されなかった(Lane 3、上)。negative control 領域のプライマーを用いた解析では免疫沈降したサンプルの増幅はほとんど検出されなかった。DMSO で処理した P19 細胞から抽出したサンプルも解析したが、atRA とあまり差は見られなかった(データ未発表)。この結果から、P19 細胞内において、RAR α は DR5(*Csn3*)を含む *Csn3* の 5'側上流域、-206 から+1 の間に結合することが示された。

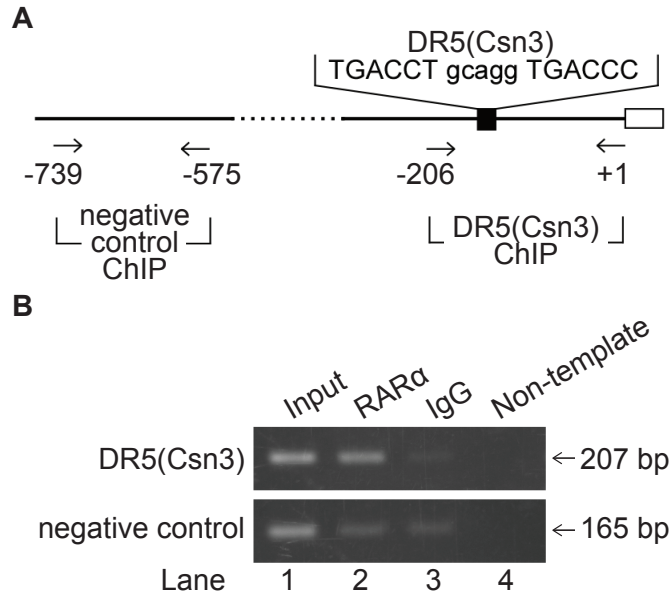


図 2-7 P19 細胞内における *Csn3* の 5'側上流域と RAR α の結合

A. *Csn3* の 5'側上流域を示す。DR5(Csn3)は黒四角で、第 1 エキソンは白四角で示す。矢印は ChIP アッセイで用いた PCR プライマーのポジションを示す。数字は転写開始点(+1)からの位置を示す。B. atRA 処理 3 時間後の P19 細胞を用いた ChIP アッセイを行った。Input は免疫沈降の前のクロマチンを用いて PCR を行ったサンプルであり、ポジティブコントロールである(Lane 1)。RAR α は抗 RAR α 抗体(Lane 2)で免疫沈降したクロマチンを用いて PCR を行ったサンプルを示す。IgG はマウス IgG (Lane 3) で免疫沈降したクロマチンを用いて PCR を行ったサンプルを示す。Lane 4 は DNA を含まないで PCR を行ったサンプルである。

3-3. マウス ES 細胞の神経分化過程及び胚発生過程における *Csn3* の発現

atRA 処理による *Csn3* の発現が P19 細胞の限定的な現象であるのかを調べるために、マウスの ES 細胞株である EB5 細胞に atRA を用いて神経分化を誘導し、*Csn3* が誘導されるか調べた(図 2-8)。胚性マーカーである *Oct3/4* は発現が減少し、神経分化マーカーである *Mash1* は発現が上昇した。これにより、ES 細胞に神経分化が誘導されたことが示された。*Csn3* は、EB5 細胞の atRA による神経分化過程においても発現が誘導された(図 2-8A)。また、一方、atRA の溶媒である DMSO では、*Oct3/4* および *Mash1* の発現もほとんど変化は見られず、*Csn3* の発現は誘導されなかった(図 2-8B)。

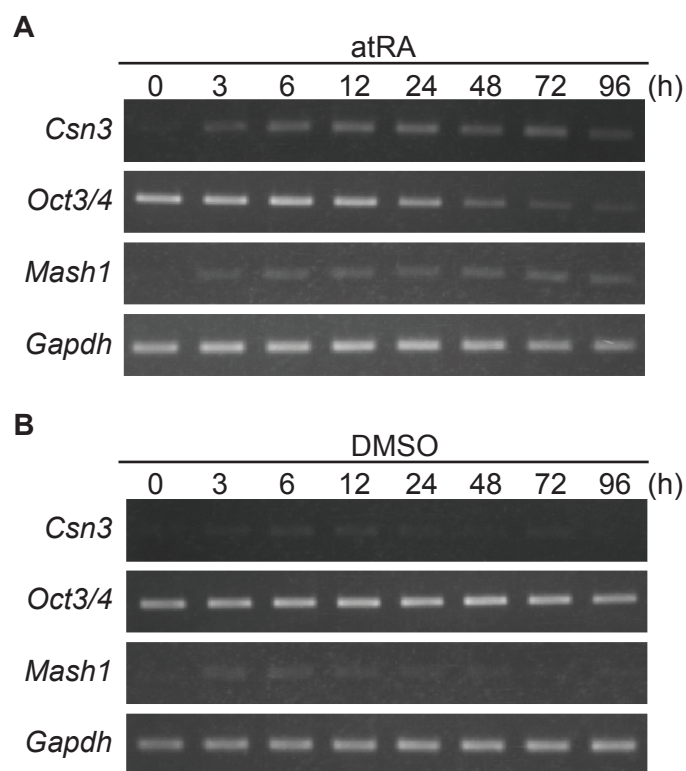


図 2-8 マウス ES 細胞である EB5 細胞の神経分化過程における *Csn3* の発現

A. atRA 処理した細胞を用いて、RT-PCR を行った。*Oct3/4* は胚性マーカー、*Mash1* は神経分化マーカーである。*Gapdh* は内部コントロールとして用いた。B. DMSO 処理した細胞を用いて、RT-PCR を行った。

また、マウスの胚発生過程の cDNA パネルを用いて *Csn3* の発現を調べたところ、E7、E11、E15 ではほとんど発現が観察されないが、E17 では *Csn3* が発現していた(図 2-9)。

以上のことから、*Csn3* の発現誘導は ES 細胞の atRA による神経分化過程やマウス胚発生過程でも見られる現象であるということが明らかとなった。

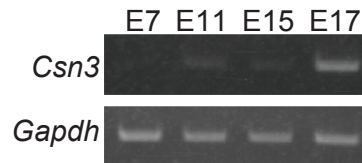


図 2-9 マウス胚発生過程における *Csn3* の発現

E7、E11、E15、E17 の胚由来の cDNA を用いて PCR を行った。*Gapdh* は内部コントロールとして用いた。

第4節 考察

DNA マイクロアレイ解析の結果から、マウス P19 細胞の神経分化過程で *Csn3* の発現が見出された。そこで、P19 細胞の神経分化過程における *Csn3* の発現を RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法により調べたところ、*Csn3* の発現が一過性であることが明らかとなった(図 2-1、2-2)。P19 細胞における *Csn3* の発現は、すでに報告されているが[59]、今回、その発現が一過性であり、P19 細胞の神経分化過程の初期に見られる現象であることが明らかとなった。atRA の代わりにその溶媒である DMSO を用いて、atRA と同条件で P19 細胞に神経分化を誘導した時、*Csn3* の発現は誘導されなかった。このことから、*Csn3* の発現には、atRA が必要であると考えられた。さらに、胚性マーカーである *Oct3/4* の発現が完全に消失する前に *Csn3* は発現し、*Mash1* の発現が誘導され始めたころに *Csn3* は減少することから、胚から神経細胞へと変遷する期間に *Csn3* が発現すると考えられる。

atRA はそのレセプターである RAR と結合して標的遺伝子の転写を制御する。RAR 遺伝子の 3 つのサブタイプ *Rara*、*Rarb*、*Rarg* と *Csn3* の P19 細胞の神経分化過程における関連性を調べたところ、*Csn3* の発現には *Rara* か *Rarg* が関与すると考えられた(図 2-3)。そこで、RAR α のアゴニストである Am80 と RAR γ のアゴニストである AC-41848 をそれぞれ atRA の代わりに用いて P19 細胞に神経分化を誘導した(図 2-4)。その結果、Am80 で処理した時に、atRA と同様に *Csn3* の発現が観察された。このことから、P19 細胞の神経分化過程において観察される *Csn3* の発現では、RAR α が atRA のレセプターとして機能することが明らかとなった。

atRA-RAR α 複合体は、標的遺伝子上にある RARE と結合し転写を制御する。そこで *Csn3* の 5' 側上流域含むレポーターベクターを作製し、調節領域を調べたところ、*Csn3* の 5' 側上流域の -200 から -136 の間に調節領域があった(図 2-5A)。この領域の中には、RAR α が結合すると予測される領域、DR5(*Csn3*)が存在した(図 2-5B)。そこで、DR5(*Csn3*)を欠損もしくは変異を入れたレポーターベクターを作製し、ルシフェラーゼ活性を測定した(図 2-5C)。その結果、転写活性が有意に減少した。これらの結果から、DR5(*Csn3*)は atRA に応答する領域であることが示された。

ここまでの研究から、P19 細胞の神経分化初期に誘導される *Csn3* の発現は、atRA と結合した RAR α が、*Csn3* の 5' 側上流域にある DR5(*Csn3*)と結合して、*Csn3* の転写を活性化すると予測された。そこで、DR5(*Csn3*)と RAR α が結合するのかを EMSA および ChIP アッセイにより調べた(図 2-6、2-7)。EMSA の結果から、DR5(*Csn3*)を含む -160 から -131 を含むオリゴヌクレオチドと RAR α が結合すること、ChIP アッセイの結果から、P19 細胞の神経分化過程において、DR5(*Csn3*)を含

む *Csn3* の 5'側上流域に *RAR α* が結合することが明らかとなった。ここまでの結果から、P19 細胞の神経分化初期に誘導される *Csn3* は、5'側上流域の DR5(*Csn3*)上に存在する *RAR α* に、核内に移行してきた atRA が結合して誘導されると考えられる。

続いて、ES 細胞である EB5 細胞の atRA による分化過程における *Csn3* の発現(図 2-8)とマウスの胚発生過程における *Csn3* の発現(図 2-9)を調べたところ、この両過程においても *Csn3* の発現が確認された。これまでに *Csn3* のノックアウトマウスが作製され、調べられた報告がある[71]。これによると、*Csn3* のノックアウトマウスは正常に発達するが、メスは乳汁産生に失敗し、子に授乳できなかった。この報告では脳に関する説明はなかったので、このノックアウトマウスにおける脳の発達や神経の機能に関しては不明である。しかし、P19 細胞の神経分化過程だけでなく、ES 細胞の神経分化過程や胚から抽出した cDNA で *Csn3* の発現が見られたことから、*Csn3* の発現は P19 細胞特異的な現象では無く、胚発生過程でも発現し機能することが予測される。

本論文により、*Csn3* の発現は、P19 細胞の神経分化の初期に atRA によって制御されていることが明らかとなった。atRA は、浮遊培養による細胞凝集とともに P19 細胞の神経分化の誘導に重要なシグナル分子であり[1,4-6]、また、胚発生初期や神経細胞の運命決定などの神経系の分化に重要な役割を果たしていることが知られている[22,27]。これらのことから、*Csn3* は神経分化の初期、運命決定に関与する遺伝子の一つである可能性が示された。実際に、*Csn3* が胚発生過程において atRA によって誘導されるかはまだ不明であるが、今回、明らかにした P19 細胞の神経分化過程初期における atRA による *Csn3* の発現機構は、胚発生過程における *Csn3* の発現と類似したものかもしれない。更なる研究が必要であるが、胚から神経への運命決定に *Csn3* がどのように関与するかは、P19 細胞の神経分化過程を用いて CSN3 のタンパクレベルの解析を行うことにより明らかにすることができると考えている。

第3章 P19 細胞における atRA による *Tal2* の発現

第1節 背景

Tal2 は bHLH ファミリーに属する転写因子である[72,73]。染色体転座 t(7;9)(q34;q32)がおこっている、ヒト T 細胞性白血病由来の SUP-T3 細胞で、*Tal2* の発現が確認されている[74]。第7染色体と第9染色体の転座は、ヒトの T 細胞性急性リンパ芽球性白血病(T-cell acute lymphoblastic leukemia : T-ALL)との関連性が指摘されており[75,76]、*Tal2* は T-ALL において、染色体転座の結果として活性化される癌遺伝子であると考えられている[77]。この他の癌細胞でも発現の変動が確認されており、肺腺癌腫瘍組織では過剰発現していることが確認され[78]、逆に、卵巣癌組織では正常組織より低く抑えられている[79,80]。

このように、*Tal2* の発現と癌には関連性が指摘されている。その一方、*Tal2* はマウスの脳の正常な発達に重要であることも示されている。*Tal2* は胚発生過程で間脳、中脳、後脳の限られた部位で発現している[54]。また、*Tal2* ノックアウトマウスは正常に生まれ、最初のうちは普通のマウスと同様に成長するが、次第に成長が止まり、生後13日から32日の間に全てのマウスが死亡する。死亡したマウスを解剖したところ、顕著な水頭症になっていることが明らかとなった[55]。これらの所見から、*Tal2* は、中枢神経系の発達に重要な役割を果たしていると考えられている。

P19 細胞は、神経分化研究のモデル細胞であり、atRA 処理と浮遊培養により神経分化を誘導した P19 細胞を用いたマイクロアレイ解析で *Tal2* の発現が6時間で上昇した。脳の発生における重要性が既に指摘されていることから、P19 細胞の神経分化過程と *Tal2* の発現にも、関係性があると考えられる。そこで、この過程における *Tal2* の発現について詳細に調べた。

第2節 実験方法

2-1. P19 細胞の神経分化誘導

本実験で用いたマウス胚性腫瘍細胞株 P19 細胞は、第2章の研究で用いた細胞と同じ、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して、理研 BRC から提供されたサブクローンの P19C6 である。培養方法、神経分化誘導の方法も第2章と同様の方法で行った。

Tal2 の発現に関与する RAR、RXR のサブタイプを調べるために、第2章で用いた RAR α アゴニストである Am80 [62,63] および RAR γ アゴニストである AC-41848[64]に加えて、RAR β および RAR γ アゴニストである Adapalene[81]、そして RXR の pan-アゴニストである Methoprene acid[82] を本研究では用いた。これらのアゴニストは全て、Sigma-Aldrich 社から購入し、DMSO に溶解した。そして、atRA の代わりにそれぞれ 100 nM で培地に加え、神経分化を誘導した。

2-2. 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析も、第2章と同じく、RT-PCR とリアルタイム PCR を用いた。簡単に述べると、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用して、P19 細胞から抽出したトータル RNA 1 μ g を SuperScript III 逆転写酵素(Life Technologies)とランダムプライマー (Takara Bio, Shiga, Japan)で RT-PCR 用に逆転写した。リアルタイム PCR 用には、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies)を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

RT-PCR の標的遺伝子の増幅及びリアルタイム PCR における *Tal2* の発現解析は、第2章とまったく同様の方法により行った。ここで用いた RT-PCR のプライマー配列は、表 3-1 に、リアルタイムのプライマー配列は表 3-2 に示す。RT-PCR の PCR 産物は 1.5%のアガロースゲル電気泳動により解析した。マウスの胚発生過程(E7、E11、E15、E17)における *Tal2* の発現解析には、MTC Multiple Tissue cDNA Panels (TAKARA BIO, Japan)を使用した。リアルタイム PCR では、*hydroxymethylbilane synthase (Hmbs)* 遺伝子をリファレンス遺伝子として用い、*Tal2* の発現レベルを補正した。

Genes	Forward primer	Reverse primer
<i>Tal2</i>	5' - ATTGCTCGAGCCCTATTACCC -3'	5' - AGAGGCTCAACTGAAGTCGAA -3'
<i>Pou5f1</i>	5' - GTTGGAGAAGGTGGAACCAAC -3'	5' - GGACTGAGTAGAGTGTGGTGA -3'
<i>Ascl1</i>	5' - CAACCGGGTCAAGTTGGTCAA -3'	5' - CCAGTTGGTAAAGTCCAGCAG -3'
<i>Rara</i>	5' - CGACGAAGCATCCAGAAGAAC -3'	5' - CGCAGAATCAGGATATCCAGG -3'
<i>Rarb</i>	5' - AAGCCTGCCTCAGTGGATTCA -3'	5' - GCGCTGGAATTCGTGGTGTAT -3'
<i>Rarg</i>	5' - GGAAGCTGTAAGGAACGATCG -3'	5' - TCCATTCGGTCTCCACAGATG -3'
<i>Rxra</i>	5' - CGACTTCTCTACCCAGGTGAA -3'	5' - CAGGTGTAGGTCAGGTCTTTG -3'
<i>Rxrb</i>	5' - CCTCAGATCAACTCCACAGTG -3'	5' - ACTCTTCTGCTCCACAGCAAG -3'
<i>Rxrg</i>	5' - AGCAGCTCTGAGGACATCAAG -3'	5' - GAGTAGAATGACCTGGTCCTC -3'
<i>Gapdh</i>	5' - ACCACAGTCCATGCCATCAC -3'	5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTA -3'

表 3-1 RT-PCR で用いたプライマーの配列

Genes	Forward primer	Reverse primer
<i>Tal2</i>	5' - GCAAAGCCTGCATCAAACAG -3'	5' - GGGAAAGAGCCCCAGAATGT -3'
<i>Hmbs</i>	5' - ACTCTGCTTCGCTGCATTG -3'	5' - AGTTGCCCATCTTTCATCACTG -3'

表 3-2 リアルタイム PCR で用いたプライマーの配列

2-3. 蛍光顕微鏡観察

Gfp と *Tal2* を融合した DNA 断片を PCR により作製し、pCAGGS ベクター[83]に組み込んだ。リポフェクトアミン 2000 を用いて、プロトコールに従い、作製したベクターを P19 細胞に導入した。48 時間後、PBS で洗い 1%グルタルアルデヒド(Nacalai Tesque)で 30 分間固定した。PBS で洗浄後、Hoechst33258 (Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan)で 30 分間染色した。PBS で洗浄後、細胞を蛍光顕微鏡 BZ-8000 (KEYENCE, Osaka, Japan)で観察した。

P19 細胞の形態変化は、浮遊培養下で atRA、DMSO および 4 つのアゴニストで処理 48 時間後にレリーフコントラスト観察法により顕鏡した。

2-4. RNAi による RAR α の抑制

shRNA ベクターである pSilencer3.1-H1 (Life Technologies)に表 3-3 にある DNA 断片を組み込み、RAR α の発現を抑制するベクターを作製した。その後、プロトコールに従い、リポフェクトアミン 2000 を用いて、作製したベクターを P19 細胞に導入した。導入後、安定発現株作製のために、ハイグロマイシン(Wako Pure Chemical Industries) を使用してセレクションした。恒常的な RAR α の発現抑制の確認は、抗 RAR α 抗体(Santa Cruz Biotechnology)および β -actin (Thermo SCIENTIFIC, CA)を用いたウエスタンブロッティング法により評価した。RAR α の抑制による *Tal2* の発現への影響はリアルタイム PCR により評価した。

RAR α

sense	5' -	GCAAGTACACTACGAACAACATTCAAGAGATGTTGTTTCGTAGTGTACTTGCTTTTTTGGAA	-3'
antisense	5' -	TTCCAAAAAAGCAAGTACACTACGAACAACATCTCTTGAATGTTGTTTCGTAGTGTACTTGC	-3'

no-target

sense	5' -	GTACTATTTCGACACGCGAAGTTCAAGAGACTTCGCGTGTGCGAATAGTACTTTTTTGGAA	-3'
antisense	5' -	TTCCAAAAAAGTACTATTTCGACACGCGAAGTCTCTTGAAGTTTCGCGTGTGCGAATAGTAC	-3'

表 3-3 RAR α ノックダウンに用いた DNA の配列

2-6. 統計解析法

リアルタイム PCR の結果は、独立した実験を 3 回行い、平均値 \pm 標準誤差で示した。二元配置分散分析(two-way ANOVA)の後、Tukey-kramer 法により多重比較を行った。有意水準は 5% 未満とした。全ての検定は、Microsoft Excel for Mac 2011 およびそのアドオンソフトである StatPlus:mac LE を用いた。

第3節 結果

3-1. P19 細胞の神経分化過程における *Tal2* の発現

DNA マイクロアレイの結果から、浮遊培養と atRA 処理によって誘導される P19 細胞の神経分化過程において *Tal2* の発現が上昇することが見出された。そこで、この過程における *Tal2* の経時的な発現を RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法により調べた。

浮遊培養および atRA 処理後、0、3、6、12、18、24、36、48 時間の P19 細胞からトータル RNA を抽出後、逆転写して cDNA を作製した。この cDNA を用いて PCR を行い、*Tal2* の経時変化を調べた(図 3-1A)。 *Csn3* で観察されたのと同様に、胚性マーカーの *Pou5f1* の減少が誘導後 36 時間で観察され[49,50]、分化マーカーの *Ascl1* の上昇が誘導後 12 時間で観察された[10,51]。これにより、P19 細胞は多分化能が失われ、神経細胞へと分化を開始したことが示された。この時、*Tal2* は一過性の発現を示した。*Tal2* の発現は、神経分化誘導後 3 時間で確認され、24 時間後にはほぼ検出されなくなっていた。次に、浮遊培養下で atRA の代わりに溶媒である DMSO (0.01%) で P19 細胞を同様に処理した(図 3-1B)。この時、*Pou5f1* および *Ascl1* の発現は変動せず、また、*Tal2* の発現も誘導されなかった。これらの結果から、*Tal2* の発現は P19 細胞の神経分化に重要な二つの処理、atRA と浮遊培養のうち、atRA が関連することが示唆された。

続いて、リアルタイム PCR を用いて、P19 細胞の神経分化過程における *Tal2* の 0~24 時間までの経時的な発現を定量的に調べた(図 3-2)。*Tal2* の発現は、処理後 3、6 時間までは上昇した。その後 12 時間には発現量の減少が観察され、24 時間後には基底レベルにかなり近づいた。以上より、浮遊培養と atRA によって神経分化が誘導された P19 細胞における *Tal2* の発現は約 1 日間で変動することが示された。

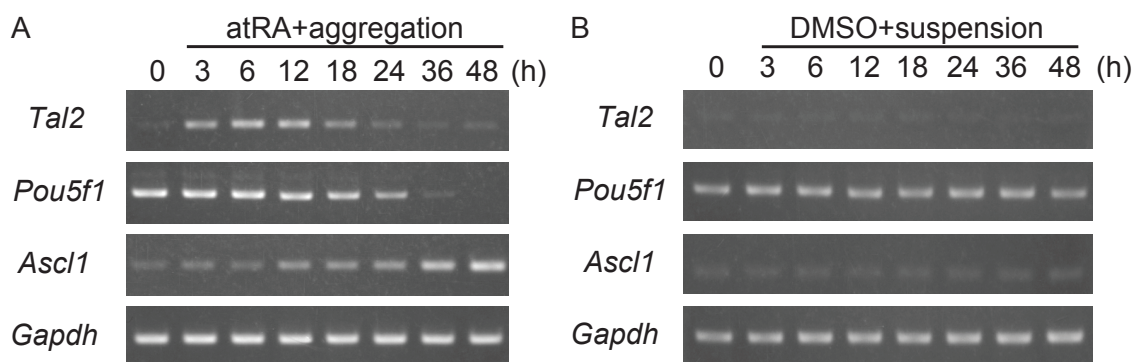


図 3-1 P19 細胞の神経分化過程における *Tal2* の発現

A. P19 細胞に浮遊培養および atRA 処理を行い、*Tal2* の 0~48 時間における発現を調べた。*Pou5f1* は胚性マーカー、*Ascl1* は分化マーカー、*Gapdh* は内部コントロールである。B. atRA の代わりに DMSO を用いて、浮遊培養下で P19 細胞を培養し、*Tal2* の 0~48 時間における発現を調べた。

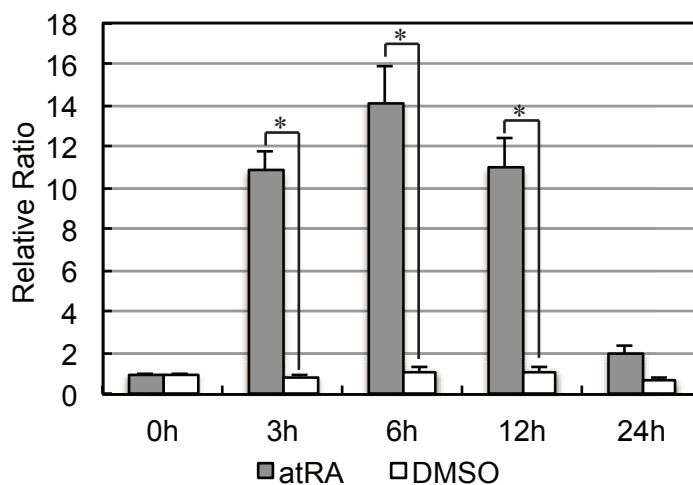


図 3-2 P19 細胞の神経分化過程における *Tal2* の経時的変化

リアルタイム PCR を用いて、P19 細胞の神経分化過程における *Tal2* の 0~24 時間における発現を定量的に調べた。灰色が atRA、白色が DMSO を示す。*Tal2* の発現量はリファレンスとして用いた *Hmbs* により補正し、さらに、誘導前(0 時間)の発現量を 1 として、各時間の発現量を計算した。独立した実験を 3 回行ない、平均値±標準誤差を算出した。two-way ANOVA の後、Tukey-Kramer 法により多重比較を行った(*: $p < 0.05$)。3h、6h、12h において、DMSO と比較して、atRA 処理での *Tal2* の発現が有意に増加した。

Tal2 は 10.5 日目から 14.5 日目までの胚の頭部で発現し、体部ではほとんど発現が確認されないこと、および成長したマウスの脳では発現していないことが既に報告されている[54]。そこで、マウスの胚の cDNA パネル(7、11、15、17 日目の胚及び脳)を用いて、胚発生過程における *Tal2* の発現をより広い間隔で調べた(図 3-3)。報告されているのと同様に、11 日目の胚で *Tal2* は発現しており、脳では発現していなかった。さらに、7 日目の胚では発現が確認できず、15、17 日目の胚でもほとんど発現していなかった。これらの結果から、*Tal2* の発現は胚発生過程においても一過性であることが明らかとなった。

以上から、*Tal2* は P19 細胞の神経分化過程の開始直後に一過性に誘導され、その制御は atRA が関与していること、また、胚発生過程においても、P19 細胞と同様に一過的な *Tal2* の発現が観察されることが明らかとなった。

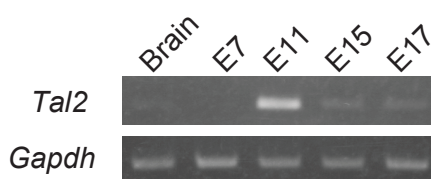


図 3-3 マウス胚発生過程における *Tal2* の発現

マウスの胚の cDNA パネルを用いて *Tal2* の経時的な発現を調べた。*Gapdh* は内部コントロールとして用いた。

3-2. P19 細胞における TAL2 の局在

P19 細胞における TAL2 の局在を調べるために、GFP と融合した TAL2(GFP-TAL2)を発現するベクターを作製した。このベクターを P19 細胞に導入後 48 時間培養した。その後、ヘキスト染色を行い、蛍光顕微鏡により観察した結果、GFP-TAL2 の核への局在が観察された(図 3-4)。この結果から、P19 細胞においても、atRA および浮遊培養による誘導により発現した TAL2 は核に移行して機能すると考えられる。

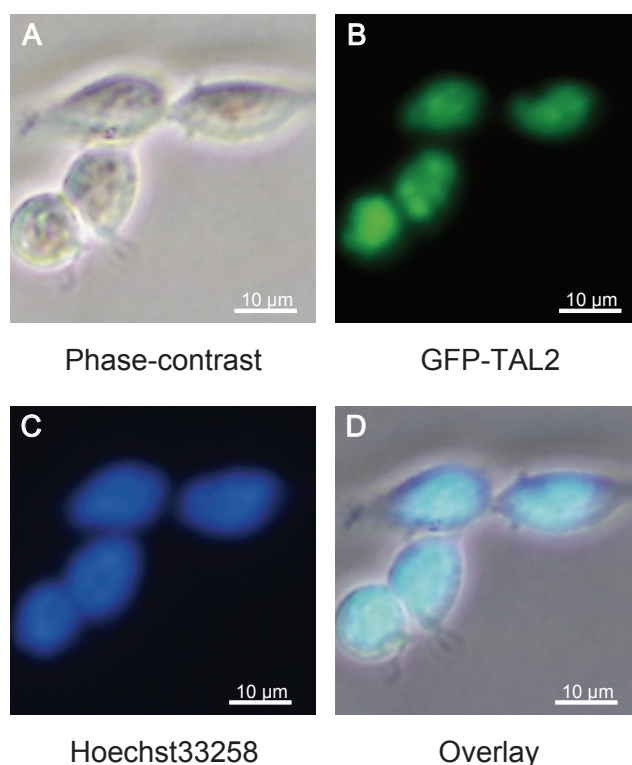


図 3-4 P19 細胞における GFP-TAL2 の局在

P19 細胞における TAL2 の局在を調べるために、GFP-TAL2 発現ベクターを作製し、P19 細胞に導入した。その後、Hoechst33258 で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。A. 位相差観察、B. GFP、C. ヘキスト染色、D. A-C を重ね合わせたものである。

3-3. atRA-RAR α による *Tal2* の誘導

P19 細胞の神経分化誘導には atRA と浮遊培養が重要である[1,4,5]。atRA の代わりに DMSO を用いて浮遊培養下で P19 細胞を処理したところ、*Tal2* は誘導されなかった(図 3-1B)。そこで、浮遊培養の代わりに接着培養下で atRA を添加した P19 細胞における *Tal2* の発現を RT-PCR で調べた(図 3-5)。その結果、浮遊培養と同様に、接着細胞でも *Tal2* の発現が誘導され、そのパターンもほぼ同じであった。P19 細胞の神経分化は、浮遊培養による細胞凝集と atRA 処理の両方が重要であるが、ここまでの結果から、P19 細胞における *Tal2* の発現は atRA が司っていることが明らかとなった。

atRA はレセプターである RAR と結合して標的遺伝子の転写を調節する。この時、RAR は同じ核内受容体ファミリーに属する RXR とヘテロダイマーを形成する。そこで、P19 細胞の神経分化過程における RAR 遺伝子のサブタイプ(*Rara*、*Rarb*、*Rarg*)および RXR 遺伝子のサブタイプ(*Rxra*、*Rxrb*、*Rxrg*)の発現の変動を RT-PCR 法により調べた(図 3-6)。

浮遊培養と atRA 処理して神経分化を誘導した P19 細胞から、上述したと同様の方法により cDNA を合成した。その後、この cDNA とそれぞれの遺伝子特異的プライマーを用いて PCR を行った。*Rara*、*Rarb*、*Rarg* の発現は、第 2 章で言及した通り、*Rara* はあまり変わらず一定の発現が見られた。*Rarb* は誘導後 3 時間で発現し、そのまま 48 時間、発現が維持された。*Rarg* は誘導前から発現していたものが減少した。

一方、*Rxra* および *Rxrb* は atRA 処理前(0 時間)から発現しており、*Rara* と同様、処理後 48 時間、発現が持続した。しかし、*Rxrg* は atRA 処理前(0 時間)から処理後 6 時間まではほぼ一様に発現していたが、12 時間で発現の減少が見られ、atRA 処理 24 時間後には発現がほとんど検出できなくなった。

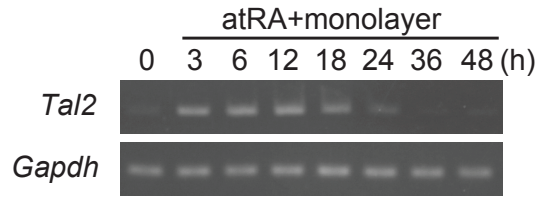


図 3-5 P19 細胞を atRA 処理のみ行った時の *Tal2* の発現

接着培養下で atRA を加えた P19 細胞における *Tal2* の経時的な発現を調べた。*Gapdh* は内部コントロールとして用いた。

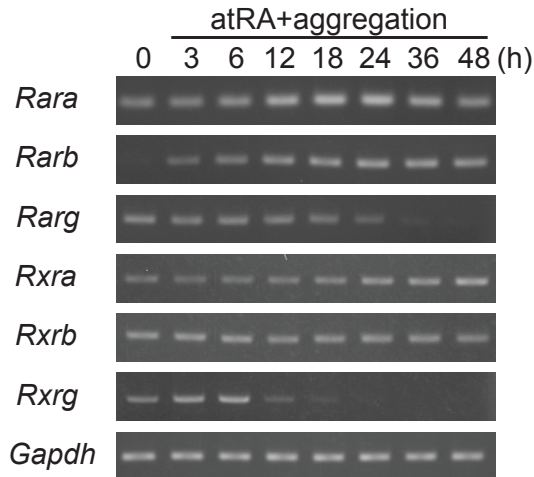


図 3-6 P19 細胞の神経分化過程における *Rara*、*Rarb*、*Rarg*、*Rxra*、*Rxrb*、*Rxrg* の発現

atRA および浮遊培養により神経分化を誘導した P19 細胞における *Rara*、*Rarb*、*Rarg*、*Rxra*、*Rxrb*、*Rxrg* の発現を調べた。*Gapdh* は内部コントロールとして用いた。

続いて、P19 細胞での atRA による *Tal2* の発現誘導に關与する RAR および RXR のサブタイプを調べた。P19 細胞に浮遊培養下で、atRA の代わりにそれぞれのレセプターに対する特異的なアゴニストを添加した(図 3-7)。Am80 は RAR α [62,63]、Adapalene は RAR β および RAR γ [81]、AC-41848 は RAR γ [64]、そして Methoprene acid は RXR の pan-アゴニスト[82]である。浮遊培養下で P19 細胞に Am80 を処理した時の *Tal2* の発現は、atRA を処理した時の発現と同様であった。Adapalene で P19 細胞を処理した時は、atRA や Am80 と比較して、弱く *Tal2* の発現が誘導された。その一方、AC-41848 および Methoprene acid で処理した P19 細胞では、*Tal2* の発現は誘導されなかった。

さらに、これらアゴニストを使った時の細胞の形態変化を比較した(図 3-8)。atRA、DMSO およびそれぞれのアゴニスト 4 種類を用いて、浮遊培養下の P19 細胞に加え、48 時間後に観察した。*Tal2* の発現が検出された atRA、Am80、Adapalene は浮遊した球形の凝集体が観察された。一方、*Tal2* の発現が検出されなかった DMSO、AC-41848、Methoprene acid は細胞の集合は確認されたが、あまり浮遊せず、きれいな球形の凝集体もほとんど観察されなかった。

これらの結果は、RAR α もしくは RAR β が P19 細胞での *Tal2* の発現に關与する可能性を示した。しかし、P19 細胞での *Rarb* の発現誘導は atRA により誘導されることが示されており[68,69]、本研究においても atRA 誘導前には発現が観察されず、atRA 処理後 3 時間から *Tal2* と同様に検出された。また、atRA や Am80 と比較して、Adapalene による *Tal2* の発現誘導は明らかに弱かった。これまでに、Adapalene は RAR α を弱く刺激することが報告されており、その活性は、RAR β と比較すると約 10 倍弱い[81]。以上のことから、Adapalene の結果は、RAR α を弱く刺激したものであり、RAR α が P19 細胞における *Tal2* の発現誘導に關与すると考えられる。

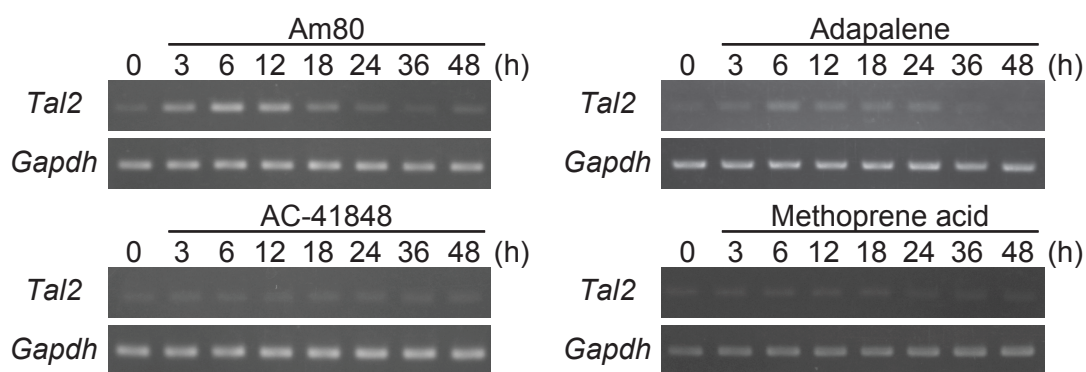


図 3-7 RAR および RXR アゴニストによる *Tal2* の発現

P19 細胞に浮遊培養下で、atRA の代わりに RAR および RXR のアゴニストを添加した。Am80 は RAR α のアゴニスト、Adapalene は RAR β および RAR γ のアゴニスト、AC-41848 は RAR γ のアゴニスト、Methoprene acid は RXR の pan-アゴニストである。

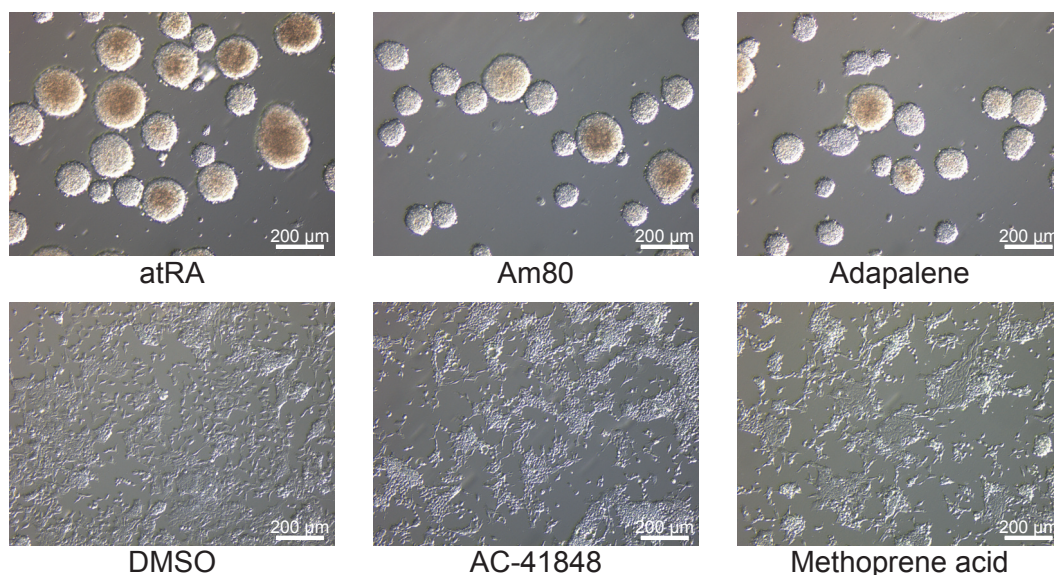


図 3-8 RAR および RXR アゴニストによる P19 細胞の形態変化

浮遊培養下で atRA、DMSO および RAR、RXR のそれぞれのアゴニストを P19 細胞に加え、48 時間後にレリーフコントラスト観察法により観察した。倒立型顕微鏡 CKX41 と 3CCD カメラ FX380(共にオリンパス)を用いて 720 倍で撮影した。

最後に、RNAiによりRAR α をノックダウンしたP19細胞でのatRAによる*Tal2*の発現を調べた(図3-9)。shRNAベクターに*Rara*を標的としたDNA断片を組み込み、P19細胞に導入した。その後、ハイグロマイシンによるセレクションにより、恒常的にRAR α の発現が抑制されたP19細胞を選択した。この細胞におけるRAR α の発現抑制はウェスタンブロッティング法により評価した(図3-8A)。RAR α の発現抑制が確認されたので、この細胞を浮遊培養下でatRA処理を行い、経時的な*Tal2*の発現を、定量的にリアルタイムPCRで調べた(図3-9B)。その結果、コントロールで見られる*Tal2*の発現が、RAR α がノックアウトされたP19細胞では、優位に抑制された。これにより、P19細胞における*Tal2*の発現は、RAR α が誘導することが明らかとなった。

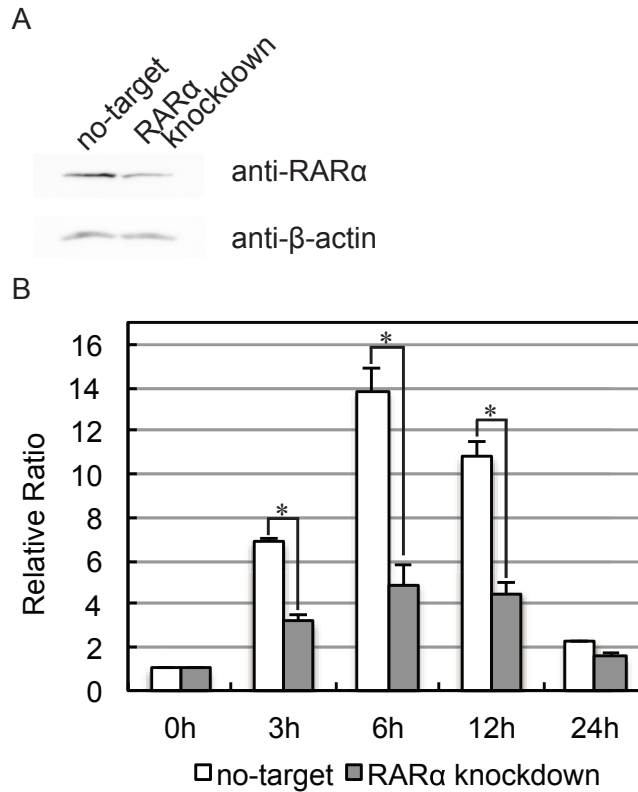


図 3-9 RARα ノックダウンによる *Tal2* の発現の抑制

A. P19 細胞における RARα の発現抑制をウエスタンブロットティング法により評価した。β-actin はタンパク質発現量のコントロールとして用いた。B. RNAi により RARα がノックダウンされた P19 細胞における *Tal2* の発現をリアルタイム PCR 法により調べた。白色がコントロール、灰色が RARα をノックダウンされた P19 細胞を示す。*Tal2* の発現量は、リファレンスとして用いた *Hmbs* により補正し、さらに、誘導前(0h)の発現量を 1 として、atRA 誘導後の各時間における発現量を計算した。独立した実験を 3 回行い、平均値±標準誤差を算出した。two-way ANOVA の後、Tukey-Kramer 法により多重比較を行った(* : $p < 0.05$)。3h、6h、12h において、コントロールと比較して、RARα ノックダウンによる *Tal2* の発現が有意に減少した。

第4節 考察

P19 細胞は atRA と浮遊培養により神経分化を誘導できる細胞である。誘導後 1 日の間で *Tal2* の発現は増減し、一過性であることが明らかとなった(図 3-1、3-2)。atRA の代わりに atRA の溶媒である DMSO で処理したところ、分化マーカー遺伝子の発現が変動せず、*Tal2* の発現も誘導されなかったことから、*Tal2* の発現は atRA と関連すると考えられた。マウスの胚発生過程での *Tal2* の発現を調べると、これまでの報告と同様に、11 日目の胚で発現が確認され[54]、その発現は、P19 細胞の神経分化過程のように一過性であることが明らかとなった(図 3-3)。これらの結果から、*Tal2* の発現は、P19 細胞に特異的なものではなく、胚発生過程において観察される現象であることが示された。

GFP と融合させた TAL2 を P19 細胞に発現させたところ、核内に局在し、さらに、核内でも発現に偏りがあることが観察された(図 3-4)。TAL2 は転写因子であり、神経分化過程での発現後も核内に局在して機能すると考えられる。TAL2 が属する bHLH ファミリーは様々な現象を調節する転写因子群である。bHLH ファミリーの属するタンパク質は、ヘテロダイマー形成に必要な HLH ドメインと DNA との結合に必要な塩基性ドメインを持ち、核内においてヘテロダイマーで標的遺伝子の転写を制御する。ヘテロダイマーは、NeuroD や Neurogenin といった臓器特異的なファミリーと E-proteins (TCF3、TCF4、TCF12)とよばれる普遍的に発現しているファミリー間で形成される[73]。*in vitro* の結果では、TAL2 と TCF3 が相互作用することが示されている[84]。GFP-TAL2 の結果から、発現した TAL2 は核内に存在し、bHLH ファミリーとヘテロダイマーを形成し、転写因子として働くと推測される。そこで、P19 細胞の神経分化過程における TAL2 の役割を考えるために、TAL2 とヘテロダイマーを形成する bHLH ファミリーの同定、および、そのヘテロダイマーが転写調節する標的遺伝子を同定するための研究が現在進行中である。

浮遊培養下、DMSO では *Tal2* の発現は誘導されなかった(図 3-1)。また、接着培養下で P19 細胞に atRA を処理すると、*Tal2* の発現が誘導された(図 3-5)。これらにより、P19 細胞の神経分化には atRA と浮遊培養の二つの処理が重要であるが、*Tal2* の発現には浮遊培養は必要なく、atRA により誘導されると考えられる。atRA は RAR-RXR ヘテロダイマーと結合して、標的遺伝子の転写を制御する。そこで、P19 細胞の神経分化過程において、*Csn3* の研究で既に行った *Rara*、*Rarb*、*Rarg* に加え、*Rxra*、*Rxrb*、*Rxrg* の発現も調べた(図 3-6)。さらに、浮遊培養下で P19 細胞に RAR、RXR それぞれのアゴニストを処理した時の *Tal2* の発現、および、その時の P19 細胞の形態を観察した(図 3-7、3-8)。その結果、RAR α のアゴニストである Am80 を atRA の代わりに用

いて P19 細胞に神経分化を誘導した時、*Tal2* の発現と細胞の凝集が観察された。さらに、RNAi により RAR α の発現を抑制した P19 細胞を作製し、浮遊培養下で atRA 処理したところ、*Tal2* の発現が抑制された(図 3-9)。以上から、P19 細胞の神経分化過程において、atRA による *Tal2* の発現は RAR α を介して誘導されることが明らかとなった。

P19 細胞の神経分化過程において、*Tal2* の発現は atRA によって誘導され、その発現パターンは、胚性マーカーである *Pou5f1* が消失する前に発現し、神経分化マーカーである *Ascl1* の発現が誘導される前に消失した。このことから、*Tal2* は、P19 細胞の神経分化が始まる直前、胚から神経分化へと移行する期間に、その発現が誘導されることがはじめて明らかとなった。*Csn3* と同じく、*Tal2* の発現も、atRA-RAR α によって誘導された。atRA は、P19 細胞の神経分化に重要な誘導剤であり[1,4-6]、また、胚発生や神経細胞への運命決定に重要な役割を果たしている [22,27]。*Csn3* と同様、*Tal2* が胚発生過程において、atRA によって誘導されるかは不明であるが、ノックアウトマウスの解析から、脳の正常な発達には TAL2 が重要であり[55]、今回の結果は、*Tal2* と神経分化との関連性を示唆する。そこで、神経分化との関わりをより強く示すために、次の第 4 章では、P19 細胞における *Tal2* の atRA による転写制御機構を調べた。

第4章 P19細胞における atRA による *Tal2* の転写調節機構

第1節 背景

ここまでの研究によって、P19細胞の神経分化過程における *Tal2* の発現は、atRA によって誘導され、また、その発現には RAR α が関与することが示された。そこで次に、atRA-RAR α 複合体による *Tal2* の発現誘導に関与する調節メカニズムを明らかにすることを考えた。

RARは標的遺伝子上の RARE に存在し、atRA と結合して転写を活性化にする[42,43,46]。そこで、*Tal2* の調節領域を予測するために、*Tal2* の転写開始点の 5'側上流域 10 kbp および転写終了点の 3'側下流域 10 kbp の範囲にある RARE のコアモチーフ、(A/G)G(G/T)T(G/C)A を探索した。マウス *Tal2* は 2 つのエキソンと 1 つのイントロンからなる。*Tal2* 上の RARE と予測された配列(本論文では DR5(*Tal2*)と称する)は、5'側上流域および 3'側下流域には存在せず、イントロンに 1 つ存在した(図 4-1)。この予測された RARE は 5 個の塩基によってコアモチーフが分けられている DR5 であった。ヒト *Tal2* は 1 つのエキソンからなり、細胞の種類によって、翻訳領域から近位と遠位の 2 つのプロモーターから転写が開始される [85]。マウスで報告されている転写開始点は 1 つであるが、DR5(*Tal2*)がイントロンに存在することから、ヒト *Tal2* の様に、複数のプロモーター領域が存在し、DR5(*Tal2*)の下流から転写が開始する可能性を考えた。そこで、最初に、P19細胞の神経分化過程における *Tal2* の転写開始点を調べた。

調べた転写開始点の上流には TATA-box と予測される配列(本論文では TATA(*Tal2*)と称する)が存在した。TATA-box はコアプロモーターに含まれる配列であり、TATA(A/T)A(A/T)(A/G)というコンセンサス配列をもち、転写開始点の約 30 塩基上流にあることが多い[86–88]。転写開始に関与するコアプロモーターの主要な DNA 配列であり、真核細胞で RNA ポリメラーゼや関連因子と複合体を形成する TFIID のサブユニットの 1 つである TATA-box binding protein (TBP)によって認識される[86,89]。

これらの配列情報から、P19細胞の神経分化過程において、DR5(*Tal2*)と TATA(*Tal2*)の 2 つの調節領域が *Tal2* の発現に関与すると予測した。そこで、これら 2 つの領域における転写活性を測定した。また、RARE は RAR α と、TATA-box は TBP と結合することから、これらのタンパク質と DR5(*Tal2*)、TATA(*Tal2*)がそれぞれ結合するのかを調べた。さらに、P19細胞の神経分化過程における DR5(*Tal2*)と TATA(*Tal2*)の関連性を調べた。



図 4-1 *Tal2* 上の RARE 様配列、DR5(*Tal2*)

シーケンスの下の矢印は、ダイレクトリピートのコアモチーフである 6 塩基を示す。ダイレクトリピート間は 5 塩基。エキソンは白い四角、アミノ酸翻訳領域は灰色の四角で示す。

第2節 実験方法

2-1. P19 細胞の神経分化誘導

本実験で用いたマウス胚性腫瘍細胞株 P19 細胞は、第2章、第3章で用いた細胞と同じ、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して、理研 BRC から提供されたサブクローンの P19C6 である。培養方法、神経分化誘導の方法も第2章、第3章と同様の方法で行った。

2-2. 5'-rapid amplification of cDNA ends (5'-RACE)

RNeasy Mini Kit (QIAGEN)をプロトコール通りに、P19 細胞からトータル RNA を抽出した。SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Takara Bio)を用いて、プロトコールに従って *Tal2* の5'末端を決定した。5'末端の増幅は Ex taq (Takara) を用い、マウス *Tal2* 特異的プライマーは次の配列のものを使用した；5'-AGAGGCTCAACTGAAGTCGAA-3'。増幅した DNA 断片は pGEM-T Easy vector (Promega)に組み込み、シーケンシングにより5'末端の配列を確認した。

2-3. ルシフェラーゼアッセイ

Tal2 の5'側上流域-2093/+73 の領域を PCR により増幅し、ホタルルシフェラーゼを発現するレポーターベクターである pGL4.10[*luc2*] ベクター(Promega)に組み込んだ。同様の方法により、-1229/+73、-604/+73、-240/+73 の領域をもつレポーターベクターを作製した。これらの配列はシーケンシングにより確認した。また、*Tal2* の5'側上流域-240/+73 の領域を組み込んだレポーターベクターから、PCR を利用して、TATA(*Tal2*)を欠損させたベクターも作製した。この欠損ベクターは TATA(*Tal2*)の解析に使用した。

P19 細胞を 12 ウェルプレートに 8×10^5 cells/well で播種し、作製したベクターをリポフェクトアミン 2000 (Life Technologies)を用いてプロトコールに従って導入した。5 時間後、浮遊培養用の 24 ウェルプレートに 2×10^5 cells/ml で再播種し、1 μ M atRA を加え、さらに 20 時間培養した[90]。その後、P19 細胞を回収し、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega)を用いてプロトコールに従ってルシフェラーゼ活性を測定した。作製したベクターと一緒に、リファレンスとしてウミシイタケルシフェラーゼを発現するレポーターベクター、pGL4.74[*hRluc*/TK]ベクター(Promega)も P19 細胞に導入した。このウミシイタケルシフェラーゼによる発光量から、それぞれ作製したベクター由来のホタルルシフェラーゼによる発光量を補正した。

Tal2 の 5'側上流域に存在する TATA(*Tal2*)の解析のために、CheckMate/Flexi Vector Mammalian Two-Hybrid System (Promega)を利用した。ホタルルシフェラーゼレポーターベクターである pGL4.31[*luc2P/GAL4UAS/Hygro*]から adenovirus major late promoter を除くために *Nhe I* と *Hind III* で制限酵素処理を行った。制限酵素処理をしたベクターの同じサイトに TATA(*Tal2*)を含む 5'側上流域-40 から+15 までを、また、TATA(*Tal2*)に変異を入れた TATA(*Tal2*)Mut を含む同領域を組み込んだ。これらの DNA 断片は一本鎖 DNA の合成を依頼し、アニーリングにより作製した。その配列の sense 鎖を表 4-1 に示す。変異を入れた配列は太字で示す。作製したレポーターベクターと、VP16と融合した MyoD、GAL4と融合した Idそれぞれの発現ベクターの共導入は、P19 細胞を 24 ウェルプレートに 4×10^5 cells/well で播種し、リポフェクトアミン 2000 (Life Technologies)を用いてプロトコールに従って行った。24 時間後 P19 細胞を回収し、Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega)を用いてプロトコールに従ってルシフェラーゼ活性を測定した。ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子は、GAL4 及び GAL4-Id を発現するベクターに組み込まれており、リファレンスとして使用した。

Tal2 のイントロンに存在する DR5(*Tal2*)の解析のために、VP16 と融合させた RAR α (VP16-RARA)をコードする遺伝子を pCAGGS ベクター[83]に組み込み、VP16-RARA 発現ベクターを作製した。pGL4.31[*luc2P/GAL4UAS/Hygro*]から GAL4 結合サイトを除くために *Kpn I* と *Nhe I* で制限酵素処理を行い、そこに、DR5(*Tal2*)および変異を入れた DR5(*Tal2*)Mut を 3 回、縦列反復させた DNA (DR5(*Tal2*) \times 3 および DR5(*Tal2*)Mut \times 3)を組み込んだ。この DNA も TATA(*Tal2*)と同様に、一本鎖 DNA の合成を依頼し、アニーリングにより作製した。その配列の sense 鎖を表 4-2 に示す。変異を入れた配列は太字で示す。下線部は DR5(*Tal2*)および DR5(*Tal2*)Mut の配列を示す。これらの作製したベクターは、TATA(*Tal2*)と同様の方法で、P19 細胞に共導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。DR5(*Tal2*)では、リファレンスとしてウミシイタケルシフェラーゼを発現する pGL4.74[*hRluc/TK*]ベクター(Promega)も P19 細胞に導入した。これらの実験では、ウミシイタケルシフェラーゼの発光量でホタルルシフェラーゼの発光量を補正した。

TATA(Tal2)	5' - GCTAGCGGCGGTGTCC <u>TATAA</u> AGGCTGTGGCAG- AGACCCTGCGTCCAGGCGAGGGCGCACAAAGCTT -3'
TATA(Tal2)Mut	5' - GCTAGCGGCGGTGTCC <u>GCGCA</u> AGGCTGTGGCAG- AGACCCTGCGTCCAGGCGAGGGCGCACAAAGCTT -3'

表 4-1 ベクター作製に用いた TATA(Tal2)および TATA(Tal2)Mut の配列

太字は変異を、下線部は TATA(Tal2)を示す。

DR5(Tal2)×3	5' - GGTACC (<u>TGA</u> ACTTTGACTCACCTG) ₃ GCTAGC -3'
DR5(Tal2)Mut×3	5' - GGTACC (<u>AAA</u> ACTTTGACTCACCTG) ₃ GCTAGC -3'

表 4-2 ベクター作製に用いた DR5(Tal2)×3 および DR5(Tal2)Mut×3 の配列

括弧は反復した配列を示す。3 回反復した。太字は変異を、下線部は DR5(Tal2)を示す。

2-4. ウェスタンブロットティング法

浮遊培養下で atRA 処理を 0、3、6、12、24 時間行った P19 細胞を PBS で洗浄し、遠心により回収して沈殿にした。この沈殿に溶解バッファー(62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], 10% glycerol, 2% SDS, 0.05 mg/ml bromophenol blue)を加え、ソニケーションにより破砕し、5 分間 95°C で処理した。SDS-PAGE で分離後、トランスバッファー(25 mM Tris, 189 mM glycine, 10% methanol)中で Immobilon-P transfer membrane (Merck Millipore)に Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad)で転写した。5%スキムミルクでブロッキングした後、1 次抗体を室温で 1 時間、反応させた。0.1% TBS-T (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)で洗浄後、2 次抗体を室温で 1 時間、反応させた。0.1% TBS-T (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)で洗浄後、Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate (Merck Millipore)で検出した。1 次抗体として、anti-RAR α antibody, anti-TFIID (TBP) antibody (共に Santa Cruz Biotechnology) と anti- β -Actin antibody (MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES, Nagoya, Japan)を、2 次抗体として Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology, MA)を使用した。

2-5. 核タンパク質抽出と Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)

核抽出は第 2 章と同様の方法で行った。P19 細胞は atRA 処理前の細胞と浮遊培養下で 3 時間 atRA 処理を行った細胞を使用した。

EMSA も第 2 章と同様の方法で行った。TATA(Tal2)と TBP の結合の解析および DR5(Tal2)と

RAR α の結合の解析のために使用した、5'末端を Alexa680 で標識されたオリゴヌクレオチドを表 4-3、4-4 に示す。変異を入れた配列は太字で示す。

スーパーシフトアッセイ用いた抗体はそれぞれ、anti-TFIID (TBP) antibody (Santa Cruz Biotechnology)および anti-RAR α antibody (ActiveMotif, CA)を用いた。核タンパク質を反応バッファーに加え、10 分間静置後、抗 RAR α 抗体を加え、60 分間、室温で反応させた。その後、Alexa680 標識プローブを加え、30 分間室温で反応させた。

TATA(Tal2)	5'- Alexa680-	GCGGTGTCCTATAAAGGCTGTGGCA	-3'
TATA(Tal2)Mut	5'- Alexa680-	GCGGTGTCC GCGCA AGGCTGTGGCA	-3'

表 4-3 EMSA で用いた TATA(Tal2)および TATA(Tal2)Mut(太字が変異部位)の配列。

DR5(Tal2)	5'- Alexa680-	CTAGGGGTGAACTTTGACTCACCTGCCAGTG	-3'
DR5(Tal2)Mut	5'- Alexa680-	CTAGGGG AAA ACTTTGACTCACCTGCCAGTG	-3'

表 4-4 EMSA で用いた DR5(Tal2)および DR5(Tal2)Mut(太字が変異部位)の配列。

2-5. ChIP アッセイ

ChIP アッセイは SimpleChIP Plus Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads) (Cell Signaling Technology)を用いて、プロトコールに従って行った。本アッセイで使用した P19 細胞の細胞数は、TATA(Tal2)の解析では 2×10^6 cells、DR5(Tal2)の解析では 4×10^6 cells。P19 細胞は浮遊培養下で 3 時間 atRA 処理を行った。解析のための PCR には、ポリメラーゼとして AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Life Technologies)を用いた。用いたプライマーの配列は表 4-5 に示す。それぞれプライマーのターゲット領域は、TATA(Tal2)が-152 から-11 まで、DR5(Tal2)が+4799 から+5017 まで、negative control が+4011 から+4202 までである。増幅した PCR 産物は、2%アガロースゲル電気泳動を用いて解析した。

Target	Forward primer		Reverse primer	
TATA(Tal2)	5'-	TTCTTCCTCCACTGCTCCTTG -3'	5'-	TCTCTGCCACAGCCTTTATAGGACA -3'
DR(Tal2)	5'-	CACCAAGGAACAGCAAGTGGA -3'	5'-	GGCCTTTCATAGCTGACCTT -3'
negative control	5'-	TGAGCCACCATATGGATGCTG -3'	5'-	CAACTGCAGCTGTTAGCTGTG -3'

表 4-5 ChIP で用いたプライマーの配列

2-6. 統計解析法

ルシフェラーゼアッセイの結果は、独立した実験を3回行い、平均値±標準誤差で示した。二元配置分散分析(two-way ANOVA)の後、Tukey-kramer 法により多重比較を行った。有意水準は5%未満とした。全ての検定は、Microsoft Excel for Mac 2011 およびそのアドオンソフトである StatPlus:mac LE を用いた。

第3節 結果

3-1. *Tal2* の転写調節領域の推定

atRA シグナルは RARE に結合する RAR を介して標的遺伝子の転写を制御する。*Tal2* のゲノム上を RARE のコア配列である(A/G)G(G/T)T(G/C)A を参照して探索したところ、RARE と予測される配列、DR5(*Tal2*)がイントロンに存在した。*Tal2* の転写開始点は、データベース上で既に報告されており[91]、予測された DR5(*Tal2*)のゲノム上の位置から、P19 細胞の神経分化過程における *Tal2* の転写開始点が、報告と同じであるのかという疑問が浮上した。そこで、5'-RACE 法により *Tal2* の 5'末端を決定した(図 4-2)。30 クローンの 5'末端をシーケンスにより確認したところ、29 クローンが 5'末端として報告されているグアニンよりも 4 塩基上流のアデニンを示し、1 クローンが 5 塩基上流のチミンを示した。29 クローンが同じ位置を示したので、P19 細胞の神経分化誘導における転写開始点(+1)は、このアデニンであると考えた。そして、推定された転写開始点のちょうど 30 塩基上流には基本転写因子の構成要素の 1 つである TBP が結合する領域である TATA-box と予測される配列、TATA(*Tal2*)が存在した。

P19 細胞の神経分化過程で観察される *Tal2* の発現に関与する可能性のある 2 つの調節領域、5'側上流域にある TATA(*Tal2*)およびイントロンにある DR5(*Tal2*)が予測された。そこで、TATA-box に結合する TBP および RARE に結合し atRA による *Tal2* の発現に関与する RAR α の P19 細胞の神経分化過程における発現をウエスタンブロットリング法により確認した。図 4-3 に示された通り、浮遊培養下で atRA 処理後 24 時間まで、これらの発現に変化は見られなかった。

```

          -30
    .....cccctcctgccgccagacaaagggcggtgtcctataaaggctgtggcagagaccctg
          TATA(Tal2)
    +1
    cgtccaggcgagggcgcacacagactggcgctgcgacagctaccttactgcgccgggtccc
    |
    | 29/30 clone
    | 1/30 clone
    |
    +73
    agctcctagcaagaagggtgcgttgacttaggggagtgaggagcagctaccgaggggact....
    Exon 1
  
```

図 4-2 *Tal2* の 5'側上流域の配列

P19 細胞における *Tal2* の 5'末端(矢印)を 5'-RACE 法により確認した。TATA(Tal2)(太字下線)が *Tal2* の 5'末端から 30 塩基上流に存在した。第 1 エキソンは下線によって示した。

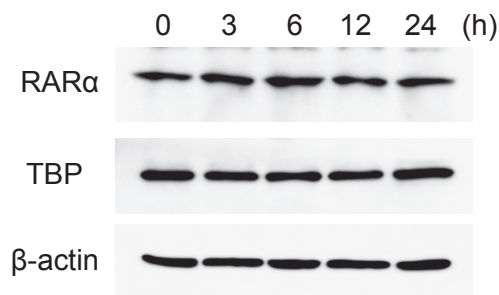


図 4-3 P19 細胞の神経分化過程における RARα および TBP の発現

浮遊培養下で 0、3、6、12、24 時間、atRA 処理した P19 細胞における RARα および TBP の発現をウェスタンブロットティングにより確認した。β-actin はコントロールとして用いた。

3-2. *Tal2* の 5'側上流域に存在する TATA(*Tal2*)の機能

P19 細胞の神経分化過程における *Tal2* の 5'側上流域の転写活性をルシフェラーゼアッセイにより調べた(図 4-4)。 *Tal2* の 5'側上流域-2093/+73、-1229/+73、-604/+73、-240/+73 のそれぞれの領域を含むレポーターベクターを作製し、P19 細胞に導入した。その後、浮遊培養下で atRA 処理もしくは DMSO 処理を行い、それぞれの細胞におけるルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、領域を含まないコントロールと比較して、全ての領域で活性が見られ、領域が短くなるほどルシフェラーゼ活性は増加した。しかし、atRA と DMSO の間に有意な差は見られなかった。このことから、atRA に応答する配列は無いことが明らかとなった。ただ、転写が活性化されたことから、基本転写因子複合体が機能していることが予測された。

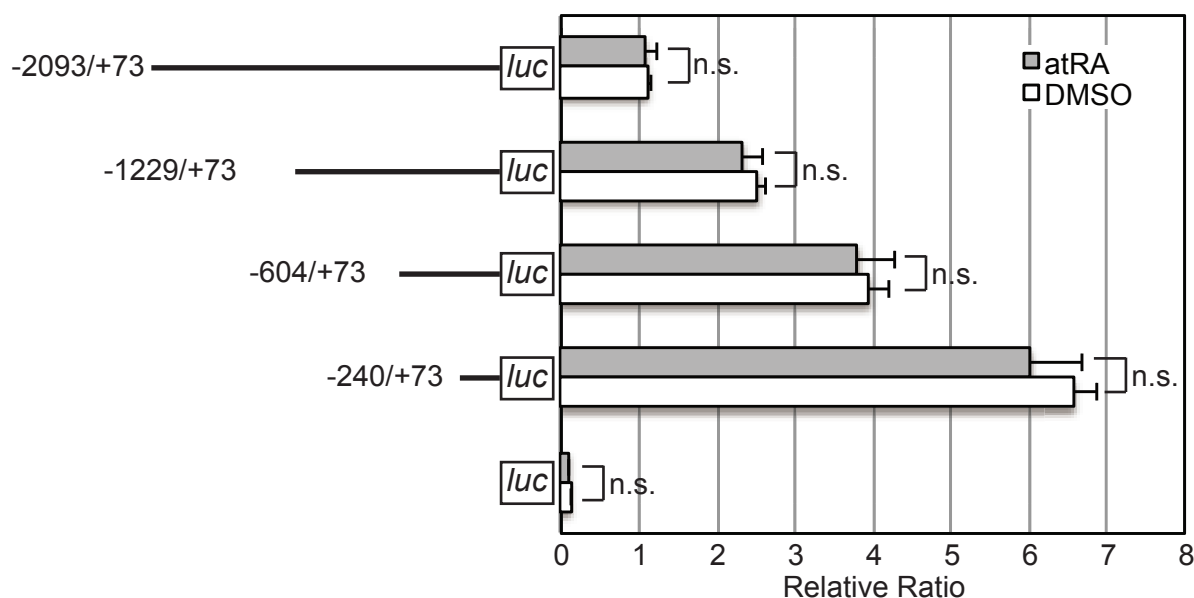


図 4-4 *Tal2* の 5'側上流域における転写活性

Tal2 の 5'側上流域、-2093/+73、-1229/+73、-604/+73、-240/+73 を含むレポーターベクターをそれぞれ P19 細胞に導入し、atRA 処理もしくは DMSO 処理した後培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。灰色のバーは atRA を、白色のバーは DMSO を示す。独立した実験を 3 回を行い、平均値±標準誤差を算出し、two-way ANOVA を行った(n.s. : non-significant)。各領域の DMSO と atRA のそれぞれの活性を比較したところ、有意な差は認められなかった。

TATA-box は転写を開始するコアプロモーターの主要な DNA 配列であり、転写開始点の 30 塩基上流付近に存在する[86]。そこで、*Tal2* の 5'側上流域-240/+73 を含むレポーターベクター (-240)、もしくは、この領域内の TATA(*Tal2*)を欠損させたレポーターベクター(-240ΔTATA)を、それぞれ P19 細胞に導入し、浮遊培養下で atRA 処理もしくは DMSO 処理を行い、20 時間後、それぞれの P19 細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。5'側上流域-240/+73 を含むレポーターベクターから TATA(*Tal2*)を欠損させたところ、atRA、DMSO のどちらの処理においても、ルシフェラーゼ活性は有意に低下した(図 4-5)。これにより、TATA(*Tal2*)が転写活性化に関与する配列であることが示唆された。

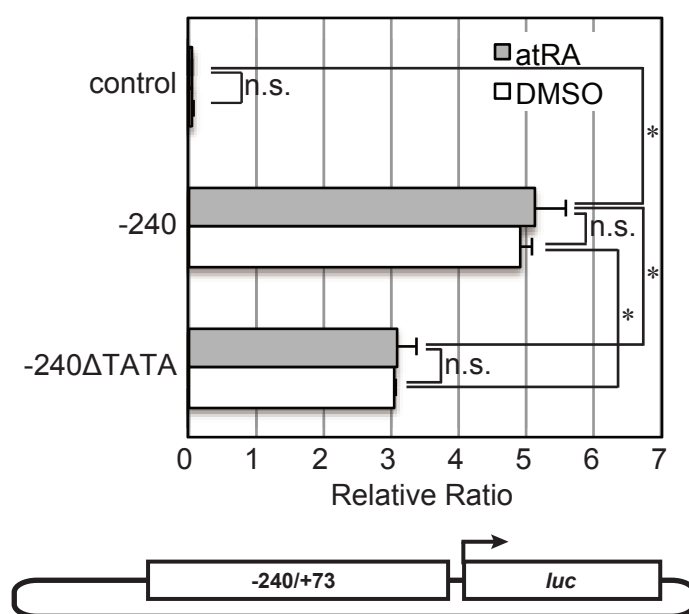


図 4-5 *Tal2* の 5'側上流域に存在する TATA(*Tal2*)の転写活性

Tal2 の 5'側上流域-240/+73 を含むレポーターベクターおよびこの領域内の TATA(*Tal2*)を欠損させたレポーターベクターを用い、atRA もしくは DMSO 処理後、ルシフェラーゼ活性を測定した。コントロールとしては *Tal2* の 5'側上流域を含まないレポーターベクターを用いた。atRA 処理した時のルシフェラーゼ活性を灰色のバーが、DMSO 処理した時のルシフェラーゼ活性を白色のバーであらわす。独立した実験を 3 回行い、平均値±標準誤差を算出した。two-way ANOVA の後、Tukey-Kramer 法により多重比較を行った(* : $p < 0.05$, n.s. : non-significant)。DMSO 処理と atRA 処理、それぞれの活性を比較したところ、有意な差は認められなかった。atRA 処理において、コントロールの活性と比較して-240 の活性は有意に増加した。また、-240 の活性と比較して-240ΔTATA の活性は有意に減少した。

そこで、*Tal2* の 5'側上流域に存在する TATA(*Tal2*)の転写活性を哺乳類細胞に適応させたツ-ハイブリッドシステム[92,93]で調べた。このシステムでは、酵母 GAL4 の DNA 結合ドメインと融合させたタンパク質と、単純ヘルペスウイルス VP16 の活性化ドメインと融合させたタンパク質が相互作用すると、細胞内のルシフェラーゼ活性が上昇する。酵母 GAL4 の DNA 結合ドメインと融合した Idタンパク質(GAL4-Id)を発現するベクターと、単純ヘルペスウイルス VP16 の活性化ドメインと融合した MyoD タンパク質(VP16-MyoD)を発現するベクターが、ポジティブコントロールとして含まれている。MyoD と Id はヘテロ二量体として相互作用するが、DNA へは結合しない。また、ルシフェラーゼを発現するレポーターベクターとしては、5 つの GAL4 結合サイトとその下流にアデノウイルスプロモーターが組み込まれたベクターを使用する。本研究では、アデノウイルスプロモーターを TATA(*Tal2*)、もしくは、変異を導入した TATA(*Tal2*)Mut に組み替えたレポーターベクターと GAL4-Id および VP16-MyoD の 2 つのタンパク質の発現ベクターを用いて、TATA(*Tal2*)の転写活性を評価した。これらのベクターを P19 細胞に共導入後、ルシフェラーゼ活性を測定した(図 4-6)。

TATA(*Tal2*) を含むレポーターベクターを導入し、GAL4-Id と VP16-MyoD の両方を発現させた P19 細胞のルシフェラーゼ活性は、他と比較して有意に増加した。続いて、TATA(*Tal2*)Mut を含むレポーターベクターを導入した P19 細胞に、GAL4-Id と VP16-MyoD の両方を発現させた時、TATA(*Tal2*)と比較して、TATA(*Tal2*)Mut のルシフェラーゼ活性は有意に減少した。これらから、導入した TATA(*Tal2*)は、アデノウイルスプロモーターの代わりに機能することが明らかとなり、コアプロモーターとして転写開始に関与することが示された。以上の結果から、P19 細胞の *Tal2* の 5'側上流域にある TATA(*Tal2*)は、コアプロモーターとして機能する配列であると考えられる。

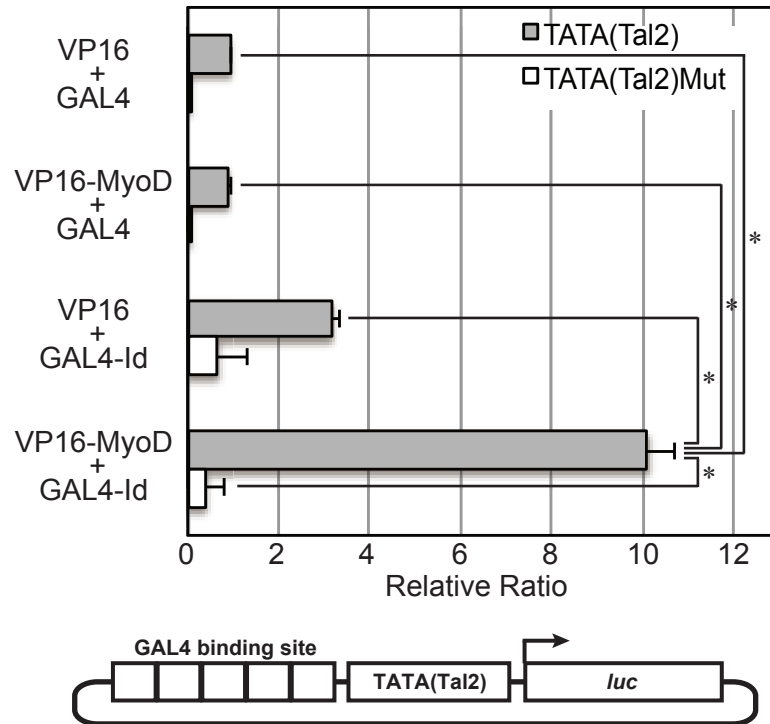


図 4-6 ツーハイブリッドシステムを利用した TATA(Tal2)の転写活性

VP16-MyoD と GAL4-Id はそれぞれ単純ヘルペスウイルス VP16 の活性化ドメインと MyoD が融合したものと酵母 GAL4 の DNA 結合ドメインと Id が融合したものを示す。これらの 2 つ発現ベクターと TATA(Tal2)もしくは TATA(Tal2)Mut を含むレポーターベクターを P19 細胞に共導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。下図は、構築したレポーターベクターの模式図。コントロールとしては、VP16、GAL4 のみを発現するベクターを使用した。TATA(Tal2) に由来するルシフェラーゼ活性は灰色のバーで、TATA(Tal2)Mut に由来するルシフェラーゼ活性は白色のバーで示す。独立した実験を 3 回行い、平均値±標準誤差を算出した。two-way ANOVA の後、Tukey-Kramer 法により多重比較を行った(* : $p < 0.05$)。TATA(Tal2)において VP16-MyoD+GAL4-Id の活性は、他の活性と比較して有意に増加し、VP16-MyoD+GAL4-Id における TATA(Tal2)の活性は、TATA(Tal2)Mut と比較して有意に増加した。

コアプロモーターに含まれる TATA-box は、TFIID の結合サブユニットである TBP によって認識され転写の活性化に参与する[89]。そこで *Tal2* の 5'側上流域に存在する TATA(*Tal2*)と TBP が結合するのかを EMSA により調べた。まず、浮遊培養下、atRA 処理後 0、3 時間の P19 細胞から核タンパク質を抽出した。Alexa680 で標識した TATA(*Tal2*)もしくは TATA(*Tal2*)Mut を含むオリゴヌクレオチドをプローブとして、P19 細胞の核タンパク質とこれらのプローブの結合を検討した(図 4-7)。

EMSA の結果、いくつかの結合が観察された。また、核タンパク質とこれら 2 種類のプローブとの結合は、異なるものが観察された。また、これらの結合は atRA 処理後 0、3 時間で変化は見られなかった(図 4-7A)。次に、atRA 処理後 3 時間の核抽出タンパク質と抗 TBP 抗体を用いたスーパーシフトアッセイを行った(図 4-7B)。その結果、TATA(*Tal2*)を含むプローブとの結合が抗 TBP 抗体の添加によって減少することが確認された(図 4-7B、左図黒色矢頭)。これは、TBP と TATA(*Tal2*)を含むプローブとの結合が TBP と抗 TBP 抗体の結合により阻害されたことを示す。また、TATA(*Tal2*)Mut では抗 TBP 抗体を加えても結合に変化はなかった。以上の結果から、TATA(*Tal2*)と TBP が結合することが示された。

次に、P19 細胞内でも同様に TATA(*Tal2*)と TBP が結合するのかを ChIP アッセイにより調べた(図 4-8)。浮遊培養下、atRA 処理 3 時間後の P19 細胞をクロスリンクし、抗 TBP 抗体により免疫沈降した。その後、精製、回収した DNA を用いて、5'側上流域の TATA(*Tal2*)を含む領域(-152/-11) をターゲットにしたプライマーで PCR を行った。Input では TATA(*Tal2*)、ネガティブコントロール領域ともに検出された。抗 TBP 抗体を用いて免疫沈降した時は、TATA(*Tal2*)のみが検出され、コントロール抗体である IgG を用いた時は両方が検出されなかった。以上の結果から、P19 細胞内において、TBP は 5'側上流域の TATA(*Tal2*)を含む-152 から-11 の間で結合することが明らかとなった。EMSA で示された TATA(*Tal2*)と TBP が結合するという結果とあわせて考えると、P19 細胞内でも、TATA(*Tal2*)に TBP は結合することが予測される。

ここまでの結果から、*Tal2* の 5'側上流域に存在する TATA(*Tal2*)は、TBP が結合し、コアプロモーターとして機能すると考えられる。

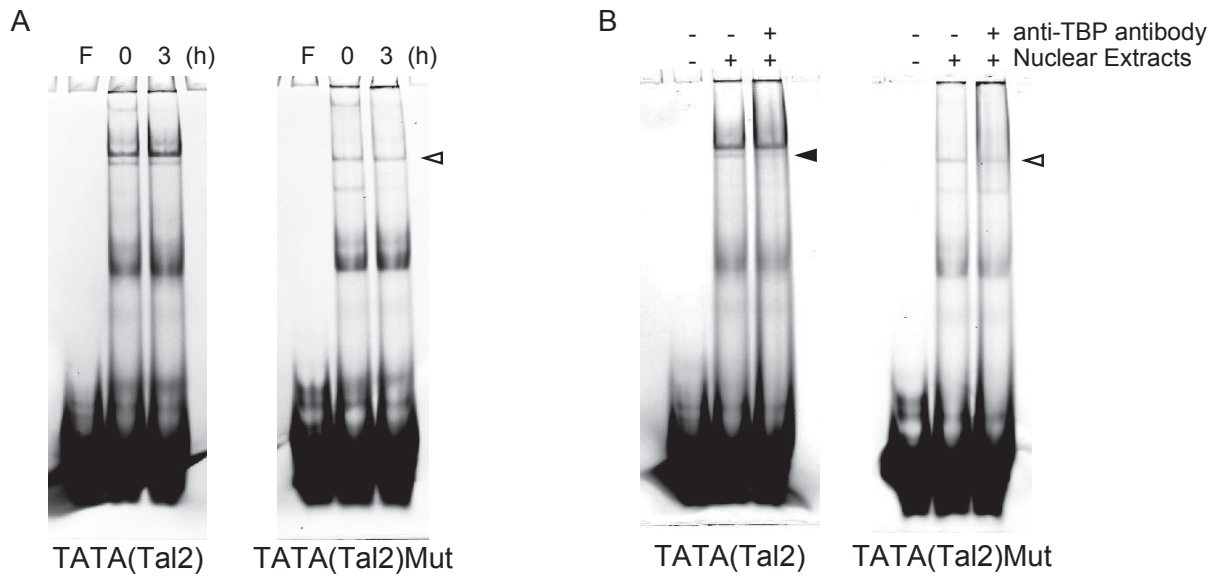


図 4-7 TATA(Tal2)と TBP の結合

A. 浮遊培養下、atRA 処理後 0、3 時間の P19 細胞から抽出した核タンパク質と、TATA(Tal2)もしくは TATA(Tal2)Mut を含む Alexa680 標識されたオリゴヌクレオチドを使用して EMSA を行った。B. 抗 TBP 抗体を用いたスーパーシフトアッセイを行った。浮遊培養下 atRA 処理後 3 時間の P19 細胞から抽出した核タンパク質を用いた。黒色矢頭は Alexa 標識オリゴヌクレオチドと TBP の結合を示す。白矢頭は非特異的結合を示す。

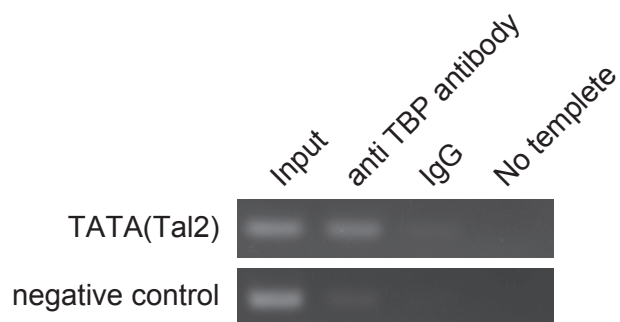


図 4-8 P19 細胞内における Tal2 の 5'側上流域と TBP の結合

P19 細胞を浮遊培養下 atRA で 3 時間処理した。その細胞を抗 TBP 抗体で免疫沈降し、共免疫沈降してきた DNA を精製した。精製した DNA を Tal2 の 5'側上流域、-152 から-11 までをターゲットとするプライマーを用いて PCR を行った。Input は免疫沈降前の全 DNA を示す。コントロール抗体として normal rabbit IgG を用いた。No template は PCR 時に精製した DNA を加えずに PCR を行ったものであり、PCR のネガティブコントロールである。

3-3. *Tal2* のイントロンに存在する DR5(*Tal2*)の機能

P19 細胞における *Tal2* は atRA によって誘導される。atRA は RAR α と結合し、RARE を介して標的遺伝子の転写を制御する。そこで、RARE のコア配列を *Tal2* 上で探索したところ、イントロンに DR5(*Tal2*)が見つかった。DR5(*Tal2*)の転写活性を調べるために、アデノウイルスプロモーターの上流の GAL4 結合サイトの代わりに、DR5(*Tal2*)もしくは変異を入れた DR5(*Tal2*)Mut を 3 回、縦列反復させた DNA 断片(DR5(*Tal2*) \times 3 もしくは DR5(*Tal2*)Mut \times 3 を組み込んだレポーターベクターを作製した。加えて、VP16 の活性化ドメインと RAR α の融合タンパク質(VP16-RARA)を発現するベクターを作製した。この VP16-RARA は atRA 無しで恒常的に転写活性化能をもつ RAR α である[94,95]。P19 細胞にこれらのベクターを共導入しルシフェラーゼ活性を測定した(図 4-9)。

VP16-RARA を発現するベクターと DR5(*Tal2*) \times 3 を含むレポーターベクターを共導入した P19 細胞では、VP16 と DR5(*Tal2*) \times 3 を共導入した P19 細胞と比較してルシフェラーゼ活性が増強された。また、VP16-RARA を導入した P19 細胞において、DR5(*Tal2*)Mut \times 3 を含むレポーターベクターのルシフェラーゼ活性は、DR5(*Tal2*) \times 3 を含むレポーターベクターと比較して有意に減少した。これらの結果から、DR5(*Tal2*)は、RARA と結合し、転写活性化に関与する配列であることが示された。

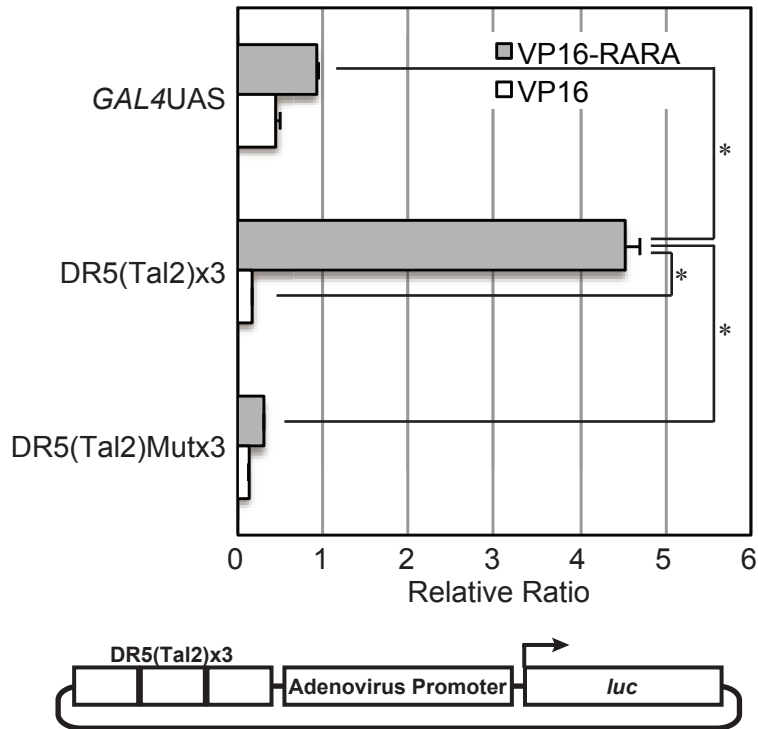


図 4-9 VP16-RARA による DR5(Tal2)の転写活性

VP16-RARA は、単純ヘルペスウイルス VP16 の活性化ドメインと RAR α の融合タンパク質を示す。P19 細胞に DR5(Tal2) \times 3、DR5(Tal2)Mut \times 3、コントロールとして GAL4 結合ドメイン(GAL4UAS)を含むレポーターベクターと VP16-RARA もしくは VP16 の発現ベクターを共導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。下図は、構築したレポーターベクターの模式図。VP16-RARA によるルシフェラーゼ活性は灰色のバーで、VP16 によるルシフェラーゼ活性は白色のバーで示す。独立した実験を 3 回行い、平均値 \pm 標準誤差を算出した。two-way ANOVA の後、Tukey-Kramer 法により多重比較を行った(* : $p < 0.05$)。DR5(Tal2) \times 3 において、VP16 の活性と比較して VP16-RARA の活性が優位に増加した。また、VP16-RARA において、DR5(Tal2) \times 3 の活性が GAL4UAS と比較して有意に増加した。さらに、DR5(Tal2)Mut \times 3 の活性は、DR5(Tal2) \times 3 の活性と比較して有意に減少した。

次に、DR5(Tal2)を介して atRA シグナルによりルシフェラーゼ遺伝子の転写が活性化されるのかを調べた(図 4-10)。P19 細胞に DR5(Tal2)×3 もしくは DR5(Tal2)Mut×3 を組み込んだレポーターベクターをそれぞれ導入し、atRA 処理もしくは DMSO 処理後にルシフェラーゼ活性を測定した。DR5(Tal2)Mut×3 を導入し atRA で処理した P19 細胞のルシフェラーゼ活性は、DMSO と比較して有意に増加した。また、この時観察された活性は、レポーターベクターを DR5(Tal2)Mut×3 に変更すると有意に減少した。

以上の結果から、P19 細胞において、*Tal2* のイントロンに存在する DR5(Tal2)は atRA シグナルに応答し、転写を活性化する配列であることが明らかとなった。

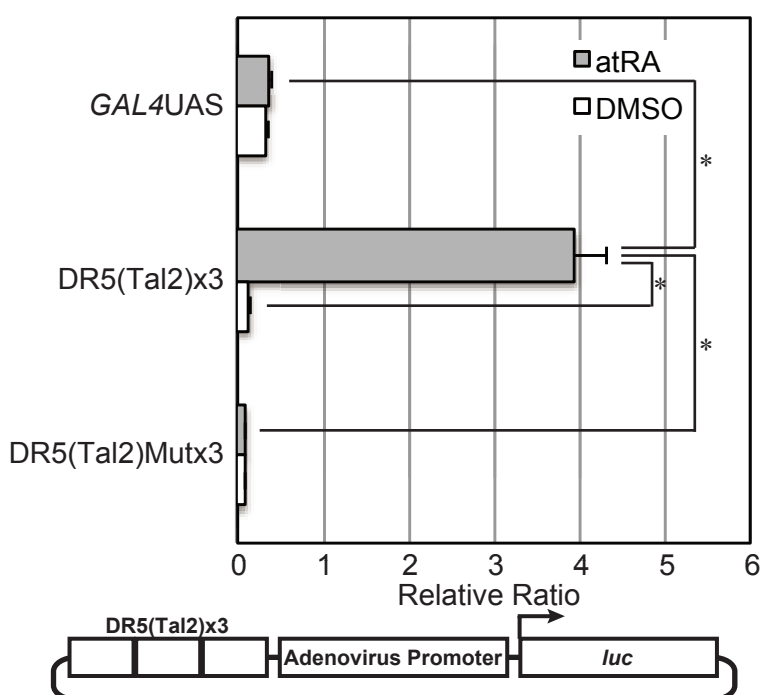


図 4-10 atRA シグナルによる DR5(Tal2)の転写活性

P19 細胞に DR5(Tal2)×3、DR5(Tal2)Mut×3 もしくはコントロールとしての GAL4 結合ドメイン (GAL4UAS)を含むレポーターベクター導入し、atRA 処理もしくは DMSO 処理後、ルシフェラーゼ活性を測定した。atRA 処理によるルシフェラーゼ活性を灰色のバーが、DMSO 処理によるルシフェラーゼ活性を白色のバーが示す。独立した実験を 3 回行い、平均値±標準誤差を算出した。two-way ANOVA の後、Tukey-Kramer 法により多重比較を行った(* : $p < 0.05$)。DR5(Tal2)×3 において、DMSO 処理と比較して atRA 処理の活性は優位に増加した。また、atRA 処理において、DR5(Tal2)×3 の活性は GAL4UAS と比較して有意に増加した。また、DR5(Tal2)Mut×3 の活性は DR5(Tal2)×3 の活性と比較して有意に減少した。

Tal2 のイントロンに存在する DR5(*Tal2*)が atRA シグナルに応答したので、次に DR5(*Tal2*)と RAR α との結合を EMSA により調べた。TATA(*Tal2*)の実験と同様に、浮遊培養下、atRA 処理した P19 細胞から atRA 処理後 0、3 時間の核タンパク質を抽出し、Alexa680 で標識した DR5(*Tal2*)もしくは DR5(*Tal2*)Mut を含むオリゴヌクレオチドと抽出した核タンパク質との結合を検討した(図 4-11)。

DR5(*Tal2*)を含む Alexa680 標識オリゴヌクレオチドを用いた時、atRA 処理後 0 時間で検出されなかった結合が atRA 処理後 3 時間で検出された(図 4-11A、黒色矢頭)。この結合は DR5(*Tal2*)Mut を含む Alexa680 標識オリゴヌクレオチドでは検出されなかった。さらに、DR5(*Tal2*)Mut では atRA 処理後 0、3 時間で核タンパク質との結合に違いがあまり認められなかった。

次に、スーパーシフトアッセイにより、DR5(*Tal2*)で見られた結合に RAR α が含まれているかを検討した。この実験には、atRA 処理後 3 時間で P19 細胞から抽出した核タンパク質と抗 RAR α 抗体を用いて行った(図 4-11B)。その結果、DR5(*Tal2*)を含む Alexa680 標識オリゴヌクレオチドで見られた結合が減少し(図 4-11B、黒色矢頭)、新しい結合が上方に確認された(図 4-11B、灰色矢頭)。また、DR5(*Tal2*)Mut では抗 RAR α 抗体を加えても、観察された結合に変化はなかった。以上の結果から、DR5(*Tal2*)と RAR α が結合することが示された。

続いて、P19細胞内における DR5(*Tal2*)と RAR α の結合を ChIP アッセイにより調べた(図 4-12)。浮遊培養下、atRA 処理 3 時間後の P19 細胞をクロスリンクし、抗 RAR α 抗体により免疫沈降した。その後、精製、回収した DNA を用いて、*Tal2* のイントロン上にある DR5(*Tal2*)を含む領域(+4799/+5017)をターゲットとしたプライマーで PCR を行った。Input では DR5(*Tal2*)、ネガティブコントロールともに検出された。抗 RAR α 抗体を用いて免疫沈降したサンプルでは、DR5(*Tal2*)のみで増幅が検出され、コントロール抗体である IgG を用いた時は両方が検出されなかった。以上の結果から、P19 細胞において、RAR α が結合する領域が、*Tal2* のイントロンにある DR5 (*Tal2*)を含む+4799 から+5017 の間に存在することが明らかとなった。これらの結果から、DR5(*Tal2*)は、P19 細胞内で RAR α と結合し、atRA シグナルに応答する配列であると考えられる。

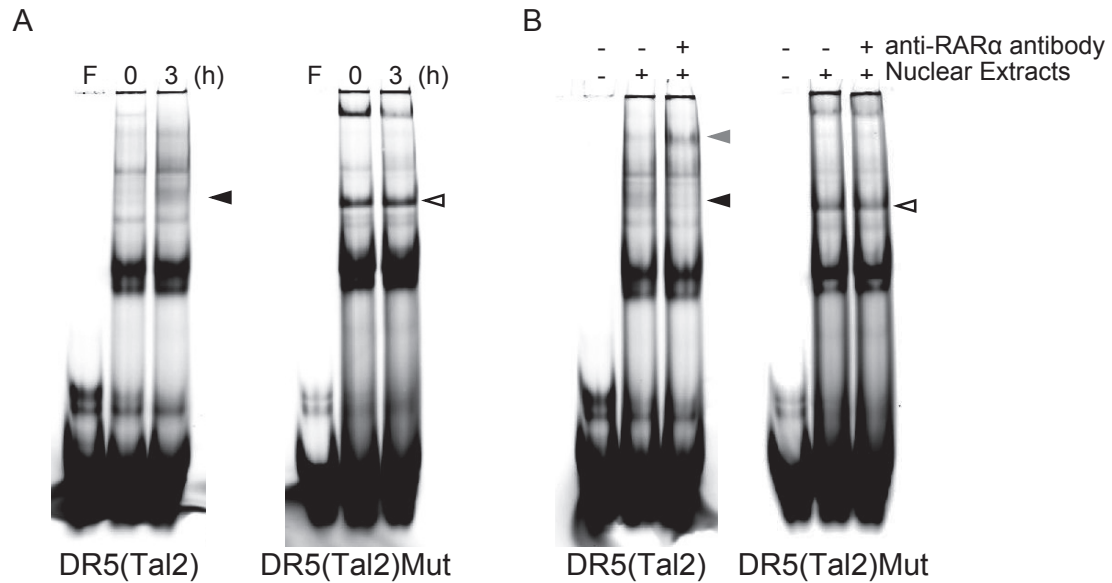


図 4-11 DR5(Tal2)と RAR α の結合

A. 浮遊培養下 atRA 処理後 0、3 時間の P19 細胞から抽出した核タンパク質と、DR5(Tal2)もしくは DR5(Tal2)Mut を含む Alexa680 標識オリゴヌクレオチドを使用して EMSA を行った。B. 抗 RAR α 抗体を用いてスーパーシフトアッセイを行った。atRA 処理後 3 時間の P19 細胞から抽出した核タンパク質を用いた。黒色矢頭は atRA 処理後 3 時間で検出された結合を示す。灰色矢頭は抗 RAR α 抗体との結合により上方で検出された結合を示す。白矢頭は非特異的結合を示す。

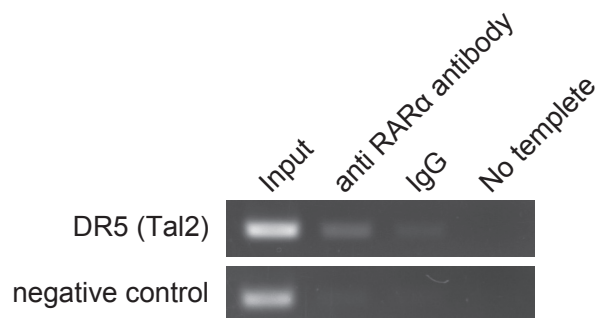


図 4-12 P19 細胞内における *Tal2* のイントロンと RAR α の結合

P19 細胞を浮遊培養下 atRA で 3 時間処理した。その後、抗 RAR α 抗体で免疫沈降し、沈降してきた DNA を精製した。精製した DNA と DR5(Tal2)を含むイントロン上の+4799 から+5017 までをターゲットとする特異的プライマーを用いて PCR で増幅した。Input は免疫沈降前の全 DNA を示す。コントロール抗体として、normal rabbit IgG を用いた。No template は PCR 時に精製した DNA を加えずに PCR を行ったものであり、PCR のネガティブコントロールである。

3-4. TATA(Tal2)とDR5(Tal2)の関連性

ここまでの研究により、*Tal2* の 5'側上流域に存在する TATA(Tal2)が TBP と結合し、コアプロモーターとして機能すること、および、イントロンに存在する DR5(Tal2)が RAR α と結合し、atRA シグナルに応答することがそれぞれ示された。これらの領域は、約 5 kb 離れているが、協調して *Tal2* の転写に関与することが推測される。そこで、これら 2 つの領域が関連するのか、ChIP アッセイを利用して検討した(図 4-13)。これまでと同様に、浮遊培養下で atRA 処理後 0、3 時間の P19 細胞を用いて、抗 TBP 抗体もしくは抗 RAR α 抗体それぞれで免疫沈降を行った。その後、精製、回収した DNA を用いて、抗 TBP 抗体で免疫沈降した DNA は DR5(Tal2)を含む領域(+4799/+5017)をターゲットとしたプライマーで、抗 RAR α 抗体で免疫沈降した DNA は TATA(Tal2)を含む領域(-152/-11) をターゲットにしたプライマーでそれぞれ PCR を行った。

すべてのサンプルで Input の増幅が確認された。atRA 処理後 0 時間の P19 細胞を用いたサンプルでは増幅はほとんど確認されなかった。また、atRA 処理後 3 時間の P19 細胞を用いたサンプルでは、それぞれの抗体により免疫沈降したもので増幅が確認されたが、コントロール抗体である normal rabbit IgG を用いたものでは増幅はほとんど見られなかった。これらの結果から、DR5(Tal2)と TBP および TATA(Tal2)と RAR α がそれぞれ相互作用することが示唆され、この二つの領域は、これらのタンパク質を介して、協調的に *Tal2* の転写に関与すると考えられる。

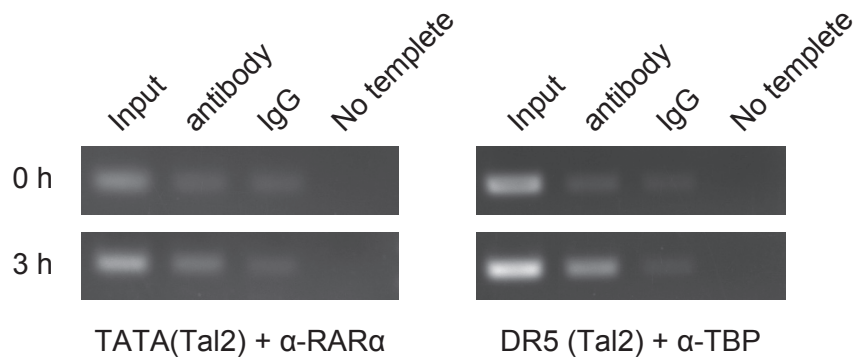


図 4-13 TATA(Tal2)と DR5(Tal2)の相互作用

P19 細胞を浮遊培養下 atRA で 0、3 時間処理した。その細胞を抗 RAR α 抗体もしくは抗 TBP 抗体で免疫沈降し、沈降してきた DNA を精製した。抗 RAR α 抗体で免疫沈降させた DNA は *Tal2* の 5'側上流域、-152 から-11 までをターゲットとするプライマーを、抗 TBP 抗体で免疫沈降させた DNA は *Tal2* のイントロン、+4799 から+5017 までをターゲットとするプライマーを用いて PCR で増幅した。それぞれのサンプルは TATA(Tal2)+ α -RAR α および DR5(Tal2)+ α -TBP で示す。Input は免疫沈降前の全 DNA を示す。コントロール抗体として、normal rabbit IgG を用いた。No template は PCR 時に精製した DNA を加えずに PCR を行ったものであり、PCR のネガティブコントロールである。

第4節 考察

P19細胞の神経分化は atRA と浮遊培養によって誘導される。この過程で観察される *Tal2* の発現が atRA-RAR α によって誘導されることが明らかとなった。そこで次に、atRA-RAR α による *Tal2* の転写調節メカニズムを調べた。

atRA シグナルは、RAR α が結合するゲノム上の特異的な配列である RARE を介して、転写を活性化する。そこで、*Tal2* の転写調節に関わる領域を、RARE のコアモチーフである (A/G)G(G/T)T(G/C)A を参照して探索し、イントロンに RARE 様配列、DR5(*Tal2*)を見つけた。*Tal2* は第2エクソンにアミノ酸翻訳領域があり、転写開始点はデータベースにすでに登録されている。DR5(*Tal2*)がイントロンにあったことから、P19細胞で atRA-RAR α によって誘導される *Tal2* の転写開始点がデータベースと異なっている可能性を考えた。しかし、調べた結果、報告されている開始点の4塩基上流のアデニンから始まることが明らかとなり(図4-2)、大きく異なることは無かった。その開始点のちょうど30塩基上流には、TATA-box 様配列、TATA(*Tal2*)が存在した。RAR の結合サイトが転写開始点より下流に存在する遺伝子に関する報告[48,96]もあり、*Tal2* の転写は、5'側上流域にある TATA(*Tal2*)と *Tal2* のイントロンにある DR5(*Tal2*)により協調的に制御されると予測した。

転写の開始には、基本転写因子を必要とする。TFIID は基本転写因子の1つであり、TBP と TBP-associated factors で構成され、コアプロモーターの認識を司る[87,88]。脊椎動物では TATA-box のようなはっきりしたシグナルを含むコアプロモーターと、CpG アイランドで見られるいくつかの開始点をもつコアプロモーターが存在し、TATA-box を含むものは少数派であることが知られている[87,89]。本研究により、*Tal2* の5'側上流域に存在する TATA(*Tal2*)は、転写開始に関与できる配列であり(図4-5、4-6)、TBP と結合することが示された(図4-7)。また、P19細胞内で、*Tal2* の5'側上流域(-152/-11)に TBP が結合することも示された(図4-8)。この領域には TATA(*Tal2*)が含まれている。以上の結果から、P19細胞の神経分化過程において、*Tal2* は5'側上流域に存在する TATA(*Tal2*)を介して転写が開始される、TATA-box 依存的な転写制御を受けると考えられる。

RARE は atRA シグナルに応答し、そのレセプターである RAR が結合するサイトである。(A/G)G(G/T)T(G/C)A の6塩基が数塩基～十数塩基のランダムな配列を挟んで直列に2つ並んだダイレクトリピートがコンセンサス配列である[43,46]。*Tal2* のゲノム、上流下流それぞれ10 kbp の範囲を探索したが、イントロンに存在する DR5(*Tal2*)以外にダイレクトリピートは見つからなかつ

た。さらに、本研究において、DR5(Tal2)は、atRA シグナルに応答する配列であることが明らかとなった(図 4-9、4-10)。また、DR5(Tal2)は RAR α との結合は、P19 細胞内においても観察された(図 4-11、4-12)。これらの結果から、P19 細胞の神経分化過程において誘導される *Tal2* は、イントロンにある DR5(Tal2)が atRA シグナルに応答することにより転写が活性化されると考えられる。

ここまでの結果から、atRA によって誘導される *Tal2* の転写は、約 5 kb 離れている TATA(Tal2)と DR5(Tal2)が、協調的に活性化すると推測される。そこで、TATA(Tal2)と DR5(Tal2)との関連性を ChIP アッセイにより調べた(図 4-13)。その結果、RAR α と TATA(Tal2)および TBP と DR5(Tal2)の相互作用を示すデータが得られた。このことから、この 2 つの領域は、RAR α および TBP を介して、協調的に *Tal2* の転写を活性化することが示唆された。RARE が転写開始点より下流に存在する報告はいくつか存在しており[48,96]、現在、*Tal2* の転写は図 4-14 のような複合体を形成して始まると考えている。atRA-RAR α による標的遺伝子の転写活性化では、RAR α と結合したコファクターが介在して TBP を含む基本転写因子複合体に atRA シグナルを伝える[34]。ゲノム上の離れた位置に存在するこれら 2 つの領域の相互作用をより明確にするために、現在、*Tal2* の転写に関連するコファクターの研究を進めている。

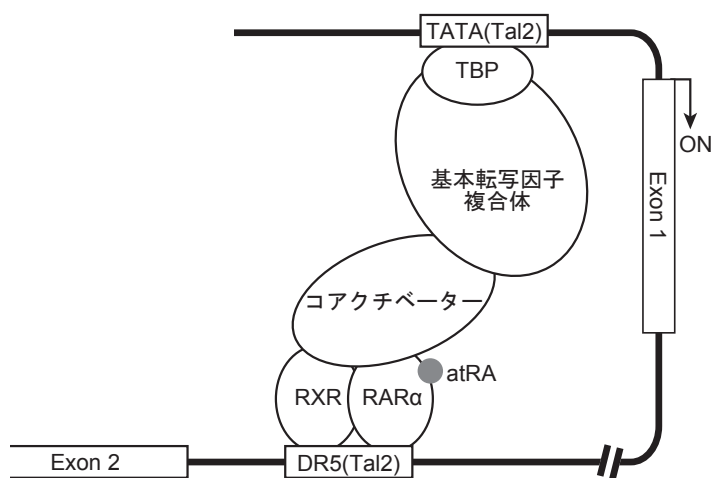


図 4-14 *Tal2* の転写活性化機構の予想図

TATA(Tal2)と DR(Tal2)は RAR α 、コアクチベーター、TBP 等を介して、相互作用し *Tal2* の転写を活性化すると予測している。

第 5 章 総括

幹細胞を神経細胞へと正確に分化させるためには、各分化段階での分子の働きを解明し、その複雑なネットワークの理解を深めることが望ましい。そのために、本研究では、神経分化の始まり、胚から神経細胞への運命決定に関与する因子を探索し、その機能を明らかにすることを目指している。マウスの EC 細胞株である P19 細胞は atRA と浮遊培養により神経分化を誘導できる細胞であり[1,4-6]、神経分化研究に多用される培養細胞である。そこで、P19 細胞の神経分化過程を用いて、マイクロアレイ解析により遺伝子を網羅的に調べ、神経分化との関連性の報告の少ない遺伝子で、発現の変動が大きかった遺伝子の中から *Csn3* と *Tal2* の 2 つに着目した。

ノックアウトマウスの解析から、*Csn3* と *Tal2* は胎生致死を引き起こす遺伝子では無いことが明らかとなっている[54,55,71]。*Csn3* ノックアウトマウスにおいて、脳に関する報告が無いことから[71]、*Csn3* は発現後、分子シャペロンとして神経分化をスムーズに進行するための補助的な役割を担うのではないかと予想している。ウシのミルクに含まれる CSN3 は、内在性のヒートショックプロテインや細胞外に分布するクラスタリンのように、ミルク中で分子シャペロンとして機能することが報告されている[58]。クラスタリンは分泌型糖タンパク質であり、シャペロン様活性をもつ[97]。クラスタリンは神経分化において重要なモジュレーターとして機能すると報告されており[60]、また、 β -アミロイド凝集を阻害するとの報告がある[98,99]。これらの所見と神経分化過程における発現から、CSN3 は神経分化過程の胚から神経への運命が決定される時期に、分子シャペロンとして機能し、神経分化のモジュレーターとして活動するかもしれないと予測している。

一方、*Tal2* ノックアウトマウスは、生まれるがその後、脳に異常が見られ、全てのマウスが死亡した[55]。この所見から、*Tal2* は脳の正常な発達に必要な遺伝子であると考えられる。胚発生過程で *Tal2* は発現するが、成体の脳では発現が無いこと[54]が、本研究においても確認された。このことから、*Tal2* は、胚発生過程において機能すると予測される。従って、*Tal2* は、発現の時期と影響の現れる時期にタイムラグのある、とても興味深い遺伝子である。近年、ゼブラフィッシュにおいて、*Tal2* が脊椎のフロアープレートに発現していることが示された[100]。フロアープレートは、神経管腹側における神経細胞やグリア細胞の分化や軸索伸長の制御に重要な役割を果たしており、ゼブラフィッシュの *Tal2* は、フロアープレートの KA⁺細胞において *gad67* の上流で働いていることが明らかとなった[101]。また、最近、マウスの中脳の発達過程における GABA 作動性ニューロンの決定に関与すると報告された[102]。しかし、マウスの脊椎では *Tal2* の発現は確認されておらず、また、中脳発達過程における転写因子 TAL2の標的遺伝子は不明であり、発生過程における

TAL2 の機能解明には更なる研究が必要とされている。

Csn3 と *Tal2* は、P19 細胞の神経分化誘導後、3 時間で発現が観察され、atRA およびそのレセプターの 1 つである RAR α により誘導されることが本研究から明らかになった。atRA は P19 細胞の神経分化誘導において重要なシグナル分子であり、胚発生や神経細胞への運命決定でも重要な役割を果たしていると考えられている[22,27]。以上のことから、P19 細胞の神経分化の初期に atRA により転写制御を受ける *Csn3* と *Tal2* は共に、胚から神経への運命決定に関わる可能性のある遺伝子であることが本研究によって示された。しかし、P19 細胞の神経分化過程において、*Csn3* と *Tal2* の減少するタイミングは異なっており、*Csn3* が 24 時間まで発現が持続したのに対し、*Tal2* は 24 時間後にはほぼ発現が検出されなくなった。胚発生過程では *Csn3* の発現は 17 日目に観察され、*Tal2* の発現は 11 日目に観察された。また、本研究において、*Csn3* と *Tal2* の RARE の位置が異なることも明らかとなった。*Csn3* の RARE は 5'側上流域にあり、*Tal2* の RARE はイントロンに存在した。この RARE の位置の違いで、P19 細胞の神経分化過程における *Csn3* と *Tal2* の発現のタイムラグを説明することは難しい。ただ、同様に atRA-RAR α による制御を受けている *Csn3* と *Tal2* で、消失のタイミングが異なるのは興味深い事象であり、その機能を解明するヒントとなるかもしれない。*Csn3* と *Tal2* の抑制される機構の違いを明らかにするためには、*Csn3* と *Tal2* それぞれについて、関与する atRA-RAR α のコファクターや RARE 近傍のエピジェネティックな変化を調べる必要があるとあり、現在、転写機構の詳細な解明を目指し研究を進めている。

また、神経分化における *Csn3* と *Tal2* の働きを理解するためには、タンパク質レベルでの解析が必要である。TAL2 は転写因子であり、機能を理解するにはターゲット遺伝子の同定が必須となる。現在、マイクロアレイや ChIP-seq を用いた網羅的遺伝子解析により TAL2 のターゲット探索することを計画中である。CSN3 に関しては、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患の原因物質と言われているタンパク質に作用して、分子シャペロン活性により、これらの凝集の予防や解除ができないかと考えている。ミルクに含まれている *Csn3* にこのような効果が見られるならば、神経変性疾患の予防や治療への応用が期待できる。現在、ヒトの CSN3 のリコンビナントタンパク質を大腸菌で作製し、タンパク質凝集阻害作用を検討している。

P19 細胞の神経分化過程の網羅的解析により、*Csn3* と *Tal2* と同様に、胚から神経への運命を決定する時期に発現が変動し、神経分化と関連する報告の少ない遺伝子がいくつかみついている。これらの遺伝子を 1 つずつ解析していくことは大変な労力である。ただ、幹細胞の神経分化をより正確に進行させるためには、必要な作業であり、本研究で得られる知見は、神経分化にお

ける分子自身の働きやその分子間ネットワークへの理解を深め、再生医療への分化研究の応用に有益なものになると考えている。

参考文献

- [1] M.W. McBurney, P19 embryonal carcinoma cells., *Int. J. Dev. Biol.* 37 (1993) 135–40.
- [2] M.W. McBurney, B.J. Rogers, Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns., *Dev. Biol.* 89 (1982) 503–8.
- [3] E.M. Jones-Villeneuve, M.W. McBurney, K. a Rogers, V.I. Kalnins, Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells., *J. Cell Biol.* 94 (1982) 253–62.
- [4] E.M. Jones-Villeneuve, M. a Rudnicki, J.F. Harris, M.W. McBurney, Retinoic acid-induced neural differentiation of embryonal carcinoma cells., *Mol. Cell. Biol.* 3 (1983) 2271–9.
- [5] M.W. McBurney, E.M. Jones-Villeneuve, M.K. Edwards, P.J. Anderson, Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line., *Nature.* 299 (1982) 165–7.
- [6] G. Bain, W.J. Ray, M. Yao, D.I. Gottlieb, From embryonal carcinoma cells to neurons: the P19 pathway., *Bioessays.* 16 (1994) 343–8.
- [7] R.J. Mullen, C.R. Buck, a M. Smith, NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates., *Development.* 116 (1992) 201–11.
- [8] J.N. Reynolds, A. Prasad, L.L. Gillespie, G.D. Paterno, Developmental expression of functional GABAA receptors containing the gamma 2 subunit in neurons derived from embryonal carcinoma (P19) cells., *Brain Res. Mol. Brain Res.* 35 (1996) 11–8.
- [9] a H.M.K. Alam, H. Suzuki, T. Tsukahara, Expression analysis of Fgf8a & Fgf8b in early stage of P19 cells during neural differentiation., *Cell Biol. Int.* 33 (2009) 1032–7.
- [10] A. Voronova, A. Fischer, T. Ryan, A. Al Madhoun, I.S. Skerjanc, *Ascl1/Mash1* is a novel target of *Gli2* during *Gli2*-induced neurogenesis in P19 EC cells., *PLoS One.* 6 (2011) e19174.
- [11] C. Wang, C. Xia, W. Bian, L. Liu, W. Lin, Y. Chen, et al., Cell aggregation-induced FGF8 elevation is essential for P19 cell neural differentiation., *Mol. Biol. Cell.* 17 (2006) 3075–84.
- [12] M.F. Finley, N. Kulkarni, J.E. Huettner, Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells., *J. Neurosci.* 16 (1996) 1056–65.

- [13] R. St-Arnaud, J.M. Moir, Wnt-1-inducing factor-1: a novel G/C box-binding transcription factor regulating the expression of Wnt-1 during neuroectodermal differentiation., *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993) 1590–8.
- [14] L.J. Jonk, M.E. de Jonge, J.M. Vervaart, S. Wissink, W. Kruijer, Isolation and developmental expression of retinoic-acid-induced genes., *Dev. Biol.* 161 (1994) 604–14.
- [15] K. Tang, J. Yang, X. Gao, C. Wang, L. Liu, H. Kitani, et al., Wnt-1 promotes neuronal differentiation and inhibits gliogenesis in P19 cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293 (2002) 167–73.
- [16] J. Nishino, K. Yamashita, H. Hashiguchi, H. Fujii, T. Shimazaki, H. Hamada, Meteorin: a secreted protein that regulates glial cell differentiation and promotes axonal extension., *EMBO J.* 23 (2004) 1998–2008.
- [17] X.-T. Jing, H.-T. Wu, Y. Wu, X. Ma, S.-H. Liu, Y.-R. Wu, et al., DIXDC1 promotes retinoic acid-induced neuronal differentiation and inhibits gliogenesis in P19 cells., *Cell. Mol. Neurobiol.* 29 (2009) 55–67.
- [18] D.J. Morassutti, W. a Staines, D.S. Magnuson, K.C. Marshall, M.W. McBurney, Murine embryonal carcinoma-derived neurons survive and mature following transplantation into adult rat striatum., *Neuroscience.* 58 (1994) 753–63.
- [19] H. Ulrich, P. Majumder, Neurotransmitter receptor expression and activity during neuronal differentiation of embryonal carcinoma and stem cells: from basic research towards clinical applications., *Cell Prolif.* 39 (2006) 281–300.
- [20] Z. Houdek, J. Cendelín, V. Kulda, V. Babuška, F. Vožeh, J. Hatina, et al., Comparison of P19-derived neuroprogenitor and naive cell survival after intracerebellar application into B6CBA mice., *Folia Biol. (Praha).* 57 (2011) 162–9.
- [21] M. Maden, N. Holder, Retinoic acid and development of the central nervous system., *Bioessays.* 14 (1992) 431–8.
- [22] M. Maden, Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system., *Nat. Rev. Neurosci.* 8 (2007) 755–65.
- [23] M. Rhinn, P. Dollé, Retinoic acid signalling during development., *Development.* 139 (2012) 843–58.

- [24] S. a Ross, P.J. McCaffery, U.C. Drager, L.M. De Luca, Retinoids in embryonal development., *Physiol. Rev.* 80 (2000) 1021–54.
- [25] Y. Chen, D.H. Reese, The retinol signaling pathway in mouse pluripotent P19 cells., *J. Cell. Biochem.* 112 (2011) 2865–72.
- [26] S. Castro-Obregón, L. Covarrubias, Role of retinoic acid and oxidative stress in embryonic stem cell death and neuronal differentiation., *FEBS Lett.* 381 (1996) 93–7.
- [27] L.M. De Luca, Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia., *FASEB J.* 5 (1991) 2924–33.
- [28] a Fraichard, O. Chassande, G. Bilbaut, C. Dehay, P. Savatier, J. Samarut, In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons., *J. Cell Sci.* 108 (Pt 1 (1995) 3181–8.
- [29] J. Pacherník, V. Bryja, M. Esner, L. Kubala, P. Dvorák, A. Hampl, Neural differentiation of pluripotent mouse embryonal carcinoma cells by retinoic acid: inhibitory effect of serum., *Physiol. Res.* 54 (2005) 115–22.
- [30] J. Lu, L. Tan, P. Li, H. Gao, B. Fang, S. Ye, et al., All-trans retinoic acid promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells via multiple pathways., *BMC Cell Biol.* 10 (2009) 57.
- [31] P. Chambon, A decade of molecular biology of retinoic acid receptors., *FASEB J.* 10 (1996) 940–54.
- [32] J.E. Balmer, R. Blomhoff, Gene expression regulation by retinoic acid., *J. Lipid Res.* 43 (2002) 1773–808.
- [33] Z. Al Tanoury, A. Piskunov, C. Rochette-Egly, Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects., *J. Lipid Res.* 54 (2013) 1761–75.
- [34] N.J. McKenna, B.W. O'Malley, Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators., *Cell.* 108 (2002) 465–74.
- [35] D. Cotnoir-White, D. Laperrière, S. Mader, Evolution of the repertoire of nuclear receptor binding sites in genomes., *Mol. Cell. Endocrinol.* 334 (2011) 76–82.
- [36] P. Dollé, Developmental expression of retinoic acid receptors (RARs)., *Nucl. Recept. Signal.* 7 (2009) e006.

- [37] D.J. Mangelsdorf, U. Borgmeyer, R. a Heyman, J.Y. Zhou, E.S. Ong, a E. Oro, et al., Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid., *Genes Dev.* 6 (1992) 329–44.
- [38] X.K. Zhang, J. Lehmann, B. Hoffmann, M.I. Dawson, J. Cameron, G. Graupner, et al., Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid., *Nature.* 358 (1992) 587–91.
- [39] D.J. Mangelsdorf, R.M. Evans, The RXR heterodimers and orphan receptors., *Cell.* 83 (1995) 841–50.
- [40] B. Lin, G.Q. Chen, D. Xiao, S.K. Kolluri, X. Cao, H. Su, et al., Orphan receptor COUP-TF is required for induction of retinoic acid receptor beta, growth inhibition, and apoptosis by retinoic acid in cancer cells., *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 957–70.
- [41] P. Lefebvre, P.J. Martin, S. Flajollet, S. Dedieu, X. Billaut, B. Lefebvre, Transcriptional activities of retinoic acid receptors., *Vitam. Horm.* 70 (2005) 199–264.
- [42] J. Bastien, C. Rochette-Egly, Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes., *Gene.* 328 (2004) 1–16.
- [43] E. Moutier, T. Ye, M.-A. Choukrallah, S. Urban, J. Osz, A. Chatagnon, et al., Retinoic acid receptors recognize the mouse genome through binding elements with diverse spacing and topology., *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 26328–41.
- [44] T. Perlmann, P.N. Rangarajan, K. Umesono, R.M. Evans, Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs., *Genes Dev.* 7 (1993) 1411–22.
- [45] D. Laperriere, T.-T. Wang, J.H. White, S. Mader, Widespread Alu repeat-driven expansion of consensus DR2 retinoic acid response elements during primate evolution., *BMC Genomics.* 8 (2007) 23.
- [46] S. Lalevée, Y.N. Anno, A. Chatagnon, E. Samarut, O. Poch, V. Laudet, et al., Genome-wide in silico identification of new conserved and functional retinoic acid receptor response elements (direct repeats separated by 5 bp)., *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 33322–34.
- [47] J.D. Chen, K. Umesono, R.M. Evans, SMRT isoforms mediate repression and anti-repression of nuclear receptor heterodimers., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 7567–71.

- [48] R.F. Gillespie, L.J. Gudas, Retinoid regulated association of transcriptional co-regulators and the polycomb group protein SUZ12 with the retinoic acid response elements of Hoxa1, RARbeta(2), and Cyp26A1 in F9 embryonal carcinoma cells., *J. Mol. Biol.* 372 (2007) 298–316.
- [49] H. Hohjoh, T. Fukushima, Marked change in microRNA expression during neuronal differentiation of human teratocarcinoma NTera2D1 and mouse embryonal carcinoma P19 cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362 (2007) 360–7.
- [50] M. Endo, M. a Antonyak, R. a Cerione, Cdc42-mTOR signaling pathway controls Hes5 and Pax6 expression in retinoic acid-dependent neural differentiation., *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 5107–18.
- [51] F. Itoh, T. Nakane, S. Chiba, Gene expression of MASH-1, MATH-1, neuroD and NSCL-2, basic helix-loop-helix proteins, during neural differentiation in P19 embryonal carcinoma cells., *Tohoku J. Exp. Med.* 182 (1997) 327–36.
- [52] D.F. Waugh, P.H. von Hippel, κ -Casein and the Stabilization of Casein Micelles, *J. Am. Chem. Soc.* 78 (1956) 4576–4582.
- [53] a Comin, M. Cassandro, S. Chessa, M. Ojala, R. Dal Zotto, M. De Marchi, et al., Effects of composite beta- and kappa-casein genotypes on milk coagulation, quality, and yield traits in Italian Holstein cows., *J. Dairy Sci.* 91 (2008) 4022–7.
- [54] S. Mori, S. Sugawara, T. Kikuchi, M. Tanji, O. Narumi, A. Stoykova, et al., The leukemic oncogene tal-2 is expressed in the developing mouse brain., *Mol. Brain Res.* 64 (1999) 199–210.
- [55] K. Bucher, M. V Sofroniew, R. Pannell, H. Impey, a J. Smith, E.M. Torres, et al., The T cell oncogene Tal2 is necessary for normal development of the mouse brain., *Dev. Biol.* 227 (2000) 533–44.
- [56] V. Calabrese, G. Scapagnini, A. Ravagna, A.M. Giuffrida Stella, D.A. Butterfield, Molecular chaperones and their roles in neural cell differentiation., *Dev. Neurosci.* 24 (2002) 1–13.
- [57] O. Iosefson, S. Sharon, P. Goloubinoff, A. Azem, Reactivation of protein aggregates by mortalin and Tid1--the human mitochondrial Hsp70 chaperone system., *Cell Stress Chaperones.* 17 (2012) 57–66.

- [58] P.E. Morgan, T.M. Treweek, R.A. Lindner, W.E. Price, J.A. Carver, Casein proteins as molecular chaperones., *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 2670–83.
- [59] P. Bouillet, M. Oulad-Abdelghani, S. Vicaire, J.M. Garnier, B. Schuhbaur, P. Dollé, et al., Efficient cloning of cDNAs of retinoic acid-responsive genes in P19 embryonal carcinoma cells and characterization of a novel mouse gene, *Stra1* (mouse LERK-2/Eplg2)., *Dev. Biol.* 170 (1995) 420–33.
- [60] S.-W. Kang, Y.-J. Shin, Y.-J. Shim, S.-Y. Jeong, I.-S. Park, B.-H. Min, Clusterin interacts with SCLIP (SCG10-like protein) and promotes neurite outgrowth of PC12 cells., *Exp. Cell Res.* 309 (2005) 305–15.
- [61] X. Gao, W. Bian, J. Yang, K. Tang, H. Kitani, T. Atsumi, et al., A role of N-cadherin in neuronal differentiation of embryonic carcinoma P19 cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284 (2001) 1098–103.
- [62] S. Nuka, N. Sawada, K. Iba, H. Chiba, S. Ishii, M. Mori, All-trans retinoic acid inhibits dexamethasone-induced ALP activity and mineralization in human osteoblastic cell line SV HFO., *Cell Struct. Funct.* 22 (1997) 27–32.
- [63] B. Zheng, M. Han, M. Bernier, X. Zhang, F. Meng, S. Miao, et al., Krüppel-like factor 4 inhibits proliferation by platelet-derived growth factor receptor beta-mediated, not by retinoic acid receptor alpha-mediated, phosphatidylinositol 3-kinase and ERK signaling in vascular smooth muscle cells., *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 22773–85.
- [64] F. Piu, N.K. Gauthier, R. Olsson, E. a Currier, B.W. Lund, G.E. Croston, et al., Identification of novel subtype selective RAR agonists., *Biochem. Pharmacol.* 71 (2005) 156–62.
- [65] J.D. Dignam, R.M. Lebovitz, R.G. Roeder, Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei., *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 1475–89.
- [66] P. Germain, P. Chambon, G. Eichele, R.M. Evans, M. a Lazar, M. Leid, et al., International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors., *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 712–25.
- [67] P. Germain, B. Staels, C. Dacquet, M. Spedding, V. Laudet, Overview of nomenclature of nuclear receptors., *Pharmacol. Rev.* 58 (2006) 685–704.

- [68] M.A. Pratt, J. Kralova, M.W. McBurney, A dominant negative mutation of the alpha retinoic acid receptor gene in a retinoic acid-nonresponsive embryonal carcinoma cell., *Mol. Cell Biol.* 10 (1990) 6445–53.
- [69] F.A. Kruyt, C.E. van den Brink, L.H. Defize, M.J. Donath, P. Kastner, W. Kruijer, et al., Transcriptional regulation of retinoic acid receptor beta in retinoic acid-sensitive and -resistant P19 embryocarcinoma cells., *Mech. Dev.* 33 (1991) 171–8.
- [70] Y. Shang, C.R. Baumrucker, M.H. Green, Signal relay by retinoic acid receptors alpha and beta in the retinoic acid-induced expression of insulin-like growth factor-binding protein-3 in breast cancer cells., *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 18005–10.
- [71] P.C. Shekar, S. Goel, S.D.S. Rani, D.P. Sarathi, J.L. Alex, S. Singh, et al., Kappa-Casein-Deficient Mice Fail To Lactate., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 8000–5.
- [72] R. Kageyama, T. Ohtsuka, J. Hatakeyama, R. Ohsawa, Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation., *Exp. Cell Res.* 306 (2005) 343–8.
- [73] J. Li, Q. Liu, M. Qiu, Y. Pan, Y. Li, T. Shi, Identification and analysis of the mouse basic/Helix-Loop-Helix transcription factor family., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350 (2006) 648–56.
- [74] Y. Xia, L. Brown, C.Y. Yang, J.T. Tsan, M.J. Siciliano, R. Espinosa, et al., TAL2, a helix-loop-helix gene activated by the (7;9)(q34;q32) translocation in human T-cell leukemia., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 11416–20.
- [75] S.D. Smith, R. Morgan, R. Gemmell, M.D. Amylon, M.P. Link, C. Linker, et al., Clinical and biologic characterization of T-cell neoplasias with rearrangements of chromosome 7 band q34., *Blood.* 71 (1988) 395–402.
- [76] B. Tycko, T.C. Reynolds, S.D. Smith, J. Sklar, Consistent breakage between consensus recombinase heptamers of chromosome 9 DNA in a recurrent chromosomal translocation of human T cell leukemia., *J. Exp. Med.* 169 (1989) 369–77.
- [77] R. Marculescu, K. Vanura, T. Le, P. Simon, U. Jäger, B. Nadel, Distinct t(7;9)(q34;q32) breakpoints in healthy individuals and individuals with T-ALL., *Nat. Genet.* 33 (2003) 342–4.

- [78] N.L. Guo, Y.-W. Wan, K. Tosun, H. Lin, Z. Msiska, D.C. Flynn, et al., Confirmation of gene expression-based prediction of survival in non-small cell lung cancer., *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 8213–20.
- [79] H. Zhu, J.J. Yu, Gene expression patterns in the histopathological classification of epithelial ovarian cancer., *Exp. Ther. Med.* 1 (2010) 187–192.
- [80] Y. Guo, P. Fu, H. Zhu, E. Reed, S.C. Remick, W. Petros, et al., Correlations among ERCC1, XPB, UBE2I, EGF, TAL2 and ILF3 revealed by gene signatures of histological subtypes of patients with epithelial ovarian cancer., *Oncol. Rep.* 27 (2012) 286–92.
- [81] B. Shroot, S. Michel, Pharmacology and chemistry of adapalene., *J. Am. Acad. Dermatol.* 36 (1997) S96–103.
- [82] M. a Harmon, M.F. Boehm, R. a Heyman, D.J. Mangelsdorf, Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 6157–60.
- [83] H. Niwa, K. Yamamura, J. Miyazaki, Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector., *Gene.* 108 (1991) 193–9.
- [84] Y. Xia, L.Y. Hwang, M.H. Cobb, R. Baer, Products of the TAL2 oncogene in leukemic T cells: bHLH phosphoproteins with DNA-binding activity., *Oncogene.* 9 (1994) 1437–46.
- [85] N. Courtial, C. Mücke, S. Herkt, S. Kolodziej, H. Hussong, J. Lausen, The T-Cell Oncogene Tal2 Is a Target of PU.1 and Upregulated during Osteoclastogenesis., *PLoS One.* 8 (2013) e76637.
- [86] J. Ponjavic, B. Lenhard, C. Kai, J. Kawai, P. Carninci, Y. Hayashizaki, et al., Transcriptional and structural impact of TATA-initiation site spacing in mammalian core promoters., *Genome Biol.* 7 (2006) R78.
- [87] T. Juven-Gershon, J.-Y. Hsu, J.W. Theisen, J.T. Kadonaga, The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription., *Curr. Opin. Cell Biol.* 20 (2008) 253–9.
- [88] J.T. Kadonaga, Perspectives on the RNA polymerase II core promoter., *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1 (2013) 40–51.
- [89] L. Tora, H.T.M. Timmers, The TATA box regulates TATA-binding protein (TBP) dynamics in vivo., *Trends Biochem. Sci.* 35 (2010) 309–14.

- [90] S.J. Gaunt, Y.-L. Paul, Origins of Cdx1 regulatory elements suggest roles in vertebrate evolution., *Int. J. Dev. Biol.* 55 (2011) 93–8.
- [91] National Center for Biotechnology Information. “Gene.”: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/21350>>, cited 25 October, 2014
- [92] C. V Dang, J. Barrett, M. Villa-Garcia, L.M. Resar, G.J. Kato, E.R. Fearon, Intracellular leucine zipper interactions suggest c-Myc hetero-oligomerization., *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 954–62.
- [93] E.R. Fearon, T. Finkel, M.L. Gillison, S.P. Kennedy, J.F. Casella, G.F. Tomaselli, et al., Karyoplasmic interaction selection strategy: a general strategy to detect protein-protein interactions in mammalian cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 7958–62.
- [94] S.M. Lipkin, C. a Nelson, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, A negative retinoic acid response element in the rat oxytocin promoter restricts transcriptional stimulation by heterologous transactivation domains., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 1209–13.
- [95] S.M. Lipkin, T.L. Grider, R. a Heyman, C.K. Glass, F.H. Gage, Constitutive retinoid receptors expressed from adenovirus vectors that specifically activate chromosomal target genes required for differentiation of promyelocytic leukemia and teratocarcinoma cells., *J. Virol.* 70 (1996) 7182–9.
- [96] L. Delacroix, E. Moutier, G. Altobelli, S. Legras, O. Poch, M.-A. Choukrallah, et al., Cell-specific interaction of retinoic acid receptors with target genes in mouse embryonic fibroblasts and embryonic stem cells., *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 231–44.
- [97] D.T. Humphreys, J. a. Carver, S.B. Easterbrook-Smith, M.R. Wilson, Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins., *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 6875–81.
- [98] J.J. Yerbury, S. Poon, S. Meehan, B. Thompson, J.R. Kumita, C.M. Dobson, et al., The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures., *FASEB J.* 21 (2007) 2312–22.
- [99] H. Willander, E. Hermansson, J. Johansson, J. Presto, BRICHOS domain associated with lung fibrosis, dementia and cancer--a chaperone that prevents amyloid fibril formation?, *FEBS J.* 278 (2011) 3893–904.

- [100] P. Pinheiro, M. Gering, R. Patient, The basic helix-loop-helix transcription factor, Tal2, marks the lateral floor plate of the spinal cord in zebrafish., *Gene Expr. Patterns.* 4 (2004) 85–92.
- [101] L. Yang, S. Rastegar, U. Strähle, Regulatory interactions specifying Kolmer-Agduhr interneurons., *Development.* 137 (2010) 2713–22.
- [102] K. Achim, P. Peltopuro, L. Lahti, H.-H. Tsai, A. Zachariah, M. Astrand, et al., The role of Tal2 and Tal1 in the differentiation of midbrain GABAergic neuron precursors., *Biol. Open.* 2 (2013) 990–7.

謝辞

本研究を遂行し、学位論文をまとめるにあたり、多くのご指導とご支援を賜りました、東京理科大学薬学部 田沼 靖一 教授、並びに、徳島文理大学香川薬学部 宮澤 宏 教授に深く感謝致します。田沼先生には、学生時代から厳しくご指導いただき、研究に向かう姿勢や研究で様々発生した困難を解決する方法など、研究の基礎を教えて頂きました。宮澤先生には、本研究を遂行するにあたり、日々の研究だけでなく多くのご指導をして頂き、辛抱強く見守って下さいました。

両先生に、心から感謝申し上げます。

本研究を通してご助言、ご協力頂いた徳島文理大学香川薬学部 喜納 克仁 准教授に深く感謝申し上げます。

本研究を実施するにあたり、数多くのご協力を頂いた、徳島文理大学香川薬学部分子生物学講座のみなさんに深く感謝致します。

最後に、私の研究生活をいつも支えてくれる家族に感謝致します。