

氏名（本籍）	こばやし たかのぶ 小林 隆 信（香川県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	乙第 342 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	神経への運命決定に関与する因子の探索

論文審査委員 (主査) 教授 田沼 靖一
教授 岡 淳一郎 教授 鍛冶 利幸
教授 樋上 賀一 准教授 内海 文彰

論文内容の要旨

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。いくつか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、2 つの処理、atRA と浮遊培養が重要である。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 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、RARE と結合し、atRA による遺伝子の転写制御に関与する。

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おこなった。いくつかの変動する遺伝子が確認されたが、その中から、2 つの遺伝子、*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。これら2つは、マイクロアレイ解析で6時間後に遺伝子発現の上昇が確認された遺伝子であるが、神経分化での機能は解明されていない。そこで、これらの遺伝子と神経分化の関連性を明らかにするために、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おこなった。

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みられなくなり、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 のかわりに 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、P19細胞の神経分化過程において、atRA のレセプターである RAR の発現を調べ、さらに、特異的なアゴニストを atRA のかわりに用いて、*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ることが示され、さらに、そこに含まれる RARE が atRA シグナルに応答することが示された。そこで、*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 のかわりに DMSO で同様の処理をおこなったところ、*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日間で変動することが示された。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、レセプ

ターである *Rar* および RAR とヘテロダイマーを形成する *Rxr* の発現を調べた。さらに、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 処理をおこなった時の発現と同等であることが示された。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 が結合することが示された。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 アッセイを用いて調べた。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 を介して相互作用することが示され、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 α 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る。atRA による転写制御を受けるこれら 2 つの遺伝子は、胚から神経へコミットするのに必要とされるものであり、得られる知見は、神経分化におけるはたら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。

論文審査の結果の要旨

再生医療は神経変性疾患の有望な治療法の一つであり、幹細胞の神経細胞への分化の正確性が特に求められている。本論文審査申請者は、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 細胞を用いて、神経分化誘導直後に変動する遺伝子探索し、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ち、all-*trans* レチノイン酸(atRA)と浮遊培養による細胞凝集によって神経分化を誘導できる細胞であり、神経分化や胚発生初期に関与する遺伝子の同定およびその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。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。atRA は核内に移行後、リガンドとして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、atRA および浮遊培養処理をした P19 細胞をマイクロアレイにより解析した。その結果、神経分化との関連性の報告の少ない遺伝子で、P19 細胞の神経分化誘導後の発現変動が大きかった *Csn3* と *Tal2* を見出した。そこで、*Csn3* と *Tal2* の神経への運命決定との関連性を考察するために、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がおこなわれた。

第 2 章では、P19 細胞の神経分化誘導後における *Csn3* の発現およびその誘導機構に関する研究を行っている。*Csn3* は分化誘導 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、48 時間後には基底レベルまで減少した。この発現には、atRA およびそのレセプターの一つである RAR α が支配した。さらに、*Csn3* の転写制御機構を調べたところ、5'側上流域に RAR α が結合するレチノイン酸応答配列(RARE)が存在し、atRA シグナルに応答することが示された。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、胚発生過程においても *Csn3* の発現が確認され、*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。

第 3 章では、P19 細胞での atRA による *Tal2* の発現に関する研究をおこなっている。P19 細胞における *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た。また、マウスの胚発生過程においても P19 細胞と同様に一過性な発現があることが明らかとなった。さらに、*Csn3* と同様に、atRA が *Tal2* の発現を誘導することが明らかとなり、RAR α が発現に関与することが示された。

第4章では、P19細胞での atRA による *Tal2* の転写調節機構に関する研究をおこなっている。ゲノム上の探索により、イントロンに RARE とみられる領域が、転写開始点の 30 bp 上流に TATA-box とみられる領域があると予測された。そこで、これらの領域が転写に関与することができるのかを調べたところ、TATA-box とみられる領域は、TATA-box binding protein (TBP) が結合し、コアプロモーターとして機能することが示され、RARE とみられる領域は、*Tal2* の誘導に関与する RAR α が結合し、atRA シグナルに応答することが示された。加えて、これら二つの領域が RAR α と TBP を介して相互作用することも示された。以上の結果から、*Tal2* の発現はイントロンにある RARE と転写開始点の 30 bp 上流に TATA-box が協調的に機能し誘導され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 と RAR α 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おり、本研究により、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遺伝子である可能性が示された。本研究をさらに進めることにより得られる知見は、*Csn3* や *Tal2* などの神経分化におけるはたらきやそのネットワークへの理解を深め、再生医療へ向けた分化研究の応用に有用であり、博士（薬学）の学位に十分値する研究である。