

論文内容の要旨

申請者氏名 西原 茂城

神経幹細胞/前駆細胞は以下の二つの特徴をもっている。一つは細胞分裂による自己複製であり、もう一つは多分化能を裏打ちしている未分化状態の維持である。Wnt シグナルは標的遺伝子である *CyclinD*などを介して、細胞周期を制御しており、神経幹細胞/前駆細胞の細胞分裂による自己複製機構に関与していると考えられている。しかしながら、神経幹細胞/前駆細胞の未分化状態の維持に、Wnt シグナルがどのように関与しているかは未だ不明である。本研究ではエレクトロポレーション法を用いてニワトリ脊髄神経管に *Wnt/-βcatenin* を強制発現し、*NRSF/REST*(neuron restrictive silencing factor/repressor element-1 silencing factor)が Wnt シグナルによって正に制御されていることを見出した。さらに、新たに確立した *in ovo* ルシフェラーゼ・アッセイを用いて、その Wnt シグナルによる制御が *NRSF* のエクソン 1a に存在する Lef/TCF 結合配列を介した直接制御であることを明らかにした。 *NRSF* は VZ(ventricular zone)において神経細胞特異的な遺伝子の発現を制御する機能を持っていることから、Wnt シグナルは *NRSF* を介して神経幹細胞/前駆細胞の未分化状態の維持に関与していると考えられる。この本研究で得られた結果は、神経幹細胞/前駆細胞における未分化性の維持機構と Wnt シグナルを結びつけた初の知見である。

一方、神経幹細胞/前駆細胞の維持には Wnt シグナルだけでなく Notch シグナルも関与していると考えられている。Notch シグナルは種を越えてよく保存されているシグナル経路の一つとして知られており、脊椎動物では Notch シグナルが神経細胞への分化を抑制することによって、神経幹細胞の維持に関わっているのではないかと考えられている。しかし、前述の *NRSF* との関係は全く知られておらず、その関連性を探るためにニワトリ胚を用いて両者の関係を解析した。 *Wnt/-βcatenin* の結果と同様に *Notch 1* ICD (恒常活性化型 *Notch 1*) と *VP16-RPB-jκ* の強制発現においても *NRSF* の発現は上昇していた。また *NRSF* の発現上昇に起因すると思われる神経特異的遺伝子 *βIII-tubulin* の発現減少も観察された。これらの結果は Notch シグナルが *NRSF* の発現を正に制御していることを示唆しており、Notch シグナルによる神経幹細胞の維持には *NRSF* が関与しているのではないかと考えられた。またエレクトロポレーションで遺伝子導入してから *NRSF* の発現変化までの時間経過を調べたところ、 *NRSF* の発現上昇は *Notch 1* の直接の標的遺伝子である *CyclinD 1*, *L-fringe* と同様であることが判明した。これは、 *NRSF* が Notch シグナルの標的遺伝子である可能性を示唆している。本研究で得られたこれらの結果は、Notch シグナルと *NRSF* を結びつける初の知見であり、Notch シグナル研究や神経分化研究に対して大きな前進とすることができる。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 西原 茂城

中枢神経系の発生、分化の分子機構を理解するためには、この過程にかかわる新規遺伝子群の単離や遺伝子間のネットワークの解析が必要であると考えられる。しかし、それら神経分化に関わる遺伝子の中には、遺伝子ファミリーを形成していて機能の重複があるために一つの遺伝子変異では形質が現れないものや、発生過程において複数の機能を担っているために発生の初期で致死となり、神経系の形成過程での機能解析ができないものも多く存在する。このような遺伝子の機能を解析する場合、ノックアウトなどの遺伝子変異実験と比較して、目的の遺伝子を局所的に強制発現させることのできる実験系は強力なツールとなり得る。本研究はニワトリ胚の脊髄神経管をモデルとし、局所的に遺伝子導入が可能なエレクトロポレーション法を用いて、神経分化の分子機構を明らかにすることを目的としたものである。

ニワトリ脊髄神経管に *Wnt/-βcatenin* を強制発現した結果、*NRSF/REST* が Wnt シグナルによって正に制御されていることが明らかになった。さらに、*in ovo* ルシフェラーゼ・アッセイを用いて、その Wnt シグナルによる制御が *NRSF* のエクソン 1a に存在する Lef/TCF 結合配列を介した直接制御であることも明らかになった。*NRSF* は VZ(ventricular zone)において神経細胞特異的な遺伝子の発現を制御する機能を持っていることから、Wnt シグナルは *NRSF* を介して神経幹細胞/前駆細胞の未分化状態の維持に関与していると考えられる。一方、神経幹細胞/前駆細胞の維持には Wnt シグナルだけでなく Notch シグナルも関与していると考えられている。Notch シグナルは種を越えてよく保存されているシグナル経路の一つとして知られており、脊椎動物では Notch シグナルが神経細胞への分化を抑制することによって、神経幹細胞の維持に関わっているのではないかと考えられている。*Wnt/-βcatenin* の結果と同様に *Notch 1* ICD (恒常活性化型 *Notch 1*) と *VP16-RPB-jκ* の強制発現においても *NRSF* の発現は上昇していた。また *NRSF* の発現上昇に起因すると思われる神経特異的遺伝子 *βIII-tubulin* の発現減少も観察された。これらの結果は Notch シグナルが *NRSF* の発現を正に制御していることを示唆しており、Notch シグナルによる神経幹細胞の維持には *NRSF* が関与しているのではないかと考えられた。またエレクトロポレーションで遺伝子導入してから *NRSF* の発現変化までの時間経過を調べたところ、*NRSF* の発現上昇は *Notch 1* の直接の標的遺伝子である *CyclinD 1*, *L-fringe* と同様であることが判明した。これは、*NRSF* が Notch シグナルの標的遺伝子である可能性を示唆している。

以上のように、本論文は神経細胞の分化制御に注目して、Wnt シグナルと Notch シグナルによる *NRSF* の発現制御を明らかにし、神経幹細胞/前駆細胞の維持への関与を示唆したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。