

所属 (主指導教官)	動物遺伝子機能学講座 (川市正史 教授)		
氏名	小幡 順子	提出	平成11年12月24日
題目	神経と膵臓の発生に關与するbHLH型転写因子の解析		
<p>要旨</p> <p>RBP-JkはDNA結合蛋白質であり、Notch受容体からのシグナルを受けてHes-1の転写を活性化する。RBP-Jk自身は転写活性化能が無く、Notchの細胞内ドメインなどの他の蛋白質がco-activatorとして結合して初めて転写活性化能を持つ。</p> <p>私たちは、two-hybrid systemを用いてRBP-Jkに結合する因子の検索を行った。</p> <p>1. Two hybrid systemによるRBP-Jk結合因子の検索と同定</p> <p>マウス9.5日目胎児のcDNAライブラリーを使って450万個のクローンをスクリーニングした結果、ラットPTF1のp48サブユニットが単離された。マウスp48は、324アミノ酸からなる分子量3万5千の蛋白質をコードしており、アミノ酸配列の中央付近にbHLHモチーフがある。p48の種々の欠損変異体を作り、RBP-Jkとの結合領域を解析した結果、p48のC末端側の93アミノ酸がRBP-Jkとの結合に必要な領域であることが分かった。</p> <p>さらにCos細胞内でのRBP-Jkとp48の局在を比較した結果、p48は単独で細胞質に局在し、RBP-Jkは単独で核に局在するが、p48とRBP-Jkを共に発現させた時、RBP-Jkは細胞質に局在するようになる。ここにE47を加えるとp48とRBP-Jkは核に移行する。このようにRBP-Jkとp48の細胞内局在は一致しており、両者は動物細胞内でも結合することがわかった。さらに免疫沈降法でもRBP-Jkとp48の結合を確認した。</p> <p>2. p48の発現解析</p> <p>RT-PCRによりp48はマウス成体で膵臓と脊髄にのみ発現し、発生過程では受精後10日目をピークに発現することが分かった。受精後10.5日目の胎児を使ってin situ hybridizationを行うと、シグナルは脊髄のみに見られ、菱脳下部から全長にわたって神経管の背側に発現していた。この背側領域の神経細胞は将来Sensory interneuronに分化するので、p48はこの神経細胞の分化に機能している可能性がある。</p> <p>3. p48の転写活性</p> <p>一般にMath-1のような組織特異的なnHLH型因子は、普遍的に存在するbHLH型因子であるE47とヘテロダイマーを形成し、Eボックスに結合して転写を活性化する。そこで、Eボックスを7つ並べたプロモーターを用いた時の転写活性を検討した。その結果、p48とE47を共に発現してもプロモーターは活性化されず、むしろE47単独の転写活性をp48が抑制した。またp48はMash-1とE47による転写活性を半分程度阻害した。</p> <p>PTF1はラットの胎生15日目から膵臓の原基で発現し、膵臓の外分泌細胞の分化に關する因子である。p64、p48は消化酵素遺伝子のプロモーター中に共通して存在するPTF1モチーフに結合する。PTF1モチーフには、Eボックス(CANNTG)と、Aボックスと呼ばれるTGGGAの配列が含まれている。そこで、消化酵素遺</p>			

伝子の一つキモトリプシノーゲン遺伝子のPTF1モチーフを4つ並べた配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポータープラスミドを作成し、p48の転写活性を検討した。その結果、p48を単独で発現させると約8倍の活性化がみられ、更にE47を加えるとE47の量に依存して転写活性は約40倍まで上昇した。しかし、AボックスまたはEボックスに変異を入れたプロモーターでは転写の活性化は見られなかった。このことからp48とE47による転写活性化にはAボックスとEボックスの両方が必要であることが分かった。さらにE47とp48による協調的な転写活性化にRBP-Jkが及ぼす効果を検討した。Cos細胞を用いたとき、E47とp48の存在下でRBP-Jkの量依存に転写活性は上昇した。

4. レチノイン酸によるp48の誘導

P19細胞は凝集化とレチノイン酸添加により神経細胞に分化誘導することができる。また、凝集化させずにレチノイン酸添加のみではP19細胞の神経分化は見られない。このような処理でP19細胞を神経系細胞に分化させた時、p48は処理後2日目から6日目にわたって発現し、神経系細胞に分化させていないP19細胞では処理後1日目から2日目に一過性に発現した。よって、マウスp48の持続的な発現には神経分化の過程が必要であることが分かった。

次にp48遺伝子の転写開始部位より5'側2352bpのゲノム断片をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポータープラスミドを作成してP19細胞に導入した。その結果、レチノイン酸の量依存にルシフェラーゼ活性が250倍近くまで上昇した。p48のプロモーター領域の種々の欠損変異体を作成して同様の実験を行い、-969から-875の94bpの領域がレチノイン酸によるプロモーターの活性化に必要な領域であることを示した。

5. p48のノックアウトマウスの表現型

p48ノックアウトマウスは膵臓が完全に欠損しており、生後1日前後に死亡するが、神経系に異常はみられなかった。よってp48は神経系においては機能を保証する様な別の因子が存在する可能性が考えられる。

まとめ

膵臓の内分泌系と神経の発生において共通に機能する因子として、bHLHドメインを持つNeuroD/Beta2、Neurogenin1、Limドメインを持つIslet1、ペアードドメインを持つPax-6などが知られている。これらの因子はすべて神経管の腹側に発現しており、p48が神経管の背側に発現し、かつ膵臓の外分泌系で機能する点でこれらの因子とは異なっている。神経管の背側に局限して発現する因子としてPax-3、Pax-7、Math-1、Mash-1などが知られている。p48とこれらの因子との相互関係を明らかにすることによって、神経管の背側と膵臓の外分泌系に共通に存在する未知のシグナル伝達系を明らかにできるのではないかと考えている。またp48はRBP-Jkによる転写制御を受けることからNotchシグナル伝達系の支配下にあると考えられることと、レチノイン酸のシグナル系にも関与していることが示唆されたことから、p48はNotchシグナル伝達系とレチノイン酸のシグナル系の接点に位置する因子であるのかもしれない。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 小幡 順子

本論文は、マウスの発生初期に神経管と膵臓で発現するbasic helix-loop-helix (bHLH)型の転写因子PTF1-p48が、Notchシグナル伝達系の下流の転写調節因子であるRBP-Jkに強く結合することを発見し、その性質と生理的意義を詳細に解明したものである。

DNA結合蛋白質RBP-Jkは、発生における細胞運命決定の制御に関するNotchシグナル伝達系において、核内でNotch細胞内断片と複合体を形成し転写調節因子として機能する。申請者は、RBP-Jkと結合する新規の蛋白質を同定する目的で、酵母のTwo-hybrid法を用いたスクリーニングを行った。この結果、いくつかの遺伝子を同定した。その一つは、膵臓の外分泌組織における消化酵素遺伝子の発現を活性化するとともに、発生の初期においては、膵外分泌細胞の分化に必須な転写因子PTF1のp48サブユニットであった。

p48はNotch細胞内断片よりもさらに強くRBP-Jkに結合し、様々な変異体のRBP-Jkを使用した実験から、Notchとは個となる様式でRBP-Jkに結合することを本論文で明らかにしている。さらに、p48はそれまで考えられていた様に膵臓だけで発現しているのではなく、マウスの胎生12日前後では、後脳以下の神経管の背側で、内腔に沿った部分、すなわち、未熟な神経細胞が増殖し最初の分化を開始する領域で発現していることを発見した。神経系の分化への関与を明らかにするため、申請者は、レチノイン酸と凝集により培養条件下で神経細胞へ分化するP19細胞を用いて、p48mRNAの発現を検討した。

この結果、神経に分化する前のP19細胞ではp48遺伝子の発現は検出されないが、分化を開始したP19細胞では、発現が誘導されることを明らかにした。また、p48遺伝子の上流領域を解析して、レチノイン酸による誘導に必須なエンハンサー領域を同定した。

一般に、組織特異的なbHLH型転写因子は、普遍的に存在する別のbHLHと結合して2量体の形で、DNA上のE-box配列に結合し転写を活性化することが知られている。しかし、申請者は、この論文でp48の転写活性を詳細に検討した結果、p48は他のbHLHと複合体を作ることにより、E-BoxとともにA-Boxと呼ばれる特異的な配列を同時に認識し転写を活性化するが、E-Boxのみに対しては阻害的に働くことを明らかにした。さらに、RBP-Jkが結合することにより、p48の転写活性がさらに数倍促進されることを発見した。この結果は、p48がNotchシグナルの下流で機能することを示唆している。最近の膵臓と神経系の分化におけるNotchシグナル伝達系の関与の知見と総合して考えることにより、本論文では、Notchによる発生と分化の調節機構に全く新しい経路が存在することを提唱している。

以上のように、本論文は、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。