

学位論文題名

MATH2, a mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal*, is specifically expressed in the nervous system

(ショウジョウバエの proneural gene のひとつである *atonal* の遺伝子産物に構造上類似した哺乳類のヘリックス・ループ・ヘリックス因子 MATH2 は神経系に特異的に発現している)

学位論文内容の要旨

I. 目的と背景

ヘリックス・ループ・ヘリックス (HLH) 因子は組織の分化に関わっている転写因子と考えられている。今回、われわれは、哺乳類の神経系の分化機序を解明する目的で、最近 Jarman らにより単離されたショウジョウバエの神経分化に重要な役割をもつ HLH 因子のひとつである *atonal* の mammalian homologue をマウス genomic library よりクローニングし解析したので報告する。

II. 方法

1) MATH2 遺伝子のクローニング

atonal の遺伝子配列のうち比較的アミノ酸配列が保存されている basic 領域と 3' 側のヘリックス領域のアミノ酸に対して degenerate oligonucleotide primer を作製した。次に胎生 16.5 日目 (E16.5) のラット中枢神経より得た mRNA をもとに 1st strand cDNA を合成し、それを鋳型として先に作製した primer を用いて PCR を施行、得られた DNA をプローブとして、マウスの肝より作製した genomic library をスクリーニングした。

2) ノーザン解析

a) ontogeny をみる目的でマウスの胎生各時期ならびに成体の脳より、また b) 組織別発現をみる目的で成体の各組織より RNA を guanidium thiocyanate / cesium chloride 法により抽出した。用いた RNA は 20 μ g で、1% formaldehyde 変性ゲルにて電気泳動し、ナイロンメンブランにトランスファーしたのち、プローブとして MATH2 の全コード領域を含む DNA 断片をランダムプライマー法により 32 P を用いて標識し、ハイブリダイゼーションした。

3) *in situ* ハイブリダイゼーション解析

胎生ならびに生後中枢神経各時期でのより詳細な MATH2 の発現を検討するため、*in situ* ハイブリダイゼーションをおこなった。また E11.5 胎仔に関しては、whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションも追加した。E13.5, E15.5, E18.5 の whole embryo ならびに生後 2 日目 (P2), P5, P10 そして成体マウスより得た脳を -70 °C に冷却した isopentane につけ凍結後、OCT compound に包埋し、クリオスタットにて 10 μ m の切片を poly-L-lysine でコートしたスライドガラスに固定した。乾燥後、4 % paraformaldehyde を含む PBS で固定し、proteinase K 処理した後、0.2 % glutaraldehyde / 4 % paraformaldehyde で再固定、酢酸処理をした。プローブは、MATH2 遺伝子の全コード領域を含む 1544 bp からなる *Dra*I フラグメントを鋳型として digoxigenin で標識した cRNA プローブを作製し、ハイブリダイゼーションした。Whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションは、Wilkinson らの方法にしたがった。

3) DNA 結合実験

PCR 法により得た MATH2 並びに哺乳動物の HLH 因子である E47 の cDNA 断片を pGEMEX-1 発現ベクターにサブクローニングし、JM109 (DE3) にトランスフェクト後、大量液体培養し、1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside にて蛋白発現を誘導した。大腸菌を回収後、30 mM Tris/HCl, pH 7.5, 1mM EDTA, 20 % sucrose に溶解し、得られたサンプルを SDS / polyacrylamide gel にて泳動し、発現した蛋白をゲルから抽出した。抽出には 6 M guanidine / HCl で 20 分処理した後、0.1 M KCl / HM (20 mM Hepes pH 7.9, 1mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, 17 % glycerol) で透析する方法を用いた。異なる E box (CANNTG) を含む 29 bp からなる二本鎖オリゴヌクレオチドプローブを作製し、Klenow enzyme を用いて ³²P にて標識した。E box の配列は CAGGTG, CAGCTG, CAAATG, CAGATG とした。ゲルシフトアッセイは、Sasai らの方法によった。

III) 結果と考察

E16.5 ラット中枢神経より得た cDNA を鋳型として、degenerate oligonucleotide primer で PCR したところ *atonal* との間に高い相同性を認める二種類の DNA 断片を得、そのうち一方を MATH2 と名付け解析した。この cDNA 断片を用いてマウス genomic library をスクリーニングし、ほぼ重複した二つの陽性クローンを得た。プローブとして用いた bHLH 領域を含む約 3.2 kb を両方向からシーケンスしたところ ATG (Met) ではじまる 1011 bp の open reading frame (ORF) を認め Met codon より 9 bp 上流に in-frame で stop codon TAA が存在した。この ORF をはさむ形で上流と下流に特異的プライマーを作製し、マウス胎仔脳 cDNA とゲノム DNA に対して PCR を施行し、得られた産物をゲル電気泳動にて比較することにより、この ORF がイントロンを含まないことがわかった。以上より MATH2 蛋白は、337 アミノ酸からなり分子量は 38.3 kDa と推測された。bHLH 領域のホモロジーについては、アミノ酸で *atonal* とは 53 %, 今回得られたもうひとつの *atonal* ホモログである MATH1 とは 61 % の相同性を認めた。構造上の特徴として、*atonal* 蛋白の bHLH 領域が C 末端に存在するのに対し MATH2 ではほぼ中央に存在すること、transcriptional regulation への関与が推定されている酸性領域が bHLH 領域の上流に存在することがあげられる。

ノーザン解析ならびに *in situ* ハイブリダイゼーションより MATH2 mRNA は末梢ならびに中枢神経系に特異的に発現していることが明らかになった。発現時期は E11.5 以降成体

に至るまで発現しており、胎仔では神経系でも特に将来大脳皮質となる telencephalon に多く発現していた。Telencephalon での発現で特徴的なことは、未分化な神経細胞が集合している ventricular zone での発現は少なく、分化途中ないしは最終分化した神経細胞やグリア細胞で形成されている intermediate zone と cortical plate に強い発現が認められたことである。このことは、MATH2 mRNA が成体においても神経系に発現し続けていることとあわせて考えると、MATH2 は神経分化の初期段階ではなくむしろ分化途中あるいは最終分化を終えた神経細胞ないしはグリア細胞で細胞の維持などの役割を果たしているものと考えられた。

bHLH 因子は homodimer あるいは heterodimer を形成して DNA 結合コンセンサス配列である E box に結合することにより転写調節活性を示すと考えられているが、ゲルシフトアッセイの結果から、MATH2 単独では E box には結合せず、*atonal* と heterodimer をつくることが知られているショウジョウバエの bHLH 遺伝子 *daughterless* の mammalian homologue である E47 と heterodimer を形成することにより E box に結合することがわかった。

以上より、今回あらたにクローニングした bHLH 因子の MATH2 は神経系に特異的に発現しており、その発現時期ならびに発現部位から考えて、神経系の分化あるいはその維持に重要な役割を果たしており今後の解析が期待されるものと考えられた。

IV) 結語

マウス中枢神経よりあらたな bHLH 因子である MATH2 をクローニングし、以下の結果を得た。

- 1) MATH2 は 1011 bp の ORF をもち、337 アミノ酸の蛋白をコードしていた。
- 2) MATH2 蛋白は *atonal* と異なり bHLH 領域がほぼ中央に位置し、その上流に転写活性の調節に重要であると考えられる酸性領域が存在した。
- 3) bHLH 領域のアミノ酸の相同性は、*atonal*, MATH1 と比較して各々 53%, 61% であった。
- 4) MATH2 mRNA の発現は、神経系特異的で E11.5 以降成体にいたるまで認められ、とくに telencephalon、そして後に形成される大脳皮質に顕著であった。
- 5) MATH2 mRNA は telencephalon のなかでも分化途中ならびに最終分化を終えた神経細胞やグリア細胞で形成される intermediate zone と cortical plate に強い発現を認めた。
- 6) MATH2 蛋白は E47 蛋白と heterodimer を形成することにより E box と結合した。

学位論文審査の要旨

主査 教授 小池 隆夫
副査 教授 井上 芳郎
副査 教授 長嶋 和郎

学位論文題名

MATH2, a mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal*, is specifically expressed in the nervous system

(ショウジョウバエの proneural gene のひとつである *atonal* の遺伝子産物に構造上類似した哺乳類のヘリックス・ループ・ヘリックス因子 MATH2 は神経系に特異的に発現している)

神経系の初期発生や分化のメカニズムについてショウジョウバエをはじめとした無脊椎動物と脊椎動物とのあいだに共通した遺伝子群や制御機構がはたらいっていることが明らかになってきた。今回、哺乳類における神経分化のメカニズムを解明する目的でJarmanらによりあらたにクローニングされたショウジョウバエの末梢神経分化に重要な役割をはたすと考えられている遺伝子 *atonal* に対する mammalian homolog をマウスより単離することを試みた。

atonal は転写因子のひとつであるヘリックス・ループ・ヘリックス(HLH)因子に属している。HLH因子は、一般に組織の分化に関わっている転写因子群として知られているが、蛋白構造上の特徴として、basic-helix-loop-helix領域と呼ばれる構造をもっており、この領域のアミノ酸配列に関しては、種族をこえて比較的温存されていることがわかっている。本研究では、この領域のアミノ酸に対応する塩基配列の4 fold degeneracyのoligonucleotide primerを作製し、ラット胎生16.5日目の脳より抽出したmRNAに対しRT-PCRを施行し、増幅されたDNA断片の塩基配列を決定することにより *atonal* とアミノ酸で53%のホモロジーをもつ約120bpのDNA断片を得た。さらにこのDNA断片をプローブにマウス肝より作製したgenomic libraryをスクリーニングすることにより、最終的にSouthern blotで陽性を示す約1.5kbのDraI DNA断片を得た。このDNA断片の塩基配列を決定したところ、翻訳開始コドンATGからはじまるHLH領域を含む1011bpのopen reading frame (以下、ORFと略す)が存在し、9bp上流には、in-frameで終始コドンTAAが存在することがわかった。このORFが翻訳されていることは、ORFを挟む形でoligonucleotide primerを作製し、マウス胎児脳mRNAに対しRT-PCRを施行することにより確認した。またRT-PCRで得られたバンドの大きさからこのORFにはイントロンが存在しないことが推測された。以上の結果から、予想される

MATH2蛋白は、337アミノ酸、分子量38.6kDaでほぼ中央にHLH領域が存在し、そのN端側に転写活性の制御に特徴的な酸性アミノ酸領域が存在する構造を有することが明らかとなった。

MATH2の発現時期ならびに発現部位をみるためnorthern blotならびに*in situ* hybridizationをおこなった。その結果、MATH2は胎生11.5日目頃より発現が認められるようになり成体にいたるまで持続するものの、その発現量は低下傾向にあった。発現部位は中枢ならびに末梢神経系に限局しており、胎生期中枢神経では分裂・増殖している神経前駆細胞が存在するventricular zoneよりも、神経系細胞への分化が決定されもはや分裂しない細胞で構成されているintermediate zoneや最終分化が終了した細胞で構成されているcortical plateでMATH2の発現を認めた。

HLH因子は、HLH因子同士がheterodimerを形成し標的遺伝子のエンハンサー領域に存在するCANNTGで表されるE boxと呼ばれるコンセンサス配列に結合することにより転写を制御することがわかっている。Jarmanらは*atonal*が普遍的に存在するHLH因子、*daughterless*とheterodimerを形成しE boxに結合することをゲルシフトアッセイにて証明した。MATH2に関しても同様のアナロジーが存在すると仮定し、MATH2蛋白ならびに*daughterless*のmammalian homologであるE47蛋白を大腸菌を用いて調製し、E box配列を含むoligonucleotideを合成、プローブとして用いることによりゲルシフトアッセイを施行した。その結果MATH2は、単独では結合しないがE47とheterodimerを形成することによりE boxに結合することが明らかとなった。

以上が今回の研究において明らかにされたことであるが、最も注目すべき点としてMATH2の発現パターンがあげられる。すなわちその発現時期ならびに部位から考えて神経系に作用することはもちろんであるが、神経系細胞への分化という初期段階に作用するのではなく、神経系細胞に分化することが決定された細胞の最終分化あるいは分化を終えた細胞の維持に作用することが推測された。

今後は、その機能を明らかにすべく、トランスフェクション実験、抗体の作製、さらにはノックアウトマウスの作製などが必要と思われる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。