

学位論文題名

骨形成因子 BMP とレチノイン酸による 神経分化の分子機構

学位論文内容の要旨

当研究室では、骨形成因子 (BMP-2) とビタミン A 誘導体であるレチノイン酸 (RA) が交感神経系の神経幹細胞である神経堤細胞に協同的に作用して、神経栄養因子受容体のひとつ TrkC の発現を誘導し初期分化を引き起こすとともに神経特異的新規蛋白質 BRINP1 (BMP/RA-Inducible Neural specific Protein1) を誘導することを明らかにした。さらに我々は、BRINP1 の類似蛋白質 2 種を同定し、これらを BRINP ファミリーと名付けた。本研究では、まず BMP2/RA による神経分化の分子機構について解析を行った。また BRINP ファミリーの発現・機能解析結果についても報告する。

I. BMP/RA による交感神経の初期分化

I-I. BRINP1 遺伝子の発現調節機構

交感神経細胞において BMP2/RA は BRINP1 を強く誘導する。そこで、まず BRINP1 の発現調節機構を解析することにより BMP2/RA の作用機構を明らかにしようと考えた。はじめに転写開始点周辺配列の転写調節に対する寄与を Luciferase Assay 法を用いて解析したところ、この領域にはコアプロモーター領域および非神経細胞特異的のサブレッサー領域が存在した。サブレッサー領域を詳細に解析したところ、NRSF (Neuron restrictive silencing factor) が非神経細胞特異的に結合して遺伝子の発現を抑制する配列 NRSE (Neuron restrictive silencing element) が見いだされた。この BRINP1-NRSE を解析した結果、NRSF は BRINP1-NRSE に結合して BRINP1 のプロモーター活性を抑制することが明らかとなった。

I-II. TrkC 遺伝子の発現調節機構

BRINP1 と同様に BMP2/RA によって強く誘導を受ける遺伝子、TrkC の発現調節機構の解析を行った。まず転写開始点上流配列のプロモーター活性を解析したが、細胞種特異的な発現調節領域は見つからなかった。そこで TrkC も BRINP1 と同様の発現調節を受けている可能性を考えてゲノム配列を詳細に解析したところ、NRSE 配列が 4 箇所見つかった (NRSE-A,B,C,D)。ゲルシフトアッセイの結果、NRSE-D のみが NRSF と特異的に結合することが明らかとなった。また Luciferase Assay 法を用いて、NRSE-D は TrkC のプロモーター活性を非神経細胞特異的に抑制することも明らかにした。以上の結果から、TrkC も BRINP1 と同様に、NRSF によって発現制御を受けていることが明らかとなった。さらに BRINP1 や TrkC と同様に BMP2/RA で発現が誘導される Synaptophysin も NRSE を有すること等から、BMP2/RA による交感神経の分化には NRSF が関与している可能性が強く示唆された。

I-III. SCG における BMP2 と RA による NRSF, REST4 の発現変化

これらの結果より、BMP2 と RA は NRSE を介して交感神経細胞の分化に必須な遺伝子の発現を制御している可能性が示された。そこで RT-PCR を用いて解析したところ、SCG ニューロンにおいて、BMP2 と RA は NRSF の発現はほとんど変化させないが、NRSF の機能を阻害する NRSF のスプライシングバリエアント REST4 の発現を BRINP1 や TrkC と同様に強く誘導することが明らかとなった。また SCG の発達過程における発現を解析したところやはり REST4 の発現パターンと BRINP1、TrkC の発現パターンは相関性が高かった。これらの結果より BMP2 と RA による交感神経の初期分化においては、REST4 の誘導が重要な役割を果たすことが示された。

II. BRINP ファミリー

II-I. BRINP ファミリーの同定と発現パターンの解析

まず我々は BRINP1, 2, 3 のアミノ酸配列を解析した。その結果 BRINP1, 2, 3 は非常に高い相同性を持ち、膜移行性シグナル配列および、不安定なタンパクに共通してみられる PEST 配列を持っていた。続いて遺伝子発現パターンを解析したところ、BRINP1, 2, 3 はいずれも神経組織特異的に発現していた。さらに SCG や脳の発達過程において BRINP1, 2, 3 は、それぞれ特徴的な発現変化を示した。すなわち脳内において BRINP1 は神経細胞層に広く発現しているのに対し、BRINP2, 3 はそれぞれ互いに領域相補的な発現を示した。また BRINP1 のみが交感神経細胞や神経芽細胞腫において BMP2/RA により誘導されることが明らかとなった。

II-II. BRINP ファミリーの生理機能の解析

BRINP 過剰発現系を構築し、フローサイトメトリー法を用いて細胞周期移行の変化を解析した。その結果、BRINP ファミリーは細胞周期抑制蛋白質であることが明らかとなった。さらに、極めて悪性度の高い脳腫瘍の 1 種である髄芽腫より得られた Daoy 細胞において、この細胞の腫瘍化のキーフaktorである NRSF の異常な活性が、BRINP1 の発現を抑制していることを明らかにした。これらの結果より、髄芽腫における NRSF の異常な活性が BRINP1 の発現抑制を引き起こし、その結果、細胞周期抑制が解除され、腫瘍化が起こる可能性が示唆された。

個体レベルで BRINP ファミリーの機能を解析することを目的として BRINP1, 2, 3 それぞれのノックアウトマウスを作製することとした。BRINP ファミリー遺伝子は、いずれもゲノムの広い領域に存在するため、まず開始コドンを含む Exon2 を欠損した BRINP1 ノックアウトマウスを作製した。しかし、このマウスでは、Exon2 をスプライスアウトした mRNA が発現しており、野生型と比べて顕著な表現型は見られなかった。そこで次に、BRINP1, 2, 3 の各 Exon の内、タンパク質全体の中の最も広い領域をコードしている Exon8 を欠損したノックアウトマウスを作出することとした。既に Exon8 およびその周辺配列をネオマイシン耐性遺伝子に置換したターゲティングベクターを作製した。現在、これらのベクターを用いて、相同組み換えを起こしたネオマイシン耐性の ES 細胞を得たところである。今後、Exon8 ノックアウトマウスの表現型を解析することにより、BRINP ファミリーの生理機能を明らかにできると考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 松 岡 一 郎
副 査 教 授 鈴 木 利 治
副 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 助 教 授 松 本 健 一

学 位 論 文 題 名

骨形成因子 BMP とレチノイン酸による 神経分化の分子機構

本学位論文申請者の研究室では、これまでに骨形成因子 (BMP2) とビタミン A 誘導体であるレチノイン酸 (RA) が発達期の交感神経細胞に協同的に作用して、同神経細胞の分化・成熟に必須である神経栄養因子 NT3 の受容体, TrkC の発現を誘導すると共に, 新規神経特異的タンパク質 BRINP1 (BMP/RA-Inducible Neural specific Protein1) を誘導することを明らかにしている. 続いて同研究室では, BRINP1 の類似タンパク質2種を同定し, それらは BRINP ファミリーと命名されている.

本学位申請者, 中谷俊幸は, BMP2/RA による神経分化および遺伝子発現の分子機構について解析すると共に, BRINP ファミリーの発現・機能を解析し, 重要な知見を得た.

BMP2 と RA は交感神経細胞において BRINP1 と TrkC の発現を強く誘導する. そこで本学位申請者は, 両遺伝子の転写調節機構を解析することにより BMP2/RA の作用機構を明らかにしようと考えた. まずルシフェラーゼ法を用いて両遺伝子のプロモーター活性を解析したところ, NRSF (Neuron restrictive silencing factor) が結合して非神経細胞特異的に発現を抑制する配列 NRSE (Neuron restrictive silencing element) が, BRINP1 と TrkC 双方の発現調節に寄与していることを明らかにした. さらに BRINP1 や TrkC と同様に BMP2/RA で発現が誘導される Synaptophysin 遺伝子も NRSE を有すること等から, BMP2/RA による交感神経細胞の分化には NRSE が関与している可能性を指摘した. そこで RT-PCR を用いて解析したところ, また交感神経節の発達過程における遺伝子発現を解析したところ, NRSF の機能を阻害する NRSF のスプライスバリエント, REST4 の発現パターンと BRINP1, TrkC の発現パターンは相関性が高かった. さらに初代培養下の交感神経細胞において, BMP2 と RA は, REST4 の発現を BRINP1 や TrkC と同様に強く誘導することを明らかにした. これらの結果

より交感神経の初期分化においては、BMP2 と RA が、REST4 を誘導して NRSF の機能を阻害することにより神経特異的遺伝子の発現を誘導することが重要な役割を果たしていることを強く示唆した。

続いて本学位申請者は、BRINP ファミリー各タンパク質のアミノ酸配列を解析した。その結果、BRINP1, 2, 3 は互いに高い相同性を持ち、膜移行性シグナル配列および、不安定なタンパクに共通してみられる PEST 配列を持っていることを明らかにした。さらに遺伝子発現パターンを解析して、BRINP1, 2, 3 がいずれも神経組織特異的に発現していることを明らかにした。さらに交感神経節や脳の発達過程において BRINP1, 2, 3 が、それぞれ特徴的な発現変化を示すことを明らかにした。また過剰発現系において BRINP ファミリーが細胞周期抑制能を有することが示されている。本学位申請者は、悪性度の高い脳腫瘍の 1 種である髄芽腫より得られた Daoy 細胞において、この細胞の腫瘍化の重要な因子である NRSF の異常な活性が BRINP1 の発現を抑制していることを明らかにした。これらの結果より、髄芽腫における NRSF の異常な活性が BRINP1 の発現抑制を引き起こし、その結果、細胞周期抑制が解除されて腫瘍化が起こる可能性を示唆した。

さらに本学位申請者は、動物個体レベルでの BRINP ファミリーの機能を明らかにすることを目的として、BRINP1,2,3 それぞれのノックアウトマウスの作製を行っている。BRINP ファミリー遺伝子は、いずれもゲノム上の広い領域に存在するため、まず開始コドンを含む Exon2 を欠損した BRINP1 ノックアウトマウスを作製した。このマウスでは、Exon2 をスプライスアウトした mRNA が発現しており、野生型と比べて顕著な表現型は見られていない。そこで現在、各 Exon の内、タンパク質全体の中で最も広い領域をコードする Exon8 を欠損した BRINP1,2,3 のノックアウトマウスを作成している。今後、これらノックアウトマウスの表現型を解析することにより、BRINP ファミリーの詳細な生理機能が明らかになると期待される。

本学位申請者のこれらの研究成果は、BMP と RA による神経分化の重要な分子機構を明らかにするものであり、今後さらなる発展が期待される、よって薬学博士号を授与するにふさわしいと認める。