

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 竹澤 慎一郎

本論文は核内レセプター転写共役因子の機能解析に関するもので、三章よりなる。視細胞特異的核内レセプター(Photoreceptor Nuclear Receptor; PNR)は網膜視細胞層にのみ特異的に発現する核内レセプターである。マウスにおいて PNR は胚発生の E18 前後に網膜視細胞層の細胞核がある領域(Outer Nuclear Layer; ONL)に発現が見い出され、成体に至るまで発現している。本遺伝子の不活性化はヒトでは Enhanced S-Cone Syndrome(ESCS)として視覚障害が生じ、マウスにおいても同様に変異が知られている。より詳細な解析から、視細胞発生の段階で PNR は神経網膜前駆細胞(Retinal Progenitor Cells; RPCs)の増殖を負に制御しており、かつ特定細胞(青色錐体細胞)の分化抑制機能を示された。さらに成体においては視細胞の正常な機能維持に必要であることから、PNR は視細胞の発生・分化・恒常性の維持にとって必須の視細胞制御因子であると考えられる。

核内レセプター群は、脂溶性低分子やステロイドホルモンをリガンドとしたリガンド依存的転写制御因子である。一方 PNR を始めとして、リガンドを持たない核内オーファンレセプター群の中には構成的な転写抑制能により標的遺伝子の発現を制御するレセプターが知られている。このような構成的転写抑制型核内レセプターは、NCoR や SMRT といったコリプレッサーがその CoRNR motif を介して直接核内レセプターに結合することで転写抑制される。この転写抑制は、NCoR/SMRT が会合するヒストン脱アセチル化酵素 HDAC の活性により発揮される。即ち NCoR/SMRT は細胞内の生理条件により Sin3A、HDAC1/2、HDAC3、TBL1 などの構成因子群が様々な組み合わせにより複合体を形成する。

このように PNR の視細胞増殖制御能も標的遺伝子の転写抑制を介して発揮されていると考えられるが、PNR の標的遺伝子群は未知であり、更に転写抑制機構も不明であった。一方 NCoR もしくは SMRT による PNR の制御も推定はできるものの、NCoR/SMRT 欠損マウスや培養細胞の解析において視細胞の増殖・分化やそれらの機能必須性は観察されなかった。そのため、視細胞においては PNR の転写制御能を担う未知コリプレッサーの存在が予想された。そこで、PNR の転写抑制能を担うコリプレッサーを探索する目的で Yeast two-hybrid screening を行い、新規コリプレッサーの同定に成功した。更にその複合体を精製により同定し、機能について解析した。

まず第一章では、Yeast two-hybrid screening の結果、新規の PNR 相互作用因子を単離した。この因子は 1194 アミノ酸から構成され、C 末端側にファミリー間で保存された Devh-box motif を持つことから、Dev-CoR と名付けた。Dev-CoR の N 末端側には CoRNR motif が存在した。実際、Dev-CoR の PNR に対する結合も、この CoRNR motif が必要であった。Dev-CoR の発現は、RT-PCR 法により様々な組織に見い出されたが、網膜組織における発現では、in-situ RT-PCR 法により、ONL に特異的であった。また、胚発生におけ

る眼球での Dev-CoR の発現は E12 から成体にかけて発現していることが明らかとなった。これは PNR の発現部位、時期と一致しており、Dev-CoR の発現は PNR と空間的、時間的に共存することが示唆された。

次に PNR に対する Dev-CoR のコリプレッサーとしての機能を、Dev-CoR 自身の転写制御能についてレポーターアッセイにより調べた。その結果、Dev-CoR は PNR の転写を協調的に抑制しており、一方 CoRNR motif 欠失変異体は PNR の転写抑制に影響しないことから、CoRNR motif を介して転写抑制能を発揮していることが示された。また、Dev-CoR の N 末端側に強い転写抑制能があり、核抽出液からこの領域にリクルートされる因子群を免疫沈降し、HDAC アッセイをしたところ、HDAC 活性が見い出された。以上より、Dev-CoR は PNR のコリプレッサーであり、HDAC を含んだ複合体を形成することが示唆された。

第二章では、PNR の Dev-CoR 複合体機能の解明を目的に、Dev-CoR 高発現 293F 細胞株を樹立し、その核抽出液から Dev-CoR を含む複合体を精製した。グリセロール密度勾配遠心法により分画したところ、約 1MDa の巨大複合体の存在が見い出され、この複合体には Dev-CoR を含め 15 種のタンパク質から構成されていた。MALDI-TOF-MS もしくはウェスタンブロットティングにより同定したところ、新規コリプレッサー複合体であることが明らかとなった。この複合体は、HDAC1/2 や HDAC3、NCoR/SMRT、Sin3A、RbAp46/48、TBL3 といった核内レセプターに関連した既知コリプレッサーに加え、p107 や RBBP2、RAP140、ING1、CDK9、Myb-binding protein1A といった細胞周期関連因子ならびに約 200KDa の未同定タンパク質を含む新規複合体であることが判明した。

PNR のコリプレッサーである Dev-CoR の複合体中に細胞周期関連因子である p107 などと同定し、PNR が RPCs の増殖抑制を誘導することから、Dev-CoR 複合体は PNR の転写制御を介した細胞増殖抑制制御能を担うことが予想された。そこで第三章では、Dev-CoR 自体の生理学的機能を解明するために、以下の実験を行なった。まず、colony formation assay により Dev-CoR の細胞増殖能につき検討したところ、細胞増殖を抑制する因子であることが示唆された。次に FACS 解析から、Dev-CoR 高発現細胞は G0/G1 期に停止している細胞の率が高まることが示唆された。M 期同調培養後の G1/S 移行期のマーカーである CyclinE の発現も Dev-CoR 高発現細胞で遅延することが明らかとなった。また、Dev-CoR タンパク質の発現自体も G1 前期にピークがあり、G1 前期の増殖制御因子であることが強く示された。これらの結果から、PNR の転写制御を介した RPCs の増殖抑制の制御においても、Rb/p107/HDAC 及び Myb 関連因子を含んだ Dev-CoR 複合体が寄与していることが示唆された。

以上、本論文は核内レセプター PNR の新規コリプレッサー及び複合体を単離、同定し、機能を解明しており、転写制御学、分子発生学いずれの分野においても発展性が期待され、学問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(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。