

論文の内容の要旨

論文題目 転写因子 Pax6 アイソフォームの機能解析

氏名 清水 奈穂

【序】

発生過程において眼、脳、膵臓の分化に重要な寄与を果たしている Pax6 は、paired box と呼ばれる高度に保存された DNA 結合モチーフを持つ転写因子である。Pax6 には 2 種類のスプライシングバリエント Pax6(WT)と Pax6(5a)が存在し、両者は exon 5a を含まないか含むかで異なる(図 1)。Paired box は PAI と RED のサブドメインにさらに分けられ、Pax6(WT)は PAI domain を介して、一方の Pax6(5a)は RED domain を介して、DNA と結合すると考えられている。Pax6(WT)については、眼形成のマスターコントロール遺伝子に代表される機能に加えて、下流で働く遺伝子群についての報告が複数なされるなど解析が進んでいる。一方、Pax6(5a)については、exon5a 部位や RED domain 内での変異による先天性疾患が報告されているものの、研究は始まったばかりであり不明な点が多い。

マウス胚性幹(ES)細胞は多分化能を有しており、*in vitro* において様々な細胞系列への分化誘導が可能であることが知られている。本論文では、この ES 細胞を利用して Pax6(5a)に依存する分化誘導系を確立し、そのときの遺伝子発現の変化を解析することで分子レベルでの Pax6(5a)の機能が解析されている。その結果、Pax6(5a)が特異的に bHLHb2, Pou5f1 へとつながる転写因子カスケードを介して、ES 細胞から神経細胞へ分化誘導する可能性が見出されている。

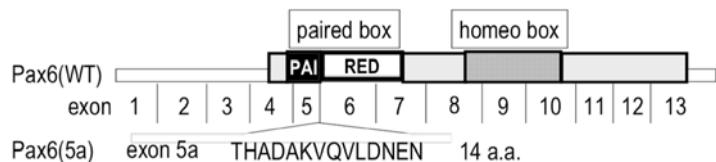


図1 Pax6遺伝子のスプライシングバリエント

【結果】

1. Pax6(5a)の発現制御が可能な ES 細胞株の樹立

Tet-off system は tetracyclin(Tet)の除去/添加により目的遺伝子の on/off 発現制御を可能にするシステムであ

る。この Tet-off system を ES 細胞に導入し、Tet によって Flag-tag を融合した Pax6(WT)および Pax6(5a)の発現制御が可能な ES 細胞株の樹立を試みた。その結果、RT-PCR により mRNA レベルで (図 2a)、また、ウェスタンブロッティング法によりタンパク質レベルで(図 2b)、Tet 添加の場合にはそれぞれ Pax6 の発現が抑制され、Tet の除去によりその発現が誘導されてくることを確認し、目的の細胞株の樹立に成功した。

2. Pax6(5a)依存的な神経細胞分化誘導系の確立

次に樹立した ES 細胞株を利用して、Pax6(5a)依存的な細胞分化誘導系の構築を試みた。未分化状態を維持するために ES 細胞は、通常は白血球阻害因子 (LIF) 存在下で単層培養されている。そこで、まず ES 細胞を分化させるために、単層培養のまま LIF を除去して、Tet 存在の有無それぞれにおいて分化を促した。しかし、形態的な観察による両者の差を得ることはできなかった。次に、初期胚を模倣していると考えられる胚様体 (embryoid body; EB) を形成させ浮遊培養することにした。EB を利用することで、様々な培養条件により三胚葉への分化誘導が可能であることが知られている。EB 形成後、分化開始 3 日目に繊維芽細胞増殖因子(basic FGF)を添加し、さらに 4 日後、ゼラチンコート処理をしたディッシュに接着させた。その結果、分化開始 10-11 日目(Day10-11)になると、Pax6(5a)依存的に EB から突起が伸長されていることを見出した(図 3)。神経細胞の分化マーカーである抗 β -III tubuline 抗体を用いて細胞染色を行ったところ、Pax6(5a)依存的に誘導された突起が陽性像を示した。さらに、RT-PCR により神経幹細胞のマーカーである Musashi の発現が、Pax6(5a)を発現した細胞でより強いことを見出した。

3. Pax6(5a)の細胞分化に寄与する時期の検討

細胞分化開始(Day0)から突起伸張が観察される Day11 までの過程において、Pax6(5a)が細胞分化に寄与する時期を検討した。まず Tet を除去して細胞分化を開始させ、次に一日ごとに日数を追って Tet を添加し、その影響を Day11 の EB からの突起伸張の割合を指標に検討した(図 4a)。その結果、Day3 以降まで Tet を除去すると、分化に大きな影響を与え

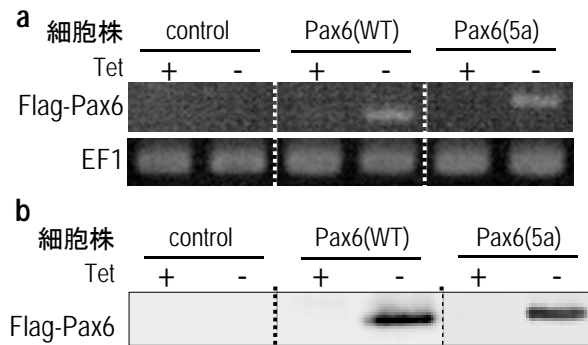


図2 Tetにより発現制御可能なES細胞株の樹立

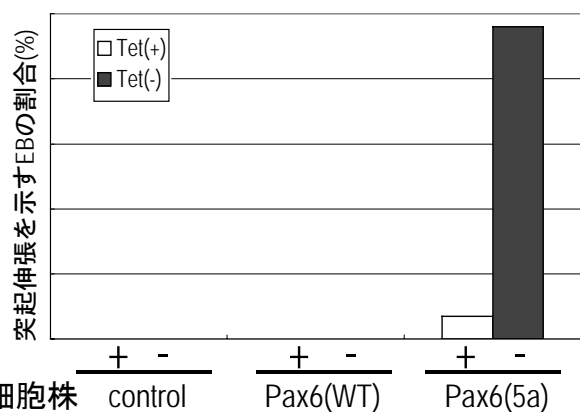


図3 Pax6(5a)依存的なEBからの突起伸張

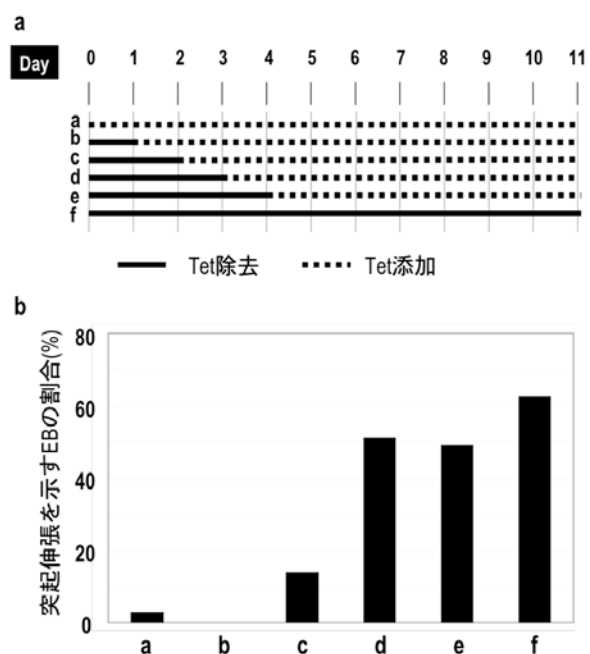


図4 Pax6(5a)の神経分化に及ぼす時期の検討

ることを見出した(図 4b)。このことから Pax6(5a)が分化に強い影響を及ぼすのは、Day2 以降であると考えられた。

4. DNA マイクロアレイによる Pax6(5a)下流で働く遺伝子の網羅的解析

次に神経細胞への分化過程において、Pax6(5a)の下流で変動している遺伝子を網羅的に調べる目的で、DNA マイクロアレイを行った。Tet を常に除去あるいは、最初の 2 日間のみ Tet を除去した二つの条件下において分化を誘導し、分化開始から 3 日目(Day3)および Day5 における遺伝子の発現変化を比較した(図 5○印)。

Pax6(5a)の下流で機能している候補遺伝子は、Pax6(5a)の発現を抑制後、両条件における発現量の差が拡大していくものと考えられる。そこでまず、Day3 と Day5 における遺伝子の発現量を比較し、上記の条件に適し、さらに外胚葉・神経分化に関与が知られているものを選出した。

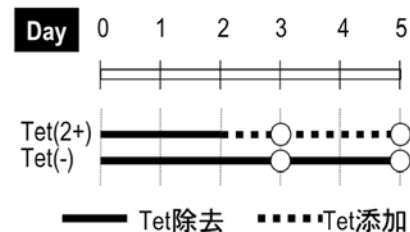


図5 DNAマイクロアレイによる解析

ES 細胞から神経細胞までの分化過程は、ES 細胞から外胚葉・神経幹細胞への初期分化、神経幹細胞の維持、神経幹細胞から神経細胞への分化成熟の段階に分けられると考えられる。そこで、先ほど選出した遺伝子が、どの段階で関与しているか過去の知見を元に分類を試みた結果、以下の三つのグループに大別できた(図 6)。

1) 初期分化や神経幹細胞の維持に寄与することが示唆されている Pou5f1 や Sox2 など、2) 初期外胚葉や神経幹細胞のマーカートして利用される Fgf5 や Ina など、3) 神経幹細胞からの成熟分化に関与していることが示唆されている Amigo や Nr-CAM など。これらのうち最も初期段階にはたらく Pou5f1, bHLHb2 などの遺伝子群 1) が Pax6(5a)の影響を受けていると考えられる。

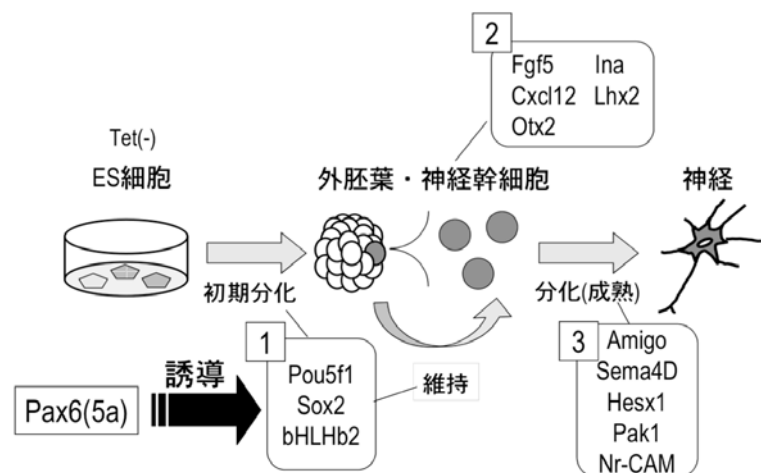


図6 神経分化において推測されるPax6(5a)の機能

5. Pax6(5a)により発現制御をうける遺伝子の検討

過去の知見から、bHLHb2 と Pou5f1 が Pax6(5a)の下流で最も初期に機能する可能性を考えた。そこで、まずマウスゲノムより bHLHb2 と Pou5f1 の上流をそれぞれクローニングし、それらに対する Pax6(5a)の影響を、HEK293T 細胞、Neuro2A 細胞、NTERA2 細胞を利用してレポーターアッセイにより検討した。その結果、Neuro2A 細胞と NTERA2 細胞において、bHLHb2 の発現を Pax6(5a)が制御、Pou5f1 の発現を bHLHb2 が制御している可能性を見出した。このとき、Pax6(WT)による bHLHb2 の制御の可能性について同様に検討した。その結果、bHLHb2 は Pax6(WT)による影響を受けなかった。以上より、bHLHb2 の発現制御は Pax6(5a)に特異的であることが示唆された。

【まとめ】

本研究において私は、Pax6 遺伝子に存在するスプライシングバリエント Pax6(5a)に特異的な機能解析を、ES 細胞を用いて行った。まず tetracycline により Pax6(WT)および Pax6(5a)の発現制御が可能な ES 細胞株を樹立した。次に、これらの細胞株を利用して Pax6(5a)依存的な分化系の構築を試み、EB を利用することで Pax6(5a)依存的に神経細胞へ分化する系の構築に成功した。さらに Pax6(5a)の下流で働く遺伝子を調べるために、ES 細胞から神経の分化過程において Pax6(5a)が必要である時期を検討し、その時期における遺伝子発現の差を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、未分化な細胞から神経細胞への分化を促進したり、神経幹細胞の維持に寄与したりすることが知られている bHLHb2 や Pou5f1 の発現を、Pax6(5a)が制御している可能性が示唆された。次に、bHLHb2 と Pou5f1 の発現を Pax6(5a)が制御しているのか、レポーターアッセイにより検討したところ、bHLHb2 の発現を Pax6(5a)が、Pou5f1 の発現を bHLHb2 が制御している可能性を見出した。このとき bHLHb2 の発現は Pax6(WT)には影響を受けず、Pax6(5a)特異的であった。また、bHLHb2 の Pax6(5a)による発現制御は Neuro2A 細胞や、NTERA2 細胞では観察されたが、HEK293T 細胞では観察されなかった。先に、単層で分化させた場合には神経細胞への分化誘導が観察されなかった結果とあわせて考え、Pax6(5a)が機能するためには、ある「場」が提供されることが必要であると考えられる。

以上より、次の様なモデルが考えられる。まず、未分化な ES 細胞から LIF を除去し、EB を形成させることで分化を促すシグナルが生じる。さらに Tet を除去し、Pax6(5a)の発現を誘導すると、Pax6(5a)が bHLHb2 の発現を誘導する。bHLHb2 は ES 細胞から外胚葉への分化を促進する。次いで、bHLHb2 は Pou5f1 の発現を誘導する。Pou5f1 は外胚葉から神経幹細胞への分化を促進したり、神経幹細胞への維持に寄与したりする。そして最終的に神経細胞へと成熟分化していく、というものである (図 7)。

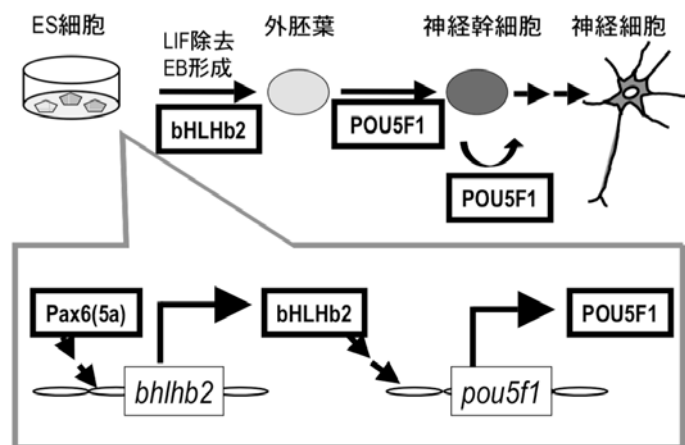


図7 Pax6(5a)による神経細胞誘導のモデル

Pax6(5a)に関して、神経細胞への運命付けが生じるよりも早い時期における機能や、神経細胞への分化過程における Pax6(5a)の下流因子についての知見はこれまでに例がなく、今回が初めての報告となる。