

## 審査結果の要旨

氏名 清水 奈穂

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転写因子 Pax6 は、paired box と呼ばれる高度に保存された DNA 結合モチーフを有する。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。Paired box はさらに PAI と RED のサブドメインに分けられ、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、下流で働く遺伝子群について多くの報告があり、解析が進んでいる。一方、Pax6(5a)については、exon 5a 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。「転写因子 Pax6 アイソフォームの機能解析」と題する本論文においては、Pax6 の発現制御が可能な ES 細胞株を樹立し、それを利用することで Pax6(5a)が特異的に ES 細胞から神経細胞への分化誘導を促進することを見出している。さらに、神経細胞への分化誘導に際して、Pax6(5a)が bHLHb2、Pou5f1 に続く転写因子カスケードを制御している可能性を提示している。

### 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 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。RT-PCR により mRNA レベルで、さらに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、Tet による発現制御を確認している。

### 2. Pax6(5a)の発現に依存した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)の発現に依存する細胞分化誘導系の構築を試みた。ES 細胞からの *in vitro* 分化誘導系に、初期胚を模倣していると考えられる胚様体 (embryoid body; EB)を形成させる三次元培養法がある。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。Pax6(5a)を発現させた結果、分化開始 10-11 日目(Day 10-11)になると、Pax6(5a)に依存して EB から突起が伸長されていることを見出した。神経細胞の分化マーカーである抗  $\beta$  III チューブリン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。この結果から、Pax6(5a)が ES 細胞から神経細胞への分化を促進していると考えられる。

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

次に ES 細胞から神経細胞までの分化過程において、Pax6(5a)が細胞分化に強く寄与す

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、その影響を分化開始から Day 11 の EB からの突起伸張の割合を指標に検討した結果、Pax6(5a)が分化に強い影響を与える時期は、Day 2以降であると考えられた。次に、上記の時期において Pax6(5a)に依存して変動する遺伝子を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。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類が可能と考えられる。そこで、変動を示した因子の中から外胚葉・神経分化に関与が知られているものを選出し、どの段階で関与しているかを過去の知見を元に分類を試みた。その結果、A) 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、B) 初期外胚葉や神経幹細胞のマーカースとして利用される Fgf5 や Ina など、C) 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 などに分類された。これらのうち、Pax6(5a)は最も初期段階にはたらく Pou5f1、bHLHb2 などの遺伝子群 A に対して影響を与えると考えられた。

#### 4. Pax6(5a)により発現制御をうける遺伝子の解析

DNA マイクロアレイの解析結果から、Pax6(5a)は bHLHb2 と Pou5f1 の発現を制御している可能性を考えた。マウスゲノムより bHLHb2 と Pou5f1 の上流域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、レポーターアッセイにより検討した。その結果、Pax6(5a)は bHLHb2 の発現を、さらに bHLHb2 は Pou5f1 の発現を制御している可能性を見出した。このとき、Pax6(WT)による bHLHb2 の発現制御の可能性について同様に検討したが、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された。

本論文から、ES 細胞から神経細胞までの分化過程において、次の様なモデルが提示される。1) 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。2) ここへ Pax6(5a)の発現を誘導すると、Pax6(5a)が bHLHb2 の発現を誘導する。3) bHLHb2 は ES 細胞から外胚葉への分化を促進する。4) 次いで、bHLHb2 は Pou5f1 の発現を誘導する。5) 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。6) そして最終的に神経細胞へと成熟分化を促す。これらの転写因子群は、マウス胎児脳に存在する神経幹細胞に共通して発現しており、今回示した転写のカスケードは発生過程においても機能していると考えられる。

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 Pax6(5a)の機能や、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、本論文が初めての報告となる。以上のように、本論文は Pax6(5a)の機能及び下流の支配機構に対して新たな知見を与えると共に、神経の発生機構の解明に有用な情報を提供しており、博士(薬学)の学位として十分な価値があるものと認められる。