

## 審査の結果の要旨

氏名 星川 慎弥

本研究は末梢神経のミエリンを形成し伝導機能の維持、恒常性の維持に重要な働きをするシュワン細胞の分化機構を解明するために、ミエリン形成初期に上昇するシュワン細胞の分化マーカーでありミエリンの構成蛋白である Myelin-associated glycoprotein (MAG) の遺伝子プロモーターの解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

1. ラットゲノム遺伝子の MAG 遺伝子プロモーター領域をルシフェラーゼベクターに組み込み、デリーション解析を行うことにより、MAG 遺伝子転写活性を高めるシスエレメントを新規に同定した。その配列は 5' -acaagggccccctttgtgccc-3' の 20 塩基であり、シュワン細胞特異的に作用し、種間（ヒト、ラット、マウス）で完全に保存されていた。また、既知の転写因子の結合コンセンサスを含んでいなかった。このシスエレメントを含む 2 本鎖 DNA プローブ (DIG 標識) およびシュワン細胞核抽出蛋白を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、DNA-蛋白複合体のバンドが観察され、シスエレメントとシュワン細胞核蛋白の結合が示された。
2. シスエレメントに結合し、MAG 遺伝子転写活性を高める蛋白を同定するため、酵母ワンハイブリッドスクリーニングを行った。シュワン細胞の mRNA より作成したライブラリープラスミド由来の蛋白、およびシスエレメントをベイトに持つレポータープラスミドの相互作用で、栄養欠乏培地での酵母のコロニー生育が見られる。陽性コロニー 800 検体からライブラリープラスミドを回収し、シークエンス解析を行った。得られた候補遺伝子をシュワン細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、MAG 転写活性を高める蛋白として、RING finger protein 10 (RNF10) を新規に同定した。

3. RNF10 の機能解析を行った。in vitro 翻訳により合成した RNF10 を用いてゲルシフトアッセイを行い、シスエレメントと RNF10 の結合が示された。RNF10 を強制発現させたシュワン細胞および ROS 細胞 (Rat Osteoblast cell line) で、ルシフェラーゼアッセイを行うとシスエレメントの存在時のみ活性の上昇が見られ、RNF10 がシスエレメントに作用し MAG の転写活性を高めていることが示された。また、RNF10 の RING ドメインを欠失させた変異体では活性の上昇は見られず、同ドメインが転写活性化に必要であることが示された。HA-RNF10 を発現させたシュワン細胞の免疫染色により RNF10 の核局在が示され、転写への関与を支持するものであった。

RNAi 技術を用いてシュワン細胞において RNF10 をノックダウンしたところ、ルシフェラーゼアッセイで活性の上昇を示さなかった。また、MAG の発現は mRNA レベル(リアルタイム PCR)、蛋白レベル(ウエスタンブロット)、共に抑制されており、RNF10 が MAG 転写活性化・発現に必須の因子であることが示された。In vitro ミエリン形成アッセイにおいて、RNF10 をノックダウンしたシュワン細胞では、ミエリン形成が著しく抑制されており、RNF10 は MAG の転写調節および、シュワン細胞分化の最終形態であるミエリン形成に重要な因子であることが示された。

以上、本論文は MAG 遺伝子プロモーター解析により、MAG 遺伝子におけるシュワン細胞特異的な新規のシスエレメントを同定した。また、シスエレメントに結合し転写制御を行う蛋白 RNF10 の存在を明らかにし、MAG の発現、ミエリン形成に重要な働きをしていることを示した。本研究はいまだ未知の部分が多いシュワン細胞分化、ミエリン形成における転写制御の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。