学位論文の要旨

Transcriptional programs in neural development and diseases
神経の発生と遺伝病に関わる転写プログラム

團野 宏樹

研究 1. 眼形成不全の原因遺伝子間の分子的関係

我々脊椎動物は, 外界の情報を得るために眼という神経性の器官を発達させてきた。眼は, 明るさ, 色, 濃淡, 形など, 様々な外部情報の受容と伝達の役割を担う, 複雑な機能と構造を有する器官である。そのため, 眼は秩序ある発生プログラムによって形成される必要がある。発生段階において, 予定脳領域の一部が左右に突出し, 表皮と相互作用することにより眼胞が形成される。眼胞は成長因子などの細胞外環境の受容と, 様々な転写因子の発現による細胞内状態の変化によって, 眼胞内でのさらなる領域化と発生運命の決定を行う。そのような複雑な発生プログラムになんらかの異常が起こると, 眼の形成不全が引き起こされる。ヒトの重篤な先天性眼形成不全として, 小眼球症と無眼球症が知られており, 約 5000 人に 1 人の割合で認められる。これらの原因遺伝子として, 高度に保存された転写因子コード遺伝子 *Sox2*, *Otx2*, *Rax* などが同定されている。しかし, 原因遺伝子同士がどのような関係をもって眼の発生を制御しているのかは不明であった。そこで私は, ヒト眼形成不全の原因遺伝子間の分子的な関係を探ることによって, ヒトの眼の発生プログラムの一端を明らかにすることを目指した (図 1A)。

私は最初に, *Rax* 遺伝子の上流制御に注目して比較ゲノム解析を行った。*Rax* 遺伝子周辺ゲノムをヒト, イヌ, ネズミ, ニワトリ, カエルなどで比較したところ, 転写開始点の約 2000 塩基対上流に, 遺伝子をコードしないにも関わらず保存された配列 CNS（conserved noncoding sequence, 以下 CNS1）が存在していた。アフリカツメガエルを用いた二種類のレポーターアッセイにより, CNS1 は予定眼領域で *Rax* の転写を誘導するシス制御活性を有することが明らかとなった。

より詳細に見ると, CNS1 は特に保存された 35 塩基対の配列を含んでいた。この配列の中には完全に保存された Otx 結合予想配列と Sox 結合予想配列が存在していた。ヒトの眼の形成不全の原因遺伝子として, *Rax*, *Otx2*, *Sox2* がこれまでに同定されていたことから, 私は, 「Otx2 と Sox2 タンパク質が CNS1 へ直接結合することにより *Rax* の転写を制御する」という仮説をたてた。

まずゲルシフトアッセイにより, *in vitro* で Otx2 と Sox2 タンパク質が CNS1 中の結合予想配列に結合することを確かめた。さらに, *in vivo* でこれらのタンパク質が CNS1 に結合しているのかを調査するために, Otx2 と Sox2 タンパク質に対する抗体を用いて, ツメガエルの神経胚頭部領域からのクロマチン免疫沈降アッセイを行った。その結果, 胚発生において, 内在性の Otx2 と Sox2 タンパク質が CNS1 に実際に結合していることが明らかになった。

次に, ツメガエルの細胞とヒト腎臓由来培養細胞 HEK293T を用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ, Otx2 単独又は Sox2 単独の過剰発現は *Rax* レポーターの転写を誘導しないが, Otx2 と Sox2 の両方の同時過剰発現は *Rax* レポーターの転写を活性化することが明らかとなった。

Otx2 と Sox2 タンパク質が *Rax* の転写活性化に関して協調性を有していたことと, CNS1 における Otx 結合配列と Sox 結合配列の間の距離が短く (6 塩基対) また距離が脊椎動物間で保存されていることから, Otx2 と Sox2 タンパク質が複合体を形成することが予想された。GST プルダウンアッセイと共免疫沈降法により, *in vitro* と *in vivo* で, Otx2 と Sox2 が生化学的に相互作用することが明らかとなった。また, ヒトで同定された眼形成不全の原因となる Sox2 のミスセンス変異は, Sox2 と Otx2 による *Rax* の制御に影響を与えることが確かめられた。

ここまでの結果により, 「Otx2 と Sox2 タンパク質が互いに直接相互作用し, シス制御配列である CNS1 を介して相互依存的に *Rax* の転写を活性化する」という, ヒトを含む脊椎動物で保存された遺伝子とシス制御配列からなる眼の発生プログラムが明らかになった (図 1B)。

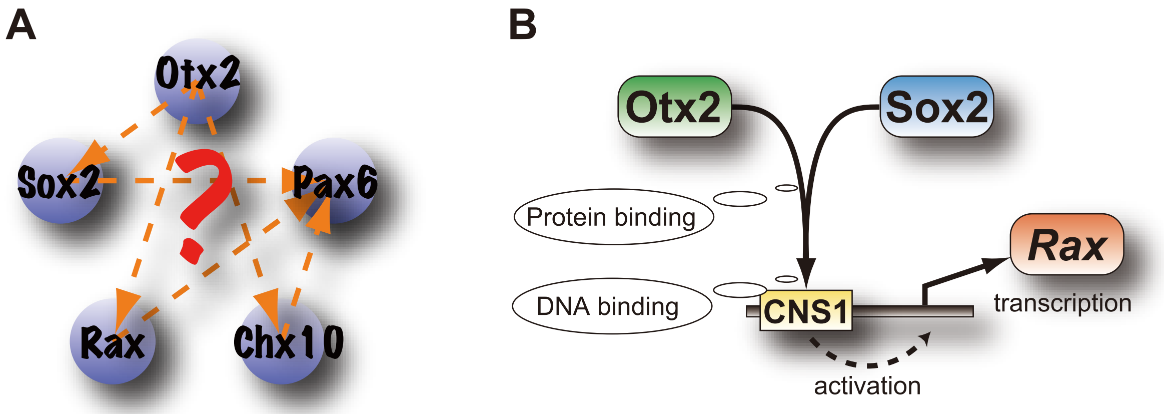

図 1: (**A**) ヒトの眼の形成不全の原因遺伝子として複数の遺伝子が同定されてきた。しかし, それらの関係は明らかでない。私はヒトの眼の形成不全の原因遺伝子間の関係を探ることによって, ヒトの眼の発生と遺伝病の分子プログラムを明らかにすることを目指した。(**B**) ヒトの遺伝病の知見, カエル胚を用いた操作性の高い実験, そして比較ゲノム解析を組み合わせることによって明らかになったヒト眼形成不全原因遺伝子間の分子的関係。転写因子 Otx2 と Sox2 が互いに相互作用し, 進化的に保存されたシス制御配列である CNS1 を介して相互依存的に *Rax* の転写を活性化する。

研究 2. 転写因子 Otx2 に支配される眼と脳の転写プログラムの同定

研究 1 により, 転写因子 Otx2 が眼の発生と遺伝病に関わる転写プログラムを上流で制御していることが明らかになったが, Otx2 の変異は眼の形成不全だけでなく, 脳の形成不全, 双極性障害, 学習不全などを引き起こすことが知られていることから, Otx2 は脳の発生と遺伝病に関わる転写プログラムをも制御していると考えられた。そこで私は研究 2 において, 脳における Otx2 の標的遺伝子を包括的解析技術により同定することを目指した。同様のアプローチにより, 眼の発生と遺伝病に関わる, *Rax* 以外の標的遺伝子の同定も行うことができると考えられる。

私は Otx2 を哺乳類の神経前駆細胞に過剰発現させ, その細胞の遺伝子発現の変化をマイクロアレイによって解析することにした。発生中の哺乳類胚の予定神経細胞に時空間的に統制して遺伝子の過剰発現を行い, そこから精度の高い遺伝子発現プロファイルを得るのは技術的に困難である。そこで私は, *in vitro* で神経の前駆細胞に分化させたマウス胚性幹細胞に, Otx2 を薬剤誘導により過剰発現させるという方法を用いた。

定量的 PCR 法によるマウス胚性幹細胞の無血清培養条件のスクリーニングの結果, 培養液に白血病抑制因子, レチノイン酸および繊維芽細胞成長因子のいずれも含まれない無血清培地

中においてラミニン上で培養した胚性幹細胞は, 神経の前駆細胞に分化運命が方向付けられることがわかった。

また, 時間的に Otx2 の過剰発現を制御するために, テトラサイクリンの除去で *Otx2* の転写発現を制御可能な胚性幹細胞株を樹立した。この細胞を選定した培養条件で神経の前駆細胞に分化誘導し, 4 日間の培養後, テトラサイクリンの存在化または非存在化でさらに 2 日間培養し, RNA を抽出した。本マイクロアレイ解析においては 2 回の生物学的反復及び 2 回の技術的反復を行っている。線形モデルと経験ベイズ法を用いた解析から, 複数の Otx2 の標的遺伝子候補が見出された。標的遺伝子候補のうち 12 個については定量的 PCR 法により, Otx2 による遺伝子発現誘導に確証を与えた。また, これらの遺伝子は有意に脳や眼に関係する機能アノテーションが関連付けられていたことから, 本探索の有効性が示された。標的遺伝子の第 1 候補となった *Nr2e1* は, *Otx2* とともにその変異が双極性障害の危険因子として二つの独立した先行研究にて見出されていたことから, 本研究で同定された転写制御関係が双極性障害に深く関わっている可能性が考えられる。さらに, 得られたマイクロアレイデータを用いて, その変異が眼の形成不全の原因であることが示されている, または可能性が考えられている合計 12 個の遺伝子の発現が Otx2 によっていかに制御されているかについても調査し, 研究 1 で明らかとなった転写制御関係をより拡張することに成功した。

In vitro 分化系, 薬剤誘導性過剰発現系, 及びマイクロアレイ解析を組み合わせた本研究は, 時空間的な統制を行った *in vitro* 実験系と, そこから得られる定量的データの統計解析が, 発生や遺伝病などに関わる *in vivo* の遺伝子プログラムの同定と解析に有用であることを示している。この戦略により, 転写因子 Otx2 が眼と脳の発生とその遺伝病に関わる転写プログラムをいかに支配しているかが明らかになった。