

[別 紙 2]

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 横山敦

多細胞生物の正常な発生と臓器形成には、遺伝子発現の時期・組織特異的な制御が伴う。この遺伝子発現制御は DNA 結合性転写因子がリクルートする転写共役因子複合体によるクロマチン構造調節を介して行われている。

クロマチン構造調節は、ヒストンの翻訳後修飾と、ヌクレオソームの再構築とに大別され、それぞれ特異的な転写共役因子群によって担われている。転写共役因子群は、核内で複合体を形成することで協調的に機能し、選択的なクロマチン構造調節を行うと考えられている。即ち、転写共役因子は、複合体を形成することで基質特異性や酵素活性、さらには複合体安定化等の多様な制御機構を獲得しているといえる。しかしながら、個々の複合体の制御機構や、生物学的意義は殆ど不明であり、複合体レベルでの生化学的な解析が待たれる。本研究では、神経細胞の分化系をモデルに、神経分化制御を担う転写共役因子複合体を生化学的手法で単離・同定しその機能解析を試みている。

第一章の序論に引き続き、第二章では視神経由来細胞株を用いて、神経転写共役因子複合体の生化学的な同定を試みている。具体的には、神経幹細胞特異的に発現し未分化維持に働くことが知られるオーファン核内受容体 TLX をベイトとし結合因子を生化学的に探索した。その結果、ヒストン脱メチル化酵素として知られる因子 LSD1 (Lysine specific demethylase 1) を同定した。また、レポータープラスミドを染色体に組み込んだクロマチンルックアッセイ、クロマチン免疫沈降アッセイ等の解析により、LSD1 複合体が TLX の転写抑制活性を担う転写共役抑制因子複合体であることを明らかにした。

第三章では、Neuro2a 細胞を用いた分化系において、LSD1 が分化過程を通じて発現することを見出し、LSD1 の神経分化過程における機能について解析している。その結果、LSD1 は神経分化時には分化促進に働くことを見出した。また、LSD1 による分化促進を説明する因子取得のために、Neuro2a 細胞を用いた LSD1 相互作用因子の生化学的探索を行い、LSD1 相互作用因子として転写因子としての機能が予想される因子 NZF2 (Neural zinc finger factor 2) を見出し、NZF2 がやはり神経分化に必須の因子であることを見出している。また、マウス各臓器由来 cDNA を用いたリアルタイム PCR により NZF2 が脳組織特異的に発現することを見出した。さらに、Neuro2a 細胞でのクロマチン免疫沈降アッセイにより、NZF2 の標的遺伝子の一つとして神経分化の鍵因子である Mash1 を見出し、NZF2 による神経分化促進の一端は Mash1 遺伝子の誘導であることが示唆された。最後に、免疫沈降実験から、NZF2 を含んだ LSD1 複合体の構成因子が分化過程において変化する可能性を示している。

第四章では、転写共役因子の複合体としての機能を解析するための実験系として、クロマチンテンプレートを用いた *in vitro* 転写系の構築を行っている。フランス IGBMC の Laszlo Tora 博士との共同研究により、再現性よく *in vitro* においてクロマチンテンプレートを用いた転写反応を行う実験系の構築に成功した。

本論文は、神経細胞の分化系をモデルとした生化学的な解析から、クロマチン構造調節を担うヒストン修飾因子複合体の同定に成功した。本研究は、神経細胞を材料とした生化学的解析の新たな試みであり、生体内における時期・組織特異的な転写制御における染色体構造調節の理解に繋がるものであると期待される。以上より、審査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。