



Title	Regulation of Neuronal Differentiation by Interactions of Necdin with E2Fs
Author(s)	小林, 正克
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44058">https://hdl.handle.net/11094/44058</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	小 林 正 克 こ ばやし まさ かつ
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 3 8 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 14 年 12 月 27 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学 位 論 文 名	Regulation of Neuronal Differentiation by Interactions of Necdin with E2Fs (Necdin と E2F の相互作用による神経分化制御機構)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉 川 和 明 (副査) 教 授 岡 田 雅 人 教 授 関 口 清 俊

### 論 文 内 容 の 要 旨

Necdin は、マウス P19 胚性ガン細胞が神経分化する際に発現する遺伝子産物として発見された。Necdin 結合蛋白質である転写因子 E2F1 や p53 は、細胞周期やアポトーシスに関係することから、Necdin が神経細胞の増殖や生存に深く関与することが示唆されている。しかし、実際に Necdin が果たす神経分化における役割は未だ明確ではない。今回、私は神経分化の研究に有用であるマウス神経芽細胞腫 N1E-115 細胞を用いて、Necdin による神経分化機構を E2F との相互作用を中心に解析を行った。

#### 1. マウスニューロblastoma細胞の分化に伴う蛋白質の発現変化

Dimethyl sulfoxide (DMSO) を用いた分化誘導に伴うマウスニューロblastoma N1E-115 細胞の形態変化、ならびに神経分化マーカー蛋白質の発現量の変動を調べた。N1E-115 細胞は DMSO 処理により細胞増殖が停止し、細胞体の平坦化、神経突起伸展などの分化形態を示した。さらに、DMSO 処理時間に伴い神経分化マーカーとして用いた Synaptophysin と Synaptotagmin の発現が上昇した。また、細胞周期調節などに重要な Rb ファミリー蛋白質の蛋白質発現を解析したところ、分化に伴い p107 は減少し、p130 は増加した。さらに、E2F 結合配列への結合活性を検討したところ、分化に伴い p107-E2F 複合体は減少したが、p130-E2F 複合体は増加していた。また、N1E-115 細胞では Necdin の発現は検出できなかった。

#### 2. Necdin の異所性発現による神経分化形質の誘導

未分化 N1E-115 細胞に necdin cDNA を強制発現させると神経突起伸展が見られた。Necdin 発現細胞において、Synaptophysin と Synaptotagmin の発現が上昇しており、E2F1 依存性遺伝子である cdc2 や cyclinA1 の発現が抑制されていた。また、Necdin 発現細胞における Rb ファミリー蛋白質の発現変動および E2F 結合配列に対する結合活性は、分化した N1E-115 細胞に類似していた。これらの Necdin による変化は、E2F1 と結合できない変異体 Necdin ΔN では確認できないため、E2F1 との相互作用が Necdin による神経分化に関与することが示唆された。

#### 3. Necdin と E2F との相互作用および Necdin に対する E2F1 の拮抗作用

転写因子 E2F1 は細胞分化を抑制するが、E2F4 は細胞分化を促進することが報告されている。Necdin と E2F1 および E2F4 との結合を検討したところ、E2F1 および E2F4 の C 末端に存在する転写活性化領域と結合することが明

らかになった。Necdin は、E2F 依存性遺伝子の一つである DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の E2F1 および E2F4 による転写を阻害した。Necdin は N1E-115 細胞の増殖を抑制し、E2F1 は Necdin による増殖抑制作用に拮抗した。また、E2F1 は Necdin による神経突起伸長に対して拮抗した。一方、E2F4 はこれらの Necdin による作用に拮抗しなかった。以上より、N1E-115 細胞において、Necdin は E2F1 依存性遺伝子発現を阻害することにより細胞の増殖を抑制し、神経分化を誘導することが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

Necdin は、分化した神経細胞に発現し、細胞増殖を抑制する作用をもつ蛋白質である。Necdin は細胞周期調節に重要な働きをする転写因子 E2F1 に結合し、その転写活性機能を阻害することが既に明らかにされている。E2F1 は、細胞増殖や細胞死に関連する重要な転写因子であり、Necdin は E2F1 との相互作用を介して神経細胞の増殖抑制や生存を促すことが示唆される。しかし、Necdin が神経分化過程において実際に E2F1 と相互作用をして、神経分化に影響を及ぼすかについては明らかではなかった。本論文は神経分化の研究に有用であるマウス神経芽細胞腫 N1E-115 細胞への遺伝子導入法を用いて、Necdin による神経分化機構を E2F1 との相互作用を中心に解析したものである。Necdin cDNA を未分化状態の N1E-115 細胞に導入すると、細胞増殖抑制と共に神経突起伸長が起こり、シナプスの分化マーカー蛋白質が発現した。また、細胞周期制御因子である Rb ファミリー蛋白質 (Rb, p107, p130)、E2F1、E2F4、cdc2、cyclinA1 の発現、および E2F 結合配列を用いたゲルシフトアッセイのパターンは神経分化した N1E-115 細胞での変化と類似していた。Necdin は細胞内で E2F1 および E2F4 と複合体を形成したが、Necdin による細胞増殖抑制作用と神経突起伸長作用に拮抗するのは E2F1 のみであった。以上の結果より、Necdin は神経分化過程において E2F1 の作用と拮抗することによって、細胞増殖を抑制し、神経分化を誘導することが示唆される。本論文は Necdin が E2F1 との相互作用によって、神経分化を制御することを始めて明らかにしたものであり、博士 (理学) の学位論文として十分価値のあるものと認める。