



Title	Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells
Author(s)	田中, 真哉
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45638
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	田中 真哉
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 19072 号
学位授与年月日	平成 16 年 12 月 10 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	Interplay of SOX and POU factors in regulation of the <i>Nestin</i> gene in neural primordial cells (神経原基細胞における Nestin 遺伝子の SOX および POU 因子による協調的制御)
論文審査委員	(主査) 教授 近藤 寿人 (副査) 教授 吉川 和明 教授 八木 健

論文内容の要旨

神経系はニューロンやグリア細胞から構成され、神経幹細胞はそれらの細胞へと分化することができる未分化な細胞である。神経幹細胞の性質を規定している転写制御系を理解するため、Nestin 遺伝子の転写制御領域（エンハンサー）の転写制御機構を解析した。Nestin は中間径フィラメントタンパク質であり、神経系において神経幹細胞特異的に発現される。また、転写制御因子 SOX2 も神経幹細胞特異的に発現されることが知られている。

McKay らは、Nestin の神経幹細胞での発現をもたらすエンハンサーはその第 2 イントロンに存在し、そのエンハンサーには、転写制御因子である POU 因子の結合部位が必要であり、また、その部位に POU 因子の Class III (POU III) に属するタンパク質が結合することを明らかにしていた。私は、POU 因子結合部位の隣に SOX 結合部位が存在しており、SOX2 タンパク質がその部位に結合することを確認した。ニワトリ胚に Nestin エンハンサー (258 bp) と EGFP 遺伝子を連結したレポーター遺伝子を導入したところ、野生型エンハンサーはニワトリ神経管において活性を有していたが、SOX あるいは POU 因子の結合部位に変異を導入したエンハンサーは活性を失った。このことから、Nestin エンハンサーの活性化に POU 因子結合部位だけでなく SOX 結合部位も必要であることが明らかになった。

Nestin エンハンサーの SOX 結合部位と POU 因子結合部位を含む 30 bp の領域 (Nes30) がエンハンサー活性を有しているかどうかを調べるために、Nes30 にルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーター遺伝子を数種の培養細胞に導入し、その活性を調べた。Nes30 は神経系の細胞で特異的に活性化され、この 30 bp の領域が Nestin エンハンサーのコア領域であることが明らかになった。エンハンサー活性が見られなかった細胞に、外的に SOX2 と Brn2 (POU III の一つ) を導入すると Nes30 は相乗的に活性化された。SOX2 と Brn2 のタンパク質は、in vitro で Nes30 に同時に結合した。Nes30 の SOX および POU 因子結合部位の位置を入れ替えた変異エンハンサー、および、それぞれの結合部位間に 10 bp の塩基を挿入した変異エンハンサーはどちらも活性化されなかった。これらのことから、SOX2 と Brn2 が Nestin エンハンサーに結合し、タンパク質間で協調的に作用し、Nestin エンハンサーを制御していることが示された。

次に、どの SOX あるいはどの POU 因子が Nes30 を活性化するかを調べたところ、SOX1/2/3 および SOX11 と Brn1/Brn2/Brn4/Oct6 (すべて POU III) のすべての組み合わせが Nes30 を活性化した。これらの活性化した SOX

および POU 因子と Nestin の胚における発現の関係を知るため、SOX1/2/3、SOX11、Brn2、Nestin のマウス胚脊髄における発現を調べた。脳室層では、SOX1/2/3 と Brn2 が発現しており、脳室下層では SOX11 と Brn2 が発現していた。Nestin は脳室層と脳室下層で発現されていた。このことから、Nestin の発現は脳室層において、SOX1/2/3 と Brn2、脳室下層で SOX11 と Brn2 により制御されていると考えられた。Brn2 タンパク質は、脳室層、脳室下層で核内に存在していたが、中間層では細胞質に存在していたことから、脳室層、脳室下層における Nestin の発現制御には、Brn2 タンパク質の細胞内局在も大きく関与していることが示された。

以上のことから、ネスチン発現細胞は、SOX1/2/3 (SOX Group B1) と Brn2 (POU III) により制御される脳室層の細胞と、SOX11 (SOX Group C) と Brn2 (POU III) により脳室下層の細胞とに分けられ、神経原基細胞として2つのタイプの細胞であると考えられた。この2種の神経原基細胞で、異なる組み合わせの SOX と POU 因子の協調的な制御が、Nestin を含む細胞特異的な遺伝子の発現を調節し、未分化な神経系細胞の性質を決めていると考えている。

論文審査の結果の要旨

中間径フィラメント蛋白質の一つ Nestin は、胚の時期から成体にいたるまで神経系の幹細胞で発現され、神経幹細胞のマーカーとして認識されている。一方、転写制御因子 SOX2 も神経系の幹細胞で発現されていることが知られている。

申請者田中真哉は、これらの遺伝子発現の関連を明らかにすることによって、神経幹細胞の性質を明らかにできると考え、胚の神経原基（神経幹細胞を含む胚の神経前駆体）における Nestin 遺伝子の発現制御を解析した。そして(1)Nestin 遺伝子の神経系での発現が、SOX と POU 転写制御因子の複合体によって直接に制御されていること、(2)このエンハンサーを活性化する組合せが、B1 グループの SOX (SOX2 など) とクラス III POU 因子 (Brn2 など)、あるいは C グループの SOX (SOX11 など) とクラス III POU 因子に限られることを見出した。

申請者はさらに胚の脊髄におけるこれらの転写制御因子の発現を解析して、次の結論に達した。(1)胚の神経幹細胞層である脳室層では B1 グループ SOX とクラス III POU 因子の複合体によって Nestin 遺伝子が活性化される。(2)その外側に位置して未分化な神経前駆細胞からなると考えられている脳室下層でも Nestin 遺伝子が発現されるが、それは C グループ SOX とクラス III POU 因子による遺伝子活性化に対応する。

(3)神経分化が開始される、より外側の中間層では、C グループ SOX とクラス III POU 因子が依然として発現されているが、そこではクラス III POU 因子が核から排除されて転写制御活性を失うことが神経分化の一要因である。

申請者の研究成果は、Nestin を発現する神経系原基が SOX2 などに支配される状態と、SOX11 などに支配される状態の2つの状態を含むことを示し、後者からの神経分化にはクラス III POU 因子の細胞内局在の調節が関与するという新しい制御機構を発見したものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。