The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Regulatory mechanisms of neuronal and myogenic differentiation by interactions of necdin with Dlx and Msx homeodomain proteins
Author(s)	桑島, 孝明
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46500
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

【61】

氏　　名	桑島孝明（くわじまたかあき）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学位記番号	第　20031　号
学位授与年月日	平成18年3月24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	Regulatory mechanisms of neuronal and myogenic differentiation by interactions of necdin with Dlx and Msx homeodomain proteins （NecdinとDlx/Msxホメオドメイン蛋白質の相互作用によるニューロンおよび筋細胞分化の制御機構）
論文審査委員	（主査） 教　授　吉川　和明 （副査） 教　授　永井　克也　　教　授　岡田　雅人

論文内容の要旨

Necdin は、分裂終了したニューロンや骨格筋に発現し、これらの細胞の最終分化状態の安定化に重要な役割を果たすものと考えられている。Necdin は MAGE（melanoma antigen）ファミリーに属するが、このファミリーの蛋白質の機能については不明な点が多い。MAGE-D1（以下 D1）は、Dlx/Msx ファミリーホメオドメイン蛋白質と結合する新規の MAGE ファミリー蛋白質として同定された。D1 は C 末端側に Necdin と相同性の高い領域（MHD；MAGE homology domain）を持ち、この部位で Necdin と結合する可能性がある。そこで本研究では、Necdin は D1 との結合を介して、Dlx/Msx ファミリーホメオドメイン蛋白質の機能に影響を与えるかを検討した。

① Necdin の Msx を介した筋細胞分化の制御

D1 には MHD とは別に存在する WQxPxx 繰り返し領域を介して Msx2 と結合することが報告されている。そこで、Necdin、D1、Msx の三者の複合体が形成されるかを調べたところ、D1 は MHD を介して Necdin と、WQxPxx 領域を介して Msx1 および Msx2 と結合することがわかった。次に、Necdin-D1-Msx 複合体の機能を検討するため、ホメオドメイン蛋白質結合配列を含む Wnt1 プロモーターを用いて Necdin による Msx 依存性転写活性の変化を検討した。Msx は単独では Wnt1 プロモーター活性を抑制したが、Necdin は D1 の存在下で Msx の抑制作用に拮抗した。ホメオボックス蛋白質 Msx（Msx1、Msx2）は、主に中胚葉系細胞の分化を抑制することが知られている。免疫組織化学法によって Necdin と D1 の分布を調べたところ、両者は胎生 14.5 日齢のマウスでは骨格筋に高レベルに発現していることがわかった。そこで、筋分化のモデル細胞の一つである C2C12 細胞を用いて Necdin、D1、Msx 複合体の細胞分化に及ぼす作用を検討した。C2C12 細胞に恒常的に Msx2 を発現させたところ、筋分化が抑制された。この Msx2 恒常発現細胞系にアデノウィルスベクターを用いて、Necdin と D1 を共発現させたところ、Msx2 による筋分化抑制の解除が認められた。この際、Necdin は D1 を介して Msx2 と複合体を形成していることが明らかになった。したがって、Necdin は Msx による MyoD などの筋細胞分化関連遺伝子の発現抑制を解除することによって、筋細胞の分化を促進するものと考えられる。

② Necdin の Dlx を介したニューロン分化の制御

Necdin は、胎生 13.5 日齢のマウス前脳の大脳皮質、中隔、および視床下部において高く発現しているが、この部

位ではDlxファミリーホメオドメイン蛋白質も高発現していることが知られている。そこで免疫組織化学法でこれらの蛋白質の分布を調べたところ、Necdinは中隔や視床下部においてDlx2やDlx5と共存することが明らかになった。また、これらの細胞はグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD）やcalbindin D-28Kが陽性であるためGABA作動性ニューロンであることが分かった。Dlx2やDlx5は発生期のマウス前脳においてGABA作動性ニューロンの分化、特異化、及び移動に関与することが知られている。そこで、Necdin-D1-Dlxの複合体が形成されるかを検討したところ、Msxと同様の機序で三者の複合体が形成されることが明らかになった。また、この複合体は、Dlx2によるWnt1プロモーターの活性化を増強することがわかった。次に、NecdinのGABA作動性ニューロンへの影響を調べるために、培養した胎生13.5日齢マウスの前脳切片に電気穿孔によってNecdin cDNAを導入する方法を樹立した。この方法で、Dlx2およびD1が内在性に高発現している基底核原基領域にNecdinを発現させたところ、GADやcalbindinを発現するGABA作動性ニューロンが顕著に増加した。さらに、Necdinノックアウトマウス（父性Necdin遺伝子欠損マウス）では、胎生14.5日齢の前脳においてGABA作動性ニューロンの減少が見られた。これらの結果、NecdinはD1を介してDlxと結合することによりGABA作動性ニューロンの分化を促進するものと推定される。

論文審査の結果の要旨

Necdinは、分裂終了したニューロンや骨格筋に発現し、これらの細胞の最終分化状態の安定化に重要な役割を果たすものと考えられている。Necdinは、細胞増殖や生存を制御する種々の蛋白質、たとえば転写因子E2FやP53、神経成長因子受容体TrkA、p75などと結合して、細胞増殖抑制、分化、生存などを調節しているものと推定される。一方、NecdinはMAGE（melanoma antigen）ファミリーに属するが、このファミリーに属する蛋白質間の相互作用については不明である。Dlx/Msxファミリーホメオドメイン蛋白質と結合する新規のMAGEフアミリー蛋白質として同定されたMAGE-D1は、Necdinと相同性の高い領域（MAGE homology domain）を持ち、この部位でNecdinと結合する可能性がある。本研究は、NecdinがMAGE-D1との結合を介して、Dlx/Msxファミリーホメオドメイン蛋白質の機能に影響を与えるかを検討したものである。本研究により、NecdinはMAGE-D1を介してDlx2やMsx2などのホメオドメイン蛋白質と複合体を形成して、ニューロンや筋細胞の分化や特異化を促進することが明らかになった。Necdinは、Dlx/Msxホメオドメイン転写因子ファミリーと協調して、前脳部や頭部の発生や発達に重要な役割を果たすことが推定される。また、Necdinはゲノムインプリンティングが関与する脳発達異常症Prader-Willi症候群の原因遺伝子と推定されているため、本研究は、この疾患の発症機構の解明にも寄与するものと考えられる。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。