

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Regulatory mechanisms of neuronal E2F1-Cdc2 system by the imprinted gene <i>necdin</i>  |
| Author(s)    | 栗田, 光將  |
| Citation     | 大阪大学, 2007, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/47702">https://hdl.handle.net/11094/47702</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">〈a href="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">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|               |  |
|---------------|--|
| 氏 名           | 栗 田 光 将  |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (理 学)  |
| 学 位 記 番 号     | 第 2 0 8 8 4 号  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成 19 年 3 月 23 日   |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>理学研究科生物科学専攻  |
| 学 位 論 文 名     | Regulatory mechanisms of neuronal E2F1-Cdc2 system by the imprinted gene <i>necdin</i><br>(インプリント遺伝子 <i>Necdin</i> によるニューロン内 E2F1-Cdc2 系の制御機構) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 吉 川 和 明<br><br>(副査)<br>教 授 八 木 健 教 授 岡 田 雅 人   |

#### 論 文 内 容 の 要 旨

*Necdin* は、神経幹細胞が神経分化する際に誘導され、ほぼ全てのニューロンに存在する。哺乳類の *Necdin* 遺伝子 (*Ndn*) はゲノムインプリンティングによって父性 *Ndn* のみから発現することが知られている。*Necdin* は細胞周期制御因子である E2F1 と結合し、E2F1 依存的な転写活性を抑制する。また、E2F1 過剰発現による細胞死が *Necdin* によって抑制されることから、*Necdin* は E2F1 と相互作用をすることによって、神経分化に伴う細胞死の抑制に重要な役割を果たすものと推定される。これらの *Necdin* の性質は、E2F1 結合因子として知られている癌抑制遺伝子産物 *retinoblastoma* 蛋白質 (*Rb*) の性質と類似する。そこで本研究では、*Necdin* と E2F1 との相互作用を *Rb* との比較において検討し、*Necdin* の E2F1 制御機構とその神経生物学的意義を解明することを目指した。

*Rb* による増殖抑制機構に必要なクロマチンリモデリング因子 *Brg1/Brm* が欠損しているヒト子宮頸癌 C33a 細胞を用いて検討したところ、*Necdin* は細胞増殖を抑制し、細胞周期に関わる蛋白質キナーゼ *Cdc2* の発現を抑制した。*Cdc2* は E2F 標的遺伝子の一つであり、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を用いて *Necdin* が *cdc2* プロモーターに作用するかについて検討した。その結果、マウス胚性癌細胞 P19 細胞 (未分化幹細胞) への遺伝子導入系では *Necdin* は E2F1 に依存したプロモーター局在性を示し、神経分化条件下においても内在性 *Necdin* は *cdc2* プロモーターに局在することが判明した。*Necdin* と E2F1 の相互作用による *Cdc2* 制御の生理学的意義について検討するため、マウス小脳顆粒神経細胞 (CGN) を用いて検討を行った。培養 CGN を低  $K^+$  濃度で処理したところ、E2F1 と *Cdc2* の発現量が顕著に増加し、アポトーシスが誘導された。この条件下で ChIP 解析を行ったところ、*Necdin* と E2F1 は共に *cdc2* プロモーターに局在していた。次に、*Ndn* 欠損マウスから調製した CGN を用いて内在性 *Necdin* の機能を検討した。*Ndn* 欠損 CGN を低  $K^+$  濃度で培養すると、野生型と比較してアポトーシスが増強され、E2F1 および *Cdc2* の mRNA と蛋白質の発現量も有意に増加していた。また、*Ndn* 欠損 CGN では、*Cdc2* 発現量と同様に *Cdc2* キナーゼ活性が増加しており、*Cdc2* 阻害剤 *roscovitine* で処理をすると、アポトーシスの増強が阻止された。次に、*Ndn* 欠損マウスの小脳を免疫組織化学により解析したところ、分化 CGN が多数存在する内顆粒層において *Cdc2* 陽性細胞数とアポトーシスを起こした細胞数の増加が認められた。この結果から、*Necdin* は E2F1-Cdc2 経路を抑制することにより、CGN のアポトーシスを防ぐ役割を果たしているものと推定される。この研究によって明らかになったニュ

ーロンにおける **Necdin** と **E2F1** の相互作用による **Cdc2** 活性の制御機構は、神経分化に伴う細胞増殖抑制機構と生存（死）制御の生物学的意義を考える上で重要なものと思われる。

### 論文審査の結果の要旨

**Necdin** は、神経幹細胞が神経分化する際に誘導され、ほぼ全てのニューロンに存在する蛋白質である。哺乳類の **Necdin** 遺伝子 (**Ndn**) はゲノムインプリンティングによって父性 **Ndn** のみから発現することが知られている。**Necdin** は細胞周期制御因子 **E2F1** と相互作用をすることによって、細胞死を阻止するものと推定されてきた。しかし、神経分化時に内在性に発現する **Necdin** が生理条件下で **E2F1** と相互作用をして、細胞死を制御しているかどうかは明らかではなかった。本研究では、父性 **Ndn** 欠損マウス由来の小脳ニューロンを用いて、**Necdin** による **E2F1** を介した細胞死の制御機構と、その神経生物学的意義を検討した。**Cdc2** キナーゼは分裂終了したニューロンでは細胞死（アポトーシス）を誘導することが知られているが、この過程において、**Necdin** と **E2F1** の複合体が *cdc2* 遺伝子プロモーター上で形成され、**Cdc2** の発現が抑制されることにより、ニューロンのアポトーシスが阻止されることが証明された。本研究によって明らかになったニューロンにおける **Necdin** と **E2F1** による **Cdc2** 発現の制御機構は、神経分化に伴う細胞増殖抑制機構と生存（死）制御の生物学的意義を考える上で重要なものと思われる。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。