

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (薬学)	氏名	岡原 京平
論文題目	糖脂質ガラクトシルセラミドのオリゴデンドロサイト特異的な発現調節機構に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>脊椎動物のニューロンの軸索の周りには絶縁性のミエリン鞘が存在し、神経パルスの伝導の高速化を可能にしている。ミエリンはグリア細胞の一種オリゴデンドロサイトの細胞膜がニューロン軸索に巻き付くことにより形成されており、糖脂質ガラクトシルセラミド(GalCer)を構成成分に持つ。セラミドにガラクトースが1つ付加した構造をもつGalCerは、脳における主要な糖脂質の一つであり、オリゴデンドロサイトに特異的に発現している。GalCerは発生時のミエリン形成以外にも、脱ミエリン疾患での再ミエリン化にも寄与する可能性が示唆されており、GalCerの発現調節機構を明らかにすることで、これらの疾患の治療に有用な知見を得られると期待される。GalCerの生合成はCGT(ceramide galactosyltransferase)と呼ばれる酵素によって行われるが、どのような機構でCGTとGalCerがオリゴデンドロサイト特異的に発現しているのかはほとんどわかっていない。本研究は、オリゴデンドロサイト特異的にCGT遺伝子が発現する分子機構の解明を目的として行ったものである。</p> <p>申請者は、まずCGTの転写を促進する転写因子の同定を試みた。CGTの発現はオリゴデンドロサイトの分化に伴って上昇する。そのため、オリゴデンドロサイトの分化に関わる転写因子群と、CGTのプロモーター領域をクローニングしたレポーターコンストラクトを培養細胞で共発現させることにより、CGTの転写を促進する転写因子を探索した。その結果、転写因子Nkx2.2がCGTの転写を促進することを見出した。さらにプロモーター領域の一部を欠如させた変異体の作製と解析を行い、Nkx2.2による転写活性化に必須な領域を同定した。また、クロマチン免疫沈降法により、同定したゲノム領域にNkx2.2が生細胞中で結合していることを確認した。</p> <p>一方、Nkx2.2とは別に、CGTの転写を抑制する転写因子を新たに見出した。申請者は、CGT遺伝子の転写開始部位近傍のプロモーター領域のみを組み込んだレポーターコンストラクトに比べて、第一イントロンを含むより広い領域を組み込んだレポーターコンストラクトではプロモーター活性が著しく低いことを発見した。そこでさらに詳しい解析を行い、第一イントロンの中にCGTプロモーターの活性を抑制する転写因子結合モチーフE-boxを同定した。また、オリゴデンドロサイト特異的に発現する転写因子OLIG2がこのE-box領域に結合すること、OLIG2がCGT遺伝子のプロモーター活性を強く抑制することを確認した。</p> <p>次に、転写因子Nkx2.2およびOLIG2が内在性のCGT遺伝子の発現量を制御するか否かを調べた。Nkx2.2を単独で培養細胞に過剰発現させたものでは内在性のCGT mRNAの発現レベルが上昇し、この上昇効果はOLIG2との共発現により抑制された。さら</p>			

に、分化誘導したオリゴデンドログリオーマでNkx2.2をノックダウンするとCGTのmRNAレベルが低下した。また、Nkx2.2によってCGTの発現を上昇させた細胞の糖脂質を薄層クロマトグラフィーと質量分析により解析し、CGTの産物であるGalCerの発現レベルが上昇していることを確認した。またマウス脳においても、CGTがほとんど発現していない発生初期ではNkx2.2の発現が低くOLIG2の発現が高いこと、発生の進行に伴いCGTが発現してくる時期にNkx2.2の発現が上昇しているのに対してOLIG2の発現は変化しないことが確かめられ、これらの転写因子が脳においてもCGT遺伝子の正と負の制御に関わることが示唆された。

以上の結果より、CGTの発現はNkx2.2とOLIG2によってそれぞれ正と負に制御されることが明らかになるとともに、オリゴデンドロサイトが分化する過程でのCGT発現がこれらの転写因子の発現変化によって制御されることが示唆された。本論文は、これまでにほとんどわかっていない組織特異的な糖転移酵素の発現機構を理解する上で重要な知見を与えるものであり、脱ミエリン疾患の新たな治療法開発の一助となることが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

ミエリン鞘は、脊椎動物のニューロンの軸索の周りに存在する絶縁性の構造であり、神経インパルスの跳躍伝導を可能にしている。ミエリンはグリア細胞の一種オリゴデンドロサイトの細胞膜がニューロンの軸索に巻き付くことによって形成される。糖脂質のガラクトシルセラミド(GalCer)はセラミドにガラクトースが一つ付加したものであり、脳における主要な糖脂質の一つであり、オリゴデンドロサイトに特異的に発現している。GalCerは、発生時のミエリン形成だけでなく、脱ミエリン疾患での再ミエリン化に寄与する可能性が示唆されている。したがって、GalCerの発現調節機構を明らかにすることによって、これらの疾患の治療に関して有用な知見を得られることが期待される。GalCerの生合成は、CGT (ceramide galactosyltransferase) によって行われるが、どのような機構でCGTとGalCerがオリゴデンドロサイト特異的に発現しているのかはわかっていない。著者は、本論文で、オリゴデンドロサイト特異的にCGT遺伝子が発現する分子機構の解明をめざして一連の研究を行った。

CGT遺伝子の発現はオリゴデンドロサイトの分化に伴って上昇するので、著者はまず、オリゴデンドロサイトの分化に関わる転写因子群のコンストラクトと、CGT遺伝子のプロモーター領域をクローン化したレポーターコンストラクトを培養細胞で共発現させることによって、CGT遺伝子の転写を促進する因子を探索した。その結果、転写因子Nkx2.2がCGT遺伝子の転写を促進することを新たに見出した。さらにプロモーター領域の一部を欠失させたさまざまなレポーターコンストラクトを作製して同様の解析を行い、Nkx2.2による転写活性化に必要なプロモーター領域を特定した。さらに、クロマチン免疫沈降法によって、特定したプロモーター領域にNkx2.2タンパク質が生細胞内で結合していることを確認した。

一方、Nkx2.2とは別に、著者はCGTの転写を抑制する転写因子を新たに見出した。まず、CGT遺伝子の転写開始部位近傍のプロモーター領域のみを組み込んだレポーターコンストラクトに比べて、第一イントロンを含むより広い領域を組み込んだレポーターコンストラクトではプロモーター活性が著しく低いことを発見した。そこでさらに詳細な解析を行い、第一イントロン内にCGTプロモーターの活性を抑制する転写因子結合モチーフE-boxが存在することを見出した。そして、オリゴデンドロサイト特異的に発現する転写因子OLIG2がこのE-box領域に結合すること、およびOLIG2がCGT遺伝子のプロモーター活性を著しく抑制することを確認した。

次に著者は、Nkx2.2とOLIG2が培養細胞内で内在性のCGT遺伝子の発現量を制御するのかどうかについて検討した。Nkx2.2を単独で培養細胞に過剰発現させた場合には内在性のCGT mRNAの発現レベルが上昇し、この上昇はOLIG2との共発現によって抑制された。さらに、分化誘導したオリゴデンドログリオーマにおいてNkx2.2をノックダウンするとCGTのmRNAレベルが低下した。また、Nkx2.2によってCGTの発現を上昇させた細胞の糖脂質を薄層クロマトグラフィーと質量分析によって解析し、CGTの酵素作用の生

成物であるGalCerの発現レベルが上昇していることを確認した。またマウス脳においても、CGTがほとんど発現していない発生初期においてはNkx2.2の発現レベルが低いのに対してOLIG2の発現レベルが高いこと、発生段階の進行に伴ってCGTが発現してくる時期にNkx2.2の発現が上昇するのに対してOLIG2の発現レベルは変化しないことを確認した。このような結果は、Nkx2.2とOLIG2が、脳においてもCGT遺伝子の発現のそれぞれ正と負の制御に関わることを示唆する。

以上のように、著者は、CGT遺伝子の発現はNkx2.2とOLIG2によってそれぞれ正と負に制御されることを明らかにするとともに、オリゴデンドロサイトが分化する過程でのCGT遺伝子の発現がこれらの転写因子の発現変化によって制御される可能性を示した。本論文は、これまでほぼ未解明であった組織特異的な糖転移酵素の発現調節機構を理解するうえで重要な知見を与えるものであり、本論文の研究成果は脱ミエリン疾患などの新たな治療法開発の一助となる可能性がある。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成26年8月28日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日以降