

(続紙 1)

京都大学	博士（生命科学）	氏名	駒井 妙
論文題目	ニューロン特異的PRドメインタンパク質Prdm8の発現と分子機能の解析		
（論文内容の要旨） 多細胞生物の発生過程では、受精卵もしくは幹細胞という1つの細胞を出発点として、個体を構成する多種多様な細胞が作り出される。そして、運命決定された個々の細胞の性質は長期間・複製を越えて維持される必要がある。この分子基盤として不可欠なのがエピジェネティックな遺伝子発現制御機構である。エピジェネティックな制御とは、遺伝子配列に変化を伴わずに遺伝子発現を制御する機構であり、その情報は細胞分裂を経ても維持される。 ヒストン修飾は代表的なエピジェネティックな遺伝子制御機構の1つであり、我々の研究室ではその中でヒストンリジン残基のメチル化修飾に注目して解析を行ってきた。ヒストンリジン残基のメチル化修飾は1つの例外を除き、共通してSETドメインを持つタンパク質によって触媒されることが示されている。 PRドメインタンパク質はヒストンリジンメチル化酵素の触媒ドメインであるSETドメインと相同性を持つことから、新規のヒストンメチル化酵素である可能性から注目を集めた。マウスではPrdm1からPrdm16までの15個（Prdm7/9は同じ）のPRドメインタンパク質が見つかった。近年、いくつかのPRドメインタンパク質が発生や細胞分化の中枢を担うエピジェネティックな制御因子であることが相次いで報告されている。しかしながら、多くのPRドメインタンパク質ではヒストンメチル化活性が検出されておらず、生命機能に対する重要性は明らかにされつつも、その分子機能や作用機序にはまだ多くの謎が残っている。そこで、本研究ではPRドメインタンパク質のうち、Prdm8の分子機能を解析し、Prdm8が関与する発生・細胞分化の制御機構を解明することを目的とした。 申請者は、PRドメインタンパク質の1つであるPrdm8がニューロンで特異的に発現していることを見出し、Prdm8が神経発生へ関与することを予想した。続いて、発生期の中枢神経系組織に着目してPrdm8の詳細な発現解析を行ったところ、Prdm8は網膜では桿体双極細胞と一部のアマクリン細胞で、脊髄ではV1またはV2介在ニューロンで、大脳新皮質では主に第4層ニューロンで特異的に発現していることが判明した。E11.5の脊髄では、例外的に神経前駆細胞領域においてPrdm8の発現が確認されたが、その他の時期や組織においてはPrdm8の発現は細胞周期を離脱したpostmitoticニューロンに限定されており、ニューロンの分化、移動または成熟過程へのPrdm8タンパク質の寄与が推測された。 ニューロン分化におけるPrdm8の役割を明らかにするために作製したPrdm8ノックアウトマウスでは、野生型では観察されない異所的なスプライシングが生じることにより、N-末端部分が一部欠損したPrdm8タンパク質が発現していることが明らかとなった。このタンパク質はPRドメインを欠損していたが、ホモ欠損マウスにおいても顕著な表現型を見ることはできなかった。 Prdm8の分子機能解析を行ったが、多くのPRドメインタンパク質と同様に、Prdm8にはヒストンメチル化活性は検出されなかった。Prdm8の分子機能を知る手掛かりとして、質量分析を用いてPrdm8タンパク質複合体構成因子の同定を行ったところ、Prdm8がRNAに関連した機能を持つ分子と生体内で相互作用していることが明らかとなり、Prdm8がRNAを介した機能を持っている可能性が新たに示唆された。 近年、成体脳においても神経幹細胞が存在することが明らかとなり、ニューロン分化の分子基盤の解明は再生医療への応用の観点からも重要な研究に位置づけられている。Prdm8は発生過程において特定の時期に、特定のサブタイプのニューロンで発現していることから、Prdm8のさらなる機能解析によってある特定のサブタイプのニューロン分化をつかさどる分子基盤の解明に貢献する可能性があり、今後の展開が期待される。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、PRドメインタンパク質の1つPrdm8の神経系細胞における発現を発生過程を追って詳細に解析し、生化学的解析を行い、ノックアウトマウスの表現型を記述したものである。申請者の所属している研究室では、哺乳類のヒストンリジンメチル化酵素をモデルとして、エピジェネティックな遺伝子発現制御が生命機能をいかにコントロールしているか、の研究を行っている。タンパク質のリジン残基のメチル化修飾は1つの例外を除き、共通してSETドメインを持つタンパク質によって触媒される。PRドメインタンパク質は、リジンメチル化酵素ドメイン、SETドメインと相同性を持つPRドメインを有し、新規のヒストンメチル化酵素である可能性から注目を集めている。本論文の研究対象であるPrdm8は、これまでその機能の解析がほとんどなされていなかったPRドメインタンパク質ファミリー分子の1つである。

本論文では、まず、マウス各組織でのPrdm8 mRNAの発現を検討し、Prdm8 mRNAが神経系の細胞で特異的に発現していること、さらに神経系のニューロンで発現することを示した。次に、Prdm8特異的抗体を作成し、この抗体を用いて、中枢神経系組織におけるPrdm8の発現を発生過程を追って解析した。その結果、Prdm8は1) 網膜の桿体双極細胞と一部のアマクリン細胞、2) 脊髄のV1またはV2介在ニューロン、3) 大脳新皮質の主に第4層ニューロンで特異的に発現していることがわかった。E11.5の脊髄では、例外的に神経前駆細胞領域においてPrdm8の発現が確認されたが、その他の時期や組織においてはPrdm8の発現は細胞周期を離脱したpostmitoticニューロンに限定していた。生化学的解析からは、多くのPRドメインタンパク質と同様に、Prdm8はヒストンメチル化活性を示さなかった。一方、質量分析の結果、Prdm8はRNAに関連した機能を持つ分子と生体内で相互作用している可能性が明らかとなり、Prdm8がRNAを介した機能を持っていることが示唆された。生体内におけるニューロン分化におけるPrdm8の役割を明らかにするためにPrdm8ノックアウトマウスの作成が試みられた。しかし、予想しなかった本来存在しないような異所的なスプライシングにより、一部欠損型のPrdm8タンパク質が発現していることが明らかとなった。この部分欠損Prdm8を発現するマウスでは、ニューロン分化をふくむ神経発生に顕著な表現型は観察されなかった。

本論文では、哺乳類の神経発生・ニューロン分化制御におけるPrdm8の重要性を決定付けるような結果までは出せなかったものの、Prdm8の中枢神経系組織における発現様式を詳細に解析し、特に大脳新皮質の第4層ニューロンの有用なマーカーであることを示した。学術的意義は十分に認められ、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、平成22年1月28日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日