

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	上 谷 大 介
論文題目	Intrinsic transition of ES cell differentiation into neural progenitors (ES 細胞から神経前駆細胞への内因的分化機構)		
(論文内容の要旨)			
本論文では、ES 細胞から神経前駆細胞への分化を制御する分子メカニズムの解明を目的として以下の解析を行なった。まず、In vitro において ES 細胞を効果的に神経分化させる SFEB (Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like Aggregates) 法を用いて、マウス ES 細胞を神経前駆細胞へと分化させ、その際に神経分化に伴い発現が上昇する遺伝子を DNA-microarray を用いてスクリーニングを行った。その結果、ES 細胞から神経前駆細胞への分化過程において発現が有意に上昇する 109 個の遺伝子が同定された。そのうち 29 個の遺伝子が神経前駆細胞に特異的な発現を示すことが判明した。 この 29 個の遺伝子の cDNA をクローニングし、マウス ES 細胞に強制発現させたところ、その 1 つの Zfp521 が強い神経分化促進活性を有することが明らかとなった。例えば、神経分化を強く抑制する因子である牛胎児血清や BMP 4 を含む培地でマウス ES 細胞を培養した場合にも、Zfp521 の強制発現により神経分化を誘導できることが観察された。Zfp521 は核内に局在する multiple-zinc finger 因子をコードし、その発現は in vitro 分化系において、神経分化とともに上昇する。また、マウス初期胚においては、神経上皮細胞にその発現が認められた。 次に、Zfp521 が神経分化に必須であるかどうかを検討するため、Zfp521 の機能阻害実験を行った。shRNA により Zfp521 が抑制された ES 細胞では、SFEB 法での神経分化が抑制され、Zfp521 は多能性細胞から神経前駆細胞への分化に必須な因子であることが明らかになった。この in vitro 神経分化培養系において、Zfp521 の発現が抑制されたため神経分化が阻害された ES 細胞でも、epiblast (胚盤上葉) 細胞への分化は効率よく起こることから、Zfp521 は少なくとも epiblast 以降の分化に必要であることが分かった。この細胞では内胚葉や中胚葉組織、あるいは表皮細胞への分化も正常に起こることが確認された。これらの結果から、Zfp521 は epiblast より神経前駆細胞へと分化する段階に特異的に作用していることが明らかとなった。 さらに、Zfp521 の作用機序を検討した。クロマチン免疫沈降法により Zfp521 が結合している DNA 領域を探索した結果、Sox3 や Pax6 といった初期神経遺伝子のゲノム領域に結合することが分かった。また、Zfp521 を強制発現させると、Sox3 のプロモーター活性が上がることも明らかになった。タンパク免疫沈降法および機能阻害実験により、Zfp521 は general co-activator である p300 と結合し、それらの協調作用が神経分化活性に必要であることが分かった。 以上のことから、ES 細胞から神経前駆細胞への分化の過程の中で、Zfp521 は神経分化の初発過程に必須の制御因子であり、p300 依存的な転写アクチベーターとして働くことが明らかとなった。			

(論文審査の結果の要旨) 本研究では、多能性幹細胞から神経前駆細胞への分化段階を制御する機序を明らかにする事を目的として以下の解析を行った。まず、試験管内において ES 細胞を効果的に神経分化させる SFEB (Serum-free Floating culture of Embryoid Body-like Aggregates) 法を用いて、マウス ES 細胞を神経前駆細胞へと分化させ、その際に神経分化に伴い発現が上昇する遺伝子を DNA-microarray を用いてスクリーニングを行った。その結果、神経分化の初発段階に誘導される因子として multiple-zinc finger タンパク質 Zfp521 を同定した。 マウス ES 細胞の試験管内分化系を用いた解析から、Zfp521 は神経分化促進活性を有しており、通常神経分化が起こらない牛胎児血清や BMP4 を含む培養条件下においても、Zfp521 の強制発現により神経分化を誘導できることが明らかとなった。 RNAi 法による機能阻害実験の結果、Zfp521 はマウス及びヒト ES 細胞の神経分化に必須であり、epiblast より神経前駆細胞へと分化する段階に特異的に作用していることが明らかとなった。さらに、Zfp521 は Sox3 など神経前駆細胞特異的遺伝子のプロモーター領域に結合すること、また、転写 co-activator である p300 と複合体を形成し、転写活性化因子として働くことが判明した。 以上の研究は、脳発生の開始機序における分子メカニズムの解明に貢献し、神経細胞への選択的分化等の神経難病の再生医療の進展に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成23年 3月 8日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			