

氏名(本籍)	なが た ゆ か 永 田 由 香 (熊 本 県)		
学位の種類	博 士 (学 術)		
学位記番号	博 甲 第 1,346 号		
学位授与年月日	平成 7 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
審査研究科	生 物 学 科 研 究 科		
学位論文題目	FUNCTIONAL ANALYSES OF HELIX-LOOP-HELIX PROTEINS ID 1, ID 2 AND ID 3 ON NEURAL CELL DIFFERENTIATION (神経系における Id ファミリーの機能解析)		
主 査	筑波大学教授	理学博士	平 林 民 雄
副 査	筑波大学教授	理学博士	山 根 國 男
副 査	筑波大学教授	農学博士	田 仲 可 昌
副 査	筑波大学教授	理学博士	宗 像 英 輔

論 文 の 要 旨

一個の未分化細胞が分化形質を発揮する細胞へ変換するためには多くの階層性のある遺伝子産物が動員される。本研究はそのような遺伝子産物である Id ファミリーが神経分化において普遍的機能を持っているか否かを明らかにすることを目的として行った。まず、PC 12細胞における発現を Northern blot 分析により調べたところ、すべての Id ファミリーは分化誘導とともに一過性に増加し、分化後も増殖中の細胞と同じレベルの高い発現がみられた。この現象が PC 12細胞に特異的である可能性も考えられるので別の神経系モデルとして P 19細胞を用いてレチノイン酸による分化誘導に伴う発現を調べたところ同様の現象が観察された。このことから、少なくとも PC 12と P 19細胞の神経系への分化には、Id の発現が減少することは必須ではなく、むしろ増加することが必要と考えられる。また、ラット初期胚における Id ファミリーの発現を in situ hybridization を用いて調べたところ、三種類の Id の発現に違いは見られなかったものの、すべての Id ファミリーの発現は、特に後脳や中脳の未分化な細胞集団からなる心室帯において顕著にみられ、既に神経に分化した部分では見られなかった。以上のことから、Id ファミリーは immediate-early gene 産物として機能し、神経細胞の初期分化において重要な役割を担っている可能性が考えられた。

一方、Id ファミリーの全塩基配列を決定しそれらの構造を解析したところ、Id ファミリーのアミノ酸はセリン、スレオニンに富んでおり、セリン/スレオニンキナーゼでリン酸化されうる部位が存在することを見いだした。同年、プロテインキナーゼ C (PKC) が MyoD をリン酸化し、その DNA への結合を阻害すること、また、プロテインキナーゼ A (PKA) も MyoD の転写活性化能を阻害するこ

とが他のグループにより報告されており、本研究でも Id ファミリーがリン酸化により bHLH 蛋白質を調節している可能性を予想して、まず、それぞれの Id を *in vitro* でリン酸化するキナーゼの同定を行った。Id 蛋白質は glutathione S-transferase (GST) との融合蛋白質として産生し、アフィニティー精製したものをを用いて *in vitro* キナーゼ反応を行った。その結果 Id 1 と Id 2 は PKA で、すべての Id ファミリーは PKC で、Id 2 と Id 3 は cdc 2 キナーゼでリン酸化され、カゼインキナーゼではリン酸化部位があるにもかかわらずどの Id も酸化されなかった。このことから、Id ファミリー PKA, PKC, cdc 2 キナーゼ等のセリン/スレオニンキナーゼの直接の基質となることが示された。また、これらのリン酸化のパターンの違いから、リン酸化する酵素の違いが Id の機能の違いを反映している可能性が考えられた。次に、実際に *in vivo* でもリン酸化されているかどうかを確かめるために、Id 1 に関しては抗体を作成し、PC 12細胞を free の³²P でラベルした細胞抽出液を用いて免疫沈降を行った。NGF で分化誘導した細胞抽出液の免疫沈降物からはリン酸化された Id 1 が検出されたが、NGF 未投与では検出されなかった。これらの結果は、Id ファミリーは分化誘導にともないリン酸化され、bHLH 蛋白質とのホモ/ヘテロダイマー形成を制御して、結果的に bHLH 蛋白質の DNA への結合を調節している可能性を示唆した。特に Id ファミリーとこれまでに同定されている bHLH 蛋白質とのダイマー形成に必要な HLH ドメインの Loop 領域に、PKA のリン酸化部位が保存されていることを見いだした。そこで、PKA リン酸化による Id 1 と Id 2 の調節機構の解析を行った。まず、Id ファミリーがダイマーを形成していると考えられている、bHLH 蛋白質に属し普遍的な発現を示す E 47 の GST との融合蛋白質を作成した。この E 47 と PKA でリン酸化した Id 1 と Id 2 のヘテロダイマー形成と、リン酸化していない Id 1 と Id 2 とのヘテロダイマー形成の違いを gel shift assay により調べた。その結果、Id 1 と Id 2 は E 47 とのヘテロダイマーを形成し DNA との結合を同様に阻害したが、その阻害の程度にリン酸化による影響は見られなかった。また、Id と E 47 両方の Loop 領域のリン酸化のヘテロダイマー形成能への影響も同様に調べたが、この場合にもリン酸化による効果は観察されなかった。これらの事実から、Id の PKA によるリン酸化はすくなくとも E 47 とのヘテロダイマー形成には直接的には関与していないことが明らかとなった。

審 査 の 要 旨

本研究においては細胞分化の因子を検出する目的で、神経細胞に分化する PC 12細胞から Basic-Helix-Loop-Helix 蛋白質の単離を試みた。その結果、Helix-Loop-Helix 蛋白質である Id 蛋白質を発見し、この成分が分化誘導に際し、一過性に発現されること、分化に抑制的に働くことを示した。さらにリン酸化を受けることによりどのように作用するか、他の成分との相互作用がどのように修飾されるかを調べ挙げることにより、神経細胞の分化機構の研究に大きく貢献したと判断された。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。