慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers ofthe isll gene for motor and sensory neuron-specific expression.
Sub Title	比較ゲノム学を用いた運動神経細胞ならびに感覚神経細胞特異的に発現する転写因子islet-1の発現調節機構の解析
Author	植村, 修
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.2 (2005. 6) ,p.7-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050602-0007

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Comparative functional genomics revealed conservation and diversification of three enhancers of the *isl1* gene for motor and sensory neuron-specific expression.

（比較ゲノム学を用いた運動神経細胞ならびに感覚神経細胞特異的に
発現する転写因子islet-1の発現調節機構の解析）

植　村　　修

内容の要旨

LIM/homeodomain型の転写因子（LIM-HD）であるIslet-1（Isl1）は、運動神経細胞ならびに感覚神経細胞の分化直後から発現しており、それらの発生過程に重要な役割を担っている。特に運動神経細胞では、他のLIM-HDとの発現の組み合わせにより、軸索投射や細胞体の位置などの運動神経細胞のサブタイプが規定される。我々は、このサブタイプ特異的な*isl1*の発現機構の解析を行った。

ゼブラフィッシュ*isl1*においては、遺伝子の約20Kb下流に後脳の運動神経細胞での発現を調節する領域（CM）と、約55Kb下流に感覚神経節細胞での発現を調節する領域（SS）が同定されている。これらの領域から数百bpの最小制御領域を同定し、それぞれzCREST1（zebrafish conserved regulatory element for *islet-1* 1）、zCREST2と名付けた。GFPを用いたtransgenic fishの解析から、zCREST1は、後脳の運動神経細胞だけでなく背側の体幹筋を支配する脊髄運動神経細胞に、一方zCREST2は、感覚神経細胞だけでなく、腹側の体幹筋と胸ビレの外転筋を支配する脊髄運動神経細胞にGFPを発現していた。

上述の通り、運動神経細胞はLIM-HD群の発現の組み合わせでいくつかのサブタイプに分類される。マウスでは、背側の体幹筋を支配する運動神経細胞にはIsl1とLhx3が、腹側の体幹筋と肢芽の腹側の筋肉を支配する運動神経細胞にはIsl1とIsl2が、そして肢芽の背側の筋肉を支配する運動神経細胞にはLhx1とIsl2が、それぞれ発現している。マーカー遺伝子の発現を検討したところ、ゼブラフィッシュの胸ビレの外転筋はマウスの肢芽の腹側の筋肉と相同であることが示された。またzCREST1とzCREST2には、その塩基配列やゲノム上の相対的位置関係まで高度に保存された領域が、フグからヒトにいたるまで存在していることがデータベース検索から分かった。これらのことから、高等動物でも脊髄運動神経細胞における*isl1*の発現は、CREST1,2によって制御されていると考えられた。transgenic mouseの解析では、期待された通り、CREST1は背側の体幹筋を支配する運動神経細胞に、CREST2は腹側の体幹筋と肢芽の腹側の筋肉を支配する運動神経細胞に、レポーターの発現を誘導していた。

興味深いことに、zCREST2は感覚神経細胞における活性を有するが、ヒトCREST2ではそれは認められなかった。このことから高等動物では*isl1*の感覚神経細胞における発現は、CREST2以外の領域によって担われていると考えられた。そこで、ゼブラフィッシュとヒトの*isl1*近傍のゲノム配列を比較し、遺伝子の上流に高度に保存された配列（CREST3）を同定した。CREST3は、感覚神経細胞に対する転写活性を持っていることが分かった。またCREST3と似た配列（C3R, CREST3 related）を、他の*isl1*ファミリー遺伝子のゲノム近傍に同定した。C3Rは、CREST3と同様に、感覚神経細胞における活性を有していた。*isl1*ファミリー遺伝子は全て感覚神経細胞に発現していることから、それらの発現は進化的に保存されてCREST3とその類似配列C3Rによって制御されていることがここに示された。

以上のように、本研究から、*isl1*とそのファミリー遺伝子の、種間で高度に保存された神経細胞特異的発現機構が明らかになった。

論文審査の要旨

LIM/homeodomain型転写因子であるIslet-1は、運動神経細胞並びに感覚神経細胞の発生直後から発現しており、それらの分化に重要な役割を担っている。しかし、特定の神経細胞におけるこれらの発現調節機構は不明であった。申請者らは、ゼブラフィッシュIslet-1遺伝子近傍のゲノムDNAを検索し、運動神経細胞特異的にこの遺伝子の転写を調節する２つのゲノム領域を同定した（CREST1, 2）。さらに、実験的手法とデータベース検索の併用により、神経細胞特異的なIslet-1ファミリー遺伝子の発現機構の解析を行い、Islet-1ファミリー遺伝子群の、種間で高度に保存された神経細胞特異的発現機構を明らかにした。

審査では、低濃度のplasmidを用いた理由について質問され、ゼブラフィッシュ胚では外来のplasmidが増幅されることを利用して、DNAの細胞毒性を最小限に抑えつつ、効率良く解析するためと回答された。また、生体では染色体上で遠く離れた位置で機能しているが、promoterの直上にenhancerを挿入することで得られた結果の妥当性につき議論された。これに対し、古典的なenhancerの活性は染色体上の位置や向きに依存しないこと、今回の結果が生体でのIslet-1の発現を再現していることから、妥当と考えられると回答された。hsp70遺伝子promoterを用いたことの妥当性にも言及され、研究の目的がenhancerの活性がpromoterに依存しないことを示すことにあり、promoterを変えても齟齬のない結果が得られていること、transgenic mouseを作製する際に、外来のpromoterを用いることは通例行われていることが説明された。

定量的な検討の必要性については、種間で保存された神経細胞特異的な発現を規定する制御領域の同定を目的としたため、定量的な解析は行わなかったと回答された。また、Islet-1の発現を制御するのに必要十分な領域を同定したことを完全に証明するためには、enhancerのknock outを行う必要があることが助言された。さらにCREST3並びにC3Rについてtransgenicを用いた解析を行っていない点については、CREST1, 2に関して一過性発現系とtransgenicを用いた解析を行い、それぞれ齟齬のない結果を得たことから、この結果が妥当なものと考えられると説明された。最後に、本研究の将来的な展望について質問があり、Islet-1遺伝子は運動神経細胞の発生に重要な役割を担っていることから、神経細胞の再生治療への手がかりをつかむことを目標としていると回答された。

以上、本研究はいくつかの検討課題を残しているものの、神経細胞の分化・特異化機構の一端を解明した重要な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　リハビリテーション医学　里宇　明元
解剖学　仲嶋　一範　　内科学　鈴木　則宏
分子生物学　清水　信義
学力確認担当者：
審査委員長：仲嶋　一範

試問日：平成17年 2月22日