

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19500299  
 研究課題名（和文）ニューロン／グリア運命決定分子PRP19遺伝子の選択的スプライシング機構の解明  
 研究課題名（英文）Analysis of alternative RNA splicing mechanism of PRP19 gene in neural/astroglial cell fate decisions.  
 研究代表者  
 田代 文夫 (TASHIRO FUMIO)  
 東京理科大学・基礎工学部・生物工学科・教授  
 研究者番号：70089332

研究成果の概要：中枢神経系の発生におけるニューロン分化からグリア分化への移行メカニズムの解明は、神経分化の最も重要なテーマの一つである。本研究ではニューロン／グリア細胞のスイッチ機構に係る PRP19 $\alpha$ と選択的スプライシングバリエント PRP19 $\beta$ の遺伝子発現制御メカニズムの解析を介してニューロン／グリア細胞分化機構の解析を行った。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学, 神経科学, 腫瘍学

科研費の分科・細目：神経科学, 神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経科学, 脳・神経, 発生・分化, mRNA スプライシング

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物において中枢神経系を形成するニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトは、神経管を形成する一層の神経外胚葉が増殖・分化して創り出される。これら神経幹細胞がニューロン産生からグリア産生に切りかわる時に機能するスイッチ分子を解明することは、神経分化の最も重要なテーマの一つである。我々はマウス胚性腫瘍細胞 P19 細胞のレチノイン酸(RA)による神経分化誘導システムを用いて、PRP19 $\alpha$  (precursor RNA processing-19 $\alpha$ )および N 末端領域に 19 アミノ酸残基が挿入されたスプライシング

バリエント PRP19 $\beta$ が、ニューロン／グリア細胞分化のスイッチとして機能していることを見出した。P19 細胞に PRP19 $\alpha$ を過剰発現させると、RA 処理せずに凝集培養するだけでニューロンへと分化することを明らかにする一方で、スプライシングバリエント体である PRP19 $\beta$ を P19 細胞に過剰発現させると、ニューロン分化の抑制とグリア細胞への分化促進が見られた。PRP19 $\beta$ によるニューロン分化抑制メカニズムの一端は、PRP19 $\beta$ の挿入部位を介したペプチジルプロリルイソメラーゼ Cyclophilin A と結合することでニューロン分化関連遺伝子の転写活性を抑制し、ニュー

ロン分化誘導を抑制していると考えられる。これらのことより、PRP19 $\alpha$ および $\beta$ は、哺乳類におけるニューロン/グリア分化の運命を決定するスイッチ分子であると考えられ、PRP19 $\alpha/\beta$ の遺伝子発現制御機構の解明が望まれる。

## 2. 研究の目的

哺乳類におけるニューロン/グリア分化の運命を決定するスイッチ分子である PRP19 $\alpha$  および $\beta$ の機能解析とその遺伝子発現制御メカニズムの解析は、中枢神経系の分化メカニズムの解明に繋がると期待される。本研究では(1) cAMP によるラットグリオーマ C6 細胞のグリア細胞分化モデルを用いて、グリア細胞分化における PRP19 $\beta$  の機能解析と(2)PRP19 $\alpha$  および $\beta$ の遺伝子発現制御メカニズムの解析を行う。さらに、(3)RA によるマウス胚性腫瘍 P19 細胞の神経分化誘導モデルを用いて、神経栄養因子による神経分化誘導モデルの解析を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)PRP19 $\beta$ によるグリア細胞分化誘導メカニズムの解析

本研究では cAMP 処理によりアストロサイトやオリゴデンドロサイトへと分化する C6 細胞を用いて、PRP19 $\beta$ によるグリア細胞誘導メカニズムを解析した。C6 細胞を cAMP により分化誘導後、PRP19 $\alpha$ および $\beta$ の遺伝子発現とアストロサイト分化に必須なシグナル伝達経路である JAK-STAT 経路の活性を解析した。更に、センスおよびアンチセンス PRP19 $\beta$  mRNA を安定に発現する C6 細胞株を樹立し、PRP19 $\beta$ を過剰発現および発現低下させた際のアストロサイト分化誘導について解析した。次に、PRP19 $\beta$ 特異的なスプライシング導入部位に結合するタンパク質を yeast two-hybrid 法により探索した。得られた結合タンパク質と PRP19 $\beta$ との関連を解析し、グリア細胞分化誘導メカニズムを解析した。

### (2) PRP19 $\alpha$ および $\beta$ の遺伝子発現制御メカニズムの解析

PRP19 $\alpha$ および $\beta$ の遺伝子発現制御メカニズムを調べるために、*in silico*によるプロモーター解析を行った。C6 細胞および P19 細胞におけるグリア分化誘導時の推測された転写因子の活性と PRP19  $\alpha$ および $\beta$ の遺伝子時期を解析した。

### (3)神経栄養因子による神経分化誘導モデルの解析

哺乳類の中枢神経系のニューロンは、分泌する神経伝達物質によって多様なサブタイプに分類され、神経発生時のサブタイプの正確な多様化が、正常な神経回路の形成に重要な働きをしている。ニューロンの多様化に神経栄養因子が関わっていることが示唆され

ているが、中枢神経系の発生時のニューロンのサブタイプ特異化に対する詳細な神経栄養因子の作用メカニズムはほとんど解明されていない。P19 細胞は RA 存在下での凝集培養による神経分化誘導後に、哺乳類の神経発生時と同様に、ニューロン発生に続いてアストロサイト発生が起こるため、神経発生の優れたモデル細胞である。本研究ではこの神経発生モデルを用いて、ニューロンの多様化に対する神経栄養因子による影響の解析を目的とした。初めに、P19 細胞の神経分化誘導モデルにおける、NGF ファミリーのレセプター Trk 及び p75<sup>NTR</sup> の発現を解析した。次に、神経栄養因子によるニューロンサブタイプの特異化に対する影響を調べるために、P19 細胞を神経分化誘導し 4 日目に NGF や BDNF を添加し、その 2 日後にニューロンサブタイプマーカーの発現を RT-PCR により解析した。

## 4. 研究成果

### (1) PRP19 $\beta$ によるグリア細胞分化誘導メカニズムの解析

本研究では、cAMP 処理するとアストロサイトへ分化する C6 ラットグリオーマ細胞を用いて、PRP19 $\beta$ のアストロサイト分化における機能解析を行った。初めに、C6 細胞をアストロサイトへ分化誘導した際の PRP19 $\alpha$ , PRP19 $\beta$  の発現を調べた。RT-PCR 法により PRP19 $\alpha$  および $\beta$ の発現変動を解析したところ、PRP19 $\alpha$  および $\beta$ はともに cAMP 処理後 1 日目から 4 日目にかけて発現が上昇した (Fig. 1A)。このことから、PRP19 $\beta$ は C6 細胞内において、cAMP

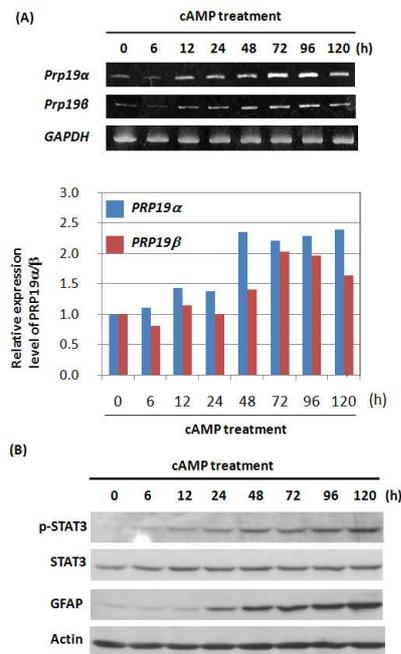


Fig.1 C6細胞をアストロサイトに分化誘導におけるPRP19 $\alpha$ および $\beta$ のmRNA発現量とSTAT3の活性化

(A) C6細胞に1 mMのcAMPを添加し経時的にRNAを調製した。PRP19 $\alpha$ およびPRP19 $\beta$ の発現をそれぞれに特異的プライマーを用いてRT-PCRを行った。PRP19 $\alpha/\beta$ の発現はGAPDHの発現を内部標準として数値化した下図に示した。(B) C6細胞に1 mM cAMPを添加後、経時的にタンパク質を調製し、 $\alpha$ -リン酸化STAT3抗体、 $\alpha$ -STAT3抗体、 $\alpha$ -GFAP抗体および内部標準として $\alpha$ -Actin抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。

処理後 1 日目から 4 日目の間にアストロサイトの分化に関与する因子として機能していることが考えられた。また分化に伴い PRP19 $\alpha$  および  $\beta$  の転写を誘導する機構が働いていることが推測された。

C6 細胞は cAMP 処理することにより IL-6 の発現が誘導される。細胞外に分泌された IL-6 は受容体である gp130 に結合し、その結果 JAK-STAT 経路が活性化されると GFAP や S100 $\beta$  などアストロサイト特異的遺伝子の転写が活性化され、アストロサイトの分化が誘導される。そこで、C6 細胞を cAMP によりアストロサイト分化誘導後の経時的な STAT3 の活性化をウェスタンブロット法により解析した。その結果、cAMP 処理後 6 時間ほどで活性化 STAT3 のバンドが検出され、その後も活性化が続いた (Fig. 1B)。このことから、PRP19 $\alpha$ / $\beta$  の発現が誘導されるのに先駆けて STAT3 の活性化が起きることが明らかとなった。

アストロサイト分化に伴い発現が誘導された PRP19 $\beta$  がどのようにしてアストロサイト分化を促進しているのか調べるため、センスおよびアンチセンス PRP19 $\beta$  mRNA を安定に発現する C6 細胞株を樹立した。得られた各細胞株からタンパクを調製し、ウェスタンブロット法により PRP19 $\beta$  の発現量を確認した結果、センス PRP19 $\beta$  発現細胞 (S1) およびアンチセンス PRP19 $\beta$  発現細胞 (AS1) では、pcDNA3 空発現ベクターを導入したベクターコントロール細胞 (V1) に比べて PRP19 $\beta$  タンパク質の発現量は 2.8 倍および 0.3 倍であった。また、PRP19 の mRNA レベルの発現においても同様の結果が得られた (Fig. 2A)。

これまでの研究により PRP19 $\beta$  がアストロサイトのマーカータンパク質の発現を促進することが明らかとなったことから、PRP19 $\beta$  が JAK-STAT 経路の活性化に関与することでアストロサイトの分化を促進していると考えられる。そこで、STAT3 の活性化レベルについて細胞株間で変化があるかどうかウェスタンブロット法により解析した。その結果、V1 に比べ S1 ではより強い活性化が誘導され、長時間維持された。その一方で、AS1 では、

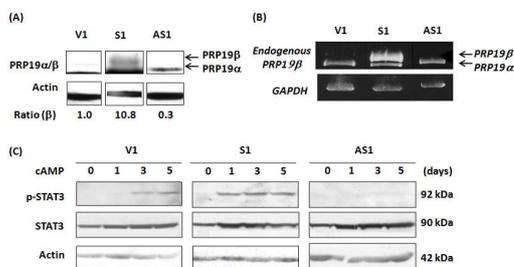


Fig. 2 C6細胞のアストロサイト分化においてPRP19 $\beta$ はSTAT3の活性化に影響を与える

(A, B) pcDNA3発現ベクターのCMVプロモーターをEF1 $\alpha$ に置き換えたpcDNA3-EF1 $\alpha$ 発現ベクターに、senseおよびantisense PRP19 $\beta$ 配列を組み込んだ発現ベクターを作製した。C6細胞にこれらの発現ベクターを遺伝子導入し、pcDNA3空ベクター安定発現: V1, Sense PRP19 $\beta$ 安定発現:S1とAntisense PRP19 $\beta$ 安定発現: AS1の各細胞株を樹立した。PRP19 $\alpha/\beta$ の発現を $\alpha$ PRP19 $\alpha$ / $\beta$ 抗体を用いてウェスタンブロット (A) および PRP19  $\alpha/\beta$ プライマーを用いた RT-PCR (B) により、各細胞株における PRP19 $\beta$  の発現を解析した。ウェスタンブロット解析では Actin を RT-PCR では GAPDH の発現を内部標準として用いた。(C) C6トランスフェクタント細胞株に 1 mM cAMP を添加し、STAT3 の活性化を経時的にウェスタンブロットにより解析した。内部標準として Actin を用いた。

ほとんど活性化は検出できなかった (Fig. 2B)。この結果から、PRP19 $\beta$  は STAT3 のリン酸化を促進し JAK-STAT 経路を活性化することで、アストロサイトの分化を促進することが示唆された。

更なる PRP19 $\beta$  の機能解析を行うために、PRP19 $\beta$  特異的である配列とその前後を含む 27 アミノ酸 (PRP19 $\beta$ <sub>83-101</sub>) と結合する因子を Yeast two hybrid 法によるスクリーニングを行い、8 つの遺伝子を同定した (Table. 1)。我々は以前に同定された遺伝子の 1 であるイソプロビルイソメラーゼの cyclophilin A が、グリア分化の促進に働くことを証明している<sup>1)</sup>。また、PRP19 $\beta$  には E3 触媒ドメインである ring finger domain を有していることから、同定されたプロテアソーム活性化因子 PA200 と共同して、ユビキチン・プロテアソーム系に関与することが示唆された。そこで、PRP19 $\beta$  は STAT3 のリン酸化を負に制御するホスファターゼをユビキチン・プロテアソーム系により分解し、STAT3 のリン酸化を制御しているのではないかと仮定し、以下の解析を行った。

Table.1 PRP19 $\beta$ は特異的に結合する因子の探索

PRP19 $\beta$ に特異的である19アミノ酸とその前後の配列を含む27アミノ酸をベイトとして、Yeast two hybrid法によりレチアイン酸処理12時間後のP19細胞DNAライブラリーよりスクリーニングし、PRP19 $\beta$ が結合する因子の探索を行った。得られた10個の陽性クローンの中には、ユビキチンプロテアソーム経路で標的するプロテアソーム活性化因子PA200同定された。

name	Number of clones
unknown	3
prothumicin alpha ( Ptma )	1
ribosomal protein S7	1
ribosomal protein S26	1
cyclophilin A (CypA)	1
ribosomal protein S1a	1
Endometrial bleeding associated factor (Ebfaf)	1
proteasome activator subunit 4 (PA200)	1

JAK-STAT 経路の STAT3 のリン酸化を制御していることが報告されている PTP1B、JAK のリン酸化を制御していることが示唆されている SHP2 の発現量をウェスタンブロットにより細胞株間で解析した。その結果、SHP2 の発現量は細胞株間で有意な差が見られなかったのに対し、PTP1B では S1 で発現量が減少していることが明らかとなった (Fig. 3A)。そこで、この発現量の減少が分解によるものか否かを解析するために、タンパク合成阻害剤である cycloheximide を処理してタンパクの合成を阻害し、PTP1B の代謝回転速度を比較した。その結果、cycloheximide 処理 24 時間後には、S1 では顕著に PTP1B のタンパク質量が減少し、一方 A1 ではほとんど変化がなかった (Fig. 3B, C)。この結果から、PRP19 $\beta$  が PTP1B の分解を誘導することで STAT3 のリン酸化の促進に働いている可能性が示唆された。

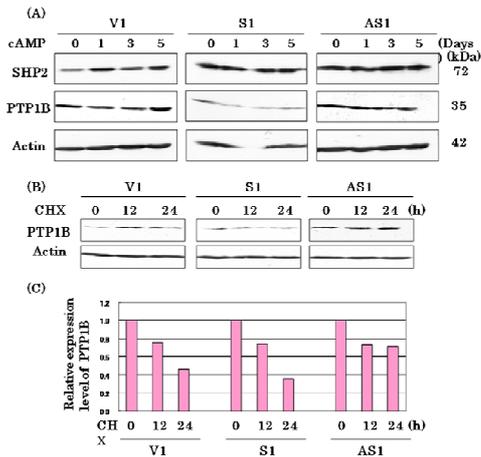


Fig. 3 PRP19βはPTP1Bタンパク質の発現を低下させる

(A) COS7細胞にPRP19β (wild typeあるいはring finger domain欠損体)を遺伝子導入し、48時間後にcAMPを添加し、0, 1, 3, 5日経過後にタンパク質を調製し、Western blottingを行った。SHP2, PTP1B, Actinの発現をWestern blottingにより解析した。  
 (B) 同様にcAMP処理を行い、24時間後に転写阻害剤であるcycloheximide (CHX)を最終濃度1 mg/mlになるように添加し、PTP1Bの発現をウェスタンブロット解析により解析した。  
 (C) Actinを内部標準としてPTP1Bの発現量を数値化した。

*In vitro*でのPRP19βとPTP1Bの結合を調べるため、COS7細胞にPRP19βとPTP1Bを一過性に遺伝子導入し $\alpha$ -PTP1B抗体で免疫沈降を行った。その結果、両者が結合していることが明らかとなった(Fig. 4A)。PRP19βによるPTP1Bのユビキチン化を証明するために、COS7細胞にPRP19βのwild typeあるいはring finger domain欠損体、PTP1BとHisタグ標識ユビキチンがタンデムに結合したプラスミドベクター[His-(Ub)<sub>8</sub>]を一過性に遺伝子導入し、 $\alpha$ -PTP1B抗体で免疫沈降を行い、 $\alpha$ -PTP1B抗体でウェスタンブロット解析を行った。その結果、wild type PRP19βを遺伝子導入によりユビキチン化されたPTP1Bが110 kDaに検出されたが、ring finger domainを欠損させたPRP19βを遺伝子導入したもので

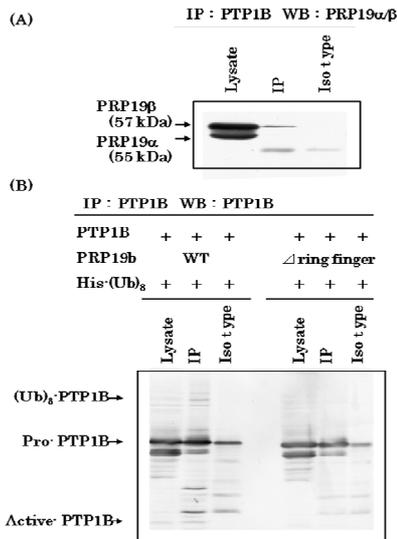


Fig. 4 PRP19βはPTP1Bと結合しユビキチン化する

(A) COS7細胞にPTP1BとPRP19β発現ベクターを遺伝子導入し、48時間後に最終濃度が1 mMになるように1 mM cAMPを添加し、24時間後に1 mM cAMPを添加し、0, 1, 3, 5日経過後にタンパク質を調製し、Western blottingを行った。SHP2, PTP1B, Actinの発現をWestern blottingにより解析した。  
 (B) 同様にcAMP処理を行い、24時間後に転写阻害剤であるcycloheximide (CHX)を最終濃度1 mg/mlになるように添加し、PTP1Bの発現をウェスタンブロット解析により解析した。  
 (C) Actinを内部標準としてPTP1Bの発現量を数値化した。

はPTP1Bのユビキチン化は検出されなかった(Fig. 4B)。このことから、PRP19βのring finger domainを介してPTP1Bがユビキチン化されることが明らかとなった。

PRP19βによるPTP1Bのユビキチン化を介したPTP1Bの分解促進がアストロサイト分化与える影響を調べるために、野生型PRP19βあるいはring finger domainを欠損させたPRP19β  $\Delta$ ring finger domainベクターをC6細胞に遺伝子導入して、cAMPを添加したアストロサイト分化をGFAPの発現量を指標に解析した。その結果、PRP19β  $\Delta$ ring finger domainを過剰発現させると、GFAP陽性のアストロサイトへの分化がコントロールに比べ3割に抑制された(Fig. 5)。このことから、PRP19βはPTP1Bのユビキチン化と分解促進を介してアストロサイト分化を促進しており、PRP19β  $\Delta$ ring finger domainはアストロサイト分化に対してドミナントネガティブに作用して野生型のPRP19βの機能が抑制することが示唆された。

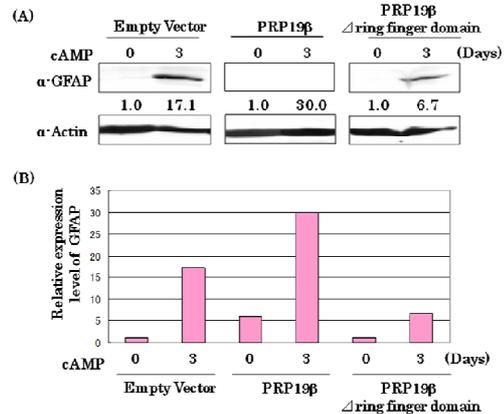


Fig. 5 PRP19β ring finger domainを介してアストロサイト分化を促進する

(A) C6細胞にPRP19β (wild typeあるいはring finger domain欠損体)ベクターあるいは空ベクターをそれぞれ遺伝子導入し、24時間後にG418を400 ng/mlで処理して1週間選択を行った。その後、1 mM cAMPを添加し、3日後にタンパク質を調製し、アストロサイト分化の指標であるGFAPの発現をWestern blottingにより解析した。  
 (B) Actinの発現を内部標準として数値化した。

以上の結果から、C6細胞内において、PRP19βはring finger domainを介してPTP1Bをユビキチン化することでSTAT3のリン酸化による活性化を誘導し、アストロサイトへの分化を促進させていることが明らかになった。本研究により明らかとなった。

## (2) PRP19αおよびβの遺伝子発現制御メカニズムの解析

PRP19遺伝子の発現制御メカニズムを調べるために、転写因子結合配列解析ソフトとして公開されているTF SEARCHおよびTRANSFACを用いてrat Prp19遺伝子の5'上流領域(ORF開始点から-10,000 bp~+2,000 bpの領域)のプロモーター解析を行った。TRANSFACではスコア90以上の結果を参照し、2つのソフトで共通して結合の可能性が予測された転写因子の結果のみを抽出した結果、アストロサイト分化に係るSTATx、とNF-1お

よびニューロン分化時に活性化するC/EBPの結合領域が存在した。中でも第1イントロンを含む複数の領域でSTATの結合配列と相同性の高い配列が存在していた(Fig. 6A)。このことから、STATがPRP19遺伝子産物の転写を制御している可能性が考えられた。

これまでの研究で、P19細胞をRAにより神経分化誘導した際、神経分化誘導初期においてPRP19 $\alpha$ および $\beta$ の発現が上昇することが明らかとなっている<sup>1)</sup>。また、神経分化誘導初期に当たるRA処理3時間後からSTAT3の活性化することから、PRP19 $\alpha$ および $\beta$ の発現上昇とSTAT3の活性化に相関がみられる。そこで、アストロサイト分化誘導のSTAT3の活性化がPRP19 $\alpha$ および $\beta$ の発現を制御していると推測し、JAKキナーゼ阻害剤であるAG490を用いて、STAT3活性化の抑制によるPRP19 $\alpha$ および $\beta$ 発現の影響を調べた。C6細胞にAG490を処理して2時間後に分化誘導を行い、3日目に細胞抽出液を調製しウェスタンブロットを行ったところ、AG490の処理濃度依存的にSTAT3の活性化が抑制された(Fig. 6B)。また、RT-PCRによりPRP19 $\alpha$ および $\beta$ の発現を解析した結果、活性化STAT3の抑制とともに発現が減少していくことが明らかとなった(Fig. 6B)。この結果から、PRP19 $\alpha$ および $\beta$ の発現上昇にはSTAT3の活性化が必要であることが明らかとなり、C6細胞においてアストロサイト分化誘導に伴うPRP19 $\alpha$ / $\beta$ の発現誘導はJAK-STAT経路の活性化を介していることが強く示唆された。

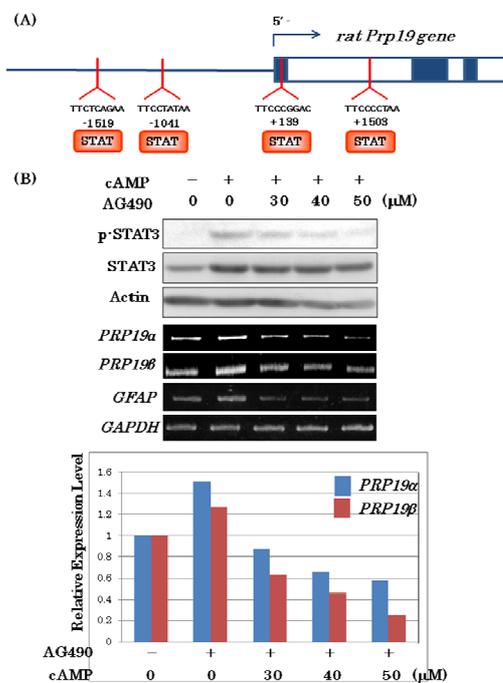


Fig. 6 アストロサイト分化誘導時にPRP19の発現はSTAT3により制御される

(A) rat Prp19遺伝子5'上流領域(-10,000~+2,000)に対してinsilicoによるプロモーター解析を行った。TF SEARCHならびにTRANSFACを用いて調べた結果、2つのサイトで共通してPRP19遺伝子のプロモーター領域に、4ヶ所のSTAT結合領域が存在した。  
(B) C6細胞にJAKキナーゼ阻害剤AG490を処理して2時間後に1 mM D cAMP処理により分化誘導し、3日後にタンパク質とRNAを調製した。STAT3の活性化を $\alpha$ -pSTAT3および $\alpha$ -STAT3抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。PRP19 $\alpha$ / $\beta$ 発現はPRP19 $\alpha$ / $\beta$ プライマーでRT-PCRを行った。ウェスタンブロット解析ではActinをRT-PCRではGAPDH発現を内部標準として用いた。

### (3) 神経栄養因子による神経分化誘導モデルの解析

NGFファミリーは全て同一のp75<sup>NTR</sup>に結合する一方、Neurotrophic tyrosine kinase receptor (Trk)にはA、B、Cの3種類が存在し、それぞれにNGF、BDNF、NT-3が特異的に結合する。P19細胞をRAにより神経分化誘導し、GFAP陽性アストロサイトに分化する神経分化誘導後11日目までのNGFファミリーレセプターの発現をRT-PCRにより解析した。神経分化誘導後4日目からは、全てのNGFファミリーレセプターが発現していることが明らかとなった(Fig. 7)。この結果を基に、以後P19細胞の神経分化誘導後4日目に各神経栄養因子を添加し、神経分化誘導後6日目にニューロンの多様化への影響を調べた。神経栄養因子のニューロンサブタイプ特異化への影響を解析するために、P19細胞を神経分化誘導の4日目にNGFあるいはBDNFを1、10、50 ng/mlの濃度でP19細胞に添加し、6日目に各ニューロンサブタイプマーカーの発現をRT-PCRによって解析した。NGF添加によりコリン作動性ニューロンマーカーcholine acetyltransferase (ChAT)、グリシン作動性ニューロンマーカーNMDA receptor channel subunit 3A (NR3A)とドーパミン作動性ニューロンマーカーnuclear receptor related 1 (Nurr1)の発現が亢進された(Fig. 8A)。また、グルタミン酸作動性ニューロンマーカーNMDA receptor channel subunit 2B

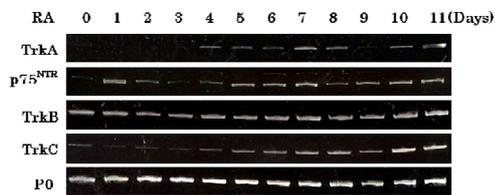


Fig. 7 P19細胞の神経分化誘導時におけるNGFファミリーレセプターの発現変化

P19細胞を神経分化誘導し、NGFファミリーレセプターであるTrkA,B,Cとp75<sup>NTR</sup>の発現変化をそれぞれの遺伝子に特異的なプライマーを用いてRT-PCRにより解析した。内部標準にはP0の発現を用いた。

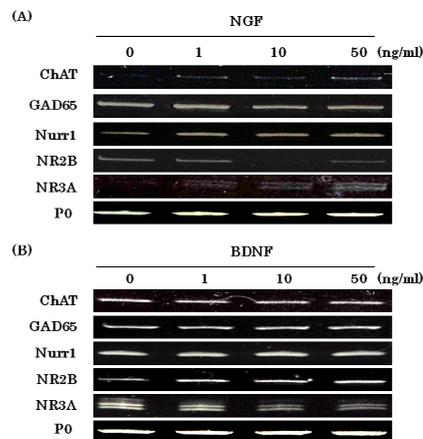


Fig. 8 P19細胞のNGFおよびBDNF刺激によるニューロンサブタイプ特異化に対する影響

(A) P19細胞を神経分化誘導し、4日目に表記濃度でNGFを添加し、6日目に各ニューロンサブタイプマーカーの発現をRT-PCRによって解析した。内部標準としてP0の発現を調べた。  
(B) (A)と同様にBDNFを表記濃度でP19細胞に添加し、ニューロンサブタイプマーカーの発現をRT-PCRにより解析した。内部標準としてP0の発現を調べた。

(NR2B)の発現は抑制され、GABA 作動性ニューロンマーカーGlutamate decarboxylase 65kDa (GAD65)の発現はNGF 添加による影響は受けなかった(Fig. 8A)。一方でBDNF 添加ではNR2Bが発現亢進とNR3Aが発現抑制されたがChAt, GAD65とNurr1の発現には影響を与えなかった。これらのことより、NGFは中枢神経系の発生時におけるコリン、ドーパミンおよびグリシン作動性ニューロンの特異化を促進し、グルタミン酸作動性ニューロンの特異化を抑制することが、BDNFは中枢神経系の発生時におけるグルタミン酸作動性ニューロンの特異化を促進し、グリシン作動性ニューロンの特異化を抑制することが明らかとなり、NGFとBDNFはニューロンサブタイプへの特異化に対照的な機能をする事が示唆された。

本研究で明らかにしたPRP19 $\alpha$ とそのスプライシングバリエーションPRP19 $\beta$ によるグリア細胞分化メカニズムとPRP19遺伝子発現制御機構の解析は、未だ詳細が明らかにされていない発生段階でのニューロンからグリア細胞分化誘導へと切り替わるスイッチ機構の解明に繋がる重要な知見であり、スプライシング分子機構が破綻したときに生じる神経疾患の発症機序に対する基礎的研究として、重要な知見を提供すると思われる。これらの研究成果は国内の主要な学会で発表を行った。また、神経栄養因子を用いた神経幹細胞からニューロン/グリア細胞への、分化誘導モデルを確立することは、再生医療の応用としてニューロン変性で引き起こされるアルツハイマー病やパーキンソン病、オリゴデンドロサイトの変性脱落に伴う多発性硬化症またはグリア細胞の機能異常が原因と考えられる統合失調症に対する、新たな治療法の開発への貢献が期待される。

#### 参考文献

1) Yumiko Urano, Yasushi Kawasaki, Fumio Tashiro, *et. al.*, Involvement of the mouse Prp19 gene in neuronal/astroglial cell fate decisions, J. Biol. Chem., Vol 340, pp7498-7514, 2006

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0件)

[学会発表] (計 6件)

- ①三宮真奈、川野真梨夢、橋良美、落合寛史、荒屋さやか、田代由美子、川崎靖、田代文夫、Prp19 $\beta$ によるアストロサイト分化促進の分子メカニズム解析、BMB(biochemistry and molecular biology)

2008, 神戸国際展示場

- ②山田健之、木本明宏、吉村大祐、田代由美子、川崎靖、田代文夫、MEIS1はP19細胞の神経分化を促進する、BMB(biochemistry and molecular biology) 2008, 神戸国際展示場
- ③川崎靖、内田洋平、遊佐渉、山田健之、川野真梨夢、田代(浦野)有美子、郡司渉、宇津木孝彦、村上康文、田代文夫、Involvement of PRP19 $\beta$  in Neuronal/Astroglial Cell Fate Decisions, BMB(biochemistry and molecular biology), 2007, パシフィコ横浜
- ④川野真梨夢、橋良美、田代(浦野)有美子、落合寛史、川崎靖、田代文夫、PRP19-betaによるグリア分化誘導メカニズム、BMB(biochemistry and molecular biology), 2007, パシフィコ横浜
- ⑤遊佐渉、山田健之、嶽本香菜、木本明宏、川野真梨夢、落合寛史、三宮真奈、田代(浦野)有美子、郡司渉、宇津木孝彦、村上康文、川崎靖、田代文夫、神経分化関連因子PRP19 $\beta$ によるIGF-2を介したアストロサイト分化制御機構、BMB(biochemistry and molecular biology), 2007, パシフィコ横浜
- ⑥山田健之、遊佐渉、木本明宏、嶽本香菜、田代(浦野)由美子、郡司渉、宇津木孝彦、村上康文、川崎靖、田代文夫、Meis1aとそのスプライシングバリエーション体 Meis1bによる神経分化制御 BMB(biochemistry and molecular biology), 2007, パシフィコ横浜

[図書] (計 1件)

- ①村上康文、田代文夫、他、ポストゲノムの分子生物学入門、講談社、pp54-62, 2007

[その他]

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田代 文夫(TASHIRO FUMIO)  
東京理科大学・基礎工学部・教授  
研究者番号：70089332

(2)研究分担者

2007年度  
川崎 靖(KAWASAKI YASUSHI)  
東京理科大学・基礎工学部・助教  
研究者番号：60385549

(3)連携研究者

2008年度  
川崎 靖(KAWASAKI YASUSHI)  
東京理科大学・基礎工学部・助教  
研究者番号：60385549