

氏 名 久 米 秀 明

学位（専攻分野） 博士(学術)

学 位 記 番 号 総研大甲第341号

学位授与の日付 平成10年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Evaluation of KW8, a novel NeuroD family :  
a neuron-specific differentiation-related  
transcription regulatory protein with basic  
helix-loop-helix domain

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 池 中 一 裕  
教 授 小 幡 邦 彦  
助 教 授 老 木 成 稔  
助 教 授 森 泰 生  
助 教 授 八 木 健 (岡崎国立共同研究機構生理学研究所)

## 論文内容の要旨

Basic helix-loop-helix (bHLH) transcriptional factors play critical roles for determination and differentiation in various developmental pathways both in mammals and invertebrates. Although the role of bHLH proteins have been defined in cell fate determination and differentiation in mammalian myogenesis and *Drosophila* neurogenesis, the regulation of mammalian neurogenesis by bHLH factors is still unclear. By their screening of the genes related to long term potentiation (LTP) in rat hippocampal slice, a novel neuron-specific bHLH protein was isolated. In the present thesis, he investigated the structure and properties of this novel bHLH protein, designated KW8, in the hope of elucidating the essential roles of bHLH proteins in neural development and neural functions.

KW8 was consisted of 1846 nucleotides. The predicted KW8 protein consisted of 382 amino acid residues with bHLH domain. In the bHLH region, the gene was highly homologous with NeuroD and MATH2, a mammalian homologue of *Drosophila* neurogenic bHLH protein Atonal. In this region, KW8 had 96% or 95% sequence identity between these proteins respectively. On the other hand, the sequence of the other regions had little homology with the known genes. On northern blotting the size of KW8 mRNA was ~2.5 kb. Westernblotting revealed the ~50 kDa band by the antibodies raised against the synthesized peptide of the N- and C-terminal region of the predicted amino-acid sequence.

The transactivation of reporter gene was observed in the yeast transformed with the construct contained carboxyl-terminal region of KW8. This result suggested that the region could activate the transcription of reporter gene instead of yeast GAL4 activator domain and KW8 had a transcriptional activity. The alkaline phosphatase treatment of brain tissues and the metabolic labeling with <sup>32</sup>Pi in COS-1 cells showed that the KW8 protein was phosphorylated *in vivo*. It was suggested that the transcriptional activity of KW8 might be regulated by the phosphorylation and dephosphorylation. In COS-1 cells and Neuro2A cells, overexpressed KW8 protein was localized in nuclei. However, no morphological changes were observed in overexpressing cells.

KW8 expression was first observed at embryonic day 12.5. The expression was detected in the wall of brain vesicles as well as in the spinal cord. In the cerebrum at embryonic days KW8 mRNA was observed mainly in the part of cortical plate. The result indicated that KW8 might be expressed in the neural cells which migrated from ventricular zone and undergone terminal differentiation, but not in the dividing neural precursor cells. KW8 was expressed not only at embryonic and neonatal days but also in adulthood. This result suggested that KW8 might be involved in the functions such as terminal differentiation and maintenance of the differentiated state in addition to neurogenesis.

In the adult, KW8 was expressed only in brain tissues, such as cerebral cortex, hippocampus and cerebellum. The KW8 protein localized in the nuclei of neuron. In these tissues KW8 was detected with equal abundance. NeuroD and MATH-2/NEX-1 were also detected in these tissues. But NeuroD expression was most abundant in the cerebellum, with lower levels in the cerebral cortex. In contrast, MATH-2/NEX-1 expression was showed high level in cerebral cortex and low level in cerebellum. This spatial diversity suggested that these factors might activate the transcription of different genes in the distinct tissues. In adult brain KW8 positive cells were also detected with anti- MAP2 antibody. In contrast, anti-GFAP and anti-CNPase antibody did not stain these cells. The results might suggest that KW8 mainly express and function in neurons.

The mouse genome clone of KW8 revealed that it was identical with the reported sequence of NDRF/NeuroD2. Hence it was concluded that NDRF/NeuroD2 was a mouse homologue of KW8. The gene contained two exons which were interrupted by a ~ 1 kb intron. The entire protein coding region including bHLH domain were located in exon 2. This feature of an intron-less coding region was conserved in several neurogenic bHLH proteins.

It has been suggested that the bHLH factors play an essential role for determination and differentiation in various tissues. The spatiotemporal distribution of KW8 raised the possibility that this gene might be involved in neuronal activities in adulthood, in addition to neurogenesis in embryonic stage.

## 論文の審査結果の要旨

Basic helix-loop-helix (bHLH)転写制御因子は、脊椎動物や無脊椎動物の発生分化において重要な役割を持つことが示唆されている。脊椎動物の神経系においても幾つかのbHLH転写制御因子が報告されている。しかしながら、その機能については未だ明らかにされていない。

久米秀明君は、ラット海馬スライスの長期増強 (LTP)に関連する遺伝子の検索の過程で、新規のbHLH転写制御因子遺伝子である KW8を得た。KW8は、1846bp、382残基の配列であることが推定され、bHLH領域内では、特に神経特異的 bHLH転写制御因子である NeuroDや MATH2に高い相同性が見出された。ラットにおけるKW8の発現は、12.5日胚から認められ、分裂している細胞ではなく、分化している細胞に発現していることが観察された。その発現は、発生の初期だけでなく、成体においても大脳皮質、小脳、海馬といった脳組織特異的にその発現が見られた。また、マーカー蛋白質の局在との比較から、KW8は、ニューロンに発現していることも示唆された。成体の脳内における局在はNeuroDやMATH2とは若干異なっており、脳内においてこれらの因子が異なった機能を持つことも考えられた。

KW8に対する抗体を作成し、イムノブロットを行ったところ、脳組織において50kDA程のバンドに反応が見られた。この抗体を用いた脳組織の免疫染色では、細胞の核内にKW8の発現が観察された。また、KW8を遺伝子導入した培養細胞においても、その発現は核内に見られた。しかし、その導入細胞の形態などに特に変化は見られなかった。

アルカリフォスファターゼを用いた脱リン酸化と<sup>32</sup>P正リン酸を用いた培養細胞の標識実験により、KW8が生体内でリン酸化を受けていることが示された。一方、KW8のbHLHのC端側の部分は、酵母内でレポーター遺伝子の転写を活性化したことから、この領域が転写活性化能を持つ可能性が示唆された。

以上の結果より、神経特異的 bHLH転写制御因子KW8は神経の発生分化の段階だけでなく、成体の脳内における神経活動においても重要な働きを持つこと、またKW8は、生体内においてリン酸化されていることが示された。KW8の転写活性化能が、このリン酸化によって制御されている可能性も十分に考えられた。

このように、久米君の研究は神経細胞の遺伝子発現制御機構を知る上で大きな手がかりを与えたもので、学位授与に値すると審査委員全員一致で判断した。また、博士論文は十分なレベルの英語で書かれており、出願者の英語能力は十分であると判断できた。生理学一般知識についての質問にもよく答えたので、久米秀明君は学位取得に十分な学識を有すると判断する。

また、審査委員会において提出論文の発表をさせた後に、その内容のみならず学問的背景や関連分野や研究動向についての口頭試問を行ったが、いずれに対する応答も的確であった。本論文は英語で書かれており、英語力にも何ら問題はないものと判断された。

以上、総合的に判断し、学位を取得するに足る水準に十分達しているものと判定した。