

氏 名 大河原 剛

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第 809 号

学位授与の日付 平成 1 6 年 9 月 3 0 日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 A novel basic helix-loop-helix (bHLH) transcriptional  
repressor, NeuroAB, expressed in bipolar and amacrine  
cells in the retina.

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 山 森 哲 雄  
教授 上 野 直 人  
教授 高 田 慎 治

All retinal neurons develop from a common retinal progenitor, cell fate becoming irreversible during the final mitosis. Different cell types are produced in an ordered manner: The most likely order in chick is retinal ganglion cells, cone photoreceptors, amacrine cells and horizontal cells, followed by rod photoreceptors, bipolar cells, and finally Müller glia, with significant overlap in the appearance of these different cell types. This order is largely conserved among the vertebrates, which suggests conserved regulatory mechanisms underlying the onset of specification of each cell type.

A variety of extrinsic and intrinsic factors have been demonstrated to regulate retinogenesis. Extrinsic factors including secreted factors have been suggested to influence intrinsic factors. It is known that the basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors play an important role as intrinsic factors in the cell fate determination of retinal cell types. Based on sequence similarity, neuronal bHLH proteins can be largely divided into two families: Achaete-Scute complex (AS-C) related proteins and Atonal-related protein (ARPs). Furthermore, based on phylogenetic tree analysis, four subgroups have been proposed in the ARP family: the Neurogenin, NeuroD, ATO, and BETA3 groups.

He identified a novel chick bHLH transcription factor, NeuroAB. A phylogenetic tree prepared from bHLH sequences suggests that NeuroAB is a member of the BETA3 group, which consists of BETA3, BHLHB4, and Olig1-3. *In situ* hybridization and immunostaining indicated that NeuroAB is expressed predominantly in postmitotic bipolar cells and GABAergic amacrine cells in the retina. These findings suggest that NeuroAB is involved in the maturation and maintenance of bipolar cells and GABAergic amacrine cells.

The bHLH transcription factors bind to DNA as dimers and recognize the consensus sequence CANNTG, called the E-box. A DNA pull down assay indicated that the NeuroAB protein binds to the E-box sequence. bHLH proteins function as a transcriptional activator or repressor in many developmental events. To investigate the transcriptional properties of NeuroAB, he performed reporter assays using the minimal herpes simplex virus thymidine kinase (TK) promoter with five copies of the E-box sequences and the native GAP-43 promoter containing E-box motifs. The results obtained from the two promoters suggested that NeuroAB functions as a transcriptional repressor.

Protein phosphorylation represents a mechanism that is frequently employed by cells to regulate functions of a variety of molecules including transcription factors. Recently, some transcription factors have been demonstrated to be regulated by phosphorylation at a specific serine residue by GSK3 $\beta$  that is a serine/threonine kinase known to play important roles in a variety of developmental events. He found a consensus phosphorylation site for GSK3 $\beta$  in NeuroAB at serine 56. A series of reporter assay showed that the repressive activity of NeuroAB is inhibited by phosphorylation at a specific serine residue in the consensus phosphorylation site for GSK3 $\beta$ . Similar phosphorylation sites are observed in other BETA3 group members: BETA3, BHLHB4, Olig1, and Olig2. This finding suggests that the activities of BETA3 group members are

commonly regulated by GSK3 $\beta$  or other kinases sharing the same substrate specificity such as GSK3 $\alpha$ . It is conceivable that protein phosphorylation regulates transcription factor activity by modulating cellular localization, protein stability, protein-protein interactions or DNA binding. The results of the DNA binding assays suggested that phosphorylation of NeuroAB by GSK3 $\beta$  leads to reduction of the DNA-binding activity.

As the expression profile of GSK3 $\beta$  in the developing retina had yet to be elucidated, he performed *in situ* hybridization to examine whether the expression of GSK3 $\beta$  is spatially and temporally regulated in the developing retina. Its strong expression was observed in ganglion cells from E8 and a subset of amacrine cells from E12. These findings suggest that NeuroAB is involved in the maturation and maintenance of bipolar cells and GABAergic amacrine cells and regulation by GSK3 $\beta$  plays an important role in retinogenesis.

## 論文審査結果の要旨

Basic Helix-loop-Helix ドメイン (bHLH ドメイン) を有する転写因子群は、発生過程において細胞の運命決定や分化・成熟等に機能することが知られている。申請者は cDNA display 法である RLCS 法を用いて、発生 8 日目のニワトリ網膜において耳側に領域特異的に発現する遺伝子として、新規の bHLH 型転写因子を同定した。bHLH ドメインについて系統樹解析を行ったところ、本分子は Atonal-related protein サブファミリー内の BETA3 グループに属することが明らかになった。

ニワトリ網膜における発現について、Northern blotting 法および *in situ* hybridization 法による mRNA レベルの解析、更に特異的抗体を用いたタンパクレベルの解析を行ったところ、本分子は発生 8 日目から、網膜の内顆粒層の細胞に特異的に発現することが明らかになった。また、発生 8 日目で認められた耳側領域特異的な発現パターンは一過性であり、網膜の発生が進むとともに均一なパターンに変化した。様々なマーカー分子との共発現について詳細な解析を行った結果、本分子は最終分裂を終了した双極細胞と GABAergic アマクリン細胞において特異的に発現していることが明らかになった。この発現様式は、本分子が網膜の発生において GABAergic アマクリン細胞 (amacrine) と双極細胞 (bipolar cell) の 2 種類の神経細胞 (neuron) の成熟および維持に関与することを示唆していることから、NeuroAB と命名した。

次に申請者は NeuroAB の生化学的な性質を明らかにするために、*in vitro* の系を用いて解析を行い、NeuroAB は E-box と呼ばれる DNA 配列に特異的に結合し、転写を抑制する活性を有することを明らかにした。また、NeuroAB は、セリン-スレオニンキナーゼである Glycogen syntase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) によって 56 番目のセリン残基がリン酸化されること、このリン酸化により E-box への結合能が抑制され、その結果、転写抑制活性が減少することを証明した。NeuroAB を発現するアマクリン細胞においては、発生 1 2 日目より GSK-3 $\beta$  の発現が認められることから、NeuroAB は発生過程において時期特異的な活性制御を受けていると推測された。

本研究はこれまで不明であった双極細胞と GABAergic アマクリン細胞の分化・成熟に機能すると思われる転写調節因子を初めて同定したものであり、網膜の発生機構に重大な貢献をするものとして評価される。従って、本論文は学位論文として十分な内容を備えていると審査委員会は判定した。