

論文の内容の要旨

論文題目 骨格筋発生分化における転写因子 Lhx2 の機能解析

氏名 小高 悠作

LIM ホメオボックス型転写因子である Lhx2 は、発生において必須なタンパク質である。Lhx2 ノックアウトマウスは、肝臓における造血発生が起こらず胎生致死となる。また、発生期における Lhx2 の発現部位は、前脳、眼、嗅上皮、神経管、そして肢芽において確認されている。Lhx2 はこれら組織で細胞の増殖と分化を制御していると考えられている。転写因子である Lhx2 の作用機序として、Lhx2 のホメオドメインを介した転写活性機構が知られている。鰓弓中胚葉における Myf5 遺伝子、神経前駆細胞における Pax6、Cer1 遺伝子、脳下垂体における甲状腺刺激ホルモンと卵胞刺激ホルモンをコードする遺伝子のプロモーターに結合し、転写を活性化することが報告されている。Lhx2 の標的となるタンパク質と下流エフェクター遺伝子は、組織細胞ごとに異なっているが、肢芽における作用標的は未だにわかっていない。肢芽は、後に骨格筋や骨など

に分化する前駆細胞で構成されており、先行研究では *Lhx2* が筋発生に関与していることがわかっていたため、*Lhx2* は肢芽において骨格筋の発生に作用しているものであると考えられた。

そこで、*Lhx2* が骨格筋分化に作用するかを明らかにするために、*Lhx2* を筋芽細胞株 C2C12 細胞に過剰発現させ、効果を調べた。すると、*Lhx2* を過剰発現した C2C12 細胞では、筋管形成能が消失することを見出した。このとき、筋脱分化因子として知られている *Msx* ホメオボックス遺伝子や、TGF β スーパーファミリー遺伝子群の発現増加が認められた。本研究では、この現象の分子機序解析を通して骨格筋の発生分化における *Lhx2* の役割を明らかにすることを目指した。

Lhx2、*Msx1*、*Msx2* は、いずれもマウス胎仔肢芽において高発現していることが先行研究により明らかとなっている。そこで、*Lhx2* が *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の転写に必須であるかどうかを明らかにするため、胎生 11.5 日齢マウス胎仔の肢芽を単離し、*Lhx2*-siRNA レトロウイルスベクターをスピニン感染法によって感染させた。この肢芽を、寒天上で 3 日間器官培養を行った後、*Lhx2*、*Msx1*、*Msx2* の mRNA 発現レベルをそれぞれ解析した。*Lhx2* の発現が抑制された肢芽では、*Msx1*、*Msx2* 共に遺伝子発現量が減少していた。従って、*Lhx2* は *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の上位で働いていることが示唆された。

次に、*Lhx2* が、*Msx1*、*Msx2* 遺伝子を直接転写制御しているか、レポーターアッセイを用いて検討した。先行研究により、*Lhx2* のコンセンサス結合配列が明らかとなっている。*Msx1* は、転写開始点上流-1795 から-1790 base pair(bp)と、-1309 から-1304 bp 領域に、*Msx2* は、-267 から-262 bp と、-186 から-181 bp 領域に、それぞれ 2 ヶ所ずつ *Lhx2* コンセンサス結合配列を有していた。これらのゲノム DNA 領域を含む pGL3 ベクター

を 293T 細胞にトランスフェクトしたところ、*Msx1* 遺伝子の-2097 から-1189 bp 領域を挿入した場合に、*Lhx2* 依存的なルシフェラーゼ活性が約 48 倍増大し、*Msx2* 遺伝子の-533 から+73 bp 領域を挿入した場合に約 4 倍増大した。さらにこの活性は、*Lhx2* 結合配列を欠失させると有意に低下した。これらの結果より、*Lhx2* はコンセンサス結合配列を介して直接 *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の転写を制御していることが示唆された。

つづいて、*Lhx2* が *Msx1*、*Msx2* のコンセンサス結合配列に結合しているか、ゲルシフトアッセイにより解析した。*Msx1*、*Msx2* 遺伝子上流域のコンセンサス結合配列を含んだ 20 mer のオリゴヌクレオチドを ^{32}P で末端標識し、*Lhx2* を過剰発現させた 293T 細胞から単離した核抽出タンパク質と反応させたところ、電気泳動移動度が遅くなった ^{32}P 標識バンドが検出された。これらのバンドの位置は、抗 *Lhx2* 抗体存在下では上方にスーパーシフトした。一方で、コンセンサス結合配列を改変したオリゴでは、これらの ^{32}P 標識バンドは検出されなかった。

さらに、生体内で *Lhx2* が *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の転写制御を行っている証拠を得るために、肢芽を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイを行った。マウス胎仔肢芽のクロマチン分画を、抗 *Lhx2* 抗体とコントロール抗体を用いて免疫沈降を行い、PCR によって比較した。その結果、抗 *Lhx2* 抗体の免疫沈降物中に、*Msx1*、*Msx2* 遺伝子のプロモーター領域がそれぞれ検出された。

最後に、この *Lhx2* の転写制御様式は、他の遺伝子についても同様に行われるのかを確かめるために、鰓弓において *Lhx2* が転写制御する *Myf5* 遺伝子を、肢芽を用いた ChIP アッセイにより確認した。すると、先行研究と同様に *Lhx2* が *Myf5* 遺伝子上流で結合することがわかった。しかしながら、*Myf5* 遺伝子の発現レベルは増加しなかったことから、組織特異的に存在するコファクターと協調しながら転写制御することが示唆され

た。

以上の実験結果は、Lhx2 が *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の転写制御領域に結合していることを証明する。骨格筋発生の前組織である肢芽では、まず間葉系組織の増殖成長がおこる。Lhx2 は *Msx1*、*Msx2* 遺伝子の転写を正に制御することによってそのプロセスをサポートする。そして、TGF β など他の下流エフェクター遺伝子の発現誘導を介して骨格筋系への早期分化を抑制しているものと推察される。また、Lhx2 の転写制御機構は組織特異的な転写因子と協調しながらそれぞれの発生分化に作用することが考えられる。