

博士論文

ポリコーム群タンパク質による神経系前駆細胞の
分化運命転換メカニズムの解析

東京大学大学院 工学系研究科
化学生命工学専攻 後藤研究室
37107164 壺井 將史

目次

	ページ
略語一覧	2
緒言	5
第一章 序論	6
第二章 材料と実験方法	27
第三章 結果	37
第四章 考察	64
結言	78
参考文献	79
発表論文	90
謝辞	91

略語一覽

aCSF	Artificial cerebrospinal fluid
ASE	amphid sensory
bHLH	Basic Helix-Loop-Helix
Bmi1	B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1
BPB	Bromophenol blue
BRCA1	breast cancer susceptibility gene 1
BSA	Bovine Serum Albumin
Cas9	CRISPR associated protein 9
Cbx	chromobox
cdkn	Cyclin-dependent kinase inhibitor
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat
DIV	Days <i>in vitro</i>
Dlk1	Delta-like 1 homolog
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribo nucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Eed	embryonic ectoderm development
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced GFP
ERT2	Estrogen receptor T2
ESCs	Embryonic stem cells
Ezh1/2	Enhancer of zeste homologue 1/2
E~	Embryonic day ~
FA	formaldehyde
FACT	Facilitates chromatin transcription
FAIRE	Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements
Fezf2	Forebrain embryonic zinc finger 2
FGF	Fibroblast Growth Factor

FISH	fluorescence in situ hybridization
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFAP	Glia fibrillary acidic protein
GFP	Green fluorescent protein
HDAC	Histone Deacetylase
H2AK119ub1	Histone H2A Lysine 119 monoubiquitination
H3K4me2	Histone H3 Lysine 4 dimethylation
H3K4me3	Histone H3 Lysine 4 trimethylation
H3K27ac	Histone H3 Lysine 27 acetylation
H3K27me3	Histone H3 Lysine 27 trimethylation
ICM	inner cell mass
ICC	Immunocytochemistry
IRES	Internal ribosome entry site
Kdm2b	lysine (K)-specific demethylase 2B
Lef1	Lymphoid enhancer-binding factor-1
L3mbtl2	Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 2
Mbd3	Methyl-CpG-binding domain protein 3
MEF	Mouse embryonic fibroblast
mRNA	messenger ribonucleic acid
Neurog1/2	Neurogenin 1/2
NP-40	Nonidet P-40
NT2	neuronally committed human teratocarcinoma cells (Ntera-2)
NuRD	Nucleosome Remodeling Deacetylase
PFA	Paraformaldehyde
PBS	Phosphate-buffered saline
PcG	Polycomb Group Proteins
PCR	Polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimine
Phc	Polyhomeotic-like protein
PIC	pre-initiation complex
PRC1/2	polycomb repressive complex 1/2
RNAPII	RNA polymerase II

RNAPII S2P	Serine2 phosphorylated form of RNA polII
RNAPII S5P	Serine5 phosphorylated form of RNA polII
qPCR	quantitative PCR
RT	Reverse transcription
RYBP	RING1 and YY1-binding protein
SAM	Sterile alpha motif
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Suz12	Suppressor of zeste 12 homolog
SWI/SNF	Switch/Sucrose NonFermentable
TALE	Transcription activator-like effector
TBP	TATA-binding protein
TBS	Tris-buffer saline
Tcfap2c	transcription factor AP-2 gamma
Tet	Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation
Trim37	Tripartite motif-containing protein 37
TrxG	Trithorax Group proteins
TSS	Transcription start site
Ubc	Ubiquitin-conjugating enzymes
VPA	Valproic acid
VP16	Herpes simplex virus protein 16
VSV-G	Vesicular stomatitis virus G glycoprotein
WB	Western blotting
YAF2	YY1 associated factor 2
Zrf1	Zuotin-related factor 1
4-OHT	4-hydroxytamoxifen

緒言

内部細胞塊に由来する多能性幹細胞は様々な種類の細胞を産み出せる多分化能を有する。多能性幹細胞において、個体発生に重要な **developmental gene** は、発現はしていないが分化刺激に応じて活性化可能な「転写準備状態（解除可能な抑制状態）」にある。2006 年にマウス ES 細胞において、多くの **developmental gene** における「転写準備状態（解除可能な抑制状態）」の形成に貢献する中心的な因子としてポリコーム群タンパク質複合体（Polycomb group proteins; **PcG**）が報告された（Azura et al., 2006; Bernstein et al., 2006）。それ以降、幹細胞における **PcG** の遺伝子発現制御の重要性が広く認識され、ES 細胞のみならず様々な組織幹細胞の分化能制御に **PcG** が重要な働きをすることが分かってきた。一方で、発生の時間が進むに伴い、**developmental gene** は適切なタイミングで「解除できない抑制状態」によって転写抑制され、幹細胞の分化能は制限されていく。近年の研究から、**PcG** がこの「解除できない抑制状態」を形成し、幹細胞の分化能の制限に働くことも明らかになった。

以上のように、**PcG** は個体発生の様々な段階で **developmental gene** の発現制御を行う重要な因子であることが分かってきた。一方で近年、**PcG** はこれまで考えられていた以上に多様な構成因子から成り立つことが明らかになり、その発現制御機構モデルも年々刷新されている。つまり、**PcG** がどのような分子メカニズムによりターゲット遺伝子の発現を抑制するかについては未だ不明な点が多く残されている。また、**PcG** が **developmental gene** において発生の時間軸に従って「解除可能な抑制状態」から「解除できない抑制状態」へと切り替えることは、「幹細胞がいつどのような種類の細胞を産み出すか」を決める重要な分子基盤の一つである。しかしながら、この発生学上非常に重要な問題に対する答えは未だ得られていない。

本研究では、大脳新皮質由来神経系前駆細胞をモデル系として **PcG** がいかにしてターゲット遺伝子の発現抑制を引き起こすかを解明することを目的とした。加えて、神経系前駆細胞において **PcG** が「解除可能な抑制状態」と「解除できない抑制状態」を形成する分子メカニズム、およびその切り替えを引き起こすメカニズムの解明に取り組んだ。

第一章 序論

i . PcG は幹細胞の分化多能性維持に貢献する

幹細胞は自己複製能および分化能を有した細胞である。例えば、内部細胞塊 (inner cell mass; ICM) に由来する多能性幹細胞から樹立された胚性幹細胞 (Embryonic stem cells; ESCs) は我々の体を構成する各組織に存在するほぼ全ての細胞を産み出すことのできる分化多能性 (pluripotency) を有する。そもそも、幹細胞の分化能はいかにして規定されているのだろうか。

これまで、幹細胞の分化能を規定する分子メカニズム解明のために *in vitro* で維持、増殖が可能な ES 細胞が広く用いられてきた。ES 細胞の中では発生過程において重要な働きをする一連の遺伝子群 (developmental genes) はほとんど発現しないように抑制されている。しかしながら、これらの遺伝子群は分化刺激に応じて発現可能な状態 (poised state) にある。この「poised state」にある developmental gene は低レベルではあるが転写が起きていることが分かっており、それらの遺伝子座において転写開始型の RNA ポリメラーゼ II (RNAP II S5P; RNA ポリメラーゼ II の C 末端部位に存在するリピート配列 Y-S-P-T-S-P-S の 5 番目のセリン残基にリン酸化が入ったフォーム) が転写開始点近傍に存在することが報告されている (Guenther et al., 2007; Mikkelsen et al., 2007; Stock et al., 2007; Brookes et al., 2012)。現在、この「poised state」が ES 細胞の分化多能性を規定する中心的なメカニズムであると考えられている。それではこの「poised state」はいかにして形成されるのだろうか。これまでに、クロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP) とマイクロアレイを組み合わせた ChIP-on-chip 法や高速 DNA シーケンスを組み合わせた ChIP-seq 法を用いたヒストン修飾のゲノムワイドな解析が行われた。その結果、ES 細胞の developmental gene の遺伝子座 (プロモーター領域) に、抑制性のヒストン修飾として知られるヒストン H3 の 27 番目のリシンのトリメチル化 (H3K27me3) 修飾および転写活性化との相関が知られている H3K4 トリメチル化 (H3K4me3) 修飾が濃縮していることを複数のグループが報告した (Azuara et al., 2006; Bernstein et al., 2006)。H3K27me3 修飾はポリコム群タンパク質複合体 (PcG; Polycomb Group Proteins) に、H3K4me3 修飾はトライソラックス群タンパク質複合体 (TrxG; Trithorax Group proteins) によってそれぞれ触媒される。転写抑制および転写活性化の指標となるヒストン修飾が

同じ遺伝子座上に濃縮した状態は **bivalent state** と呼ばれ、**developmental gene** における「**poised state**」の形成に重要であると考えられて来た。特に **PcG** は、その機能欠損によって **ES** 細胞の未分化性の維持が出来なくなることから広く注目されてきた。

PcG は進化的に高度に保存されたタンパク質の複合体であり、ショウジョウバエにおいて体節形成や前後軸形成に重要なホメオティック遺伝子 (**Hox genes**) の制御因子として初めて同定された (Lewis., 1978)。2つの主要な **PcG** 複合体として **PRC1** 複合体および **PRC2** 複合体が知られており、**PcG** による遺伝子発現制御には **PRC1** および **PRC2** が協調的に働く。実際に、**ES** 細胞において **PRC1** の構成因子である **Ring1A/B** や **PRC2** の構成因子である **Ezh1/2**、**Eed** タンパク質の機能欠損により **developmental gene** の脱抑制が起きることが示されている (Boyer et al., 2006; Endoh et al., 2008; Shen et al., 2008)。このことから、**ES** 細胞において **PcG** は **developmental gene** の「**poised state**」の形成に必須の働きをしていると考えられる。

また、分化能を持った幹細胞は各組織にも存在し、一般的に組織幹細胞 (**Tissue stem cell**) と呼ばれる。**PcG** は様々な組織幹細胞においても、その未分化性の維持に貢献していることが分かっている。表皮幹細胞において **PRC1** の構成因子である **Cbx4** をノックダウンすると分化が促進され、**PRC1** が未分化性の維持に必要であることが示唆されている (Luis et al., 2011)。また、表皮幹細胞、神経幹細胞において **PRC2** の構成因子である **Ezh2** をノックアウトすると未分化性が維持されず分化細胞が増加することが報告されている (Ezhkova et al., 2009; Pereira et al., 2010)。このように、**ES** 細胞や組織幹細胞の分化能の維持に **PcG** が重要な働きをすることが明らかになっている。

ii. **PcG は分化能を失った（分化した）細胞において他の分化系譜への分化能を制限する**

一方で、内部細胞塊に存在する多能性幹細胞や組織幹細胞の分化能は発生の進行に伴って徐々に制限されていき産み出す細胞の種類が限られていく。**PcG** は、幹細胞が特定の分化系譜には分化しないように、その分化能を制限することも知られている。例えば、マウス大脳新皮質に存在する神経系前駆細胞（神経幹細胞）は発生過程においてまず様々な種類のニューロンを産生し、出生後はグ

リア細胞の一種であるアストロサイトを産生する。発生後期の神経系前駆細胞と比較し発生早期の神経系前駆細胞の方がより多くの種類の細胞を産み出すことから、神経系前駆細胞の分化能は発生時期の進行に伴って制限されると考えられている (Frantz and McConnell, 1996; Desai and McConnell, 2000)。PcG は神経系前駆細胞のニューロン分化能を制限しニューロン分化期からアストロサイト分化期への転換を引き起こすことが示されている (Hirabayashi et al., 2009)。さらにこの報告では、ES 細胞における「解除可能な抑制状態」とは異なり、PcG はニューロン分化刺激が入っても分化しないような抑制状態を形成することが示されている。また他にも、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の生殖細胞の系において PRC2 の構成因子をノックアウトした変異体では、感覚ニューロンの一種である ASE ニューロンの決定因子である Che-1 に応答して生殖細胞がニューロンに転換することが報告されている (Patel et al., 2012)。つまり、線虫の生殖細胞において PRC2 は他の体細胞系譜への分化プログラムが活性化するのを抑制していることが示唆された。このように、発生過程のいくつかのコンテキストで PcG は幹細胞の未分化性維持のみならず幹細胞の分化能の制限にも貢献することが明らかになっている。

以上のように、PcG は発生過程の様々なコンテキストにおいて幹細胞の①分化能の維持や②分化能の制限に働くことが明らかになっている。つまり、PcG が適切なタイミングで developmental gene の「poised state (①に対応)」や「分化刺激が入っても解除できない抑制状態 (②に対応)」を形成することが、正常な個体発生に非常に重要であると考えられる。しかしながら、そもそも PcG がいかにして遺伝子発現を抑制するかについてさえ未だ不明な点が多く残されている。

iii. PcG による遺伝子発現制御メカニズム

これまでに PRC2 が H3K27me3 修飾を触媒し、PRC1 構成因子である Cbx タンパク質がこの修飾に結合することが報告されている (Cao et al., 2002)。さらに、PRC2 構成因子の欠損によって PRC1 構成因子のクロマチンへの局在が失われることが報告されている (Wang et al., 2004a)。そのため、PRC1 が PRC2 によって触媒される H3K27me3 修飾を認識、結合して直接遺伝子発現抑制を

引き起こすというスキームが提唱されてきた。それでは、PRC1 はどのようにして遺伝子発現抑制を引き起こすのだろうか。

iii-1. PRC1 は H2AK119ub1 修飾を触媒し遺伝子発現を抑制する

PRC1 の構成因子である Ring1A および Ring1B は RING finger ドメインを持ち、ヒストン H2A の 119 番目のリシンにモノユビキチン化修飾 (H2AK119ub1) を触媒することが報告された (Wang et al., 2004b)。Ring1A/B によって触媒される H2AK119ub1 修飾は不活化 X 染色体やマウス ES 細胞におけるいくつかの developmental gene 遺伝子座に濃縮することが示された (de Napoles et al., 2004; Fang et al., 2004; Stock et al., 2007)。さらに、最近になって MEF、ヒトテラトカルシノーマ NT2 細胞、マウス ES 細胞において ChIP-on-chip 法や ChIP-seq 法を用いた Genome-wide な H2AK119ub1 の修飾パターン解析が報告された (Kallin et al., 2009; Richly et al., 2010; Endoh et al., 2012)。これらの Genome-wide な解析から H2AK119ub1 修飾量と PRC1 による遺伝子発現抑制には高い相関が見られることが示されている。さらに、マウス ES 細胞において、Ring1B のノックアウトもしくは Ring1A/B ダブルノックアウトすると PcG ターゲット遺伝子座上で H2AK119ub1 修飾量が低下し、遺伝子の脱抑制が起こることが示されている (Stock et al., 2007; Endoh et al., 2012)。そのため、PRC1 による遺伝子発現抑制には Ring1B によって触媒される H2AK119ub1 修飾が非常に重要な働きをすると考えられてきた。

それでは、実際に Ring1B によって触媒される H2AK119ub1 修飾は転写抑制に必要なのだろうか。最近になって、H2AK119ub1 修飾の転写抑制における必要性をより直接的に検証する実験がマウス ES 細胞を用いて行われた。Ring1B のアミノ酸残基である 53 番目のイソロイシンは E2 ユビキチンリガーゼとの相互作用に必要であり、このイソロイシンをアラニンに置換した Ring1B 変異体は E2 との相互作用が失われ H2AK119ub1 修飾触媒活性が低下することが報告されている (Buchwald et al., 2006)。この変異体 (I53A) を、Ring1B を欠損したマウス ES 細胞に発現させ機能回復するか検討する実験が行われた。Ring1B をノックアウトすると PcG ターゲット遺伝子である Hox 遺伝子群は脱抑制されるが、Ring1B (I53A) を発現させた細胞では Hox 遺伝子群の抑制が回復した。つまり、PRC1 による Hox 遺伝子群の発現抑制に Ring1B の H2AK119ub1 修飾触媒活性が必要ないことが示された (Eskeland et al., 2010)。一方で、Ring1A

および Ring1B を両方とも欠損させたマウス ES 細胞を用いて同様の実験が行われた (Endoh et al., 2012)。Endoh らの報告では、Ring1B (I53A) 変異体を発現させた細胞で、Hox 遺伝子群を含む PRC1 ターゲット遺伝子の大部分において発現抑制が回復しなかった。このことから、Ring1B の H2AK119ub1 修飾触媒活性および H2AK119ub1 修飾が PRC1 による効率的な遺伝子発現抑制に必須の役割を果たすことが示された。上記の 2 つの報告で PRC1 による遺伝子発現抑制における H2AK119ub1 修飾の必要性に違いが出た要因として、Eskeland らの報告では Ring1A による compensation の影響がある可能性が指摘されている (Endoh et al., 2012)。以上から、少なくともマウス ES 細胞における developmental gene の発現抑制には Ring1B によって触媒される H2AK119ub1 修飾が必須の役割を果たすことが示唆されている。

それでは、H2AK119ub1 修飾はいかにして転写抑制に働くのだろうか。マウス ES 細胞の developmental gene において H2AK119ub1 修飾が濃縮している遺伝子座では転写開始型 RNA ポリメラーゼ II (RNAP II S5P) は検出されるものの転写伸長型 RNA ポリメラーゼ II (RNAP II S2P) は検出されないことが示されている (Stock et al., 2007; Brookes et al., 2012)。この報告では、Ring1B のノックアウトによって H2AK119ub1 修飾量の低下と共に RNAP II S5P 結合量の低下が見られた。一方で、RNAP II S2P の結合量の増加は見られなかったものの低リン酸化状態の RNAP II の結合量が増加していた。これらのことから、Ring1B もしくはそれによって触媒される H2AK119ub1 修飾は ES 細胞の developmental gene で特徴的に見られる RNAP II のコンフォメーションを維持するのに必要である可能性が示唆されている (Stock et al., 2007; Brookes and Pombo, 2009)。また、モノサイト/マクロファージの細胞株において 2A-HUB と呼ばれる E3 ユビキチンリガーゼは H2AK119ub1 修飾を触媒しケモカイン遺伝子の発現を抑制することが報告されている (Zhou et al., 2008)。この報告では、2A-HUB の機能欠損によって転写伸長に必要な FACT および RNAP II S2P の結合量が増加することが示されている。そのため、H2AK119ub1 修飾は転写伸長の阻害に働く可能性が示唆されている。一方で、H2A モノユビキチン化が転写伸長反応ではなく転写開始反応を阻害するという報告もなされている (Nakagawa et al., 2008)。この報告では、in vitro 再構成系を用いて H2A モノユビキチン化修飾が H3K4 ジメチル化修飾 (H3K4me2) および H3K4me3 修飾を阻害すること、また H3K4 のメチル化を阻害すること

で転写の伸長段階ではなく開始段階を抑制することを示している。

一方で、これまでに考えられてきた H2AK119ub1 修飾による遺伝子発現抑制メカニズムとは異なる新しい H2AK119ub1 修飾の機能を示す報告も最近なされている。PRC1 はこれまでに知られていた以上に様々な構成因子によって形成されており、構成因子の違いによって複数種類の複合体に大別されることが示された (Gao et al., 2012)。その中でも RYBP/YAF2 というタンパク質を含む Variant PRC1 複合体が Kdm2b タンパク質依存的にクロマチン上にリクルートされ H2AK119ub1 修飾を触媒することが明らかになった。さらにこの H2AK119ub1 修飾は PRC2 がターゲット遺伝子へ結合するためのプラットフォームとして機能することがマウス ES 細胞を初めとするいくつかの系において示された (Blackledge et al., 2014; Kalb et al., 2014; Cooper et al., 2014)。このように、最近 H2AK119ub1 修飾の新たな機能も明らかにされており、H2AK119ub1 修飾はこれまで考えられてきた以上に転写抑制の様々なステップで機能していることが予想される。

iii-2. PRC1 はクロマチン凝縮活性を有し遺伝子発現を抑制する

一方で、PRC1 がクロマチン凝縮を引き起こし転写の抑制に働くことがいくつかの系で報告されている。*in vitro* 再構成系において、ヌクレオソームアレイを用いて凝集構造を電子顕微鏡によって調べたところ、PRC1 がクロマチンの凝集構造を形成する活性を持つことが示された (Francis et al., 2004)。この活性は N 末端が欠失したヒストンを用いても見られたため、PRC1 はヒストンの N 末端、もしくは N 末端に触媒されるヒストン修飾非依存的にクロマチンの凝縮を引き起こすことが示唆されている。さらに、このようなクロマチン凝縮構造が SWI/SNF などのクロマチンリモデリング因子のリモデリング活性を阻害することが報告されている (Francis et al., 2001; King et al., 2002)。また、Bickmore らのグループから FISH 法を用いてゲノムの 2 点間距離を測定することによってクロマチンの凝縮度を調べる手法が報告された。この手法を用いて ES 細胞における Hox 遺伝子群のクロマチン凝縮が PRC1 依存的に引き起こされることが示唆されている (Eskeland et al., 2010; Endoh et al., 2012)。さらにこれらの報告では、Ring1B (I53A) 変異体も野生型 Ring1B と同様に Hox 遺伝子座でクロマチン凝縮活性を有することが示されており、Ring1B は H2AK119ub1 修飾非依存的にクロマチン凝縮を引き起こすことが示唆された。

また、PRC1 の構成因子である Phc タンパク質は Sterile alpha motif (SAM) ドメインを持ち、この SAM ドメインは Head-to-tail 型の相互作用によって自己重合する活性を有することが知られている (Kim et al., 2002)。この SAM ドメインを介した自己重合を優性抑制的に阻害する変異体 Phc2 (L307R) 変異体を過剰発現する実験が最近報告された (Isono et al., 2013)。この報告では、MEF (mouse embryonic fibroblast) において PRC1 が自己集合して核内構造体を形成すること、また Phc2 (L307R) 変異体の過剰発現によってこの核内構造体の形成が阻害され Hox 遺伝子や cdkn2a 遺伝子の脱抑制が起きることが示されている (Isono et al., 2013)。

iii-3.PRC1 は転写マシナリーと直接相互作用し遺伝子発現を抑制する

最後に、3 つ目の抑制メカニズムとして PRC1 が直接転写マシナリーと相互作用し転写抑制に働くことが示唆されている。*in vitro* 再構成系において naked な DNA テンプレート上で PRC1 が転写を抑制することが報告されている (King et al., 2002)。さらに、ショウジョウバエを用いた系で、PcG が TBP や RNA polymerase の結合は阻害しないが RNA polymerase による転写の開始を阻害することが明らかになっている (Dellino et al., 2004)。また、*in vitro* 再構成系により PRC1 が RNA polymerase の pre-initiation complex (PIC) の形成を阻害することが示されている。この報告ではさらに、PRC1 が PIC 構成因子のうち mediator タンパク質のリクルートメントを強く阻害することも示されている (Lehmann et al., 2012)。

以上のように、*in vitro* 再構成系や ES 細胞を用いた解析から PRC1 が異なるメカニズムによりターゲット遺伝子の発現抑制に働くことが示されている。これまでの PcG による遺伝子発現抑制メカニズム解析は ES 細胞の *in vitro* 培養系が主に用いられ、「Static」な epigenetic 状態の解析が中心に行われてきた。しかしながら、発生過程における遺伝子発現制御は非常に「dynamic」な epigenetic 状態の変化を伴うと考えられる。そのため、個体発生などのより生理的なコンテキストにおいて、PRC1 がどのようにして遺伝子発現抑制を行っているかは未だ議論の余地が残されている。特に、「発生過程において H2AK119ub1 修飾が PcG による遺伝子発現抑制に必要であるか」は未だ検証されていない大きな問題である。

そこで、本研究において私は、大脳新皮質における神経系前駆細胞（神経幹細胞）をモデル系として、PcG (PRC1) による遺伝子発現抑制に H2AK119ub1 修飾が必要であるか解明することを目的とした。

iv. 大脳新皮質発生と神経系前駆細胞

本研究で扱う神経系前駆細胞の発生時期依存的変化について、以下少し詳しく述べたい。大脳は大脳新皮質および大脳基底核からなり、運動、感情、認知などの高次な機能を司る中枢器官である。哺乳類の大脳新皮質は 6 つの層からなり、各層ごとに形態や機能、投射先の異なるニューロンが存在する。胎生 10 日目 (embryonic day 10; E10) から E11 において、脳室に面する脳室帯 (ventricular zone) に存在する神経系前駆細胞は、増殖を繰り返しつつ最初のニューロン産生を行う。大脳新皮質ニューロンの大部分は E18 ぐらいまでに産生が終了し、産出されたニューロンは脳室帯の外側に向かって放射状方向に移動し、層構造を形成して行く。各細胞は共通の神経系前駆細胞から産み出されることが知られており、その産み出される順序も決まっている。上述したように大脳新皮質は 6 つの層からなるが、神経系前駆細胞はまず各層のニューロンを順次 (6 層→5 層→4 層→2/3 層) 産み出す。この際、早生まれのニューロンが深層 (6、5 層) を、遅生まれのニューロンが表層 (4、2/3 層) を形成する (inside-out 様式)。ニューロン分化期が終了した後、アストロサイトやオリゴデンドロサイトといったグリア分化期へと移行する。このようにして産出された様々な種類のニューロンおよび、それらをサポートするグリア細胞は、適切な時空間的制御を受けて複雑な神経回路網を形成し、大脳は正常な機能を発揮することが可能になる。各層のニューロンおよびグリア細胞が適切な数産生されるためには、神経系前駆細胞が自身のプールを維持しつつ適切な数の分化細胞を産み出すと共に、適切なタイミングで分化運命転換を行うことが非常に重要である。それでは、神経系前駆細胞の分化能はどのようにして制御されているのだろうか。

v. 大脳新皮質神経系前駆細胞の分化能制御

神経系前駆細胞の分化能制御には細胞外因的な要因に加え細胞内因的な要因

が貢献していると考えられている。その根拠として、フェレットにおける移植実験や細胞外からの影響を排除した *in vitro* 培養系における運命解析などが挙げられる。大脳発生初期の神経系前駆細胞をより発生時期の遅いホストの大脳新皮質に移植してその運命を見た結果、大脳発生後期のニューロンを産出した。逆に、大脳発生後期の神経系前駆細胞をより発生時期の早いホストの大脳新皮質に移植した結果、発生早期のニューロンは産出せず、発生後期のニューロンしか産出しないことが分かった (Desai and McConell, 2000; McConell and Koznowski, 1991)。これは、神経系前駆細胞の運命決定が、より発生後期の環境には応じ得るが、より早期の環境には応じ得ないような内因的な要因が存在していることを示唆している。また、神経系前駆細胞を *in vitro* 初代培養しても、神経系前駆細胞はニューロンを産出した後にグリア細胞を産出することが明らかになった (Qian et al., 2000)。また、ニューロン分化期初期のマウス大脳新皮質から神経系前駆細胞を採取し、*in vitro* 培養系で神経系前駆細胞の分化運命を解析した結果、異なる種類のニューロンが *in vivo* での順序と同様に産出したことから、各層ニューロンの分化運命転換においても細胞内因的な制御機構が存在することが示唆された (Shen Q. et al., 2006)。ES 細胞由来神経幹細胞も *in vitro* で各層のニューロンおよびグリア細胞を順序立てて産出する (Gaspard et al., 2008; Eiraku et al., 2008)。

以上のことは、神経系前駆細胞の分化能制御に細胞内因的なメカニズムが貢献していることを示唆している。

vi. PcG は神経系前駆細胞の分化能を制限する

それでは、神経系前駆細胞の分化能を制御する細胞内因的なメカニズムとはどのようなものであろうか。これまで、大脳新皮質神経系前駆細胞の分化能制御についてはニューロン分化からアストロサイト分化への転換がこれまで広く研究されてきた。大脳新皮質神経系前駆細胞におけるニューロン分化運命決定因子として bHLH (basic helix-loop-helix) 型転写因子である Neurogenin (Neurog) 1/2 が同定されている (Cai et al., 2000; Guillemot, 2007; Sun et al., 2001)。ニューロン分化期からアストロサイト分化期への転換では、アストロサイト分化期においてこの Neurog 1/2 の発現が抑制されることが重要である。な

ぜならば、Neurog1 はアストロサイト分化期の神経系前駆細胞に強制発現すると、アストロサイト分化誘導因子の発現を抑制しニューロン分化を誘導してしまうからである (Hirabayashi et al., 2009)。前出の(ii)で触れたように、これまでにアストロサイト分化期の神経系前駆細胞において PcG が Neurog1 の発現を抑制しニューロン分化能の制限を引き起こすことが明らかになっている (Hirabayashi et al., 2009)。実際に、ニューロン分化期からアストロサイト分化期への転換のタイミングで神経系前駆細胞において Ring1B もしくは Ezh2 のノックアウトを行うと、Neurog1 の脱抑制が起こり遅生まれのニューロンが余剰に産生されることが見られている。また、この時ニューロン分化期の延長と共にアストロサイト分化期の開始が遅れることも示されている。この時の PcG によるニューロン分化能の抑制は、分化刺激が入っても解除出来ず神経系前駆細胞はニューロンを産み出さないことが示されている。大脳新皮質神経系前駆細胞は Wnt- β -catenin シグナルに応じてニューロン分化することが示されているが (Hirabayashi et al., 2004)、恒常活性型 β -catenin である S33Y β -catenin を過剰発現してもアストロサイト分化期にある神経系前駆細胞では Neurog1 は活性化せず、ニューロン分化も誘導しない (Hirabayashi et al., 2009)。

さらに、ニューロン分化期内においても PcG が神経系前駆細胞の分化能の制限を行っていることが最近報告された。5 層ニューロン分化期から 4 層ニューロン分化期の転換のタイミングにおいても Ring1B もしくは Ezh2 のノックアウトを行うと、5 層皮質下投射ニューロンの数が増加し 5 層ニューロン分化期が延長することが示されている (Suzki-Morimoto et al., 2014)。5 層皮質外投射ニューロンの運命決定因子として Fezf2 が同定されており (Molyneaux et al., 2005; Chen et al., 2005a; Chen et al., 2005b)、この転換点においても PcG が Fezf2 の発現を抑制することが明らかになった。

このように、神経系前駆細胞において PcG が Neurog1 や Fezf2 遺伝子の発現を抑制することが明らかになっている。しかしながら、大脳新皮質神経系前駆細胞において Ring1B によって触媒される H2AK119ub1 修飾が PcG による遺伝子発現抑制に必要であるかは分かっていない。さらに興味深いことに、異なる発生時期の神経系前駆細胞を用いた ChIP 解析から、neurog1 や fezf2 遺伝子座において PRC2 によって触媒される H3K27me3 修飾が発生時期の進行に伴って上昇することが明らかになっている (Hirabayashi et al., 2009;

Morimoto-Suzki et al., 2014)。つまり、発生時期依存的に神経系前駆細胞の分化能を制限するという過程は非常に「dynamic」な epigenetic 変化を伴うものであり、この系は PcG による遺伝子発現抑制の dynamics に迫れるという点でも非常に良い系であると考えられる。そこで、本研究において私はまず、Neurog1 や Fezf2 を初めとするニューロン分化関連遺伝子の発現抑制に Ring1A/B によって触媒される H2AK119ub1 修飾が必要であるかを検討した。

vii. 大脳新皮質発生早期において PcG は神経系前駆細胞の未分化性の維持に貢献する

神経系前駆細胞の分化能制限に働くだけではなく、発生早期において PcG は神経系前駆細胞の未分化性維持に貢献することが示されている。ニューロン分化期以前から神経系前駆細胞において PRC2 構成因子である Ezh2 のノックアウトを行うと、未分化な神経系前駆細胞の数が減少し早熟なニューロン分化が起きることが報告されている (Pereira et al., 2010)。この発生早期においてはニューロン分化誘導刺激が入ると神経系前駆細胞はニューロン分化するため、PcG によるニューロン分化抑制は分化刺激に応じて解除出来る可逆的なものであると考えられる。つまり、神経系前駆細胞において PcG は「解除可能な抑制状態」と「分化刺激が入っても解除できない抑制状態」を発生の異なる時期に形成すると言える。

幹細胞が適切な分化誘導刺激が入るまで「可逆的な抑制」によって分化を抑制し未分化な状態に保つことと「不可逆的な抑制」によって特定の細胞系譜への分化能を閉ざすことは発生過程における幹細胞の大きな性質である。上述の通り、ES 細胞や組織幹細胞などを用いてこれらの制御に PcG が主要な働きをすることが示されてきたが、PcG がそれぞれの抑制状態の形成を発生上決められたタイミングでいかにして実現しているかは大きな問題である。もし、神経系前駆細胞において PcG がそれぞれの抑制状態をいかにして形成するかが分かれば、上述した幹細胞の分化能を規定するメカニズムに迫れるかも知れない。そこで本研究では、発生時期の異なる神経系前駆細胞において PcG が「解除可能な抑制状態」と「分化刺激が入っても解除できない抑制状態」を形成するメ

カニズムについても検討した。

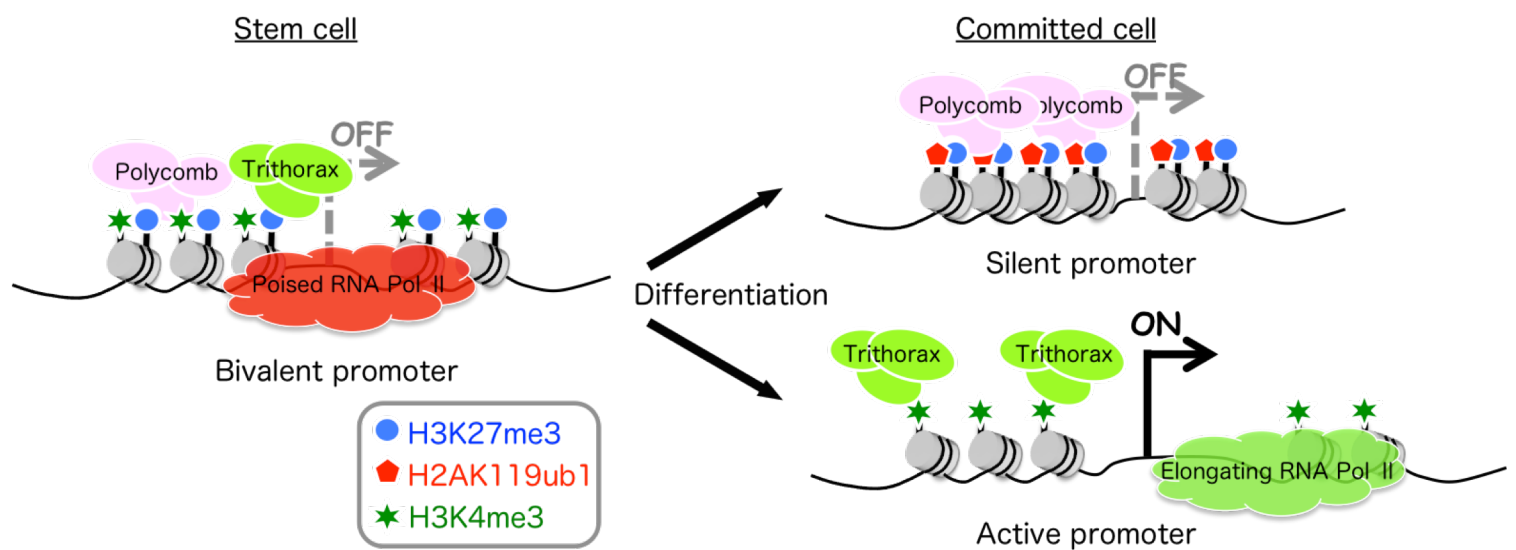


Figure1 developmental geneにおけるpoised stateは幹細胞の分化能を規定する

幹細胞において、developmental geneのpromoter領域近傍には転写開始状態にあるRNAポリメラーゼ II が検出されている。そのため、これらの遺伝子群は分化刺激に応じて転写活性化可能な「poised state」にあると考えられている。さらに、このdevelopmental geneのpromoter領域にはPolycombによって触媒されるH3K27me3修飾 (H2AK119ub1修飾) およびTrithoraxによって触媒される H3K4me3 修飾が濃縮している (bivalent chromatin state)。この bivalent state が developmental geneにおける「poised state」の形成の中心的なメカニズムであると考えられている。

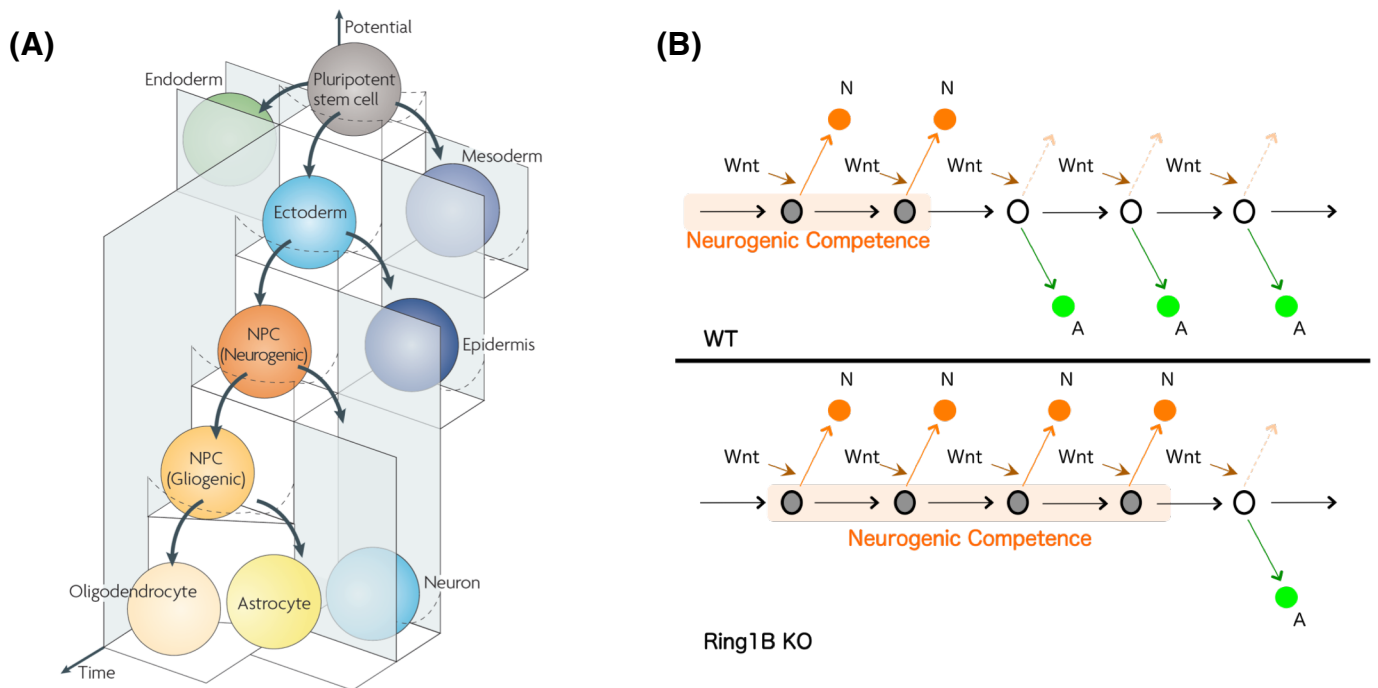


Figure2 発生過程においてPcGは幹細胞の分化能を制限する

(A) 幹細胞の分化能は発生の進行に伴って制限されていく。例えば、大脳新皮質由来神経系前駆細胞(神経幹細胞)は様々な種類のニューロンおよびグリア細胞を産生する。発生早期の神経系前駆細胞(Neurogenic NPCs)は発生後期の神経系前駆細胞(Gliogenic NPCs)よりも多くの種類の細胞を産み出す。発生後期の神経系前駆細胞ではニューロン分化能は抑制されており、この時の抑制では分化刺激が入っても「解除出来ない抑制状態(上図のWall)」が形成されている。Hirabayashi and Gotoh, *Nature Reviews Neuroscience* 2010より転載。

(B) 神経系前駆細胞のニューロン分化能は発生時期の進行に伴って制限されていくが、アストロサイト分化期においてPolycombはニューロン分化能の制限を引き起こす。アストロサイト分化期では、ニューロン分化刺激(Wntシグナル)が入っても神経系前駆細胞はニューロンを産み出さない。しかし、Polycombの機能欠損(Ring1B KO)により神経系前駆細胞はWntシグナルに応答してニューロンを産み出すようになる。このことから、神経系前駆細胞のニューロン分化能が制限される際、Polycombは分化刺激が入っても「解除出来ない抑制状態」を形成する。

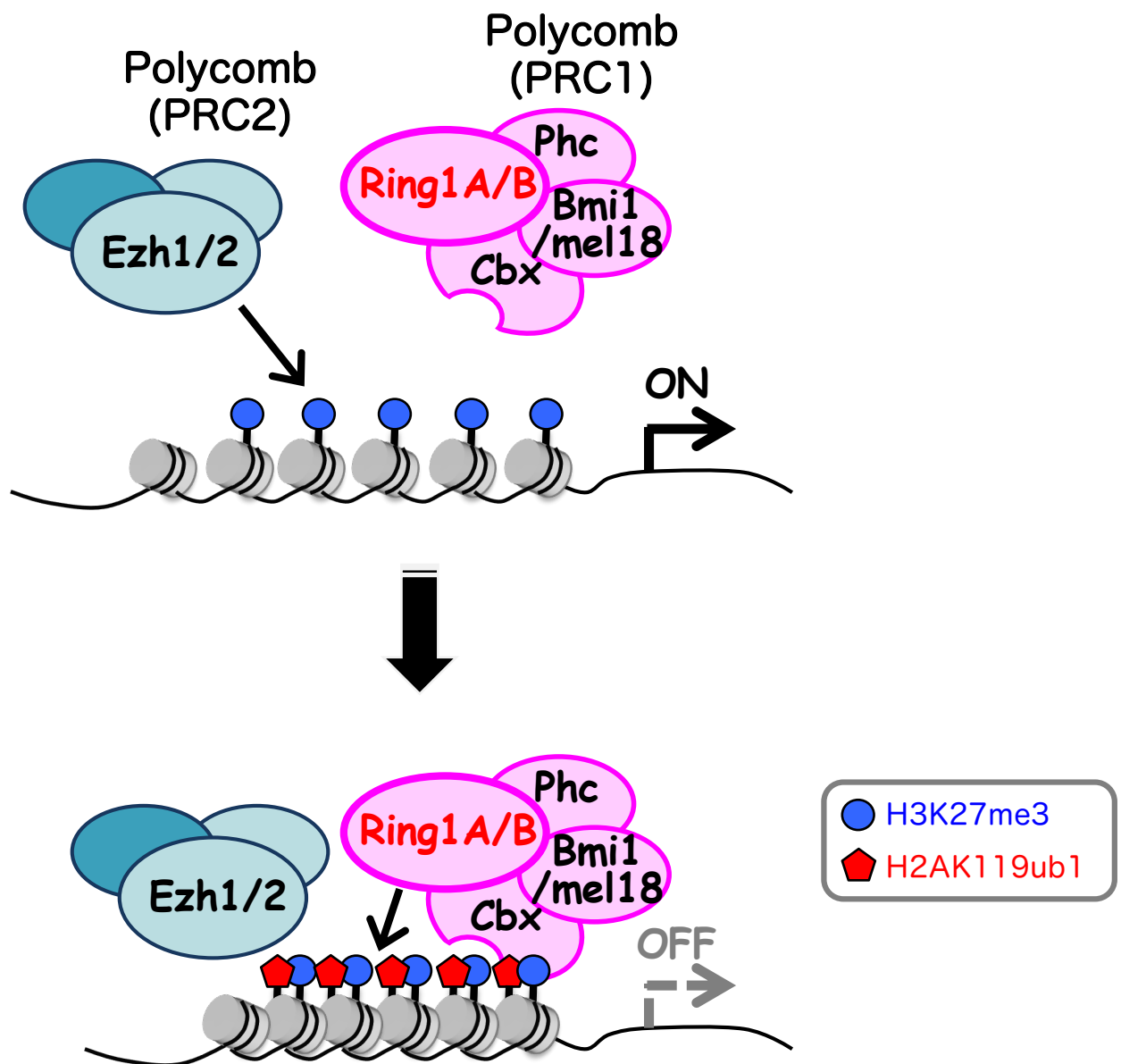
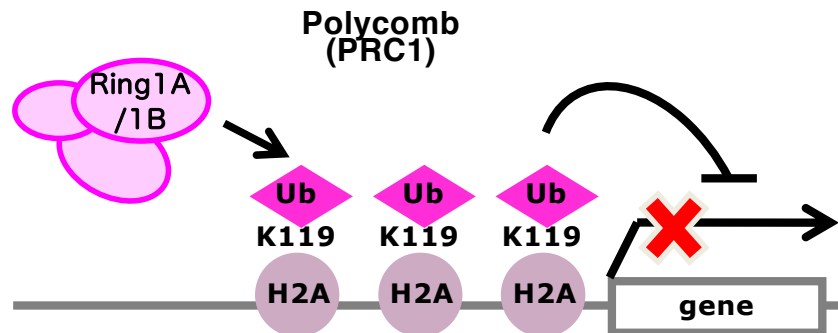


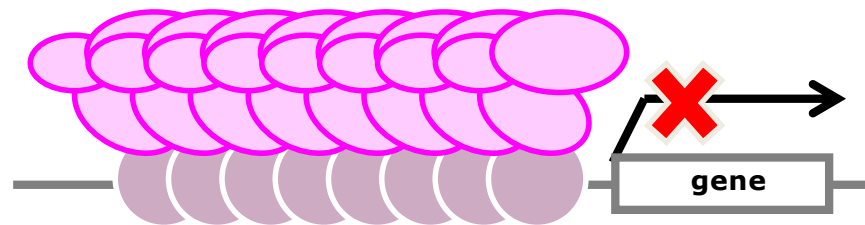
Figure3 PRC1複合体およびPRC2複合体は協調して働き、遺伝子の発現を抑制する

Polycombの主要な複合体としてPRC1複合体およびPRC2複合体が知られる。それぞれの複合体は協調してターゲット遺伝子の転写抑制に働くことが知られている。PRC2はH3K27me3修飾触媒酵素であるEzh1/2を含む複合体であり、PRC1はPRC2によって触媒されたH3K27me3修飾に結合し直接転写抑制に働くと考えられている。PRC1による遺伝子発現抑制には、その構成因子であるRing1A/Bによって触媒されるH2AK119ub1修飾が重要な役割を果たすと考えられてきた。

(A) H2AK119ub1修飾を触媒し転写を抑制する



(B) クロマチン凝縮を引き起こし転写を抑制する



(C) 転写マシナリーと直接相互作用し転写を抑制する

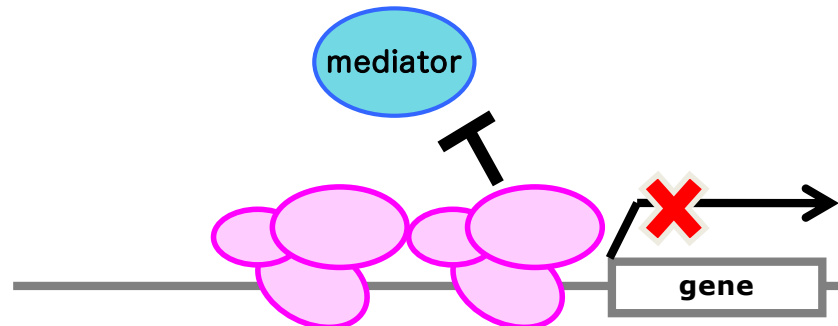


Figure4 PRC1による転写抑制メカニズム

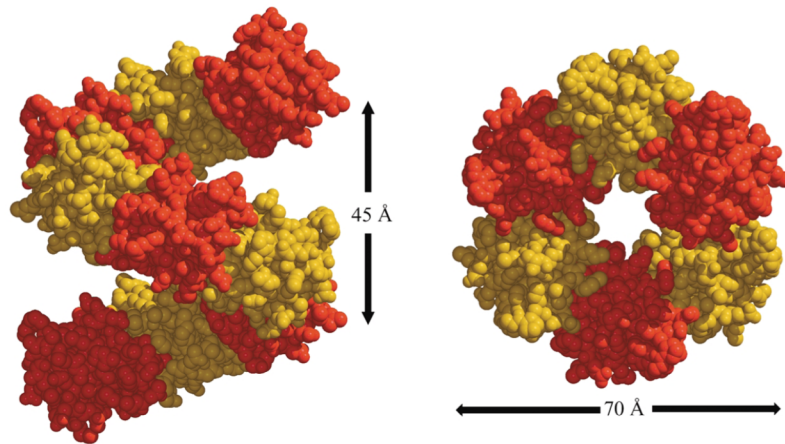
これまでに、PRC1による転写抑制メカニズムとして大きく3つのメカニズムが提唱されてきた。

(A) PRC1に含まれるRing1A/BはE3ユビキチンリガーゼでありH2AK119ub1修飾を触媒する。H2AK119ub1修飾はPRC1による遺伝子発現抑制と高い相関があることが示され、マウスES細胞においてPRC1による転写抑制に必須の役割を果たすことが示されている。

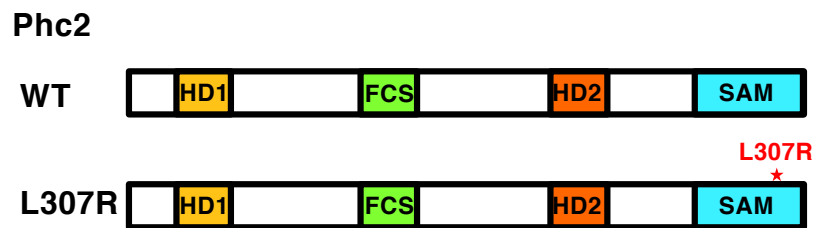
(B) PRC1はクロマチンの凝集構造を形成することが示されている。この凝集構造は、クロマチンリモデリング因子の活性を阻害することが示されている。

(C) PRC1は転写活性化因子であるMediatorタンパク質のクロマチンへの結合を阻害し、RNAポリメラーゼIIの転写開始前複合体の構築を阻害する。

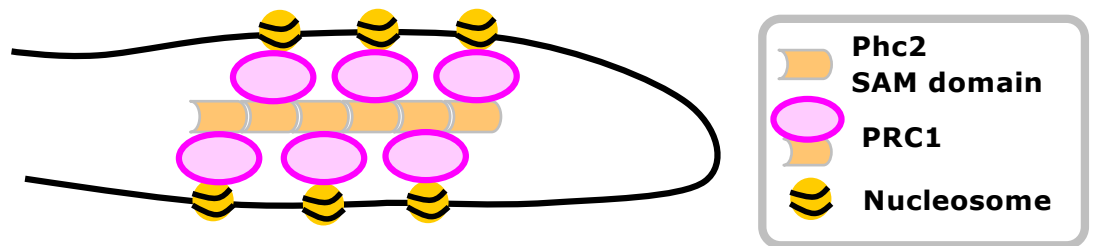
(A)



(B)



(C)



Chromatin condensation

Figure5 Phc2はSAMドメインを介してクロマチン凝縮を引き起こす

(A) *Drosophila* Phc2のSAM (L51R) ドメインのポリマー構造。SAMドメインはhead-to-tail型のポリマーを形成し、6分子で一周する左巻きの螺旋構造を取る。Kim et al., *Nature structural biology* 2002より転載

(B) マウスPhc2タンパク質の構造とL307R変異の導入位置。進化的に高度に保存された4つのドメイン [homology domain 1 (HD1), FCS zinc finger domain (FCS), homology domain 2 (HD2), SAM domain (SAM)] が同定されている。L307変異はPhc2-SAMのポリマー化を阻害する。

(C) Phc2はSAMドメインを介してクロマチン凝縮を引き起こし、遺伝子の発現抑制に貢献する。

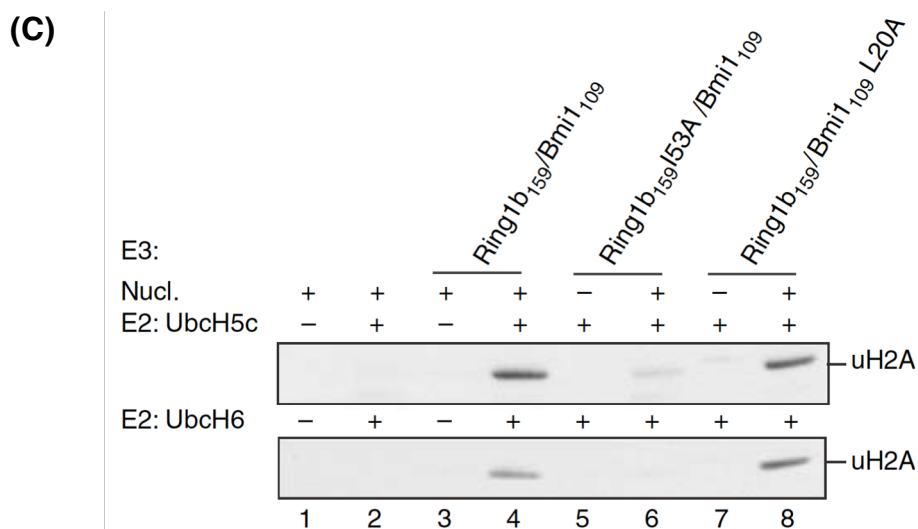
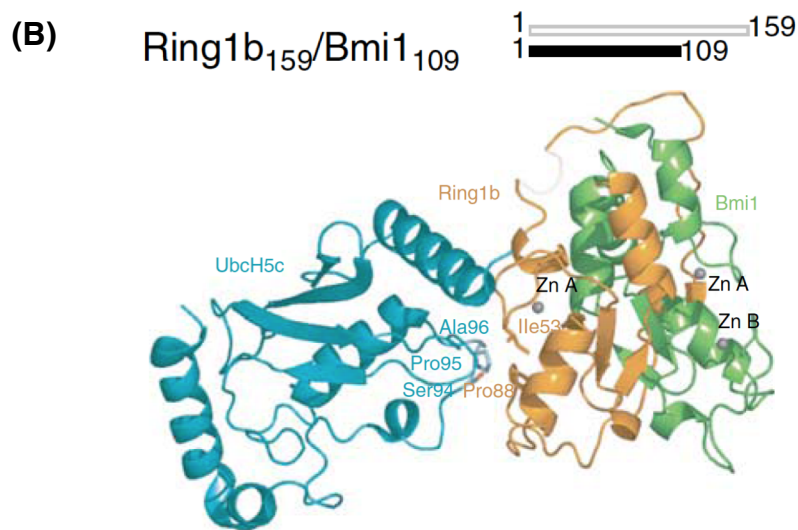
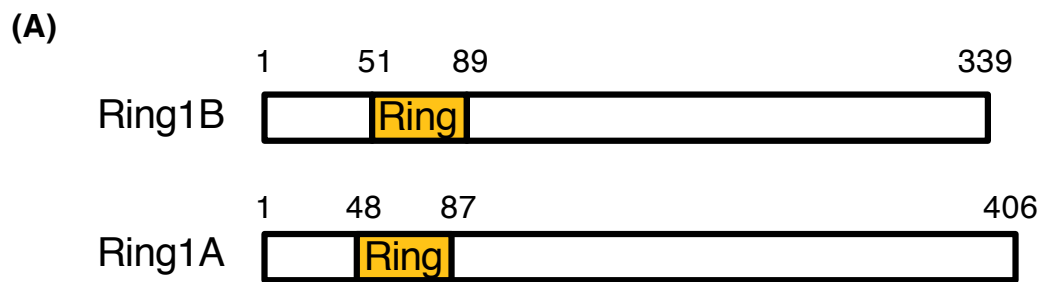


Figure6 Ring1Bの53番目のイソロイシンはH2Aユビキチン化活性に必要である

(A) マウスRing1BおよびRing1Aのタンパク質のドメイン構造。

(B) Ring1B₁₅₉/Bmi1₁₀₉の結晶構造に基づいた、E2ユビキチンリガーゼ (UbcH5c) との相互作用 interfaceのモデリング結果。I53はRing1BとUbcH5cの相互作用interfaceに位置する。

(C) Ring1BのI53A変異はRing1B₁₅₉/Bmi1₁₀₉複合体のH2Aユビキチン化触媒活性を欠損させる。

(B, C) Buchwald et al., *EMBO J* 2006より転載

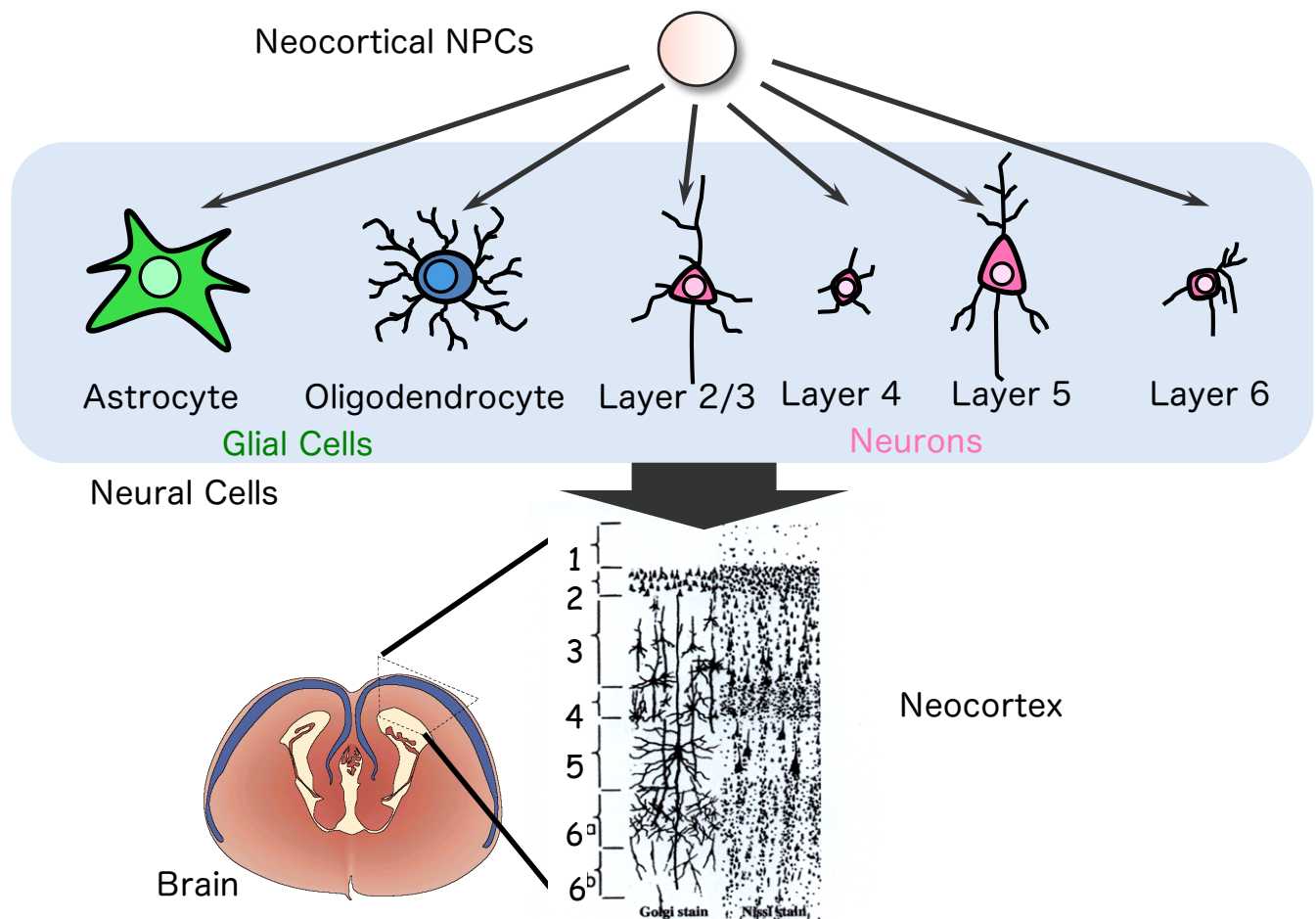


Figure7 大脳新皮質発生において神経系前駆細胞は様々な種類の細胞を産み出す

大脳は様々な種類のニューロンおよびグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）から構成される。これらの細胞は大脳新皮質に存在する神経系前駆細胞（神経幹細胞）から産み出される。神経系前駆細胞から産み出されたニューロンおよびグリア細胞は適切な時空間的制御を受けて複雑な回路網を形成する。

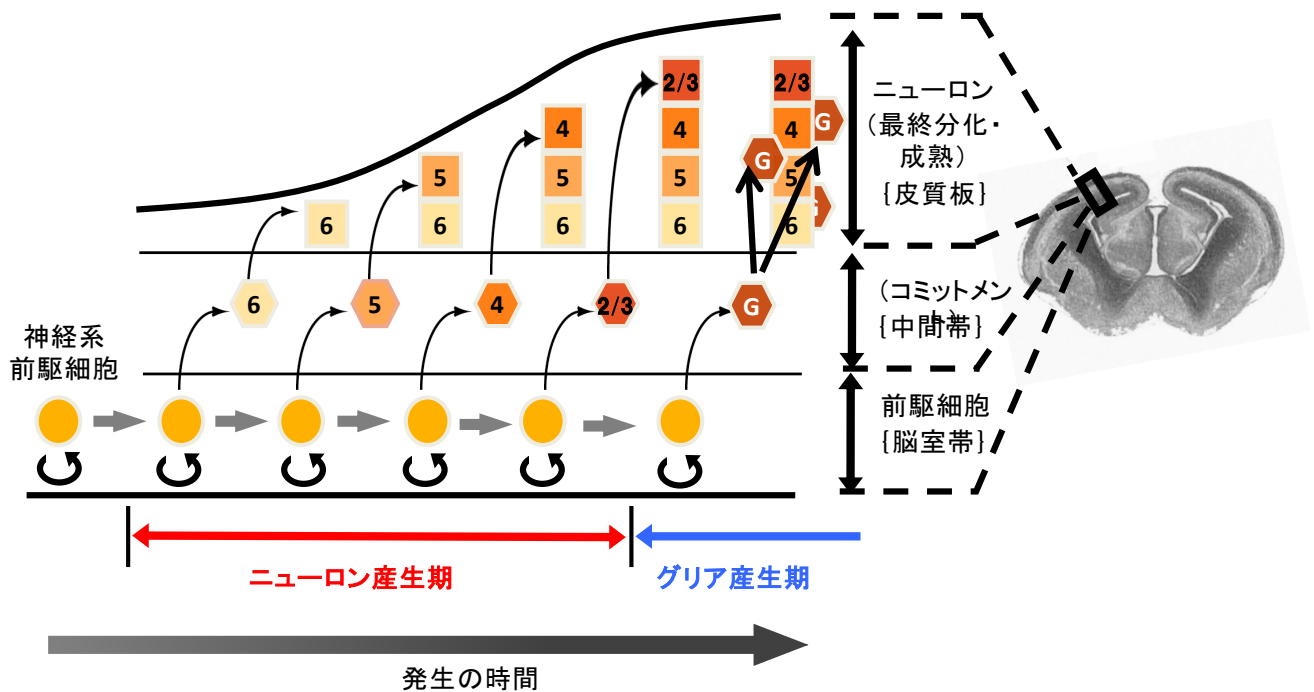
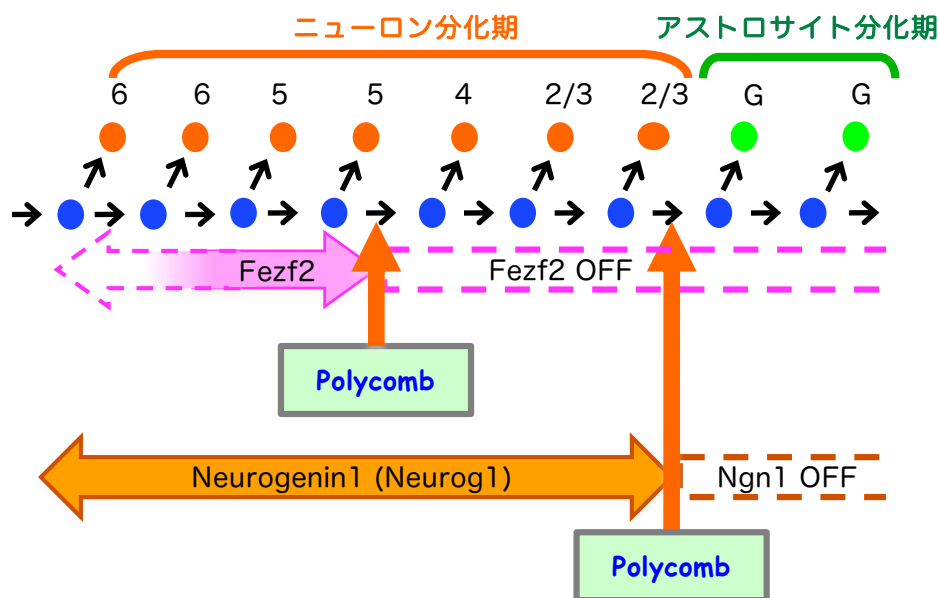


Figure8 神経系前駆細胞は発生時期依存的に各層のニューロンおよびグリア細胞を順序立てて産み出す

各層のニューロンおよびグリア細胞は共通の神経系前駆細胞から産み出される。神経系前駆細胞は
 大脳発生初期 (ニューロン分化期) において6層、5層、4層、2/3層の順に発生の時間軸に沿って各層
 のニューロンを順に産み出す。出生後にはニューロンの産生はほとんど行われず、グリア細胞の一
 種であるアストロサイトを産生するようになる。神経系前駆細胞が決められたタイミングで分化運
 命転換することが、各層のニューロンおよびグリア細胞の数の決定に重要である。

(A)



(B)

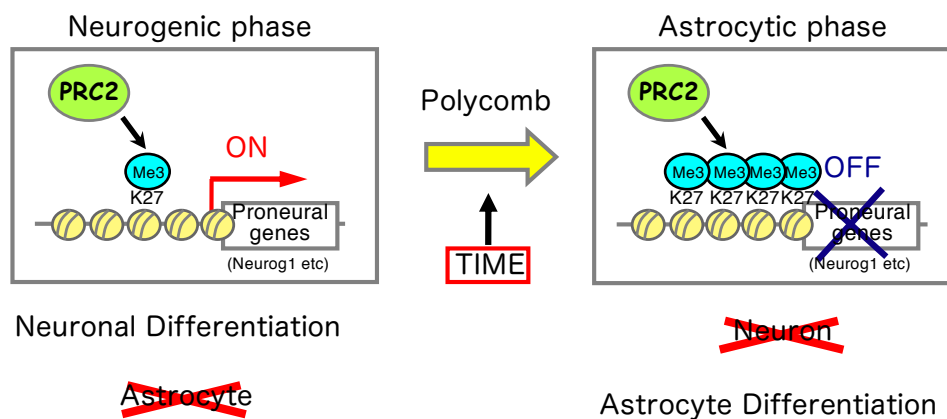


Figure9 Polycombは5層から4層ニューロン分化期、ニューロンからアストロサイト分化期の転換においてそれぞれFezf2, Neurog1の発現を抑制する

(A) Polycombは神経系前駆細胞の5層ニューロンから4層ニューロン分化期への転換、およびニューロンからアストロサイト分化期への分化運命転換を引き起こす。Fezf2は5層皮質下投射ニューロンの、Neurog1はニューロンの運命決定因子として知られる。それぞれの運命転換において、Polycombは発生時期依存的にFezf2, Neurog1の発現を抑制する。

(B) neurog1遺伝子座において、発生時期の進行に伴いPRC2によって触媒されるH3K27me3修飾が蓄積することが示されている。また5層ニューロンから4層ニューロン分化期の転換においても、同様の現象がfezf2遺伝子座において観察されている。

第二章 材料と実験方法

発現ベクターの作成

Ring1B 発現ベクターの構築

cUXIE-IRES-EGFP (internal ribosome entry site (IRES) と enhanced GFP (EGFP) シーケンスを持つ replication-incompetent なレトロウィルスベクターは Hongjun Song 博士より御供与いただいた。Ring1B の cDNA は RIKEN より購入した FANTOM2 ライブラリーより PCR を用いて増幅し、DNA シーケンスを確認した。その後、cUXIE-IRES-EGFP ベクターにサブクロニングした。Ring1B の cDNA のクローニングには以下のプライマーを使用した。

Mouse Ring1B

Fw:GGATCCATGTCTCAGGCTGTGCAG

Rv:GAATTCTCATTTGTGCTCCTTGGTGG

変異体 Ring1B 発現ベクターの構築

点変異の導入では、プライマーペアを変異導入部の配列を挟み込むように設計した。Ring1B (I53A) の作製では、鋳型として PCR-blunt Ring1B を用いた。Ring1B (I53A/C87G), Ring1B (I53A/C90G), Ring1B (I53A/D56K)の作製では鋳型として PCR-blunt Ring1B (I53A) を用いた。変異導入には、quickchange (STRATAGENE) を用いてマニュアルに従い PCR を行った。変異導入後 DNA シーケンスを確認し、cUXIE-IRES-EGFP にサブクロニングした。変異導入に使用したプライマーの配列は以下の通り。

Mouse Ring1B (I53A/C87G)

Fw: AGTGGCAACAAAGAGGGTCCTACCTGTCGG

Rv: CCGACAGGTAGGACCCTCTTTGTTGCCACT

Mouse Ring1B (I53A/C90G)

Fw: AAAGAGTGTCTACCGGTCGGAAAAAACTG

Rv: CAGTTTTTTTCCGACCGGTAGGACACTCTTT

Mouse Ring1B (I53A/D56K)

Fw: GTGCCCAGCTTGTTTGAAGATGTTAAAGAACACC

Rv: GGTGTTCTTTAACATCTTCAAACAAGCTGGGCAC

Phc2 および Phc2 (L307R) 発現ベクターの構築

Phc2 および Phc2 (L307R) 変異体 (Kim et al., 2002; Isono et al., 2013) の cDNA は、古関明彦先生より御供与頂いた。この cDNA から PCR を用いてクローニングし、DNA シークエンスを確認した。その後、cUXIE-IRES-EGFP ベクターにサブクローニングした。Phc2 および Phc2 (L307R) の cDNA のクローニングには以下のプライマーを使用した。

Mouse Phc2/Phc2 (L307R)

Fw: GGATCCATGACCTCAGGGAACGGAAACTCT

Rv: GGATCCCTAGGAGTCCTTGAGCATGCTGATG

レトロウィルスの作成

レトロウィルスの作成には PLAT-GP 細胞 (Kitamura et al., 2003) を用いた。PLAT-GP 細胞は北村俊雄先生より御供与頂いた。cUXIE-IRES-EGFP にそれぞれの遺伝子を組み込んだプラスミドおよび VSV-G (Vesicular stomatitis virus G glycoprotein) を発現するプラスミドを、PEI (Polyethylenimine) を用い PLAT-GP 細胞に遺伝子導入した。VSV-G を発現するプラスミドは Hongjun Song 博士より御供与いただいた。翌日、Blasticidin S (funakoshi), Penicillin-streptomycin (Gibco) を含まない培地に交換して、37°C で 3 日間培養した。その後、そのレトロウィルスが含まれる培養上清を 4°C、10000xg で 1.5 時間遠心し濃縮した後に、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – F12 (1:1) (Gibco) で懸濁した。

遺伝子改変マウス

Ring1B^{flox/flox} マウス (Cales et al., 2007; Endoh et al., 2008) 、 Ring1A^{+/+};

Ring1B^{flox/flox} マウス (Endoh et al., 2008)、および Rosa-CreER2 ノックインマウス (Seibler et al., 2003; Endoh et al., 2008) は古関明彦先生より御供与頂いた。これらのマウスを交配させることにより、全身で Ring1B の遺伝子破壊を出来るマウスを得た。マウスは C57BL/6J 系統で使用した。マウスの飼育および実験は全て東京大学の実験動物取り扱い基準に準じて行った。

神経系前駆細胞の単離

神経系前駆細胞は胎生 11.5 日目 (プラグ確認日を 0 日とする) の ICR マウス 大脳、あるいは胎生 12.5 日の遺伝子改変型 C57B6/J マウス大脳より、表皮、頭蓋、嗅球、大脳基底核原基、海馬を取り除き大脳新皮質を単離することで得た。得られた大脳新皮質はパパイン酵素を用いて分離、分散させた。

パパイン処理は神経細胞分散液 (Cat. No MB-X9901; 住友ベークライト) を使用した。神経系前駆細胞を分離、分散後 DMEM-F12 (1:1) に、1% penicillin-streptomycin (Invitrogen), 2% B27 Supplement (Invitrogen), 20ng/ml Fibroblast growth factor 2 (FGF2; R&D), 20ng/ml Epidermal growth factor (EGF; Upstate) を加えた培地に、 3×10^5 /ml の密度になるように細胞を播種し Neurosphere を形成させ、神経系前駆細胞のみを濃縮した。

神経系前駆細胞の *in vitro* 培養

「神経系前駆細胞の単離」で述べた方法で 3 日間 Neurosphere を形成させ、回収した。この Neurosphere に対して、trypsin で処理して、さらに物理的な力で Neurosphere を乖離させた。その後、実験内容によって異なる培養方法を行った。発生時期の異なる神経系前駆細胞を得るために、浮遊培養を続ける場合は上記の培地条件で 3 日ごとに Neurosphere の分散処理を行った。一方で単走培養する場合は、poly-D-Lysine (Sigma) コートしたディッシュ、あるいはガラスプレート (Matsunami) の上に細胞を播種した。培地には DMEM-F12 (1:1) に B27 Supplement (最終濃度 2%) を加えたものを用い、適宜 FGF2 (最終濃度 20ng/ml) を添加あるいは無添加し、それぞれの実験の期間 37°C で培養した。また、トリプシン処理は以下のように行った。得られた大脳新皮質を 0.05% trypsin (Sigma), 0.1mg/ml DNase (Roche) を含む low calcium artificial cerebrospinal fluid (lc-aCSF : 124mM NaCl, 5mM KCl, 3.2mM MgCl₂,

0.01mM CaCl₂, NaHCO₃ 26mM, d-glucose 10mM) 中に移して、37°Cで 10 分間トリプシン処理を行った。その後、0.7 mg/ml trypsin inhibitor (Sigma) を含む aCSF (124mM NaCl, 5mM KCl, 1.3mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, NaHCO₃ 26mM, d-glucose 10mM) を等量加えた。遠心分離により神経系前駆細胞を集めた後に、物理的な力で細胞塊を分散させ実験に用いた。

細胞免疫染色

「神経系前駆細胞の *in vitro* 培養」で述べた方法により、poly-D-Lysine コートしたディッシュの上に神経系前駆細胞を、FGF2 添加培地を用いて 3x10⁵/ml の濃度で細胞を播種し、24 時間後に細胞の固定を行った。その後、4% Paraformaldehyde (PFA; MERK)/ Phosphate-buffer saline (PBS) を用いて、室温で 20 分間固定反応を行った。PBS で 2 回洗浄の後、0.1% Triton X-100, 3% Bovine serum albumin (BSA)/PBS を用いて 30 分間処理した。その後、PBS で 2 回洗浄し、3% BSA/PBS 溶液で一次抗体と 4°Cで一晩反応させた。PBS で 2 回洗浄後、同様に二次抗体と室温で 40 分間反応させた。このとき同時に核を Hoechst33342 (Calbiochem) を用いて染色した。一次抗体として、mouse anti- β III tubulin 抗体 (1:2000; covance), chick anti-GFP 抗体 (1:2000; Abcam)を用いた。二次抗体として、anti-mouse IgG Alexa (1:500; Invitrogen), anti-chick IgG Alexa (ICC 1:500; Invitrogen)を用いた。

ウェスタンブロッティング法

「神経系前駆細胞の *in vitro* 培養」で述べた方法で培養した神経系前駆細胞を遠心分離法により回収し、PBS で洗浄した後、Lysis buffer (50mM Tris HCl pH7.2, 500mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 0.5% Sodium deoxycholate, 0.1% SDS)に 0.5% aprotinin と 1mM Dithiothreitol (DTT) を加えた溶液で懸濁した。その後、遠心 (15000rpm, 4°C, 20 分間) し、上清を細胞抽出液として回収した。回収した細胞抽出液に、sample buffer (62.5mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% BPB, 5% b-mercaptoethanol) を最終的にそれぞれの濃度になるように加えて、95°C 5 分間の処理後、氷冷した。

上記のようにして回収したサンプルは、SDS ポリアクリルアミド電気泳動に

よって分離し、ニトロセルロース膜に転写した。3% BSA を含む Tris-buffer saline (TBS) 溶液で、室温にて 1～数時間ブロッキング反応を行った。その後、一次抗体を 3% BSA/TBS 溶液で希釈し、4°Cで一晩反応させた。翌日、0.005% Tween-20 を含む TBS/T 溶液で 2 回洗浄後、3% スkimミルクを含む TBS 溶液に二次抗体 (horseradish peroxidase 結合抗 Mouse/Rabbit 抗体) を希釈し、室温にて 40 分間反応させた。その後、0.05% Tween-20 を含む TBS/T 溶液で 2 回洗浄した。目的タンパク質の検出は、Image Quant LAS4000 (BD) を用いて行った。一次抗体として、mouse anti-Ring1B 抗体 (1:200; MBL) mouse anti-Gapdh 抗体 (WB 1:1000; Millipore), rabbit anti-H2AK119ub1 抗体 (WB 1:1000; Cell Signaling), mouse anti-H2Aub 抗体 (WB 1:200; Millipore), rabbit anti-H2A 抗体 (WB 1:500; Millipore)を用いた。

RNA 抽出、逆転写反応、リアルタイム RT-PCR

「神経系前駆細胞の in vitro 培養」で述べた方法により、poly-D-Lysine コートしたディッシュの上に神経系前駆細胞を、FGF2 添加培地を用いて $4\sim5\times10^5/\text{ml}$ の濃度で細胞を播種し、24 時間後に DMEM-F12 培地で 1 回洗浄した後、FGF2 添加培地あるいは、FGF2 無添加培地に変え、それぞれの実験に応じて 37°Cで培養を行った。

その後 PBS で 1 回洗浄し、500ml RNAiso (Takara) を加えて細胞を回収した。100 μl の chloroform を加え、4°C 15000rpm 10 分間遠心し、上層を回収した。回収した上層に 250 μl iso-propylalcohol を加え、-80°Cで 10 分間静置した後、4°C 15000rpm 15 分間遠心し、上清を除去した。さらに 300 μl 75% ethanol を加え、再び 4°C 15000rpm 5 分間遠心し上清を除去した。ペレットを風乾させた後、distiled Water (Gibco) 10 μl で溶解した。その後、濃度測定を行い、1 μg の RNA を用いてゲノム DNA の除去反応および逆転写反応を行った。反応には ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo) を用いた。ゲノム DNA 除去反応および逆転写反応は以下のサイクルで行った。

＜ゲノム除去反応＞

1	65°C	10 分間
2	37°C	5 分間

<逆転写反応>

3	37°C	15 分間
4	50°C	5 分間
5	4°C	静置後回収

得られた cDNA はリアルタイム PCR 法を用いて定量した。リアルタイム PCR 法とは、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計が一体化した装置を用いて、PCR 増幅産物をリアルタイムでモニタリングし解析する手法である。今回用いたのは、DNA 増幅を蛍光の増幅量で置き換える SYBR Green (Toyobo THUNDERBIRD® SYBR®) によるインターカレーター法である。用いたプライマー配列は以下の通りである。

Neurog1

Fw: ATCACCACCTCTCTGACCC

Rv: GAGGAAGAAAGTATTGATGTTGCCTTA

Fezf2

Fw: CTCTACTGACAGCAAACCCA

Rv: CTTTGCACACAAACGGTCT

Lef1

Fw: CCGGTGGCTCTTTATTGT

Rv: CAAGAGGCTCCCTTTGC

Tcfap2c

Fw: TTGTCTCATTTTCAGCCTGATAAC

Rv: CGATTAGAGCCTCCTTGATATAATTC

GFAP

Fw: TCCCTAGAGCGGCAAAT

Rv: TCCTCCTTGAGGCTTTGG

Dlk1

Fw: TTCTGCGAAATAGACGTTTCGG
Rv: TGCAGGAGCATTCGTACT

p57

Fw: GGACCTTTCGTTCATGTAGC
Rv: ACATGGTACAGAGTGTCTCA

HoxA1

Fw: GCAGACCTTTGACTGGATGAA
Rv: TGGGTTGACCCACGTAG

Gapdh

Fw: TGGGTGTGAACCACGAG
Rv: AAGTTGTCATGGATGACCTT

Ring1B

Fw: ACAACGAACACCTCAGGA
Rv: TGGGCACATTAATTCACGTGTGA

クロマチン免疫沈降法

Ring1B, H2Aub (Millipore) ChIP

「5. 神経系前駆細胞の *in vitro* 培養」で述べた方法で培養した神経系前駆細胞、 1×10^6 個を DMEM-F12 (1:1) 1ml にサスペンドし、1% FA で室温にて 10 分間固定しグリシンを 125mM になるように添加し固定反応を止めた。0.3% BSA を加えて、室温 6000rpm 5 分間遠心分離し、細胞を回収し、0.3% BSA/PBS で洗浄した。その後、4°C 6000rpm 5 分間遠心し、上清を捨て細胞を回収した。

Protein A beads (Dynabeads Protein A) を PBS で 2 回洗浄し、等量の 0.5%BSA/PBS を加えて、4°C で 1 時間以上反応させ、Beads のブロッキングを行った。ブロッキングを行った beads から適量取り、anti-Ring1B 抗体もしくは anti-mouse IgM 抗体を添加し、beads に抗体を結合させた。翌日、RIPA buffer (10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA, 140mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.1%

SDS, 0.1% sodium deoxycholate) で 4 回程度洗浄し使用した。

一方、回収した細胞はまず、Swelling buffer (20mM Hepes(pH7.9), 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.1% NP-40, 1mM DTT) で懸濁し、氷上に 20 分間静置した。その後、4°C 8000rpm 5 分間遠心し、上清を捨て再び細胞を回収し、RIPA buffer で懸濁した。

ゲノムの断片化は UR-20P(TOMY 社製)を用いて氷上で 10 秒間の sonication を 10 回行った。その後、4°C 15000rpm 15 分間遠心し、上清を回収した。beads への非特異なタンパク質の付着を防ぐために、ブロッキング済みの beads を加えて、4°C 1 時間反応させた。その後、上清を適量採取し、Ring1B 抗体を結合させた beads もしくは H2Aub 抗体を加え、免疫沈降反応を 4°Cで一晩行った。この時、input として適量上清をとり、冷凍保存した。翌日、H2Aub 抗体を反応させたクロマチン溶液に anti-IgM 抗体を結合させた beads を加え、4°C 2~3 時間反応させた。

Beads の洗浄は、RIPA buffer で 7 回、RIPA/500mM NaCl buffer (10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA, 500mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate) で 2 回、LiCl buffer (10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA, 250mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% DOC) で 2 回、TE Buffer (10mM Tris-HCl(pH8.0), 1mM EDTA)で 2 回行った。その後、Direct elution buffer (10mM Tris-HCl(pH8.0), 5mM EDTA, 300mM NaCl, 0.5% SDS)を加え、65°C で 15 分間インキュベートし、上清 (免疫沈降物) を回収した。

その後、冷凍保存しておいた input と elution したサンプルに 0.25mg/ml となるように Proteinase K を加え、37°Cで一晩インキュベートした。その後、65°Cで 6 時間インキュベートし、脱リンクを行った。その後、フェノールクロロホルム処理およびエタノール沈殿を行い、DNA を精製・回収した。

定量は SYBR Green (Toyobo THUNDERBIRD® SYBR®) によるリアルタイム PCR を用いた。また、抗体として、rabbit anti-Ring1B 抗体 (Cell Signaling), mouse anti-H2Aub 抗体 (Millipore) を用いた。

H2AK119ub1 (Cell Signaling), H3K27ac ChIP

「5. 神経系前駆細胞の in vitro 培養」で述べた方法で培養した神経系前駆細胞、2x10⁵ 個を DMEM-F12 (1:1) 1ml にサスペンドし、0.5% PFA で室温にて 10 分間固定した。0.3% BSA を加えて、室温 6000rpm 5 分間遠心分離し、細胞を回

収し、0.3% BSA/PBS で洗浄した。その後、4°C 6000rpm 5 分間遠心し、上清を捨て、0.2% aprotinin を加えた Lysis buffer (1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl) で懸濁し、氷上に 10 分間静置した。

Protein A beads (Dynabeads Protein A) を PBS で 2 回洗浄し、等量の 0.5%BSA/PBS を加えて、4°Cで 1 時間以上反応させ、Beads のブロッキングを行った。ブロッキングを行った beads から適量取り、anti-H2AK119ub1 抗体もしくは anti-H3K27ac 抗体を添加し、beads に抗体を結合させた。翌日、0.5%BSA/PBS で 2~3 回程度洗浄し使用した。

ゲノムの断片化は上記と同様にして氷上で 10 秒間の sonication を 10 回程度行った。これを、0.2% aprotinin を加えた ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl, 167mM NaCl) で希釈した、その後、beads への非特異なタンパク質の付着を防ぐために、ブロッキング済みの beads を加えて、4°C 1 時間反応させた。その後、上清を適量採取し、抗体を結合させた beads を加え、免疫沈降反応を 4°Cで一晩行った。この時、input として適量上清をとり、冷凍保存した。

これ以降、免疫沈降した DNA の定量まで「Ring1B, H2Aub (Millipore) ChIP」に示したものと同様の作業を行った。抗体として、rabbit anti-H2AK119ub1 抗体 (Cell Signaling), rabbit anti-H3K27ac 抗体 (abcam) を用いた。

用いたプライマーを以下に示す。

Neurog1 TSS

Fw: CATTGTTGCGCGCCGTA

Rv: GCGATCAGATCAGCTCCT

Fezf2 TSS

Fw: ACATCCTAATGAGGTAATTATCATTTGC

Rv: ACCGTGCTAATAAACTGCC

Lef1 TSS

Fw: GGCAGCTCTTTGCTTTGAC

Rv: CCCGATCCCTCTTTGTTC

Tcfap2c TSS

Fw: CTTCCCATTAAGGCGTTCG

Rv: GCCGTGGGTGTGTAGAG

HoxA1 TSS

Fw: CTGAACTGGCAAGAGGTGA

Rv: CGACCACGCAGAGATTT

Gapdh TSS

Fw: TGCAGTCCGTATTTATAGGAACC

Rv: CTTGAGCTAGGACTGGATAAGCA

第三章 結果

第三章一節 アストロサイト分化期において PRC1 は H2AK119ub1 修飾非依存的にニューロン分化関連遺伝子群の発現を抑制する

神経系前駆細胞のニューロン分化関連遺伝子座において Ring1B の結合量および H2AK119ub1 修飾量は発生時期依存的に増加する

当研究室の先行研究から、PRC1 および PRC2 がニューロン分化期からアストロサイト分化期、さらには5層（皮質下投射）ニューロン分化期から4層ニューロン分化期への転換を引き起こすことが示された（Hirabayashi et al., 2009; Morimoto-Suzuki et al., 2014）。さらに、それぞれの転換点において、PcG は Neurog1 および Fezf2 の発現を抑制することも明らかになっている。また、この neurog1、fezf2 遺伝子座の転写開始点（Transcription start site; TSS）近傍において、PRC2 によって触媒される H3K27me3 修飾が発生時期依存的に上昇することが明らかになっている（Hirabayashi et al., 2009; Morimoto-Suzuki et al., 2014）。しかしながら、neurog1 や fezf2 遺伝子座において H2AK119ub1 修飾量やその触媒酵素である Ring1B の結合量が発現抑制のタイミングで上昇するかは不明である。

また、様々な幹細胞において PcG は多くのターゲット遺伝子を持つことが示されており、神経系前駆細胞においても Neurog1 や Fezf2 以外にニューロン分化に重要な遺伝子群をターゲットに持つ可能性が考えられる。実際に、アストロサイト分化期の神経系前駆細胞を用いて Ring1B をノックアウトすると、多くのニューロン関連遺伝子の発現が上昇することが示されている（Hirabayashi et al., 2009）。これらの遺伝子群の中で、lef1 は大脳新皮質神経系前駆細胞のニューロン分化誘導に働く Wnt シグナルの構成因子であり、VP16 を融合した Lef1 を発現させるとニューロン分化を誘導することが示されている（Munji et al., 2011）。また、tcfap2c は後頭部側のニューロン前駆細胞の産生に必要であることが示されている（Pinto et al., 2009）。以上の理由から私は、PRC1 がターゲットとして発現抑制している可能性のある遺伝子として、lef1 と tcfap2c 遺伝子に着目した。そこで私はまず、neurog1、fezf2、lef1、tcfap2c

遺伝子座において H2AK119ub1 修飾量や Ring1B の結合量が発現抑制のタイミングで増加するかを調べた。

発生時期の異なる神経系前駆細胞を得るために、Neurosphere 法と呼ばれる *in vitro* 初代培養系を用いた。Neurosphere 法は、上皮成長因子 (epidermal growth factor : EGF) と塩基性線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor 2 : FGF2) を添加した無血清培地で細胞を低密度浮遊培養することで、球状の細胞塊 (neurosphere) として神経系前駆細胞を増殖させる方法である (Reynolds and Weiss, 1996)。この系は、神経系前駆細胞のみを濃縮することが出来、さらに生体から採取するよりも多くの細胞数を回収出来るため非常に有用な系である。この方法により神経系前駆細胞を未分化な状態を維持したまま継代することで、生体内の各時期の分化能を持った前駆細胞を模倣した細胞を採取できると考えられている (Fig. 10)。まず、この Neurosphere 法を用いて神経系前駆細胞を培養した時に、ニューロン分化関連遺伝子 (neurog1、fezf2、lef1、tcfap2c) およびアストロサイト関連遺伝子 (GFAP) の mRNA 量が発生時期の進行に伴ってどのように変化するかを調べた。胎生 11.5 日目のマウス大脳新皮質より神経系前駆細胞を採取し、Neurosphere 法で 3、6、9 日間培養し、細胞を回収後 RNA 抽出、逆転写反応、定量 PCR 法を行い mRNA 量の定量を行った。その結果、neurog1、fezf2、tcfap2c は E11.5+3DIV から E11.5+6DIV にかけて顕著に mRNA 量が低下し、lef1 は E11.5 から E11.5+3DIV にかけて顕著に mRNA 量が低下する傾向が見られた (Fig. 11A-D)。一方で、GFAP は E11.5+6DIV から E11.5+9DIV にかけて mRNA 量の顕著な増加が見られた (Fig. 11E)。この結果、神経系前駆細胞を Neurosphere 法で継代することでニューロン分化関連遺伝子群の mRNA 量が低下すること、さらにアストロサイト関連遺伝子の mRNA 量が増加することが確認出来た。

この神経系前駆細胞の *in vitro* 培養系を用いて、Ring1B および H2AK119ub1 修飾に対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (Chromatin Immunoprecipitation) を行った。その後、それぞれの抗体で免疫沈降したクロマチンに対して定量 PCR 法を行い、異なる遺伝子座における Ring1B の結合量および H2AK119ub1 修飾量を調べた。その結果、neurog1、fezf2、lef1、tcfap2c 遺伝子座の TSS 領域近傍において発生時期の進行に伴って Ring1B の結合量および H2AK119ub1 修飾量が増加することが明らかになった (Fig. 11F, G)。

Ring1Bは神経系前駆細胞における主要な H2AK119ub1 修飾触媒酵素として働く

これまでに、PRC1 の必須構成因子である Ring1A および Ring1B は H2AK119ub1 修飾を触媒する酵素として報告されている (de Napoles et al., 2004; 2005; Wang et al., 2004)。一方で、H2A にモノユビキチン化を触媒する酵素として、Ring1A/B 以外にも様々な細胞種において 2A-HUB、BRCA1、Trim37 が報告されている (Zhou et al., 2008; Ruffner et al., 2001; Bhatnagar et al., 2014)。そのため、大脳新皮質神経系前駆細胞において Ring1A/B が神経系前駆細胞における主要な H2AK119ub1 修飾触媒酵素として働いているかを知るために、Ring1B のノックアウトおよび Ring1A/B のダブルノックアウトを行いウェスタンブロッティング法によりクロマチン全体での H2AK119ub1 修飾量を定量した。遺伝子の条件的破壊には Cre-loxP システムを用いた。利用した ROSA-CreERT2 ノックインマウスには、全身で恒常的に活性を有する ROSA26 プロモーターの下流に CreERT2 のトランスジーンが挿入されている (Seibler et al., 2003; Endoh et al., 2008)。従って、このマウスでは全身で CreERT2 が発現する。CreERT2 は変異型エストロゲン受容体(ERT)と Cre との融合タンパク質であり、通常は核外に存在しているが、ステロイドアゴニストであるタモキシフェン存在下で速やかに核内に移行し、Cre 認識配列である loxP で挟み込まれた遺伝子領域を環状に切り出すことが出来る。今回、この ROSA-CreERT2 ノックインマウスと Ring1B 遺伝子を loxP 配列によって挟み込んだマウス (Ring1B^{lox/lox})、および Ring1A 遺伝子を欠損させた Ring1B^{lox/lox} マウス (Ring1A^{-/-}; Ring1B^{lox/lox}) をそれぞれ交配した。これにより、タモキシフェンを投与することで Cre が核内に移行し、loxP 配列で挟まれた Ring1B 遺伝子をタモキシフェン投与のタイミング依存的に欠損させることが出来る。

Ring1A^{-/-}; Ring1B^{lox/lox}; ROSA-CreER マウスの胎生 12.5 日目の胎児から大脳新皮質を切り出し、Neurosphere法により神経系前駆細胞を6日間培養した。その後、細胞を2つに等分し、4-OHT (4-hydroxytamoxifen) 添加あるいは無添加培地によって Neurosphere 法でさらに3日間培養し、細胞の回収、ウェスタンブロッティング法による H2AK119ub1 修飾量の定量を行った。その結果、Ring1B をノックアウトした細胞ではコントロールの細胞と比較し、クロマチン全体の H2AK119ub1 修飾量が低下した (Fig. 12A)。しかしながら、

H2AK119ub1 修飾は完全に消失しなかった。さらに、Ring1A^{-/-}; Ring1B^{flox/flox} マウスを用いて上記と同条件で Ring1B のノックアウトを行い H2AK119ub1 修飾量の定量を行った。その結果、Ring1A/B をダブルノックアウトした細胞ではコントロールの細胞と比較し、クロマチン全体の H2AK119ub1 修飾量が顕著に低下した (Fig. 12B)。これらの結果から、大脳新皮質由来神経系前駆細胞においては Ring1B が主要な H2AK119ub1 修飾の触媒酵素として働いていることが示唆された。さらに、Ring1B をノックアウトした神経系前駆細胞では Ring1A が H2AK119ub1 修飾触媒酵素として働いていることが示唆された。

I53A/D56K 変異は Ring1B の E3 ユビキチンリガーゼ活性を顕著に低下させる

それでは、発生時期の進行に伴いニューロン分化関連遺伝子座で増加する Ring1B および H2AK119ub1 修飾量は発現抑制に貢献するのだろうか。ニューロン分化関連遺伝子の発現抑制における H2AK119ub1 修飾の必要性を検討するために、まず神経系前駆細胞において Ring1B の H2AK119ub1 修飾触媒活性を欠損させることの出来る変異体の作製を試みた。これまでに、Ring1B の E3 ユビキチンリガーゼとしての機能は Ring1B の N 末端にある RING ドメインによって担われることが示されている (Elderkin et al., 2007)。また、Ring1B と相互作用する E2 ユビキチンリガーゼとして、UbcH5 の 3 つのサブタイプ (a, b, c) および UbcH6 が報告されている (Buchwald et al., 2006)。Ring1B が E2 ユビキチンリガーゼ (UbcH5c, UbcH6) と相互作用するために必要なアミノ酸残基として RING ドメイン内の 53 番目のイソロイシンが報告されている (Buchwald et al., 2006)。そこでまず、大脳新皮質由来神経系前駆細胞においても I53A 変異が Ring1B の H2A ユビキチン化修飾触媒活性を欠損させるか検証した。

Ring1A^{-/-}; Ring1B^{flox/flox}; ROSA-CreER マウスの胎生 12.5 日目の胎児から大脳新皮質を切り出し、Neurosphere 法により神経系前駆細胞を 6 日間培養した。レトロウイルスを用いて野生型 Ring1B および Ring1B (I53A) 変異体を遺伝子導入した。それぞれの遺伝子導入細胞を 2 つに等分し、4-OHT (4-hydroxytamoxifen) 添加あるいは無添加培地によって Neurosphere 法でさらに 3 日間培養した。その後、細胞を回収しウェスタンブロッティング法によ

り H2AK119ub1 修飾量を定量した。その結果、野生型 Ring1B を発現させた細胞で H2AK119ub1 修飾量が部分的に回復した (Fig. 13A, B)。Ring1B (I53A) 変異体を発現させた細胞では野生型 Ring1B を発現させた細胞と比較し H2AK119ub1 修飾量の顕著な回復は見られなかった。しかし、Ring1B (I53A) 変異体を発現させた細胞ではわずかながら H2AK119ub1 修飾量の回復が見られた (Fig. 13A)。この結果から、大脳新皮質由来神経系前駆細胞において、I53A 変異は Ring1B の H2A ユビキチン化修飾触媒活性を完全には欠損させないことが示唆された。

そこで、Ring1B の H2A ユビキチン化修飾触媒活性を欠損させる新たな変異体の作製を試みた。Ring1B の RING ドメインにある 87 番目と 90 番目のシステイン残基は古典的な RING ドメインのコンセンサス配列の中でも共通して見られるアミノ酸残基であり、これらのシステインをグリシンに置換した変異体 (C87G, C90G) は H2A ユビキチン化修飾触媒活性を欠損していることが報告されている (Elderkin et al., 2007)。そこで次に、私は Ring1B (I53A/C87G) および Ring1B (I53A/C90G) 変異体を作製し、神経系前駆細胞におけるこれらの変異体の H2A ユビキチン化修飾触媒活性を評価した。上記と同様にして、Ring1A/B をダブルノックアウトした発生後期の神経系前駆細胞に Ring1B (I53A/C87G) もしくは Ring1B (I53A/C90G) 変異体を発現させ、H2AK119ub1 修飾量を定量した。その結果、Ring1B (I53A/C87G) もしくは Ring1B (I53A/C90G) 変異体を発現させた細胞では Ring1B のタンパク質量の低下が見られた (Fig. 13B)。この結果から、C87G 変異および C90G 変異はそれぞれ単独で、もしくは I53A 変異と合わさると Ring1B タンパク質の安定性の低下を引き起こすことが示唆された。

そこで別のやり方で、Ring1B の H2A ユビキチン化活性をより完全に失わせる変異体の作製を行った。Ring1B/Bmi1 複合体と UbcH5c のタンパク質結晶構造解析から、Ring1B と UbcH5c の相互作用に重要な Ring1B 上のアミノ酸残基がいくつか同定された (Bentley et al., 2011)。その中でも、私は Ring1B の 56 番目のアスパラギン酸残基のリシンに置換した変異体 (D56K) に着目した。この変異体は Ring1B/Bmi1 複合体と UbcH5c との相互作用を欠損させ、Ring1B/Bmi1 複合体の DNA との親和性を損なわない変異体であることが報告されているからである (Fig. 13C : Bentley et al., 2011)。そこで、この報告に基づき Ring1B (I53A/D56K) 変異体の H2A ユビキチン化修飾触媒活性を評価し

た。Ring1A/B をダブルノックアウトした発生後期の神経系前駆細胞を用いて上記と同様の実験を行い、H2AK119ub1 修飾量を定量した。その結果、Ring1B (I53A/D56K) を発現させた細胞では Ring1B (I53A) 変異体を発現させた細胞と比較し、H2AK119ub1 修飾量の回復が顕著に抑制されていた (Fig. 13A)。この結果から、大脳新皮質神経系前駆細胞において I53A/D56K 変異は Ring1B の H2AK119ub1 修飾触媒活性をほぼ完全に欠損させることが示唆された。

Ring1B はアストロサイト分化期の神経系前駆細胞において E3 ユビキチンリガーゼ活性および H2AK119ub1 修飾非依存的にニューロン分化関連遺伝子群の発現を抑制する

次に、今回新たに作製した Ring1B (I53A/D56K) 変異体を用いて、PRC1 によるアストロサイト分化期のニューロン分化関連遺伝子の発現抑制に H2AK119ub1 修飾が必要かを調べた。Ring1A^{-/-}; Ring1B^{flox/flox}; ROSA-CreER マウスの胎生 12.5 日目の胎児から大脳新皮質を切り出し、Neurosphere 法により神経系前駆細胞を 6 日間培養した。レトロウイルスを用いて野生型 Ring1B および Ring1B (I53A/D56K) 変異体を遺伝子導入した。それぞれの遺伝子導入細胞を 2 つに等分し、4-OHT (4-hydroxytamoxifen) 添加あるいは無添加培地によって Neurosphere 法でさらに 3 日間培養した。さらに、FGF2 添加培地で 1 日間単層培養後、FGF2 無添加培地で 4 時間培養し分化誘導を行った。その後、細胞の回収、mRNA 抽出、逆転写反応を行い mRNA 量の定量を行った。その結果、Ring1B のノックアウトにより neurog1, fezf2, lef1, tcfap2c 遺伝子の脱抑制が起きている時に、Ring1B (I53A/D56K) を導入した細胞では野生型 Ring1B を導入した細胞と同様に neurog1, fezf2, lef1, tcfap2c の発現が抑制された (Fig. 14A-D)。この結果から、アストロサイト分化期の神経系前駆細胞において Ring1B によるニューロン分化関連遺伝子の発現抑制に Ring1B の E3 ユビキチンリガーゼ活性が必要ないことが示唆された。また、様々な系において PcG ターゲット遺伝子として報告されている Hox 遺伝子やインプリンティング遺伝子 Dlk1 および cdkn1c (p57) についても、その発現抑制に Ring1B の E3 ユビキチンリガーゼ活性が必要であることを検討した。その結果、Ring1B のノックアウトによって HoxA1 の脱抑制が起きる時に、Ring1B (I53A/D56K) 変異体を発現させた細胞では HoxA1 の発現抑制が回復した (Fig. 14F, G)。一方で、興味

深いことに Dlk1, p57 については Ring1B (I53A/D56K) 変異体を発現させた細胞で発現抑制が回復しなかった (Fig. 14F, G)。つまり、HoxA1 の発現抑制には Ring1B の E3 ユビキチンリガーゼ活性が必要なく、Dlk1, p57 の発現抑制には必要である可能性が示唆された。

さらに、この時 Ring1B 抗体および H2AK119ub1 修飾抗体を用いた ChIP assay を行い、ニューロン分化関連遺伝子座における Ring1B の結合量および H2AK119ub1 修飾量の定量を行った。その結果、Ring1B (I53A/D56K) を発現させた細胞では野生型 Ring1B を発現させた細胞と同程度に Ring1B の結合量の回復が見られた (Fig. 15A)。この結果から、アストロサイト分化期の神経系前駆細胞において Ring1B の E3 ユビキチンリガーゼ活性は Ring1B のクロマチンへの結合に必要なことが示唆された。一方で、野生型 Ring1B を発現させた細胞では H2AK119ub1 修飾量の回復が見られたのに対し、Ring1B (I53A/D56K) を発現させた細胞では H2AK119ub1 修飾量が全く回復していなかった (Fig. 15B)。このことから、Ring1B の E3 ユビキチンリガーゼ活性に加え H2AK119ub1 修飾はアストロサイト分化期におけるニューロン分化関連遺伝子の発現抑制に必要なことが示唆された。

Phc2 の自己重合活性はアストロサイト分化期の神経系前駆細胞におけるニューロン分化関連遺伝子群の発現抑制に一部貢献する

それでは、アストロサイト分化期のニューロン分化関連遺伝子群における H2AK119ub1 修飾非依存的な転写抑制状態はどのようなメカニズムで形成されるのだろうか。その可能性の一つとして、PRC1 の構成因子である Phc2 の SAM ドメインを介した自己重合化による抑制メカニズムが考えられる。そこで、Phc2 タンパク質の SAM ドメインを介した自己重合活性がアストロサイト分化期におけるニューロン分化関連遺伝子の発現抑制に貢献するかを検討した。そのために、Phc2 の SAM ドメイン内にある 307 番目のロイシンをアルギニンに置換した Phc2 の変異体 (L307R) を用いた。この変異体は、過剰発現することで優勢抑制型変異体として機能し、Phc2 の自己重合を抑制することが示されている (Kim et al., 2002; Isono et al., 2013)。胎生 11.5 日目のマウス大脳新皮質より神経系前駆細胞を採取し、Neurosphere 法で 6 日間培養し、レトロウイルスにより野生型 Phc2 および Phc2 (L307R) 変異体の過剰発現を行った。その後、さ

らに 3 日間 Neurosphere 法で培養後、FGF2 添加培地で 1 日間単層培養後、FGF2 添加培地もしくは無添加培地で 6 時間培養し分化誘導を行った。その結果、コントロールの細胞と比較し Phc2 (L307R) 変異体を過剰発現したサンプルでは、fezf2, lef1, tcfap2c の mRNA 量が増加することが明らかになった (Fig. 16A-C)。このことから、Phc2 の SAM ドメインを介した Phc2 の自己重合がアストロサイト分化期の神経系前駆細胞におけるニューロン分化関連遺伝子群の発現抑制に一部貢献する可能性が示唆された。また、MEF において Phc2 の SAM ドメインを介した自己重合が Hox 遺伝子群の発現抑制に貢献することが示されている (Isono et al., 2014)。しかし、同じ遺伝子であっても細胞種によって PRC1 による発現抑制メカニズムが異なる可能性がある。そこで、神経系前駆細胞において PRC1 のターゲットとして知られる HoxA1 が、Phc2 の SAM ドメインを介した自己重合によって抑制されているかを調べた。その結果、Phc2 (L307R) 変異体の過剰発現によって HoxA1 の mRNA 量の顕著な増加が見られた (Fig. 16D)。このことから、神経系前駆細胞において HoxA1 が Phc2 の SAM ドメインを介した自己重合によって抑制されることが示唆された。

第三章二節 ニューロン分化期において Ring1B は H2AK119ub1 修飾触媒活性依存的にニューロン分化を抑制する

Ring1B はニューロン分化期の神経系前駆細胞において E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的にニューロン分化を抑制する

PRC2 の構成因子である Ezh2 が発生早期の神経系前駆細胞において、その未分化性の維持に貢献することが示されている (Pereira et al., 2010)。しかしながら、PRC1 が PRC2 と同様に神経系前駆細胞の未分化性の維持に貢献しているかは不明である。そこで、ニューロン分化期において PRC1 が神経系前駆細胞の未分化性の維持に貢献するか、また貢献するならば Ring1B の H2AK119ub1 修飾触媒活性が必要かを調べた。

Ring1A^{-/-}; Ring1B^{flox/flox}; ROSA-CreER マウスの胎生 12.5 日目の胎児から大脳新皮質を切り出し、レトロウイルスを用いて野生型 Ring1B および H2A ユビキチン化触媒活性を欠損させた変異体 Ring1B (I53A/D56K) を遺伝子導入した。

それぞれの遺伝子導入細胞を2つに等分し、4-OHT (4-hydroxytamoxifen) 添加あるいは無添加培地によって Neurosphere 法で3日間培養した。さらに、FGF2 添加培地で1日間単層培養後、Pan ニューロンマーカーである β III-tubulin に対する抗体を用いて免疫染色を行い、遺伝子導入細胞における β III-tubulin 陽性細胞の割合を調べた。その結果、コントロールの Ring1A ノックアウト細胞と比較し Ring1A/B をダブルノックアウトした細胞では顕著にニューロン分化した細胞の割合が増加した (Fig. 17A, B)。このことから、ニューロン分化期において Ring1A/B が神経系前駆細胞の未分化性の維持に貢献することが示唆された。

この時、野生型 Ring1B を発現させた細胞では Ring1B をノックアウトしていないコントロールの細胞と同程度までニューロン分化が抑制された。一方で、Ring1B (I53A/D56K) を発現させた細胞では部分的にニューロン分化が抑制されたものの完全にニューロン分化の抑制は回復しなかった (Fig. 17A, B)。このことから、ニューロン分化期における神経系前駆細胞の未分化性維持に Ring1B の E3 ユビキチンリガーゼ活性が部分的に必要な可能性が示唆された。さらにこの時、過剰発現した Ring1B の mRNA 量は野生型でも変異体でも大きな差はなかった。そのため、Ring1B (I53A/D56K) 変異体をレスキューした細胞でニューロン分化抑制が回復しなかった結果は、発現させた Ring1B の mRNA 量に差があったためではないことが示唆された。

Ring1B はニューロン分化期において E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的にニューロン分化関連遺伝子群の発現を抑制する

ニューロン分化期において、Ring1A/B が H2AK119ub1 修飾触媒活性依存的に神経系前駆細胞のニューロン分化を抑制することが明らかになった。しかしその際に、Ring1A/B がニューロン分化関連遺伝子を抑制しているか、また抑制しているならばその抑制に H2AK119ub1 修飾が必要かは分かっていない。

Ring1A^{-/-}; Ring1B^{flox/flox}; ROSA-CreER マウスの胎生 12.5 日目の胎児から大脳新皮質を切り出し、レトロウイルスを用いて野生型 Ring1B および H2A ユビキチン化触媒活性を欠損させた変異体 Ring1B (I53A/D56K) を遺伝子導入した。それぞれの遺伝子導入細胞を2つに等分し、4-OHT (4-hydroxytamoxifen) 添加あるいは無添加培地によって Neurosphere 法で3日間培養した。その後、細

胞の回収、mRNA 抽出、逆転写反応を行い mRNA 量の定量を行った。その結果、コントロールの細胞 (Ring1A^{-/-}) と比較し Ring1B を欠損した細胞 (Ring1A^{-/-}; Ring1B^{-/-}) では neurog1、 fezf2、 lef1、 tcfap2c 遺伝子の mRNA 量が上昇した (Fig. 18A-D)。この結果から、発生早期神経系前駆細胞において Ring1A/B がニューロン分化関連遺伝子群の発現を抑制することが示唆された。

さらに、ニューロン分化期の神経系前駆細胞において Ring1B によるニューロン分化関連遺伝子群の発現抑制に H2AK119ub1 修飾が必要かを調べた。その結果、Ring1A/B をダブルノックアウトし Ring1B (I53A/D56K) を導入した細胞では野生型 Ring1B を遺伝子導入した細胞と異なり neurog1, fezf2, tcfap2c の発現抑制がほとんど回復しなかった (Fig. 18A-C)。lef1 については、Ring1B (I53A/D56K) を導入した細胞で部分的に発現抑制が回復した (Fig. 18D)。この結果から、ニューロン分化期の神経系前駆細胞において Ring1B によるニューロン分化関連遺伝子の発現抑制に Ring1B の E3 ユビキチンリガーゼ活性が必要であることが示唆された。また興味深いことに、この時 Ring1A/B をダブルノックアウトし Ring1B (I53A/D56K) を遺伝子導入した細胞では野生型 Ring1B を遺伝子導入した細胞と同程度まで HoxA1 の発現抑制が回復していた (Fig. 18E)。以上の結果から、ニューロン分化期において全ての PcG ターゲット遺伝子が H2AK119ub1 修飾触媒活性依存的に抑制されるわけではないことが示唆された。

ニューロン分化期において Ring1B は E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的にニューロン分化関連遺伝子座のクロマチンに結合する

さらに、上記のニューロン分化期における Ring1B (I53A/D56K) 変異体のレスキュー実験で、ニューロン分化関連遺伝子座における Ring1B の結合量および H2AK119ub1 修飾量を検討した。Ring1A^{-/-}; Ring1B^{flox/flox}; ROSA-CreER マウスの胎生 12.5 日目の胎児から大脳新皮質を切り出し、Neurosphere 法により神経系前駆細胞を 3 日間培養した。レトロウイルスを用いて野生型 Ring1B および H2A ユビキチン化触媒活性を欠損させた変異体 Ring1B (I53A/D56K) を遺伝子導入した。それぞれの遺伝子導入細胞を 2 つに等分し、4-OHT (4-hydroxytamoxifen) 添加あるいは無添加培地によって Neurosphere 法でさらに 3 日間培養した。その後、細胞を回収し Ring1B 抗体および H2AK119ub1

修飾抗体を用いた ChIP assay を行い、ニューロン分化関連遺伝子座における Ring1B の結合量および H2AK119ub1 修飾量の定量を行った。その結果、Ring1A/B のダブルノックアウトにより fezf2, lef1, tcfap2c 遺伝子の転写開始点近傍において Ring1B の結合量の低下が見られる時に、Ring1B (I53A/D56K) を導入した細胞では野生型 Ring1B を導入した細胞と異なり Ring1B の結合量の回復が見られなかった (Fig. 19A)。この結果から、ニューロン分化期において Ring1B は E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的にニューロン分化関連遺伝子座のクロマチンに結合する可能性が示唆された。さらに、Ring1A/B のダブルノックアウトにより fezf2、lef1、tcfap2c 遺伝子の転写開始点近傍において H2AK119ub1 修飾量の低下が見られる時に、Ring1B (I53A/D56K) を導入した細胞では野生型 Ring1B を導入した細胞と異なり H2AK119ub1 修飾量の回復が見られなかった (Fig. 19B)。一方で、興味深いことに HoxA1 遺伝子の転写開始点近傍では、Ring1B (I53A/D56K) を導入した細胞で H2AK119ub1 修飾量の回復が見られず、Ring1B の結合量の回復が見られた。つまり、ニューロン分化期の神経系前駆細胞において全ての Ring1B ターゲット遺伝子座で Ring1B (I53A/D56K) 変異体が結合できなくなったわけではないことが示唆された。

神経系前駆細胞のニューロン分化関連遺伝子座において H3K27ac 修飾量は発生時期依存的に低下する

それでは、ニューロン分化期における H2AK119ub1 修飾触媒活性依存的な抑制状態とアストロサイト分化期における H2AK119ub1 修飾非依存的な抑制状態の違いはどのようにして生まれるのだろうか。この違いを生むメカニズムこそが分化能を有した状態（幹細胞性）と分化能を失った状態の違いを産むのに重要であると考えられる。私は、このニューロン分化関連遺伝子座における発生時期依存的な抑制状態の違いを生むメカニズムとして、ニューロン分化期とアストロサイト分化期では H2A ユビキチン化以前のクロマチン状態に差がある可能性を考えた。そこで、転写活性化との相関が知られるヒストン修飾である H3K27ac 修飾に着目し、ニューロン分化関連遺伝子座における発生時期依存的な H3K27ac 修飾量を調べた。

胎生 11.5 日目のマウス大脳新皮質より神経系前駆細胞を採取してそのまま回収、もしくは Neurosphere 法で 3、9 日間培養して細胞を回収後、H3K27ac 修

飾に対する抗体によりクロマチン免疫沈降法 (Chromatin Immunoprecipitation Assay) を行った。その後、免疫沈降したクロマチンに対して定量 PCR 法を行い、異なる遺伝子座における H3K27ac 修飾量を調べた。その結果、*neurog1*, *fezf2*, *lef1*, *tcfa2c* 遺伝子座の TSS 領域近傍において発生時期の進行に伴って H3K27ac 修飾量が顕著に低下することが明らかになった (Fig. 20)。

HDAC 活性はアストロサイト分化期の神経系前駆細胞における H2AK119ub1 非依存的な *neurog1* の発現抑制に必要である

ニューロン分化関連遺伝子座における、発生時期依存的な H3K27ac 修飾量の変化が、Ring1B による E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的な抑制状態と非依存的な抑制状態の違いを産む要因となっている可能性が考えられる。そこでこの可能性を検証するために、HDAC 阻害剤として知られるバルプロ酸 (Valproic acid; VPA) を用いて H3K27ac 修飾量が低下するのを阻害しようと試みた。VPA 処理によって、アストロサイト分化期における Ring1B の H2AK119ub1 修飾触媒活性非依存的な抑制状態が形成されなくなるかを検証した。

Ring1A^{-/-}; Ring1B^{flox/flox}; ROSA-CreER マウスの胎生 12.5 日目の胎児から大脳新皮質を切り出し、Neurosphere 法により神経系前駆細胞を 6 日間培養した。レトロウイルスを用いて野生型 Ring1B および H2A ユビキチン化触媒活性を欠損させた変異体 Ring1B (I53A/D56K) を遺伝子導入した。それぞれの遺伝子導入細胞を 2 つに等分し、4-OHT (4-hydroxytamoxifen) 添加あるいは無添加培地によって Neurosphere 法でさらに 3 日間培養した。VPA 添加あるいは無添加培地で 12 時間単層培養後、FGF2 無添加培地で 4 時間培養し分化誘導を行った。その後、細胞の回収、mRNA 抽出、逆転写反応を行い mRNA 量の定量を行った。その結果、VPA を添加していない条件では、Ring1B (I53A/D56K) を導入した細胞で野生型 Ring1B を導入した細胞と同様に *neurog1*, *fezf2*, *lef1*, *tcfa2c* 発現が抑制された。一方、VPA を添加した条件では、Ring1B (I53A/D56K) を導入した細胞は野生型 Ring1B を導入した細胞と異なり *neurog1* の発現抑制が回復されなかった (Fig. 21)。この結果から、少なくとも HDAC の活性がアストロサイト分化期の Ring1B による H2AK119ub1 非依存的な *neurog1* の発現抑制状態の形成に必要であることが示唆された。

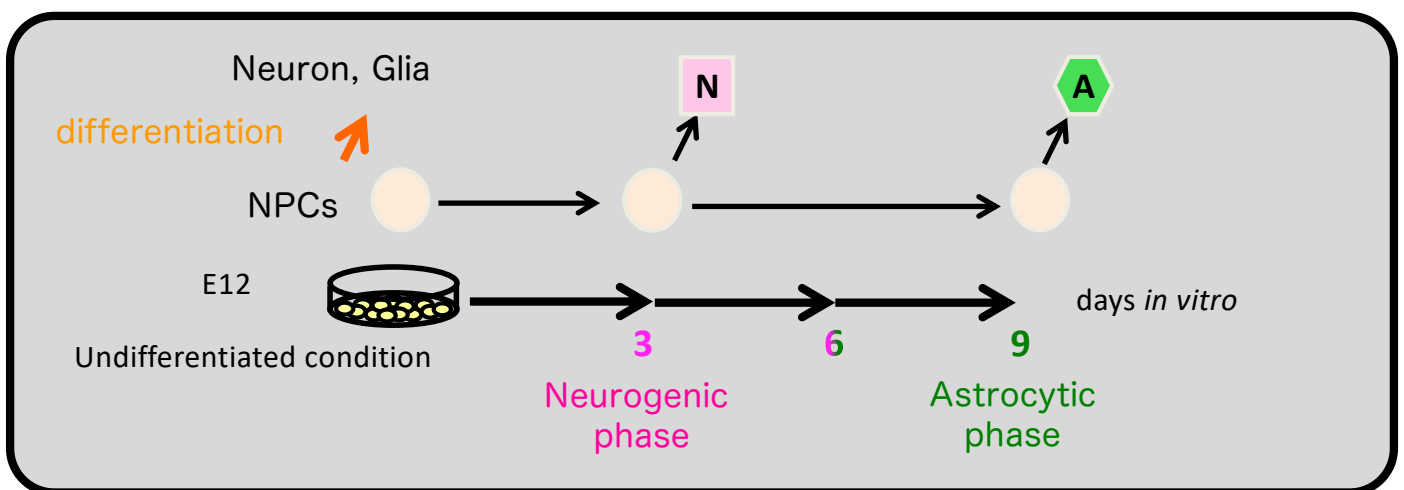
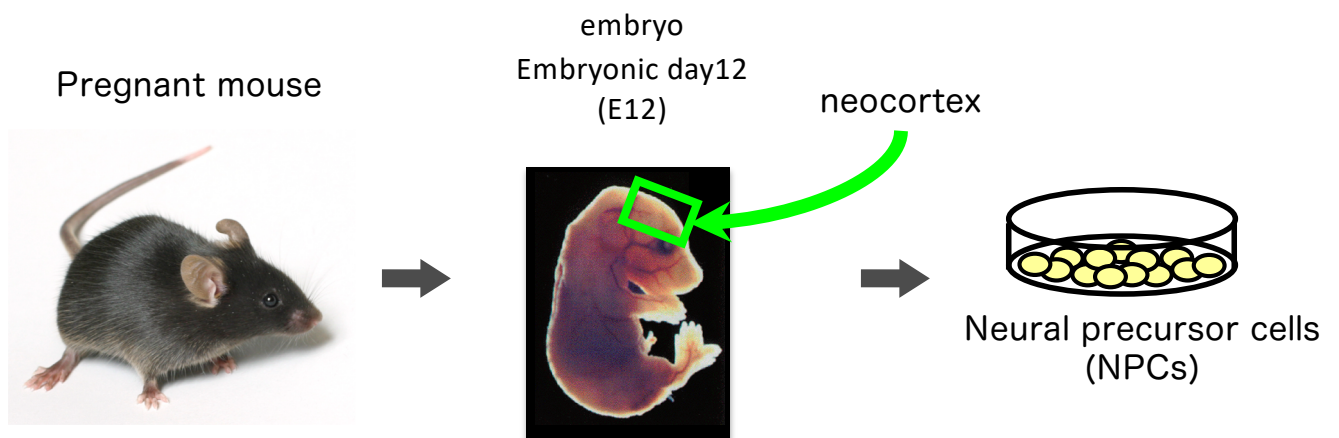


Figure10 大脳新皮質由来神経系前駆細胞の*in vitro*培養系

胎生12日目C57BL/6マウス大脳新皮質もしくは胎生11日目ICRマウス大脳新皮質より神経系前駆細胞を採取し、bFGF, EGF添加培地で浮遊培養を行う。この方法で培養すると、神経系前駆細胞はNeurosphereと呼ばれる球状の細胞塊が得られる。得られたNeurosphereを3日ごとに解離分散させ繰り返し継代することで生体の神経系前駆細胞を模倣できると考えられている。例えば、3DIVの細胞は主にニューロンを産生し、9DIVの細胞はアストロサイトを産生する。

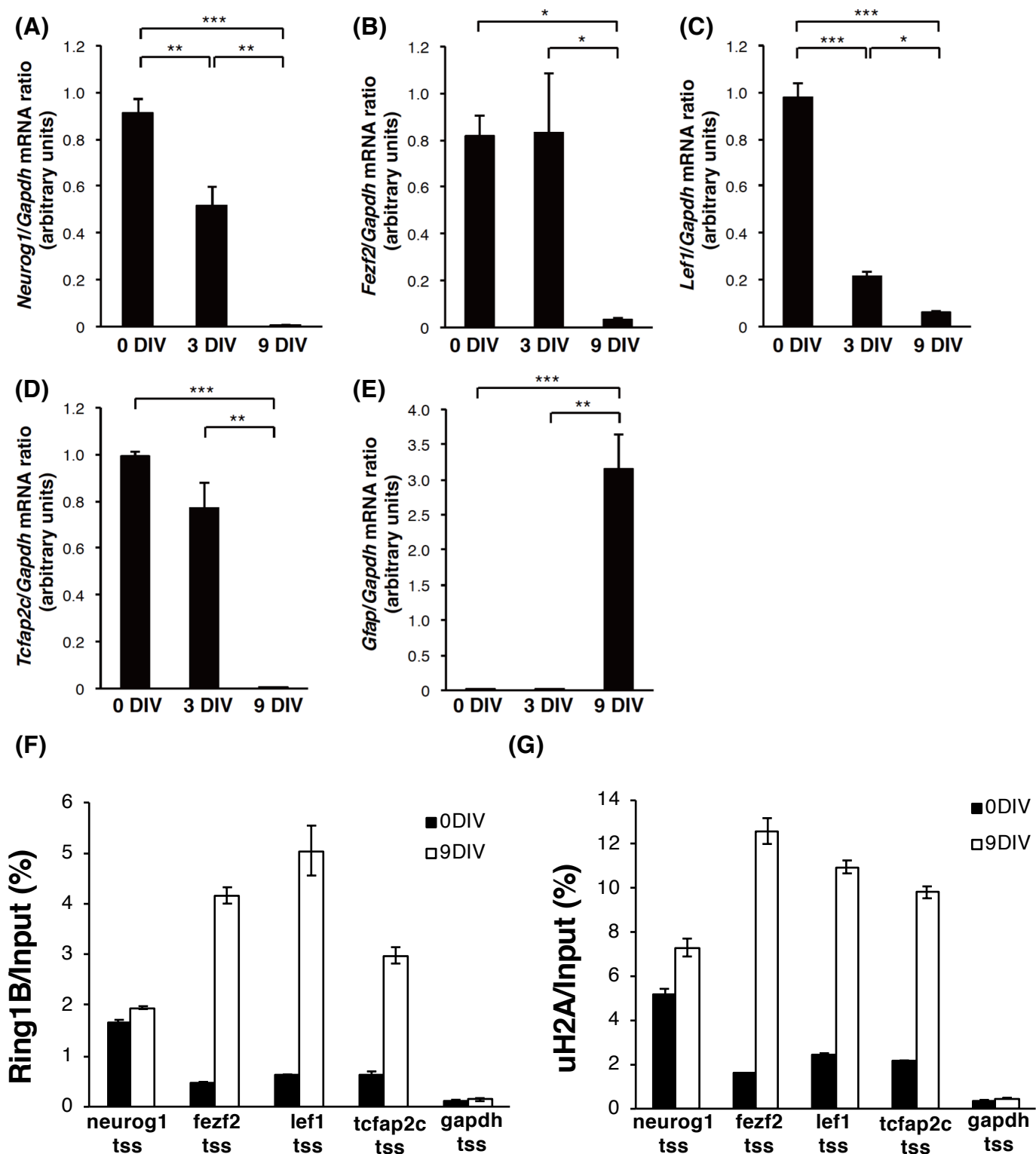


Figure11 ニューロン分化関連遺伝子座において発生時期依存的にRing1BおよびH2AK119ub1修飾量が増加する

(A-E) E11 ICRマウス大脳新皮質より神経系前駆細胞を採取し、Neurosphere法により0日、3日、9日間培養後、細胞を回収しニューロン分化関連遺伝子群 (Neurog1, Fezf2, Lef1, Tcfap2c) およびアストロサイトマーカーとして知られるGFAPのmRNA量を調べた。

(F, G) E11 ICRマウス大脳新皮質より神経系前駆細胞を採取し、Neurosphere法により0日および9日間培養後、細胞を回収した。その後、Ring1B抗体およびH2AK119ub1修飾抗体を用いたChIP assayを行い、各遺伝子座における (F) Ring1Bの結合量および (G) H2AK119ub1修飾量の定量を行った。

(A-E) $n \geq 3$, 全ての実験は独立に行い、同様の結果が得られている。エラーバーは標準誤差を表す。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey-Kramer post hoc test

(F, G) $n = 3$, 全ての実験は独立に行い、同様の結果が得られている。3回の測定のうち代表的な実験について、各サンプルを3回ずつ測定し、平均値と標準誤差を記載した。

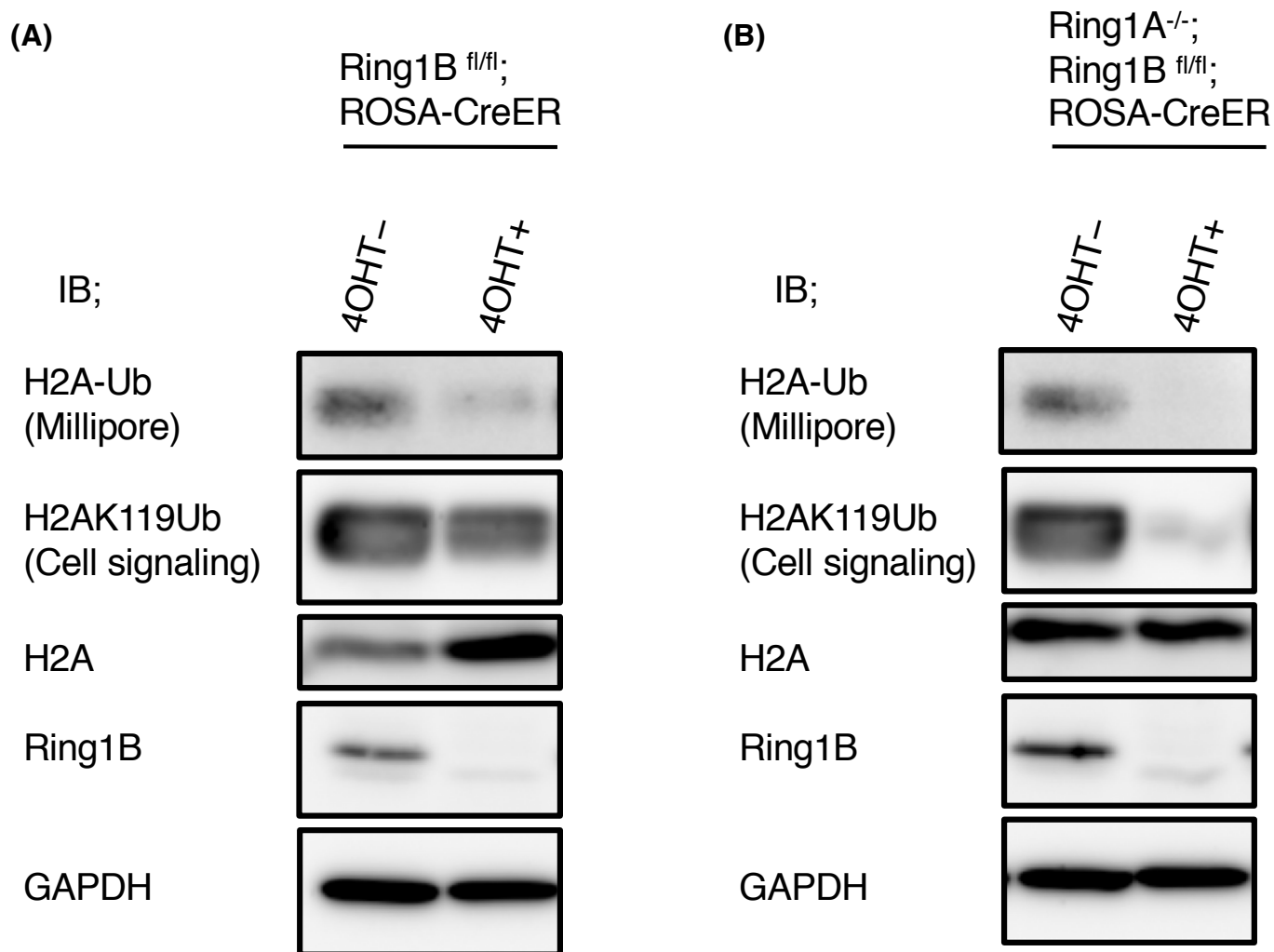


Figure12 Ring1A/Bは大腦新皮質由来神経系前駆細胞において主要なH2AK119ub1修飾触媒酵素として働く

(A) E12.5 Ring1B^{fl/fl}; ROSA-CreERマウス大腦新皮質由来神経系前駆細胞を、Neurosphere法により6日間培養した。その後、4-OHT添加あるいは無添加培地によってNeurosphere法でさらに3日間培養し、細胞の回収を行った。その後、H2Aub (millipore), H2AK119ub1 (Cell Signaling), H2A, Ring1B, Gapdhに対する抗体を用いてウェスタンブローディングを行った。n≥3

(B) E12.5 Ring1A^{-/-}; Ring1B^{fl/fl}; ROSA-CreERマウス大腦新皮質由来神経系前駆細胞を、Neurosphere法により6日間培養した。その後、4-OHT添加あるいは無添加培地によってNeurosphere法でさらに3日間培養し、細胞の回収を行った。その後、H2Aub (millipore), H2AK119ub1 (Cell Signaling), H2A, Ring1B, Gapdhに対する抗体を用いてウェスタンブローディングを行った。n≥3

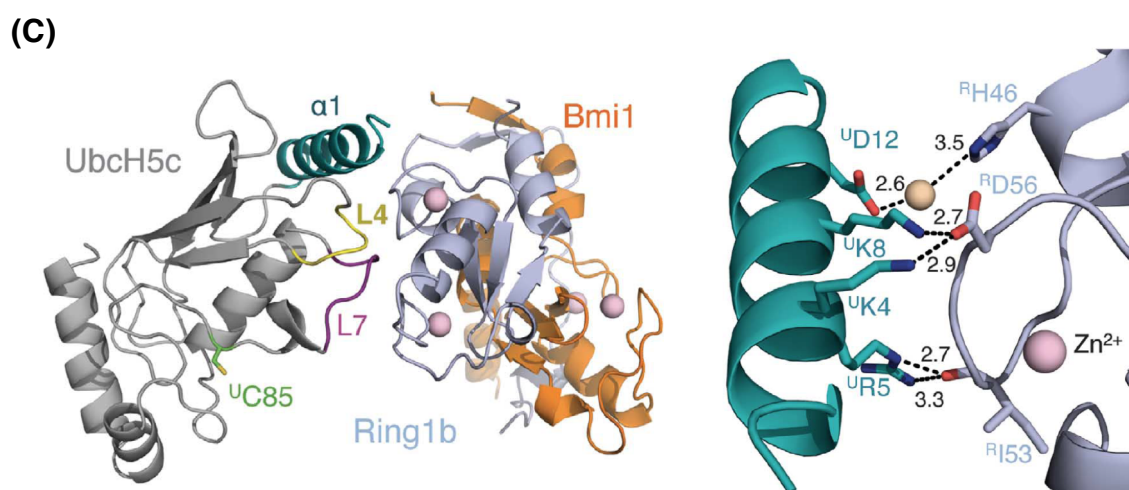
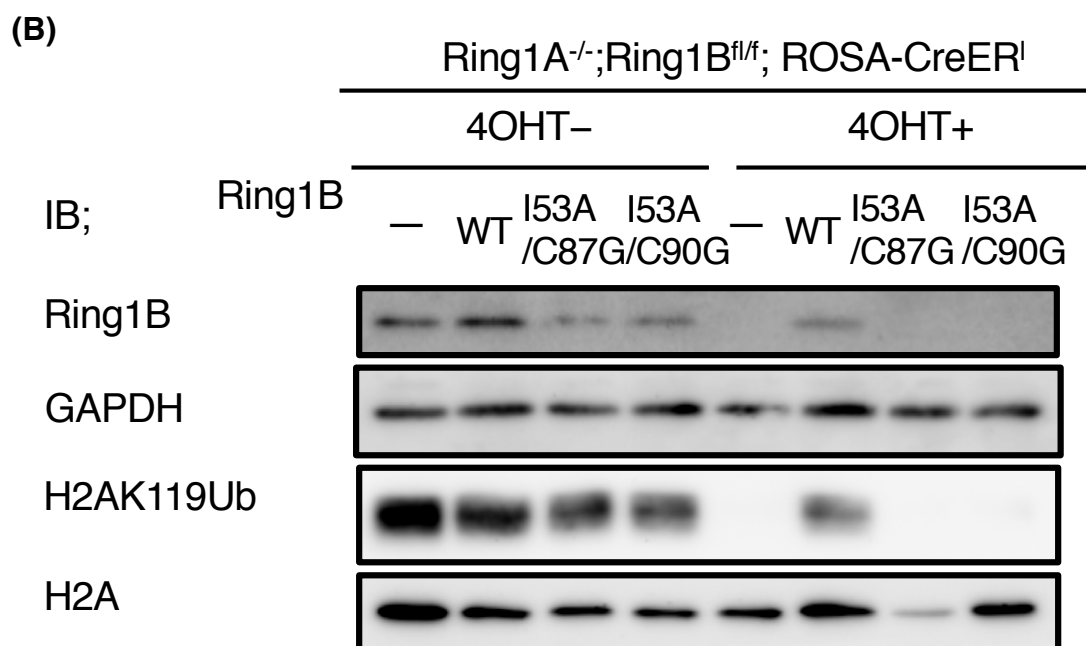
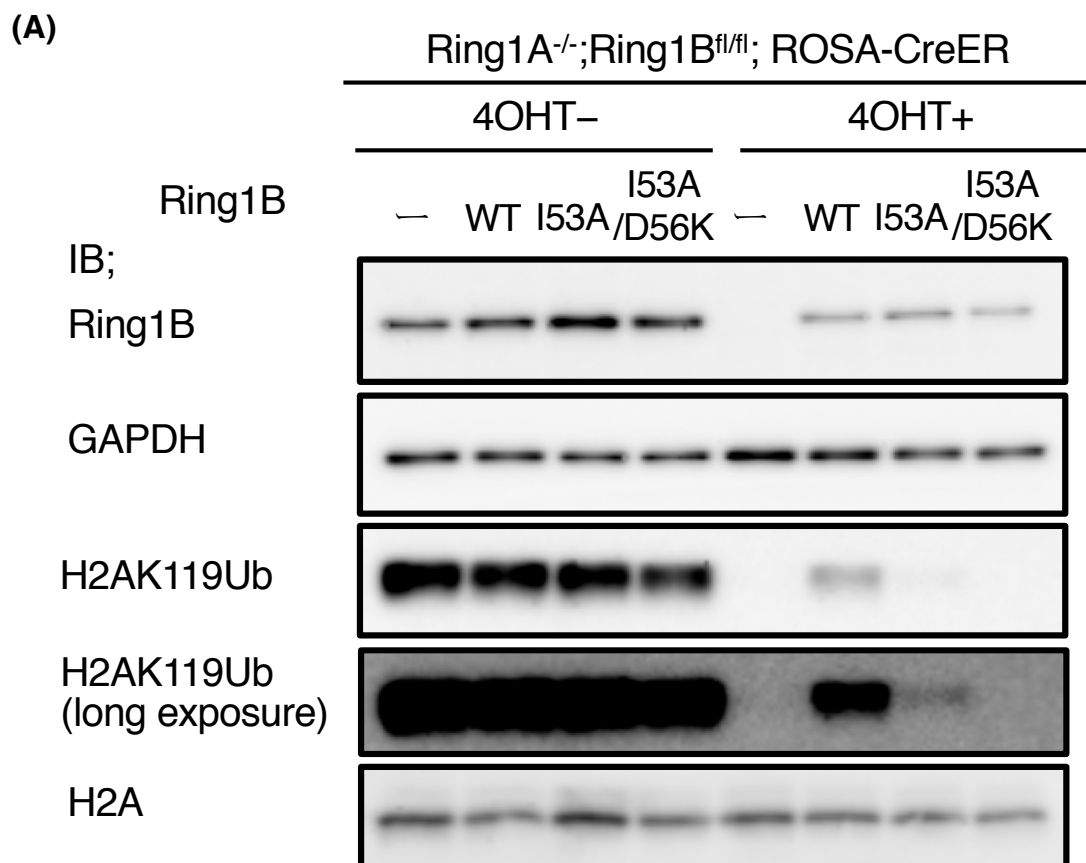
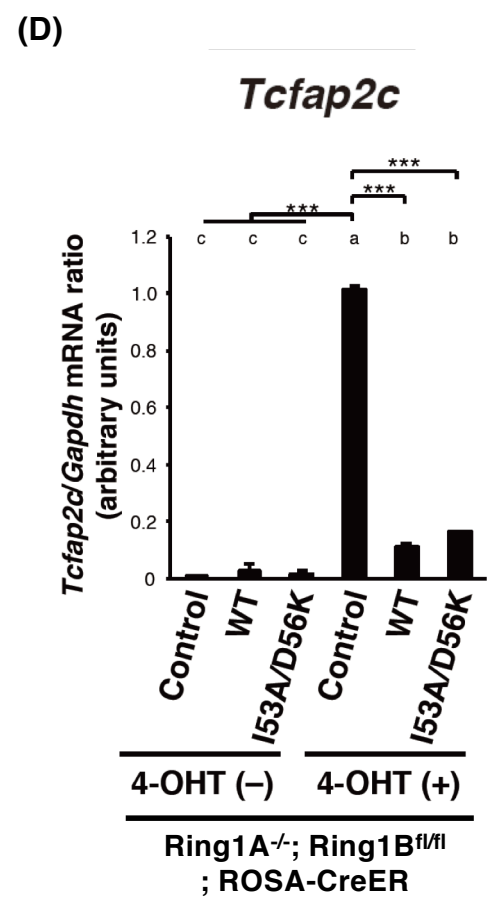
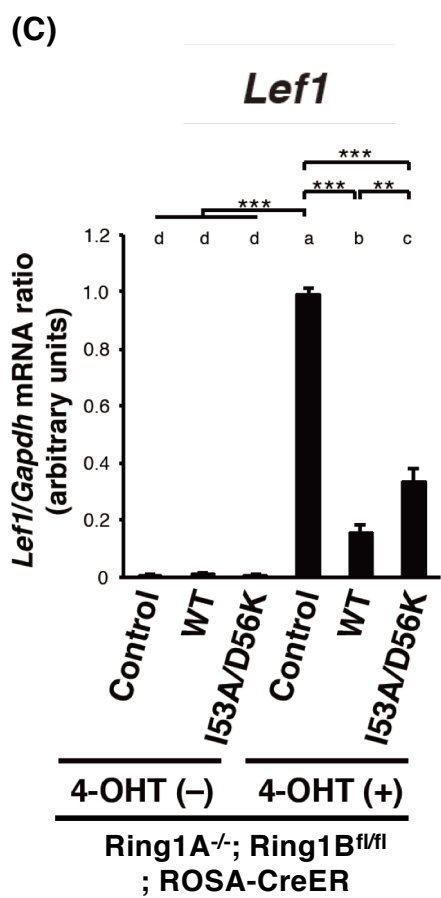
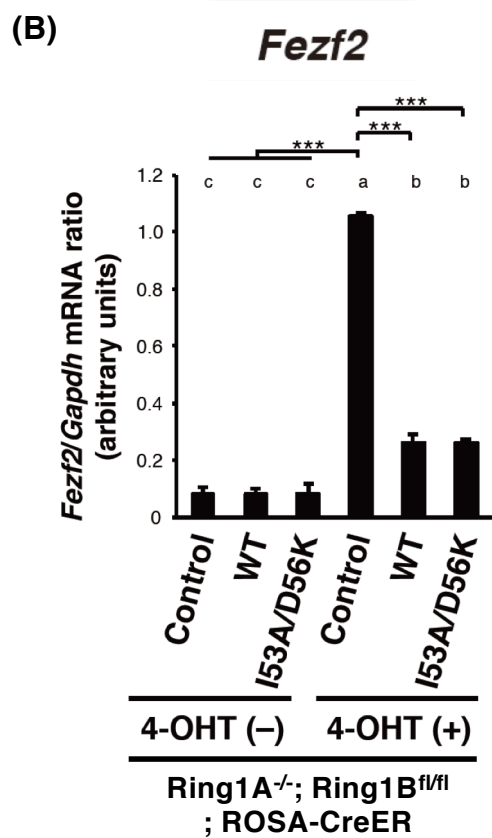
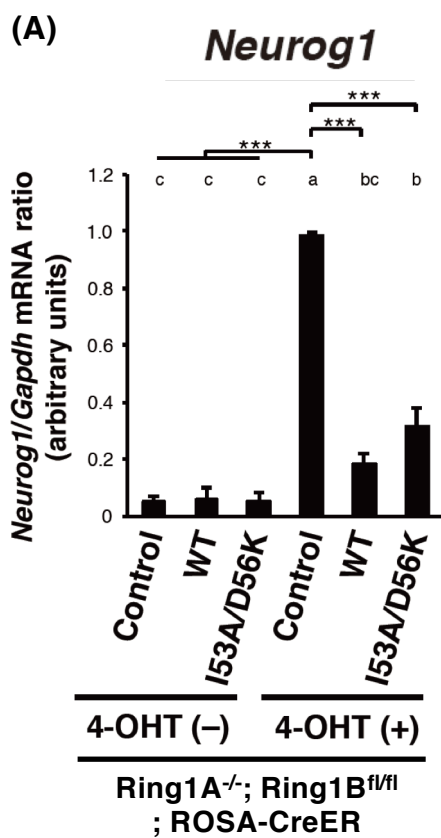


Figure13 I53A/D56K変異はRing1BのE3ユビキチンリガーゼ活性を顕著に低下させる

(A) E12.5 Ring1A^{-/-}; Ring1B^{fl/fl}; ROSA-CreERマウス大脳新皮質由来神経系前駆細胞を、Neurosphere法により6日間培養した。レトロウイルスを用いて野生型Ring1B, Ring1B (I53A) 変異体, Ring1B (I53A/D56K) 変異体を遺伝子導入した。その後、4-OHT添加あるいは無添加培地によってNeurosphere法でさらに3日間培養し、細胞の回収を行った。その後、H2AK119ub1 (Cell Signaling), H2A, Ring1B, Gapdhに対する抗体を用いてウェスタンブローディングを行った。n≥3

(B) E12.5 Ring1A^{-/-}; Ring1B^{fl/fl}; ROSA-CreERマウス大脳新皮質由来神経系前駆細胞を、Neurosphere法により6日間培養した。レトロウイルスを用いて野生型Ring1B, Ring1B (I53A/C87G) 変異体, Ring1B (I53A/C90G) 変異体を遺伝子導入した。その後、4-OHT添加あるいは無添加培地によってNeurosphere法でさらに3日間培養し、細胞の回収を行った。その後、H2AK119ub1 (Cell Signaling), H2A, Ring1B, Gapdhに対する抗体を用いてウェスタンブローディングを行った。n=1

(C) Ring1B/Bmi1-UbcH5cの結晶構造解析が行われており (Bentley et al., EMBO J, 2011)、Ring1Bとのbinding surfaceにあるUbcH5c上の3つのモチーフが取られている (N-terminal α -helix, L4 loop, L7 loop) (左図)。UbcH5cのN-terminal α -helixはRing1BのD56と塩橋を形成する。Bentley et al., EMBO J, 2011より転載



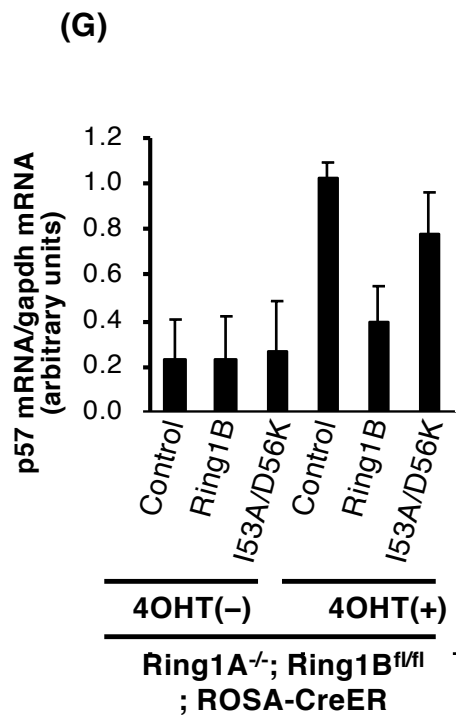
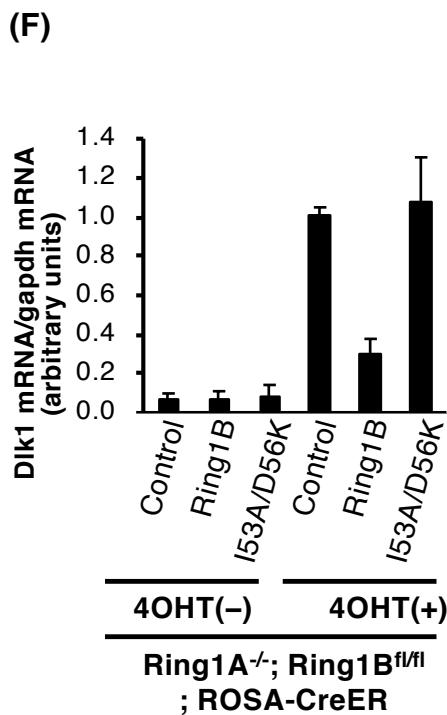
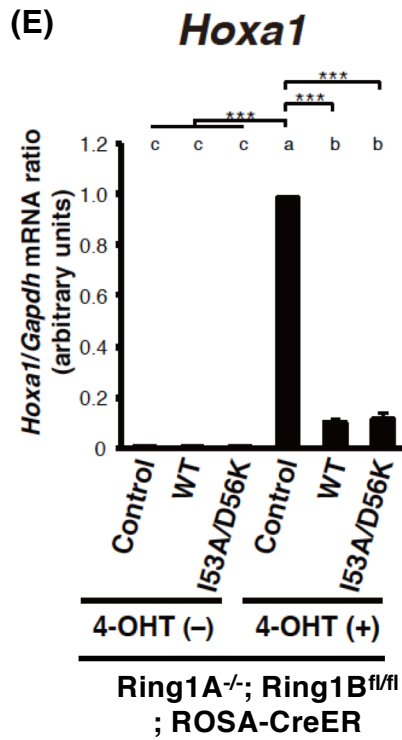


Figure14 Ring1Bはアストロサイト分化期の神経系前駆細胞においてE3ユビキチンリガーゼ活性およびH2AK119ub1修飾非依存的にニューロン分化関連遺伝子群の発現を抑制する

E12.5 Ring1A^{-/-}; Ring1B^{fl/fl}; ROSA-CreER マウス大脳新皮質由来神経系前駆細胞を、Neurosphere法により6日間培養した。レトロウイルスを用いて野生型Ring1B, Ring1B (I53A/D56K) 変異体を遺伝子導入した。その後、4-OHT添加あるいは無添加培地によってNeurosphere法で3日間培養した。さらに、FGF2添加培地で1日間単層培養後、FGF2無添加培地で4時間培養し分化誘導を行った。その後、細胞の回収、mRNA抽出、逆転写反応を行い各遺伝子のmRNA量の定量を行った (A-G)。

n=3, エラーバーは標準誤差を表す。**p<0.01, ***p<0.001, One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey-Kramer post hoc test

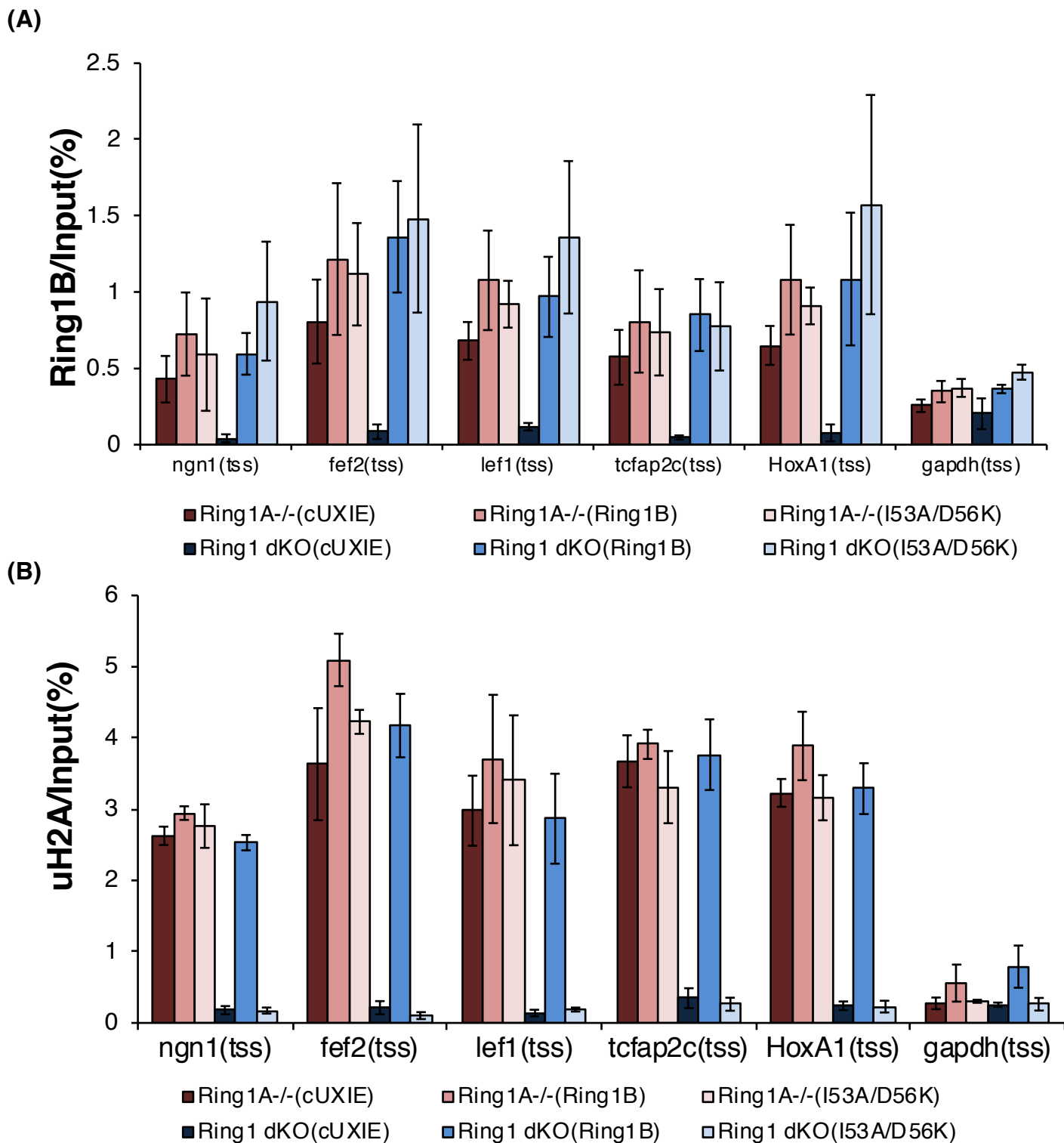


Figure15 ニューロン分化期においてRing1BはE3ユビキチンリガーゼ活性非依存的にニューロン分化関連遺伝子座のクロマチンに結合する

E12.5 Ring1A^{-/-}; Ring1B^{fl/fl}; ROSA-CreERマウス大脳新皮質由来神経系前駆細胞を、Neurosphere法により6日間培養した。レトロウイルスを用いて野生型Ring1B, Ring1B (I53A/D56K) 変異体を遺伝子導入した。その後、4-OHT添加あるいは無添加培地によってNeurosphere法で3日間培養し、細胞の回収を行った。その後、Ring1B抗体およびH2AK119ub1修飾抗体を用いたChIP assayを行い、各遺伝子座における (A) Ring1Bの結合量および (B) H2AK119ub1修飾量の定量を行った。n=3, エラーバーは標準誤差を表す。

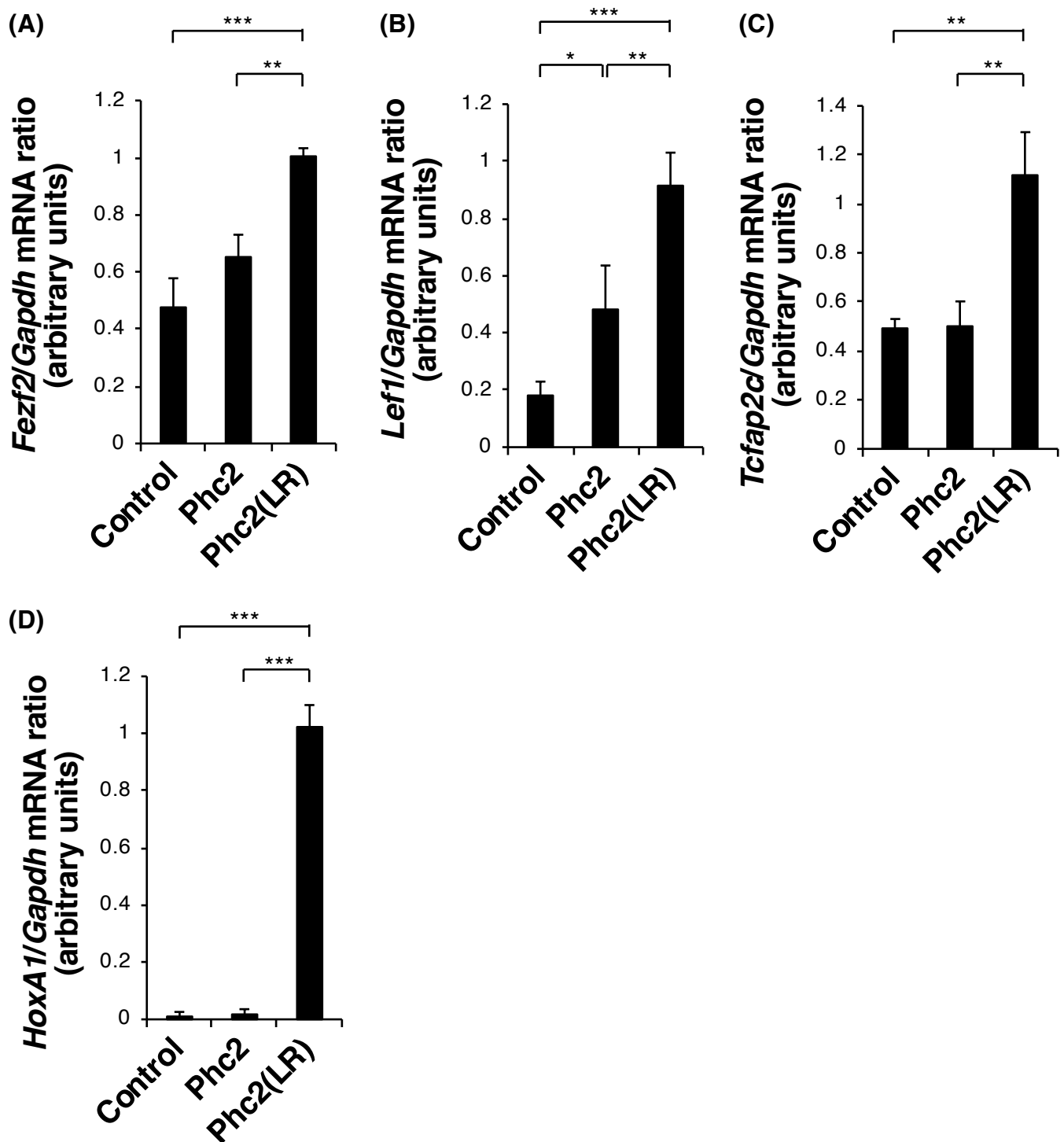


Figure16 Phc2の自己重合活性はアストロサイト分化期の神経系前駆細胞におけるニューロン分化関連遺伝子群の発現抑制に一部貢献する

E11.5 ICRマウス大脳新皮質由来神経系前駆細胞をNeurosphere法で6日間培養し、レトロウイルスにより野生型Phc2およびPhc2 (L307R) 変異体の過剰発現を行った。その後、さらに3日間Neurosphere法で培養後、FGF2添加培地で1日間単層培養後、FGF2無添加培地で6時間培養し分化誘導を行った。n=3, エラーバーは標準誤差を表す。*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey-Kramer post hoc test

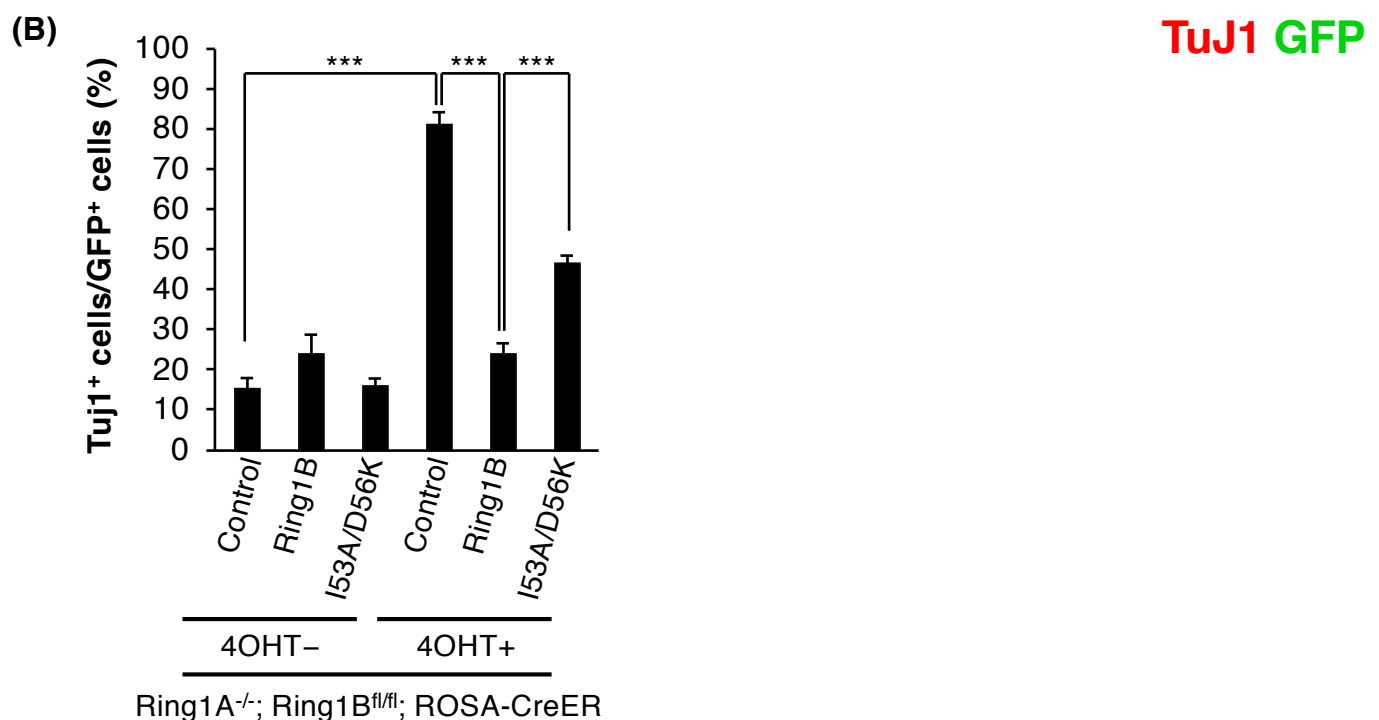
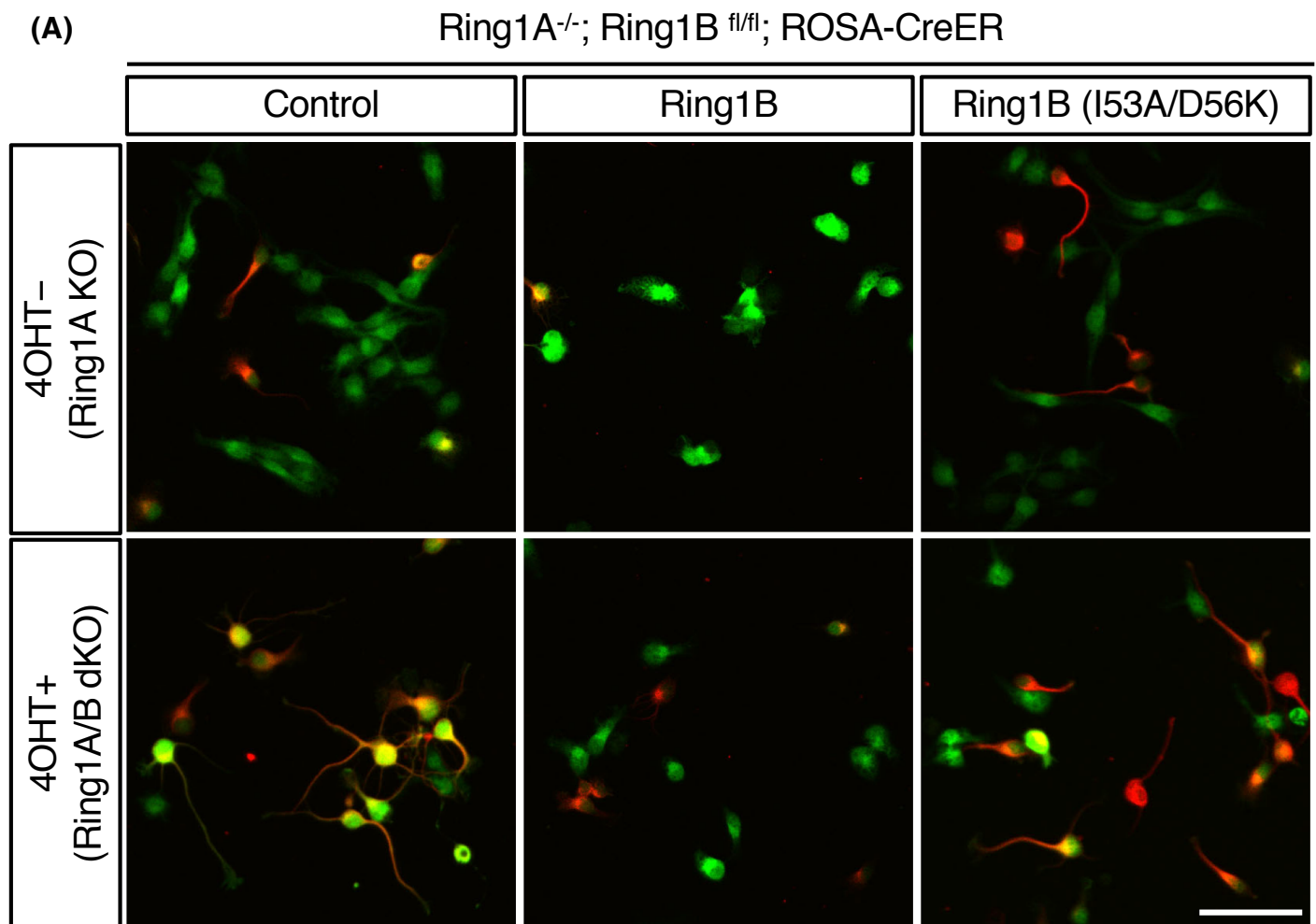
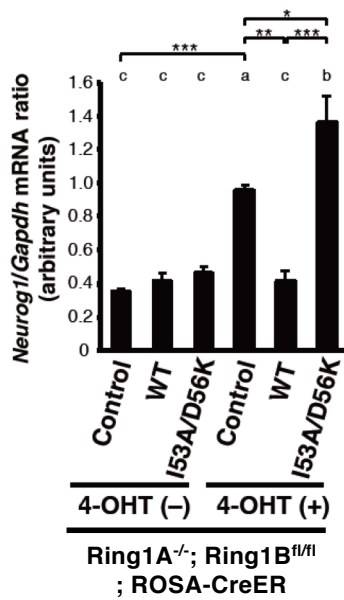


Figure17 Ring1Bはニューロン分化期の神経系前駆細胞においてE3ユビキチンリガーゼ活性依存的にニューロン分化を抑制する

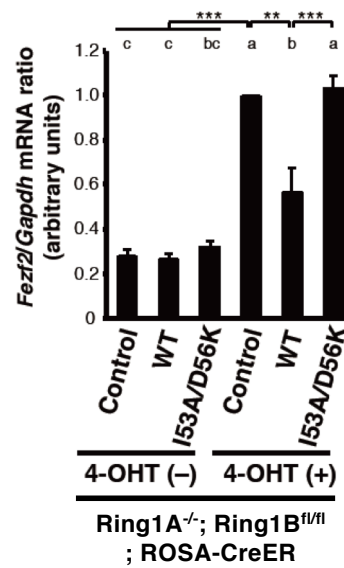
E12.5 Ring1A^{-/-}; Ring1B^{fl/fl}; ROSA-CreERマウス大脳新皮質由来神経系前駆細胞に、レトロウイルスを用いて野生型Ring1B, Ring1B (I53A/D56K) 変異体を遺伝子導入した。その後、4-OHT添加あるいは無添加培地によってNeurosphere法で3日間培養した。さらに、FGF2添加培地で1日間単層培養後、PanニューロンマーカーであるβⅢ-tubulinに対する抗体を用いて免疫染色を行い、遺伝子導入細胞におけるβⅢ-tubulin陽性細胞の割合を調べた (A, B)。

スケールバーは50μmである。n=2, エラーバーは標準誤差を表す。***p<0.001, Student's t-test

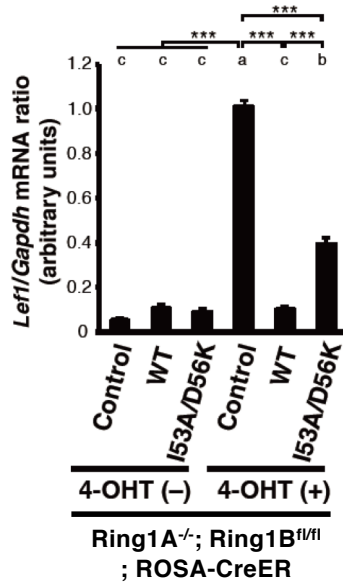
(A)

Neurog1

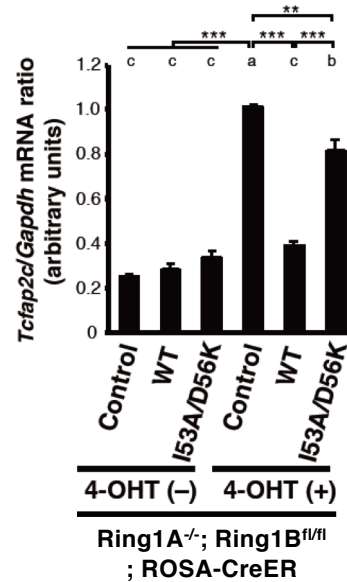
(B)

Fezf2

(C)

Lef1

(D)

Tcfap2c

(E)

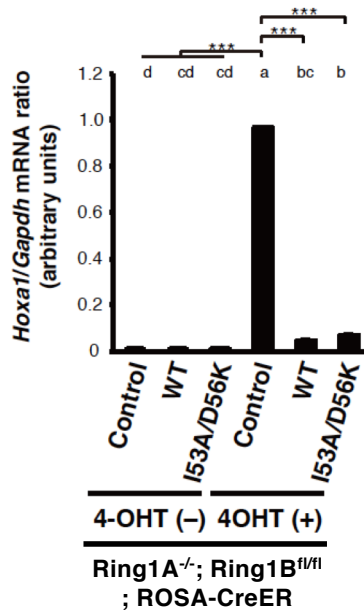
Hoxa1

Figure18 Ring1Bはニューロン分化期の神経系前駆細胞においてE3ユビキチンリガーゼ活性依存的にニューロン分化関連遺伝子群の発現を抑制する

E12.5 Ring1A^{-/-}; Ring1B^{fl/fl}; ROSA-CreERマウス大脳新皮質由来神経系前駆細胞に、レトロウイルスを用いて野生型Ring1B, Ring1B (I53A/D56K) 変異体を遺伝子導入した。その後、4-OHT添加あるいは無添加培地によってNeurosphere法で3日間培養した。その後、細胞の回収、mRNA抽出、逆転写反応を行い各遺伝子のmRNA量の定量を行った (A-E)。

n=3, エラーバーは標準誤差を表す。*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey-Kramer post hoc test

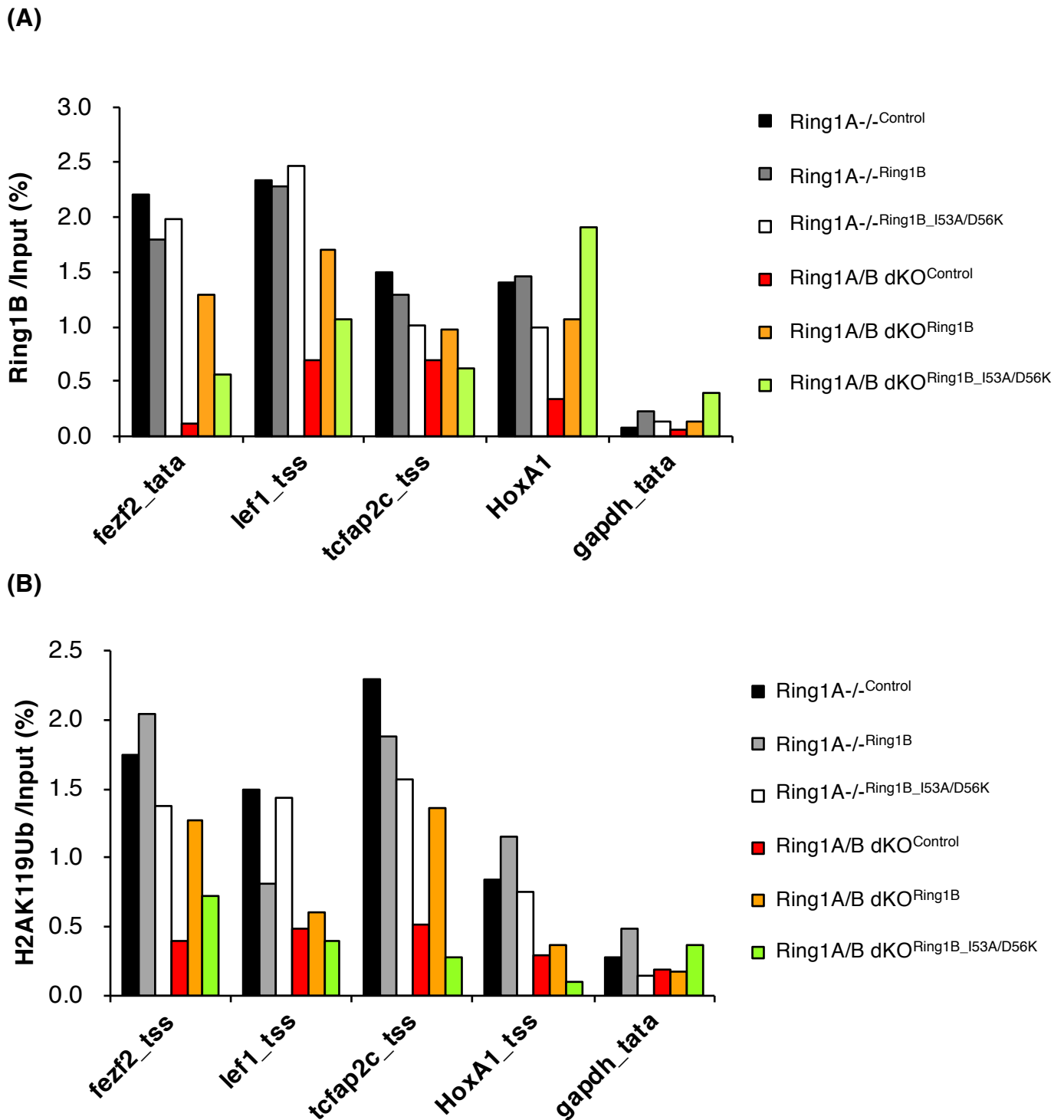


Figure19 ニューロン分化期においてRing1BはE3ユビキチンリガーゼ活性依存的にニューロン分化関連遺伝子座のクロマチンに結合する

E12.5 Ring1A^{-/-}; Ring1B^{fl/fl}; ROSA-CreERマウス大脳新皮質由来神経系前駆細胞に、レトロウイルスを用いて野生型Ring1B, Ring1B (I53A/D56K) 変異体を遺伝子導入した。その後、4-OHT添加あるいは無添加培地によってNeurosphere法で3日間培養した。細胞の回収を行った。その後、Ring1B抗体およびH2AK119ub1修飾抗体を用いたChIP assayを行い、各遺伝子座における (A) Ring1Bの結合量および (B) H2AK119ub1修飾量の定量を行った。n=2

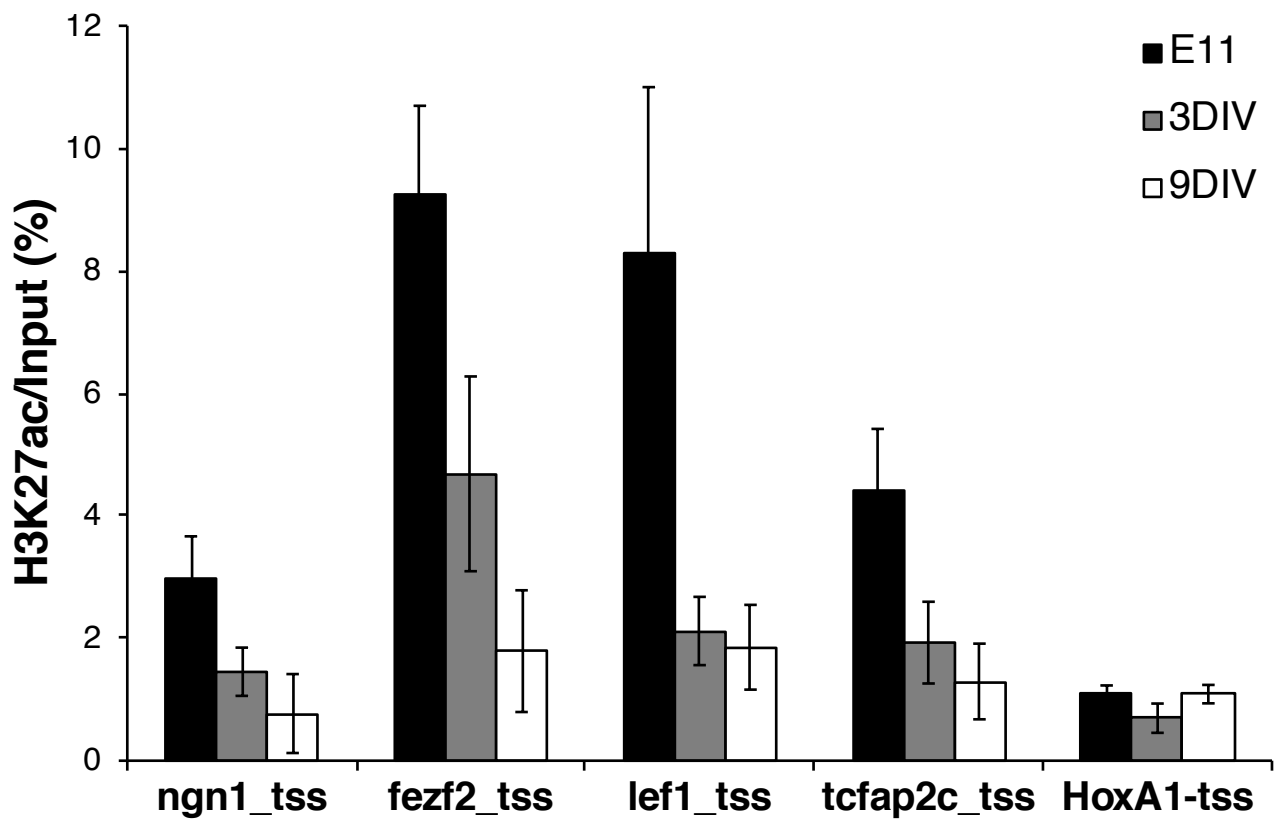


Figure20 ニューロン分化関連遺伝子座においてH3K27ac修飾量は発生時期依存的に低下する
 E11 ICRマウス大脳新皮質より神経系前駆細胞を採取しそのまま回収 (0DIV)、および
 Neurosphere法により9日間培養後、細胞を回収した。その後、H3K27ac修飾抗体を用いたChIP
 assayを行い、各遺伝子座における H3K27ac修飾量の定量を行った。n=3, エラーバーは標準誤差
 を表す。

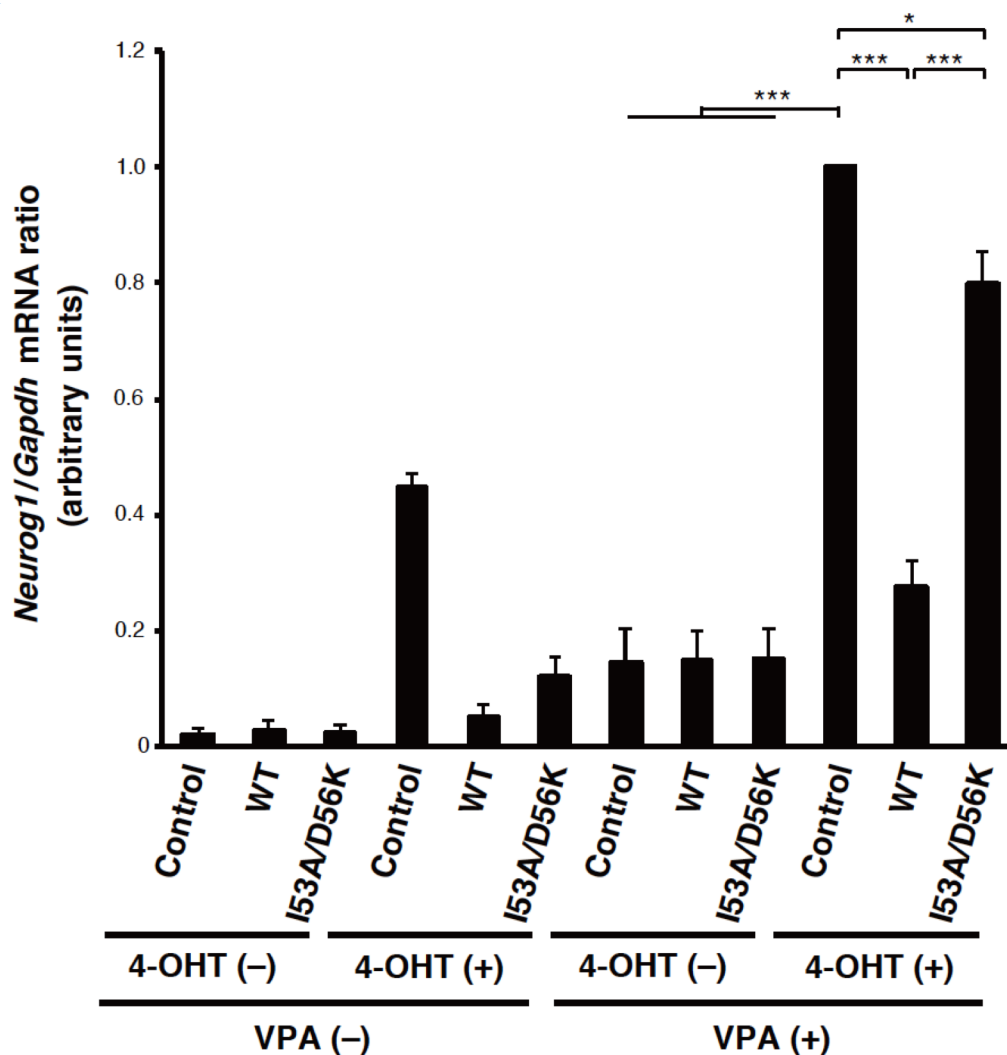


Figure21 HDAC活性はアストロサイト分化期の神経系前駆細胞におけるH2AK119ub1非依存的なneurog1の発現抑制に必要である

E12.5 Ring1A^{-/-}; Ring1B^{fl/fl}; ROSA-CreERマウス大脳新皮質由来神経系前駆細胞を、Neurosphere法により6日間培養した。レトロウイルスを用いて野生型Ring1B, Ring1B (I53A/D56K) 変異体を遺伝子導入した。その後、4-OHT添加あるいは無添加培地によってNeurosphere法で3日間培養した。VPA添加あるいは無添加培地で12時間単層培養後、FGF2無添加培地で4時間培養し分化誘導を行った。その後、細胞の回収、mRNA抽出、逆転写反応を行いneurog1遺伝子のmRNA量の定量を行った。

n=3, エラーバーは標準誤差を表す。*p<0.05, ***p<0.001, One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey-Kramer post hoc test

第四章 考察

これまでに、マウス ES 細胞において Ring1B による遺伝子発現抑制に H2AK119ub1 修飾が必須の役割を果たすことが示されている (Endoh et al., 2012)。しかしながら、動物個体の発生過程において Ring1B による遺伝子発現抑制に H2AK119ub1 修飾が必要であるかを直接検証した報告はない。今回私は、「アストロサイト分化期の神経系前駆細胞において Ring1B が H2A ユビキチン化活性非依存的にニューロン分化関連遺伝子の発現を抑制すること」を見出した。この結果は、Ring1B による遺伝子発現抑制に、H2AK119ub1 修飾が必ずしも必要でない「発生上のコンテキスト」が存在することを初めて示すものである。

また、PRC1 がクロマチン凝縮活性を持つことや H2AK119ub1 修飾を触媒することなどが示されてきた。しかしながら、発生過程においてそれらの抑制メカニズムがいつどのような遺伝子で使われているか、またそれらの抑制メカニズムが使い分けられているか、使い分けられているとしたらその生理的意義は何かについてはほとんど分かっていなかった。興味深いことに、今回私は「ニューロン分化期の神経系前駆細胞においては Ring1B が H2A ユビキチン化活性依存的にニューロン分化関連遺伝子の発現を抑制すること」を見出した。このことは発生過程において、Ring1B が発生時期依存的に異なる抑制状態を形成することを示唆する新しい知見である。

さらに、本研究において見出したこの抑制状態の違いは、幹細胞の分化能を規定する「解除可能な抑制状態 (poised state)」および分化能の制限を引き起こす「解除出来ない抑制状態」の違いに対応している可能性があり、重要な知見であると考えている (Fig. 22)。

発生時期依存的な「解除可能な抑制状態 (poised state)」および「解除出来ない抑制状態」の形成

動物の個体発生において、幹細胞は発生の時間軸に沿って順に決められた分化系譜の細胞を産み出す。幹細胞は発生の早い段階ではより多くの細胞を産み出すべく、developmental gene において「解除可能な抑制状態 (poised state)」を形成する。一方で、発生の時間が進むに従い組織幹細胞や最終分化した細胞

などでは他の分化系譜の細胞を産み出さないように不要な遺伝子群を「解除出来ない抑制状態」にする。つまり、**developmental gene** の中でも適切な遺伝子群を選び、適切なタイミングで「解除可能な抑制状態」から「解除出来ない抑制状態」にすることが、細胞の分化系譜を決定し正常な個体発生を進める重要な分子基盤の一つであると言える。それでは、発生過程において「解除可能な抑制状態」から「解除出来ない抑制状態」へと切り替える鍵となるものは何であろうか。

本研究において私は、ニューロン分化期の神経系前駆細胞では **Ring1B** は **H2A** ユビキチン化活性依存的にニューロン分化関連遺伝子の発現を抑制するが、アストロサイト分化期になると **Ring1B** が **H2A** ユビキチン化活性非依存的にニューロン分化関連遺伝子の発現を抑制することを見出した。ニューロン分化期においては、**neurog1** 遺伝子は **Wnt** シグナルに応答して活性化することが明らかになっている (Hirabayashi et al., 2004; Hirabayashi et al., 2009)。また、神経系前駆細胞を **FGF** 無添加培地で培養して分化誘導すると、**fezf2** や **tcfbp2c** 遺伝子の mRNA 量が増加する結果も得ている。そのため、ニューロン分化期における **Ring1B** による **neurog1**, **fezf2**, **tcfbp2c** の発現抑制は、分化刺激に応じて「解除可能な抑制」と言える。一方で、アストロサイト分化期では **Wnt** シグナルが入っても **neurog1** 遺伝子は活性化されないが、**Ring1B** をノックアウトし **Wnt** シグナルを活性化すると、**neurog1** 遺伝子の活性化が起きることが示されている (Hirabayashi et al., 2009)。つまりこの時の **Ring1B** による **Neurog1** の抑制は、分化刺激が入っても「解除できない抑制」であると言える。つまり、**Ring1B** によるニューロン分化関連遺伝子の抑制は発生の進行に伴って「解除可能な抑制状態」から「解除できない抑制状態」へと遷移する可能性が考えられる。本研究の結果から、その発生時期の進行に伴う抑制状態の切り替えの鍵となるものが **Ring1B** の **H2A** ユビキチン化活性、もしくは **H2AK119ub1** 修飾である可能性が考えられる。

今回私が用いた神経系前駆細胞は、内部細胞塊（ここから **ES** 細胞が樹立された）にある多能性幹細胞に由来すると考えられる。神経系前駆細胞よりも高い分化能を有する **ES** 細胞においては、大部分の **developmental gene** が **H2AK119ub1** 修飾依存的な「解除可能な抑制状態」にある (Endoh et al., 2012)。つまり、神経系前駆細胞がニューロン分化刺激に応じてニューロンを産み出すまで、ニューロン分化関連遺伝子において形成されていた **H2AK119ub1** 修飾依

存的な「解除可能な抑制状態」は維持され、ニューロン分化能が失われると H2AK119ub1 修飾に依存しない「解除できない抑制状態」に切り替わる可能性が考えられる。さらに、興味深いことに ES 細胞において Hox 遺伝子群は H2AK119ub1 修飾依存的に抑制されるが (Endoh et al., 2012)、神経系前駆細胞においては H2AK119ub1 修飾に依存しない抑制状態が形成されることを本研究において見出した。Hox 遺伝子群は体の Anterior-Posterior (A-P) 軸形成に重要であり、体の各区画の特徴付けを行っている。Hox 遺伝子群の発現パターンは成体になっても維持されており、簡単に脱抑制して活性化しないような状態になっていると考えられる。つまり、発生 の 進行に伴って活性化すべく ES 細胞においては Hox 遺伝子群を「解除可能な抑制状態」にしているが、より発生時期が進んだ神経系前駆細胞においては異なる領域で機能する Hox 遺伝子が発現しないように強固な抑制状態を築いている可能性が考えられる。今回神経系前駆細胞において、Phc2 SAM ドメインの自己重合を阻害する優勢抑制型変異の過剰発現によって HoxA1 の顕著な脱抑制が見られた。このことから、神経系前駆細胞においては Phc タンパク質の SAM ドメインを介した自己重合が働き ES 細胞とは異なる強固な抑制状態を形成している可能性が考えられる。

さらに、神経系前駆細胞においてニューロン分化関連遺伝子とは異なり HoxA1 遺伝子は発生早期 (ニューロン分化期) から H2AK119ub1 非依存的に抑制されていた。つまり、Ring1B はニューロン分化関連遺伝子群と Hox 遺伝子を区別し、それぞれの遺伝子において発生の時間軸に従って適切なタイミングで「解除可能な抑制状態」から「解除できない抑制状態」への切り替えを起こしている可能性が考えられる。この「PcG がいつどのようにして発現制御すべき遺伝子群を選択するか」に答えることは、「それぞれの組織や分化系譜がいつどのようにして規定されるか」という発生学上の大きな問題の解明につながり得るものである。

神経系前駆細胞における H2AK119ub1 修飾の必要性の検証

本研究から、神経系前駆細胞においても Ring1B ノックアウトではクロマチン全体で H2AK119ub1 修飾が残っており、Ring1A/B のダブルノックアウトでは顕著に H2AK119ub1 修飾量が低下した。この結果から、ES 細胞と同様に Ring1A の compensation の影響があることが示唆された。つまり、神経系前駆

細胞においても Ring1B による遺伝子発現抑制における H2AK119ub1 修飾の必要性を正確に評価する為には、ES 細胞と同様に Ring1A/B ダブルノックアウトの系を用いる必要があり、本研究ではこちらの系を用いた。また、マウス ES 細胞を用いた Eskeland, Endoh らの報告では、Ring1B の H2AK119ub1 修飾触媒活性を欠損させた変異体として Ring1B (I53A) を用いている。しかしながら、この変異体は神経系前駆細胞において弱いながらも H2AK119ub1 修飾触媒活性を有していた。その為私は、これまでに報告されていない変異体である Ring1B (I53A/D56K) を作製し、その変異体が神経系前駆細胞においてほとんど H2AK119ub1 修飾触媒活性を有さないことを見出した。Ring1B の 53 番目のイソロイシン残基および 88 番目のプロリン残基は UbcH5c (E2 ユビキチンリガーゼ) の 95 番目のプロリン残基および 96 番目のアラニン残基と疎水性相互作用し、I53A 変異はこの相互作用を弱める可能性が示唆されている (Bentley et al., 2011)。本研究で作製した D56K/I53A 変異体では、Ring1B の 56 番目のアスパラギン酸残基と UbcH5c の 4 番目と 8 番目のリシン残基との塩橋形成を阻害するため、I53A 変異体よりもさらに H2A ユビキチン化触媒活性を低下させることに成功したと考えている。

ES 細胞では、Ring1B (I53A) 変異体で H2AK119ub1 修飾触媒活性が完全に失われたと報告されているが、本研究の結果を踏まえると ES 細胞においても Ring1B (I53A) 変異体の H2AK119ub1 修飾触媒活性が少ないながらも残っていた可能性が考えられる。また、細胞種の違いによって Ring1B (I53A) 変異体の H2AK119ub1 修飾触媒活性が異なった可能性も考えられる。Ring1B の H2AK119ub1 修飾触媒活性を促進する因子として、Bmi1/Mel18, Ring1A, L3mbtl2, Kdm2b などが報告されている (Cao et al., 2005; Elderkin et al., 2007; Trojer et al., 2011; Wu et al., 2013)。これらの構成因子の違いによって異なる PRC1 複合体が形成されることも示唆されており (Gao et al., 2012)、ES 細胞と神経系前駆細胞での PRC1 の構成因子の違いが Ring1B (I53A) 変異体の H2A ユビキチン化活性の違いを生んだ可能性も考えられる。

アストロサイト分化期における Ring1B による H2AK119ub1 修飾非依存的なニューロン分化関連遺伝子の転写抑制メカニズム

アストロサイト分化期における Ring1B による H2AK119ub1 修飾非依存的な

遺伝子発現抑制の分子メカニズムは何であろうか。これまでに、H2AK119ub1 修飾非依存的な PRC1 による遺伝子発現抑制メカニズムとして、PRC1 がクロマチンの凝縮を引き起こし SWI/SNF によるクロマチンリモデリング活性を阻害する可能性が提唱されている (Francis et al., 2001; King et al., 2002)。Eskeland, Endoh らの報告では共に、Ring1B が Hox 遺伝子座において H2AK119ub1 修飾非依存的にクロマチン凝縮を引き起こすことを示している。これらのことから、アストロサイト分化期におけるニューロン分化関連遺伝子の発現抑制にも、PRC1 によるクロマチン凝縮が貢献している可能性が考えられる。さらに Endoh らは、Hox 遺伝子群などのクロモソーム上で遺伝子座がクラスターとなって存在するような遺伝子群は、H2AK119ub1 修飾に加えクロマチン凝縮が発現抑制に部分的に貢献する可能性を指摘している。しかしながら、neurog1, fezf2, lef1, tcfap2c 遺伝子はクラスター化して存在する遺伝子群ではなく、神経系前駆細胞においてこれらの遺伝子群は、ES 細胞の Hox 遺伝子座において見られるような long-range のクロマチン凝縮とは異なる抑制状態が形成されている可能性も考えられる。これらのことは DNase を用いた DNase I sensitivity assay やクロマチンの凝縮度合いを定量する FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) assay によって検証可能であると考えている。

また今回、ニューロン分化関連遺伝子における Ring1B の E3 ユビキチンリガーゼ活性非依存的な抑制メカニズムとして PRC1 構成因子である Phc2 の SAM domain を介した自己重合が一部貢献する可能性が示唆された。これまでに、Phc2 の SAM ドメインを介した自己重合は PcG body と呼ばれる転写抑制性の核内構造体の形成に必要であることが示されている (Isono et al., 2013)。また、この PcG body は PcG によって抑制される遺伝子群と共局在することが見られており、PcG による遺伝子発現抑制の「場」になっている可能性が示唆されている。実際に、大脳新皮質由来神経系前駆細胞において Ring1B 抗体による細胞染色を行うと Ring1B が foci 状に染色されるという予備的結果を得ている。この foci 状に染色される Ring1B の構造体が、アストロサイト分化期においてニューロン分化関連遺伝子を抑制する「場」として貢献している可能性が考えられる。

さらに、アストロサイト分化期における H2AK119ub1 非依存的な抑制メカニズムとして Ring1B が直接転写マシナリーのリクルートや活性を制御している

可能性も否定できない。RNA ポリメラーゼ II の S5P や S2P フォームに対する抗体を用いて ChIP assay を行うことで、転写のどのステップが抑制されているかが分かれば Ring1B が相互作用している分子を絞れる可能性がある。

また、遺伝子座の核内局在制御が H2AK119ub1 非依存的な抑制メカニズムに貢献している可能性も考えられる。ハエの神経幹細胞（ニューロブラスト）において早産まれニューロンの分化能が制限されると、その運命決定因子である Hunchback の遺伝子座が核辺縁領域（nuclear periphery; 転写抑制性の核内領域）に移動することが報告されている（Kohwi et al., 2013）。さらに、大脳皮質のアストロサイトにおいてアストロサイトマーカー遺伝子である GFAP は mono-allelic な発現パターンを示すが、転写活性化している allele がより核内の中心に近い領域に局在する傾向にあることが示されている（Takizawa et al., 2008）。加えて、proneural 遺伝子の一つである Mash1 はマウス ES 細胞から神経誘導する過程で転写活性化されるが、Mash1 遺伝子座の核内局在が分化に伴い核辺縁領域から核の中心に近い領域に移行することが報告されている（Williams et al., 2006）。以上の報告から、マウスの神経系前駆細胞においても分化能が制限されるとニューロン分化関連遺伝子座の核内局在が転写抑制的な核内構造体や領域に移行する可能性が考えられる。これについては、ニューロン分化関連遺伝子座に対する DNA プローブを用いた FISH 法によってニューロン分化関連遺伝子座の核内局在を調べることで検証可能である。

ニューロン分化期において Ring1B が H2AK119ub1 修飾触媒活性依存的にニューロン分化関連遺伝子の転写を抑制するメカニズム

それでは、Ring1B による E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的な転写抑制状態はいかにして「解除可能な抑制状態」を形成するのだろうか。これまで、ES 細胞を用いた解析から PcG ターゲットとなっている developmental gene の遺伝子座には H2AK119ub1 修飾が濃縮しており、転写開始型 RNA ポリメラーゼ II が転写開始点近傍に存在するが転写伸長型 RNA ポリメラーゼ II（RNAP II S2P）は検出されないことが報告されている（Stock et al., 2007; Brookes et al., 2012）。また、H2AK119ub1 修飾触媒酵素として報告されている 2A-HUB によって触媒される H2AK119ub1 修飾は RNA ポリメラーゼ II の転写伸長反応に必要な FACT complex のリクルートメントを阻害することも報告されている

(Zhou et al., 2008)。これらの報告から、H2AK119ub1 修飾は転写伸長反応を阻害する可能性が考えられている。ニューロン分化期の神経系前駆細胞におけるニューロン分化遺伝子座でも H2AK119ub1 修飾が転写伸長反応を阻害し、分化刺激に応じてこの抑制を解除している可能性が考えられる。これについては、RNAP II S5P、RNAP II S2P に対する抗体を用いて ChIP assay を行うことで、神経系前駆細胞のニューロン分化遺伝子座において RNA ポリメラーゼ II がどの転写段階にあるかを調べることで答え得ると考えている。一方、今回行ったニューロン分化期の神経系前駆細胞における Ring1B (I53A/D56K) 変異体のレスキュー実験では、Ring1B (I53A/D56K) 変異体をレスキューした細胞でニューロン分化関連遺伝子座における Ring1B の結合が回復していなかった。そのため、今回の結果だけからでは H2AK119ub1 以外に Ring1B 自身が転写抑制に働いている可能性を否定できない。序論にも述べたように、PRC1 が Mediator タンパク質のリクルートメントを阻害し RNA ポリメラーゼの PIC 複合体の形成を阻害するという報告もあり、Ring1B が直接転写マシナリーと相互作用し転写抑制に働いている可能性も考えられる。ニューロン分化期においてニューロン分化関連遺伝子の発現抑制に H2AK119ub1 修飾が必要だったのか、Ring1B が結合することが必要だったのかを区別することは難しい。しかし、TetO (Operator) /TetR (Repressor) システムや近年報告された TALE (Transcription activator-like effector)、CRISPR/Cas9 system を用いることで Ring1B (I53A/D56K) 変異体を強制的にニューロン分化関連遺伝子座に局在させたときに遺伝子発現抑制するか評価することで答えることが出来るかも知れない。

Ring1B のクロマチンへの結合と H2AK119ub1 修飾触媒活性の関係

本研究により、ニューロン分化期において Ring1B は E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的にニューロン分化関連遺伝子座へ結合し、アストロサイト分化期では E3 ユビキチンリガーゼ活性非依存的にニューロン分化関連遺伝子座へ結合することが明らかになった。これまでに、*in vitro* 再構成系により Ring1B がモノユビキチン化されている H2A に直接結合する可能性が示唆されている。その報告ではさらに、293T 細胞に H2A のモノユビキチン化修飾が触媒されるリシン残基をアルギニンに置換した H2A の変異体を発現させたところ、H2A を発

現させた細胞と比較し Ring1B のヌクレオソームへの結合量が低下していた (Richly et al., 2010)。このように、Ring1B は H2A のモノユビキチン化修飾量が高い方がよりクロマチンへ高い親和性を示すことが明らかになっている。しかしながら今回得られた結果では、アストロサイト分化期の Ring1B (I53A/D56K) 変異体をレスキューした細胞では、H2AK119ub1 修飾量が顕著に低下しているにも関わらず Ring1B (I53A/D56K) 変異体は野生型 Ring1B と同様にクロマチン上に結合していた。序論で述べたように PRC1 は PRC2 によって触媒される H3K27me3 修飾依存的にクロマチンに結合することが示されているので、アストロサイト分化期における PRC1 のクロマチンへの結合は H3K27me3 に大きく依存するのかもしれない。この点については PRC2 に含まれる H3K27 のメチル化修飾触媒酵素である Ezh1/2 の機能欠損によって Ring1B のクロマチンへの結合量を評価することで検討可能であると考えている。

さらに、最近 Ring1B (D56K) 変異体を用いた *in vitro* の解析から Ring1B と E3 である UbcH5c との相互作用が Ring1B のヌクレオソームへの結合親和性に重要であることが示唆された (McGinty et al., 2014)。しかし、今回用いた Ring1B (I53A/D56K) 変異体は発生時期を通じて Hox 遺伝子座において野生型 Ring1B と同程度にクロマチンに結合していた。さらに、ニューロン分化関連遺伝子座においてもアストロサイト分化期では Ring1B (I53A/D56K) 変異体は野生型 Ring1B と同程度のクロマチン結合能を示した。この結果から、細胞内においては Ring1B と E2 との相互作用は Ring1B のクロマチンへの結合および遺伝子発現抑制には必ずしも必要ではない可能性がある。一方で、ニューロン分化期神経系前駆細胞のニューロン分化関連遺伝子座においては Ring1B のクロマチンへの結合に E2 との相互作用が必要である可能性は否定できない。

ニューロン分化期の神経系前駆細胞において Ring1B によるニューロン分化関連遺伝子の転写抑制が解除されるメカニズム

ところで、今回見出した E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的なニューロン分化関連遺伝子における抑制状態はいかにして解除されるのだろうか。ES 細胞を用いた解析から、ES 細胞やヒトテラトカルシノーマから分化誘導すると PcG によって触媒される H3K27me3 や H2AK119ub1 修飾および PcG 構成因子の結合

が PcG ターゲット遺伝子座上から低下していくことが示されている (Bracken et al., 2006; Lee et al., 2007; Richly et al., 2010)。胎生 11.5 日目のマウス大脳新皮質より神経系前駆細胞を採取し、Neurosphere 法で 3 日間培養し、FGF2 添加培地で 1 日間単層培養後、FGF2 無添加培地で時間培養し 14 時間分化誘導を行った。その後、Ring1B および H2AK119ub1 に対する抗体を用いて ChIP assay を行い、ニューロン分化関連遺伝子座における Ring1B の結合量および H2AK119ub1 修飾量を調べた。その結果、分化誘導によって *neurog1*、*fezf2*、*tcfap2c* 遺伝子の転写量が増加していた時にこれらの遺伝子座における Ring1B および H2AK119ub1 修飾量は減少していなかった。このことから、未分化な神経系前駆細胞において Ring1B や H2AK119ub1 修飾は転写抑制に働くが、分化刺激が入るとこれらが遺伝子座に残ったまま抑制が入らなくなる、もしくはこれらの抑制をバイパスするような何らかのメカニズムが働いている可能性がある。

一方で、序論で記述したような H2AK119ub1 修飾の転写抑制機能とは異なる新しい H2AK119ub1 修飾の機能を示す報告もなされている。ヒトテラトカルシノーマ NT2 細胞において、Zrf1 (Zuotin-related factor 1) タンパク質が PRC1 によって触媒される H2AK119ub1 修飾と結合し、クロマチン上で PRC1 と置き換わり転写活性化を行うことが示唆されている (Richly et al., 2010)。ニューロン分化期の神経系前駆細胞においても H2AK119ub1 修飾に結合し、転写活性化に働く因子が存在する可能性が考えられる。

ニューロン分化期において Ring1B は H2AK119ub1 修飾触媒活性依存的にニューロン分化を抑制する

ニューロン分化期の神経系前駆細胞を用いた解析から、Ring1A/B は E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的に神経系前駆細胞の未分化性の維持に貢献する可能性が示唆された。今回行ったニューロン分化期の神経系前駆細胞を用いた Ring1B (I53A/D56K) 変異体のレスキュー実験の結果では、Ring1B (I53A/D56K) を発現させた細胞では *neurog1*、*fezf2*、*lef1*、*tcfap2c* の発現は抑制されなかったのにも関わらず部分的にニューロン分化が抑制されていた。この要因として、今回調べた *neurog1*、*fezf2*、*lef1*、*tcfap2c* 遺伝子以外にも Ring1A/B が神経系前駆細胞の未分化性を維持する際に重要なターゲット遺伝

子が存在する可能性が考えられる。嗅球 (Olfactory bulb) に存在する神経幹細胞においても Ring1B がその未分化性の維持に貢献することが示されている (Roman-Trufero et al., 2009)。その報告では、DNA マイクロアレイを用いて Ring1B ノックアウトによる遺伝子発現変化が調べられており、様々な系で幹細胞の維持に貢献することが知られている Notch シグナル関連分子の発現が顕著に低下していた。また、大脳新皮質において PRC1 構成因子の一つである Bmi1 のノックダウンを行うと神経系前駆細胞の増殖が低下することが示されており、その際の Bmi1 のターゲット遺伝子として cyclin dependent kinase (cdk) inhibitor の一つである p21 遺伝子が同定されている (Fasano et al., 2007)。このように、大脳新皮質の神経系前駆細胞においても Ring1B が未分化性維持に重要な Notch シグナルや他のシグナルの構成因子の発現を制御する可能性は十分に考えられる。Ring1B はこれらのターゲット遺伝子を H2AK119ub1 修飾非依存的に発現抑制したために Ring1B (I53A/D56K) 変異体をレスキューした細胞ではニューロン分化が部分的に抑制された可能性がある。PcG が神経系前駆細胞の未分化性維持に働く際にターゲットとなる遺伝子については未だよく分かっておらず興味深い点である。この点について検討するためには、まず Ring1B 抗体を用いた ChIP-on-chip 法もしくは ChIP-seq 法による Ring1B ターゲット遺伝子の同定が必要となる。さらに、Ring1B (I53A/D56K) 変異体を用いて Ring1A/B ダブルノックアウト神経系前駆細胞へのレスキューを行い、DNA マイクロアレイによって E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的に抑制される遺伝子および非依存的に抑制される遺伝子の探索を行う。

神経系前駆細胞のニューロン分化関連遺伝子座において発生時期依存的に Ring1B および H2AK119ub1 修飾量が増加する

今回の結果から、発生時期依存的な神経系前駆細胞の分化能の制限には H2AK119ub1 修飾ではなく Ring1B が重要な働きをしていることが示唆された。さらに、ニューロン分化関連遺伝子座において発生時期の進行に伴って Ring1B のクロマチンへの結合量が増加することが明らかになった。以上の結果から、発生時期依存的な Ring1B の結合量の増加こそがニューロン分化関連遺伝子の発現の抑制のタイミングを決定すると考えられる。それでは、Ring1B の結合量の増加を引き起こすメカニズムとは何だろうか。これまでに、PRC1 は PRC2

によって触媒される H3K27me3 修飾を認識し、クロマチンに結合するというモデルが提唱されてきた (Cao et al., 2002; Wang et al., 2004)。実際に、大脳新皮質由来神経系前駆細胞においても、発生時期依存的に *neurog1*, *fezf2* 遺伝子座において H3K27me3 修飾量が増加することが見られている (Hirabayashi et al., 2009; Morimoto-Suzuki et al., 2014)。この発生時期依存的に増加する H3K27me3 修飾が PRC1 のプラットフォームとなり Ring1B の結合量の増加を引き起こす可能性が考えられる。この可能性は、H3K27me3 修飾を触媒する PRC2 の構成因子である *Ezh1/2* 遺伝子をノックアウトによって検証可能であると考えられる。一方で最近、PRC2 によって触媒される H3K27me3 修飾非依存的にクロマチンにターゲティングする PRC1 複合体が提唱されている (Tavares et al., 2012; Gao et al., 2012; Farcas et al., 2012; He et al., 2013; Wu et al., 2013)。この複合体にも Ring1B は含まれるが、H3K27me3 修飾を認識する Cbx タンパク質が含まれないことが示されている。そのため、この複合体は variant PRC1 と呼ばれ、Cbx タンパク質を含む PRC1 複合体 (canonical PRC1) と区別されている。Variant PRC1 のクロマチンへの結合は non-methylated な DNA に結合親和性を持つ Kdm2b タンパク質によって担われ、マウス ES 細胞を用いた ChIP-seq 解析から Kdm2b が CpG island に局在することが示された (Farcas et al., 2012)。さらに、最近この Variant PRC1 複合体によって触媒される H2AK119ub1 修飾が PRC2 のクロマチンへのリクルートメントを引き起こすことが報告されている (Blackledge et al., 2014; Kalb et al., 2014; Cooper et al., 2014)。Variant PRC1 による H2AK119ub1 修飾量の増加→PRC2 結合量および H3K27me3 修飾量の増加→canonical PRC1 の結合量の増加というスキームが神経系前駆細胞のニューロン分化関連遺伝子座においても起きており、Ring1B の結合量の増加につながっている可能性が考えられる。

HDAC 活性はアストロサイト分化期における Ring1B による H2AK119ub1 修飾非依存的な *neurog1* の発現抑制に必要である

VPA は短鎖脂肪酸の一種であり、ほとんどの場合触媒活性部位に結合しクラス I およびクラス IIa の HDAC の活性を阻害する (Phiel et al., 2001)。本研究において、VPA 処理するとアストロサイト分化期にある神経系前駆細胞においても Ring1B (I53A/D56K) 変異体は *neurog1* 遺伝子の発現抑制を回復できなく

なることが明らかになった。また、ニューロン分化関連遺伝子座において転写活性化との相関が知られる H3K27ac 修飾が発生時期の進行に伴って低下することも明らかになった。これらのことから、VPA が HDAC の活性を阻害し H3K27ac 修飾の低下が抑制されたために、Ring1B が E3 ユビキチンリガーゼ活性依存的な抑制を行うようになった可能性が考えられる。もしそうであるならば、neurog1 遺伝子座における H3K27ac 修飾量の低下が「解除可能な抑制状態」と「分化刺激が入っても解除できない抑制状態」の違いを産むキーファクターであると考えられる。しかしながら、今回の結果からでは VPA による効果が H3K27ac 修飾の低下を抑制したために引き起こされたと断言することは出来ない。上述したように、VPA はクラス I およびクラス IIa の HDAC を阻害する試薬であり、H3K27ac 以外の基質の脱アセチル化反応も阻害する可能性があるためである。また、マウス ES 細胞において、HDAC を含む NuRD 複合体による H3K27 の脱アセチル化反応が PRC2 のクロマチンへのリクルートを促進することが示されている (Reynolds et al., 2012)。NuRD 複合体の構成因子である Mbd3 タンパク質のロックアウトにより PcG ターゲット遺伝子座において H3K27ac 修飾量の増加および H3K27me3 修飾量の低下が見られている。NuRD 複合体の構成因子の機能欠損を行えば、H3K27ac 修飾量の低下がアストロサイト分化期における H2AK119ub1 修飾非依存的な抑制状態の形成に必要であるかという点により迫れる可能性がある。

Ring1B は H2AK119ub1 修飾触媒活性依存的にインプリンティング遺伝子 Dlk1, p57 の転写を抑制する

アストロサイト分化期の神経系前駆細胞を用いた解析から、Ring1B が H2AK119ub1 修飾触媒活性依存的にインプリンティング遺伝子 Dlk1, p57 の発現を抑制することが明らかになった。それでは、Ring1B がこれらの遺伝子を H2AK119ub1 修飾触媒活性依存的に転写抑制する意義は何であろうか。これまでに、p57 はニューロン分化に伴って mRNA 量が増加し、ニューロン移動に必要であることが示されている (Itoh et al., 2007)。また、p57 欠損マウスではニューロン前駆細胞の増殖が促進し、深層ニューロン数の増加が見られることが報告された (Mairet-Coello et al., 2012)。これらのことから、p57 遺伝子はニューロン分化の際に発現が上昇し機能していると考えられる。ニューロン分化後

に活性化して機能出来るように、神経系前駆細胞では Ring1B が H2AK119ub1 修飾を介して p57 を「解除可能な抑制状態」にしている可能性が考えられる。また、Dlk1 は大脳脳室下帯に存在する成体神経幹細胞のニューロン新生に必要であることが報告されている (Ferron et al., 2011)。さらに、p57 遺伝子も大脳の海馬歯状回に存在する成体神経幹細胞が細胞周期の休止状態 (quiescence) を維持するのに必要であることが示されている (Furutachi et al., 2013)。これらのことから、成体神経幹細胞になると Dlk1, p57 が活性化して幹細胞の維持やニューロン新生に貢献出来るように、胎生期神経系前駆細胞においては Ring1A/B が H2AK119ub1 修飾を介して「解除可能な抑制状態」を維持している可能性が考えられる。

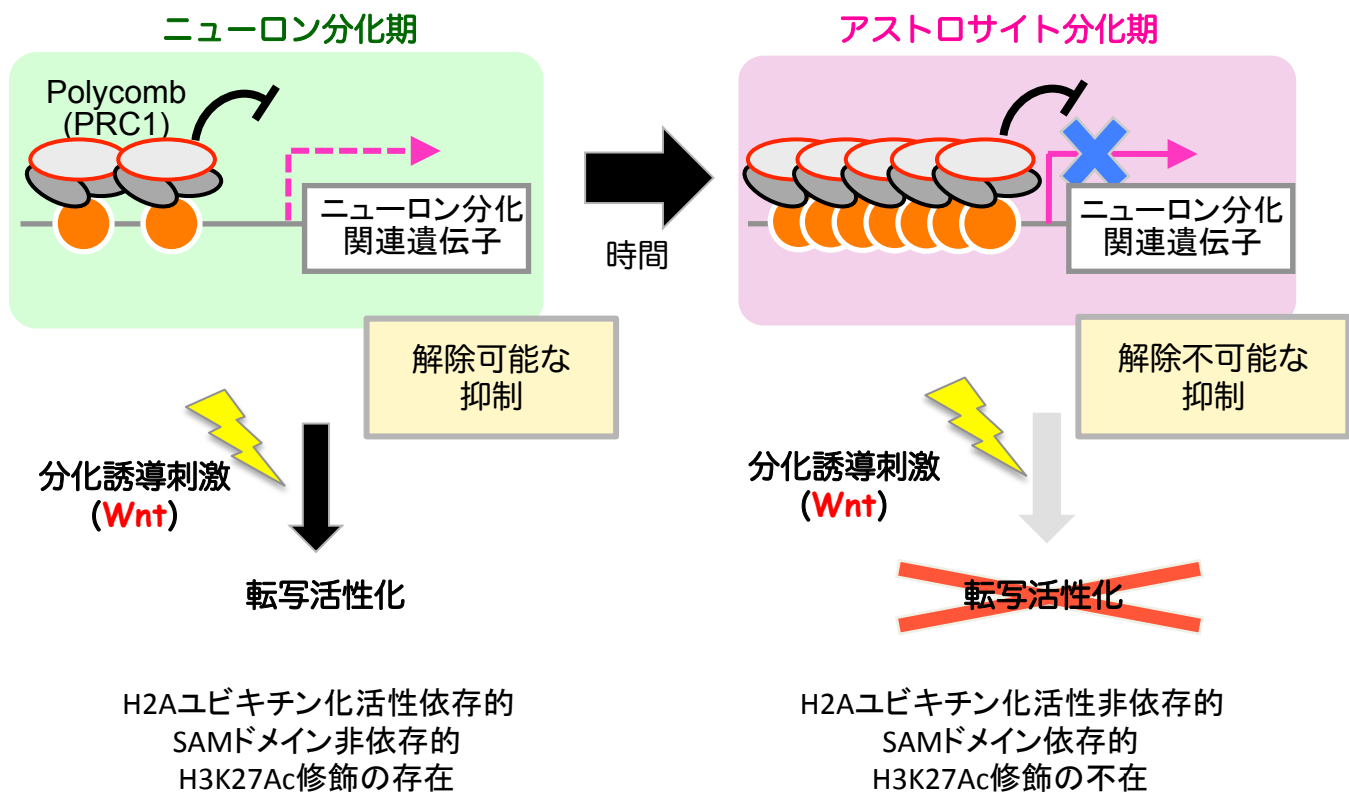


Figure22 Ring1Bはニューロン分化関連遺伝子座において発生時期依存的に異なる抑制状態を形成する

本研究により発生早期（ニューロン分化期）の神経系前駆細胞において、Ring1BはH2Aユビキチン化活性依存的にニューロン分化関連遺伝子の発現を抑制することが明らかになった。一方で、発生後期（アストロサイト分化期）の神経系前駆細胞において、Ring1BはH2Aユビキチン化活性非依存的にニューロン分化関連遺伝子の発現を抑制することも明らかになった。また、Phc2のSAMドメインを介した自己重合が、アストロサイト分化期におけるニューロン分化関連遺伝子の抑制に貢献する可能性が示唆された。それぞれの抑制状態は、幹細胞の分化能を規定する「解除可能な抑制状態」と分化能の制限を引き起こす「解除不可能な抑制状態」に対応している可能性がある。

結言

本研究により、Ring1B による遺伝子発現抑制に H2AK119ub1 修飾が必要でない「発生のコンテキスト」があることが明らかになった。これまで、Ring1B による遺伝子発現抑制には H2AK119ub1 修飾が重要であると考えられており、この結果は、PcG による遺伝子発現制御メカニズムにおいて新たな可能性を提起するものと期待している。

幹細胞が適切な分化誘導刺激が入るまで「解除可能な抑制」によって分化を抑制し未分化な状態に保つことと「解除できない抑制」によって特定の細胞系譜への分化能を閉ざすことは発生過程における幹細胞の大きな性質である。近年、ES 細胞や組織幹細胞などを用いてこれらの制御に PcG が主要な働きをすることが示されてきたが、PcG がそれぞれの抑制状態の形成を決められたタイミングでいかにして実現しているかは大きな問題である。本研究から、神経系前駆細胞のニューロン分化関連遺伝子座において Ring1B が異なる発生時期に異なる抑制状態を形成することを見出した。さらに、それぞれの抑制状態が、幹細胞において形成される「解除可能な抑制状態」および分化能を失った細胞で形成される「解除できない抑制状態」に相当する可能性がある。本研究において見出した、Ring1B によって発生時期依存的に形成される異なる抑制状態が幹細胞一般に当てはまるメカニズムならばさらにインパクトの大きいものになると考えている。

参考文献

- Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jørgensen, H.F., John, R.M., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merkenschlager, M., and Fisher, A.G. (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* 8, 532-538.
- Bentley, M.L., Corn, J.E., Dong, K.C., Phung, Q., Cheung, T.K., and Cochran, A.G. (2011). Recognition of Ubch5c and the nucleosome by the Bmi1/Ring1b ubiquitin ligase complex. *EMBO J* 30, 3285-3297.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.
- Bhatnagar, S., Gazin, C., Chamberlain, L., Ou, J., Zhu, X., Tushir, J.S., Virbasius, C.M., Lin, L., Zhu, L.J., Wajapeyee, N., and Green, M.R. (2014). TRIM37 is a new histone H2A ubiquitin ligase and breast cancer oncoprotein. *Nature* 516, 116-120.
- Blackledge, N.P., Farcas, A.M., Kondo, T., King, H.W., McGouran, J.F., Hanssen, L.L., Ito, S., Cooper, S., Kondo, K., Koseki, Y., *et al.* (2014). Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell* 157, 1445-1459.
- Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., *et al.* (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349-353.
- Bracken, A.P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K.H., and Helin, K. (2006). Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev* 20, 1123-1136.

Brookes, E., de Santiago, I., Hebenstreit, D., Morris, K.J., Carroll, T., Xie, S.Q., Stock, J.K., Heidemann, M., Eick, D., Nozaki, N., *et al.* (2012). Polycomb associates genome-wide with a specific RNA polymerase II variant, and regulates metabolic genes in ESCs. *Cell Stem Cell* 10, 157-170.

Brookes, E., and Pombo, A. (2009). Modifications of RNA polymerase II are pivotal in regulating gene expression states. *EMBO Rep* 10, 1213-1219.

Buchwald, G., van der Stoop, P., Weichenrieder, O., Perrakis, A., van Lohuizen, M., and Sixma, T.K. (2006). Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J* 25, 2465-2474.

Cai, L., Morrow, E.M., and Cepko, C.L. (2000). Misexpression of basic helix-loop-helix genes in the murine cerebral cortex affects cell fate choices and neuronal survival. *Development* 127, 3021-3030.

Cao, R., Tsukada, Y., and Zhang, Y. (2005). Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol Cell* 20, 845-854.

Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298, 1039-1043.

Chen, B., Schaevitz, L.R., and McConnell, S.K. (2005a). Fezl regulates the differentiation and axon targeting of layer 5 subcortical projection neurons in cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17184-17189.

Chen, J.G., Rasin, M.R., Kwan, K.Y., and Sestan, N. (2005b). Zfp312 is required for subcortical axonal projections and dendritic morphology of deep-layer pyramidal neurons of the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17792-17797.

Cooper, S., Dienstbier, M., Hassan, R., Schermelleh, L., Sharif, J., Blackledge, N.P., De Marco, V., Elderkin, S., Koseki, H., Klose, R., *et al.* (2014). Targeting

polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. *Cell Rep* 7, 1456-1470.

de Napoles, M., Mermoud, J.E., Wakao, R., Tang, Y.A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T.B., Silva, J., Otte, A.P., Vidal, M., *et al.* (2004). Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* 7, 663-676.

Dellino, G.I., Schwartz, Y.B., Farkas, G., McCabe, D., Elgin, S.C., and Pirrotta, V. (2004). Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Mol Cell* 13, 887-893.

Desai, A.R., and McConnell, S.K. (2000). Progressive restriction in fate potential by neural progenitors during cerebral cortical development. *Development* 127, 2863-2872.

Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., and Sasai, Y. (2008). Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 3, 519-532.

Elderkin, S., Maertens, G.N., Endoh, M., Mallery, D.L., Morrice, N., Koseki, H., Peters, G., Brockdorff, N., and Hiom, K. (2007). A phosphorylated form of Mel-18 targets the Ring1B histone H2A ubiquitin ligase to chromatin. *Mol Cell* 28, 107-120.

Endoh, M., Endo, T.A., Endoh, T., Fujimura, Y., Ohara, O., Toyoda, T., Otte, A.P., Okano, M., Brockdorff, N., Vidal, M., and Koseki, H. (2008). Polycomb group proteins Ring1A/B are functionally linked to the core transcriptional regulatory circuitry to maintain ES cell identity. *Development* 135, 1513-1524.

Endoh, M., Endo, T.A., Endoh, T., Isono, K., Sharif, J., Ohara, O., Toyoda, T., Ito, T., Eskeland, R., Bickmore, W.A., *et al.* (2012). Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity. *PLoS Genet* 8, e1002774.

Eskeland, R., Leeb, M., Grimes, G.R., Kress, C., Boyle, S., Sproul, D., Gilbert, N., Fan, Y., Skoultschi, A.I., Wutz, A., and Bickmore, W.A. (2010). Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination. *Mol Cell* 38, 452-464.

Ezhkova, E., Pasolli, H.A., Parker, J.S., Stokes, N., Su, I.H., Hannon, G., Tarakhovsky, A., and Fuchs, E. (2009). Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. *Cell* 136, 1122-1135.

Fang, J., Chen, T., Chadwick, B., Li, E., and Zhang, Y. (2004). Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *J Biol Chem* 279, 52812-52815.

Farcas, A.M., Blackledge, N.P., Sudbery, I., Long, H.K., McGouran, J.F., Rose, N.R., Lee, S., Sims, D., Cerase, A., Sheahan, T.W., *et al.* (2012). KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. *Elife* 1, e00205.

Fasano, C.A., Dimos, J.T., Ivanova, N.B., Lowry, N., Lemischka, I.R., and Temple, S. (2007). shRNA knockdown of Bmi-1 reveals a critical role for p21-Rb pathway in NSC self-renewal during development. *Cell Stem Cell* 1, 87-99.

Ferrón, S.R., Charalambous, M., Radford, E., McEwen, K., Wildner, H., Hind, E., Morante-Redolat, J.M., Laborda, J., Guillemot, F., Bauer, S.R., *et al.* (2011). Postnatal loss of Dlk1 imprinting in stem cells and niche astrocytes regulates neurogenesis. *Nature* 475, 381-385.

Francis, N.J., Kingston, R.E., and Woodcock, C.L. (2004). Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science* 306, 1574-1577.

Francis, N.J., Saurin, A.J., Shao, Z., and Kingston, R.E. (2001). Reconstitution of a functional core polycomb repressive complex. *Mol Cell* 8, 545-556.

Frantz, G.D., and McConnell, S.K. (1996). Restriction of late cerebral cortical progenitors to an upper-layer fate. *Neuron* 17, 55-61.

Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K.I., and Gotoh, Y. (2013). p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. *EMBO J* 32, 970-981.

Gao, Z., Zhang, J., Bonasio, R., Strino, F., Sawai, A., Parisi, F., Kluger, Y., and Reinberg, D. (2012). PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol Cell* 45, 344-356.

Gaspard, N., Bouchet, T., Hourez, R., Dimidschstein, J., Naeije, G., van den Aamele, J., Espuny-Camacho, I., Herpoel, A., Passante, L., Schiffmann, S.N., *et al.* (2008). An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* 455, 351-357.

Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88.

Guillemot, F. (2007). Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* 134, 3771-3780.

He, J., Shen, L., Wan, M., Taranova, O., Wu, H., and Zhang, Y. (2013). Kdm2b maintains murine embryonic stem cell status by recruiting PRC1 complex to CpG islands of developmental genes. *Nat Cell Biol* 15, 373-384.

Hirabayashi, Y., and Gotoh, Y. (2010). Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nat Rev Neurosci* 11, 377-388.

Hirabayashi, Y., Itoh, Y., Tabata, H., Nakajima, K., Akiyama, T., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2004). The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. *Development* 131, 2791-2801.

Hirabayashi, Y., Suzuki, N., Tsuboi, M., Endo, T.A., Toyoda, T., Shinga, J., Koseki, H., Vidal, M., and Gotoh, Y. (2009). Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. *Neuron* 63, 600-613.

Isono, K., Endo, T.A., Ku, M., Yamada, D., Suzuki, R., Sharif, J., Ishikura, T., Toyoda, T., Bernstein, B.E., and Koseki, H. (2013). SAM domain polymerization links subnuclear clustering of PRC1 to gene silencing. *Dev Cell* 26, 565-577.

Itoh, Y., Masuyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Gotoh, Y. (2007). The cyclin-dependent kinase inhibitors p57 and p27 regulate neuronal migration in the developing mouse neocortex. *J Biol Chem* 282, 390-396.

Kalb, R., Latwiel, S., Baymaz, H.I., Jansen, P.W., Müller, C.W., Vermeulen, M., and Müller, J. (2014). Histone H2A monoubiquitination promotes histone H3 methylation in Polycomb repression. *Nat Struct Mol Biol* 21, 569-571.

Kallin, E.M., Cao, R., Jothi, R., Xia, K., Cui, K., Zhao, K., and Zhang, Y. (2009). Genome-wide uH2A localization analysis highlights Bmi1-dependent deposition of the mark at repressed genes. *PLoS Genet* 5, e1000506.

Kim, C.A., Gingery, M., Pilpa, R.M., and Bowie, J.U. (2002). The SAM domain of polyhomeotic forms a helical polymer. *Nat Struct Biol* 9, 453-457.

King, I.F., Francis, N.J., and Kingston, R.E. (2002). Native and recombinant polycomb group complexes establish a selective block to template accessibility to repress transcription in vitro. *Mol Cell Biol* 22, 7919-7928.

Kohwi, M., Lupton, J.R., Lai, S.L., Miller, M.R., and Doe, C.Q. (2013). Developmentally regulated subnuclear genome reorganization restricts neural progenitor competence in *Drosophila*. *Cell* 152, 97-108.

Lee, M.G., Villa, R., Trojer, P., Norman, J., Yan, K.P., Reinberg, D., Di Croce, L., and Shiekhattar, R. (2007). Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science* 318, 447-450.

Lehmann, L., Ferrari, R., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A., Kurdistani, S.K., and Carey, M. (2012). Polycomb repressive complex 1 (PRC1) disassembles RNA polymerase II preinitiation complexes. *J Biol Chem* 287, 35784-35794.

Lewis, E.B. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276, 565-570.

Luis, N.M., Morey, L., Mejetta, S., Pascual, G., Janich, P., Kuebler, B., Cozutto, L., Roma, G., Nascimento, E., Frye, M., *et al.* (2011). Regulation of human epidermal stem cell proliferation and senescence requires polycomb-dependent and -independent functions of Cbx4. *Cell Stem Cell* 9, 233-246.

Mairet-Coello, G., Tury, A., Van Buskirk, E., Robinson, K., Genestine, M., and DiCicco-Bloom, E. (2012). p57(KIP2) regulates radial glia and intermediate precursor cell cycle dynamics and lower layer neurogenesis in developing cerebral cortex. *Development* 139, 475-487.

McGinty, R.K., Henrici, R.C., and Tan, S. (2014). Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome. *Nature* 514, 591-596.

Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.K., Koche, R.P., *et al.* (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553-560.

Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Hirata, T., Hibi, M., and Macklis, J.D. (2005). Fezl is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron* 47, 817-831.

Morimoto-Suzuki, N., Hirabayashi, Y., Tyssowski, K., Shinga, J., Vidal, M., Koseki, H., and Gotoh, Y. (2014). The polycomb component Ring1B regulates

the timed termination of subcerebral projection neuron production during mouse neocortical development. *Development* 141, 4343-4353.

Munji, R.N., Choe, Y., Li, G., Siegenthaler, J.A., and Pleasure, S.J. (2011). Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J Neurosci* 31, 1676-1687.

Nakagawa, T., Kajitani, T., Togo, S., Masuko, N., Ohdan, H., Hishikawa, Y., Koji, T., Matsuyama, T., Ikura, T., Muramatsu, M., and Ito, T. (2008). Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. *Genes Dev* 22, 37-49.

Patel, T., Tursun, B., Rahe, D.P., and Hobert, O. (2012). Removal of Polycomb repressive complex 2 makes *C. elegans* germ cells susceptible to direct conversion into specific somatic cell types. *Cell Rep* 2, 1178-1186.

Pereira, J.D., Sansom, S.N., Smith, J., Dobenecker, M.W., Tarakhovsky, A., and Livesey, F.J. (2010). Ezh2, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15957-15962.

Phiel, C.J., Zhang, F., Huang, E.Y., Guenther, M.G., Lazar, M.A., and Klein, P.S. (2001). Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 276, 36734-36741.

Pinto, L., Drechsel, D., Schmid, M.T., Ninkovic, J., Irmeler, M., Brill, M.S., Restani, L., Gianfranceschi, L., Cerri, C., Weber, S.N., *et al.* (2009). AP2gamma regulates basal progenitor fate in a region- and layer-specific manner in the developing cortex. *Nat Neurosci* 12, 1229-1237.

Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, A., Davis, A.A., and Temple, S. (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron

and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28, 69-80.

Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1996). Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175, 1-13.

Reynolds, N., Salmon-Divon, M., Dvinge, H., Hynes-Allen, A., Balasooriya, G., Leaford, D., Behrens, A., Bertone, P., and Hendrich, B. (2012). NuRD-mediated deacetylation of H3K27 facilitates recruitment of Polycomb Repressive Complex 2 to direct gene repression. *EMBO J* 31, 593-605.

Richly, H., Rocha-Viegas, L., Ribeiro, J.D., Demajo, S., Gundem, G., Lopez-Bigas, N., Nakagawa, T., Rospert, S., Ito, T., and Di Croce, L. (2010). Transcriptional activation of polycomb-repressed genes by ZRF1. *Nature* 468, 1124-1128.

Román-Trufero, M., Méndez-Gómez, H.R., Pérez, C., Hijikata, A., Fujimura, Y., Endo, T., Koseki, H., Vicario-Abejón, C., and Vidal, M. (2009). Maintenance of undifferentiated state and self-renewal of embryonic neural stem cells by Polycomb protein Ring1B. *Stem Cells* 27, 1559-1570.

Ruffner, H., Joazeiro, C.A., Hemmati, D., Hunter, T., and Verma, I.M. (2001). Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5134-5139.

Seibler, J., Zevnik, B., Küter-Luks, B., Andreas, S., Kern, H., Hennek, T., Rode, A., Heimann, C., Faust, N., Kauselmann, G., *et al.* (2003). Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic Acids Res* 31, e12.

Shen, Q., Wang, Y., Dimos, J.T., Fasano, C.A., Phoenix, T.N., Lemischka, I.R., Ivanova, N.B., Stifani, S., Morrissey, E.E., and Temple, S. (2006). The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nat Neurosci* 9, 743-751.

Shen, X., Liu, Y., Hsu, Y.J., Fujiwara, Y., Kim, J., Mao, X., Yuan, G.C., and Orkin, S.H. (2008). EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell* 32, 491-502.

Stock, J.K., Giadrossi, S., Casanova, M., Brookes, E., Vidal, M., Koseki, H., Brockdorff, N., Fisher, A.G., and Pombo, A. (2007). Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat Cell Biol* 9, 1428-1435.

Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M.Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., and Greenberg, M.E. (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365-376.

Takizawa, T., Gudla, P.R., Guo, L., Lockett, S., and Misteli, T. (2008). Allele-specific nuclear positioning of the monoallelically expressed astrocyte marker GFAP. *Genes Dev* 22, 489-498.

Tavares, L., Dimitrova, E., Oxley, D., Webster, J., Poot, R., Demmers, J., Bezstarosti, K., Taylor, S., Ura, H., Koide, H., *et al.* (2012). RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell* 148, 664-678.

Trojer, P., Cao, A.R., Gao, Z., Li, Y., Zhang, J., Xu, X., Li, G., Losson, R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., *et al.* (2011). L3MBTL2 protein acts in concert with PcG protein-mediated monoubiquitination of H2A to establish a repressive chromatin structure. *Mol Cell* 42, 438-450.

Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004a). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873-878.

Wang, L., Brown, J.L., Cao, R., Zhang, Y., Kassis, J.A., and Jones, R.S. (2004b). Hierarchical recruitment of polycomb group silencing complexes. *Mol Cell* 14, 637-646.

Williams, R.R., Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Dvorkina, M., Jørgensen, H., Roix, J., McQueen, P., Misteli, T., Merkschlager, M., and Fisher, A.G. (2006). Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus. *J Cell Sci* 119, 132-140.

Wu, X., Johansen, J.V., and Helin, K. (2013). Fbxl10/Kdm2b recruits polycomb repressive complex 1 to CpG islands and regulates H2A ubiquitylation. *Mol Cell* 49, 1134-1146.

Zhou, W., Zhu, P., Wang, J., Pascual, G., Ohgi, K.A., Lozach, J., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2008). Histone H2A monoubiquitination represses transcription by inhibiting RNA polymerase II transcriptional elongation. *Mol Cell* 29, 69-80.

発表論文

Masafumi Tsuboi, Yusuke Kishi, Wakana Kyoizuka, Haruhiko Koseki, Yusuke Hirabayashi, and Yukiko Gotoh

Ubiquitination-independent repression of PRC1 targets during neuronal fate restriction in the developing mouse neocortex

Developmental Cell 2018, in press

Yusuke Hirabayashi, Nao Suzuki, Masafumi Tsuboi, Takaho A. Endo, Tetsuro Toyoda, Jun Shinga, Haruhiko Koseki, Miguel Vidal, and Yukiko Gotoh

Polycomb Limits the Neurogenic Competence of Neural Precursor Cells to Promote Astrogenic Fate Transition

Neuron 63, 600-613, 2009.

Masafumi Tsuboi, Hiroyuki Morita, Yusuke Nozaki, Kenta Akama, Takuya Ueda, Koichi Ito, Knud H. Nierhaus and Nono Takeuchi

EF-G2mt is an exclusive recycling factor in mammalian mitochondrial protein synthesis

Molecular Cell 35, 502-510, 2009.

謝辞

本研究を行うにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました後藤由季子教授に心から深く感謝申し上げます。サイエンスの「サ」の字も理解していなかった私に、「思考すること」の道筋を示してくださいました。そして、後藤さんが提供してくださる、常に活発な議論が交わされているこの環境に身を置いていることに感謝の念を覚えます。ありがとうございました。

また、実際の実験手法、論理的に思考すること、研究を行っていく上での精神論などさまざまなことを教えてくださった平林祐介さん（現コロンビア大学研究員）に大変感謝しています。また、クロマチン制御を研究する上で、岸雄介助教には様々な助言をいただきました。

遺伝子改変マウスやプラスミドを御供与くださった理化学研究所の古関明彦先生に感謝申し上げます。また、古関明彦先生には遠藤充浩博士と共に Ring1B, H2Aub ChIP の手法をご教授頂きました。重ねて感謝申し上げます。レトロウイルスを用いた遺伝子導入を行うにあたり、細胞やプラスミドを御供与くださった東京大学医科学研究所の北村俊雄先生、Johns Hopkins University の Hongjun Song 博士に感謝申し上げます。

朝から晩までともに研究やさまざまな議論をし、精神的に支え合うことのできた同期の西川紗織さん、藤井佑紀さんに心から感謝します。特に、藤井佑紀さんとは修士から 5 年間、共に切磋琢磨し、時に励まし合いながら研究を行うことが出来ました。質問に快く答えてくださり、議論をともに行ってくくださった東京大学大学院薬学系研究科分子生物学教室（旧・東京大学分子細胞生物学研究所情報伝達研究分野）の皆様に感謝申し上げます。

最後に、経済的、精神的に支えてくれた家族に感謝します。

平成 27 年 1 月

壺井 將史