

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏 名 壺井 将史

1. 緒言

組織幹細胞の多くは多分化能と分裂能を有し、様々な細胞系譜に分化しながら組織を形成する。これまで胚性幹細胞(ES 細胞)や様々な組織幹細胞において多分化能、未分化性の維持および正常な分化プログラムの進行にポリコーム群タンパク質(Polycomb Group Proteins, PcG)が重要な働きをする事が示されてきた。PcG は、発生に重要な遺伝子群(developmental gene)をターゲットとし、主にこれらを抑制する事で分化過程を制御すると考えられている。その重要性にも関わらず、PcG による幹細胞の分化能と遺伝子発現を制御するメカニズムには未だ明らかにされていない部分が多い。

本研究において、私はマウス大脳新皮質における幹細胞である神経系前駆細胞をモデルとして、PcG による分化能と遺伝子発現の制御メカニズムの解明を目指した。まず PcG が神経系前駆細胞の未分化性維持および分化運命転換を発生時期依存的に制御するメカニズムについて検討した(第一章)。さらに、PcG の構成因子でありこれまであまり機能解析が為されていなかった Ezh1 の大脳新皮質発生における機能解析を行った(第二章)。

2. (第一章)PcGによる神経系前駆細胞の未分化性の維持と分化運命転換を制御するメカニズム 【序論】

大脳新皮質発生早期において神経系前駆細胞はまずニューロンを産生し、発生後期から出生後にはニューロンを産生する能力を失いアストロサイトを産み出すようになる。これまでに、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し余剰なニューロン産生を防ぐことが示されている(Pereira et al., 2009)。PcG は複数のタンパク質から構成される複合体であり、PRC (Polycomb Repressor Complex)1 複合体および PRC2 複合体からなる。PRC2 複合体が抑制性のヒストン修飾であるヒストン H3K27 トリメチル化(H3K27me3)修飾を触媒し、PRC1 複合体がその修飾を認識して遺伝子の発現抑制に働くと考えられている。この発生早期の段階では PcG によるニューロン分化抑制は可逆的であり、ニューロン分化誘導刺激が入ると PcG による

抑制が解除され神経系前駆細胞はニューロン分化する。一方発生後期(グリア産生期)においては、PcG はニューロン分化決定因子である Neurogenin1(Neurog1)などの発現を抑制し、ニューロン分化誘導刺激が入ってもニューロン分化出来ない状態にして神経系前駆細胞のグリア産生期への運命転換を引き起こすことが知られている(Hirabayashi et al., 2009)。以上から、発生時期依存的な PcG の機能制御が神経系前駆細胞の正常なニューロン産生に非常に重要であると考えられる。しかしながら、発生早期の「ニューロン分化誘導刺激に応じて解除可能な分化抑制状態」と発生後期の「ニューロン分化誘導刺激が入っても抑制解除出来ない状態」がいかなるメカニズムで実現するかは分かっていない。そこで本研究第一章では、PcG が神経系前駆細胞のそれぞれの状態を発生時期依存的に制御するメカニズムの解明を目指した。

【結果】

発生早期神経系前駆細胞においても PcG が Neurog1,Tcfap2c,Lef1 などのニューロン分化関連遺伝子群をターゲットとしているかは分かっていなかった。本研究において、PcG は発生早期において Neurog1,Tcfap2c,Lef1 の発現を未分化条件で抑制していることが示唆された。

PcG によるニューロン分化抑制は、発生早期ではニューロン分化誘導刺激で解除され、発生後期では解除されない。この抑制モードの差を説明するメカニズムとして、転写活性化に関わるヒストン修飾が分化誘導刺激による PcG 抑制解除に寄与すると考えいくつかのヒストン修飾を調べたところ、ヒストン H3K27 アセチル化(H3K27Ac)修飾量に違いがあるかをクロマチン免疫沈降法(ChIP)により検討した。その結果、早期神経系前駆細胞においては Fezf2,Tcfap2c, Lef1 遺伝子座の転写開始点(TSS)から下流の領域において H3K27Ac 修飾量が高いことが明らかになった。さらに、この H3K27Ac 修飾は後期神経系前駆細胞において大きく減少することが明らかになった。従って、H3K27Ac 修飾の存在により、発生早期における PcG 抑制の解除が可能になっている可能性が考えられる。

PcG によるターゲット遺伝子の抑制には H2Aub 依存的な抑制および非依存的な抑制が知られているが、H2Aub 修飾の必要性の議論には未だ明確な答えが出されていない。そこで、発生早期と後期の神経系前駆細胞において、ニューロン分化関連遺伝子の発現抑制に Ring1B の H2Aub 修飾触媒活性が必要であるかを検討した。H2Aub 触媒活性の必要性は、この活性を失った Ring1B 変異体(I53A/D56K)が Ring1B 遺伝子欠損の効果をレスキューするかで判定した。まず、発生早期 Ring1A^{-/-};Ring1B^{fl/fl};Rosa-CreERT2 マウス大脳新皮質由来神経系前駆細胞を用い Ring1B 遺伝子を欠損させた細胞に野生型の Ring1B もしくは Ring1B(I53A/D56K)変異体を発現させた。その結果、Ring1B 遺伝子欠損によって Tcfap2c, Lef1 遺伝子の発現が脱抑制される時に、Ring1B(I53A/D56K)変異体を発現させた細胞では Tcfap2c,Lef1 の発現抑制が回復しなかった。さらに発生後期に相当する細胞で同様のレスキュー実験を行った結果、I53A/D56K 変異体を発現させた細胞で Tcfap2c,Lef1 遺伝子の発現抑制がレスキューされた。このことから、発生後期における PcG による Tcfap2c,Lef1 遺伝子の発現抑制に Ring1B の H2Aub 修飾触媒活性は必要ない事が示唆された。

以上から、Ring1B の H2Aub 触媒活性の必要性の違いが発生早期・後期におけるニューロン分化誘導刺激に応じて解除可能か否かの違いを生む要因となっている可能性が考えられる。

【考察・課題】

本研究結果から、発生早期において *Tcfap2c*, *Lef1* 遺伝子座は H3K27Ac 修飾量が高く *Ring1B* は H2Aub 修飾触媒活性に依存した抑制メカニズムにより *Tcfap2c*, *Lef1* 遺伝子の発現を抑制し、ニューロン分化誘導刺激が入ると PcG による抑制が解除され転写活性化する。発生後期になると H3K27Ac 修飾量が低下し *Ring1B* の H2Aub 活性非依存的な転写抑制メカニズムによりニューロン分化誘導刺激が入っても PcG による抑制が解除されず転写活性化が起きないというモデルを考えている。

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。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。本研究により見出した、PcG による発生時期依存的な抑制状態の違いを生むメカニズムが幹細胞一般に当てはまるメカニズムであればさらにインパクトの大きいものになると考えている。今後は、H3K27Ac 修飾の発生時期依存的な低下が、*Ring1B* による H2Aub 触媒活性の必要性を決める要因となっているかを明らかにしたい。発生後期における H3K27Ac 修飾の低下をキャンセルする事で *Ring1B* による *Tcfap2c*, *Lef1* 遺伝子の発現抑制に H2Aub 修飾触媒活性が必要になるかどうかを現在検討中である。

3. (第二章) 大脳新皮質発生における PcG タンパク質 *Ezh1* の機能解析

【序論】

最近、機能未知であった *Ezh1* も ES 細胞において H3K27me3 修飾を触媒し、発生関連遺伝子などの発現を抑制することが示されている (Shen et., 2008)。

これまでに私は、大脳新皮質神経系前駆細胞において *Ezh2* の mRNA 量が発生時期依存的に減少し、逆に *Ezh1* の mRNA 量が発生時期依存的に上昇することを見出している。このことが第一章で示した発生時期依存的な PcG の機能制御に寄与している可能性も考えられ、大脳発生過程における *Ezh1* および *Ezh2* の機能分担は非常に興味深い点である。しかし、そもそも発生過程において *Ezh1* がどのような機能を有しているかはほとんど分かっていない。また、*Ezh1* も *Ezh2* と同様に H3K27me3 修飾触媒を担うドメインである SET ドメインを有しているが、*Ezh1* が H3K27me3 修飾を触媒し機能しているかもよく分かっていない。

そこで、本研究第二章では *Ezh1* が大脳新皮質神経系前駆細胞においてどのような機能を有しているか、また *Ezh1* が H3K27me3 修飾を触媒し機能しているかを明らかにする事を目的とした。

【結果】

発生早期において、*Ezh1* が *Ezh2* と同様に神経系前駆細胞の未分化性の維持に貢献するかは分かっていない。そこで、*Ezh1* がニューロン分化関連遺伝子群の発現抑制に寄与するかを検討した。そのために、*Ezh1* の条件的ノックアウトマウスの作製を行った。このマウスを用いて、発生早期神経系前駆細胞において *Ezh1* 遺伝子の破壊を行った。その結果、*Ezh1* は発生早期神経系前駆細胞において *Fezf2*, *Tcfap2c*, *Lef1* 遺伝子の発現抑制に貢献していることを示唆する結果を得た。また、*Ezh1* は *Fezf2*, *Tcfap2c* 遺伝子座の H3K27me3 修飾触媒には大きく貢献しない

ことを示唆する結果を得た。

当研究室の先行研究から、発生後期神経系前駆細胞において **Ezh2** は **Neurog1, Fezf2, Lef1, Tcfap2c** といったニューロン分化関連遺伝子群の発現を抑制しグリア産生期への転換を引き起こすことが示されている。しかし、発生後期神経系前駆細胞において **Ezh1** がニューロン分化関連遺伝子群の発現を抑制しグリア産生期への転換を引き起こすかは分かっていない。そこで、発生後期において **Ezh1** がこれらのニューロン分化関連遺伝子群の発現制御に寄与するか発生後期神経系前駆細胞において **Ezh1** 遺伝子の破壊を行うことで検討した。その結果、コントロールと比較し **Ezh1** をノックアウトしたサンプルでは **Neurog1** および **Tcfap2c** 遺伝子の発現が低下した。このことから、発生後期において **Ezh1** は **Neurog1** および **Tcfap2c** の転写をむしろ正に制御する可能性が示唆された。

【考察・課題】

本研究の結果から、発生早期においては **Ezh2** と **Ezh1** が協調して神経系前駆細胞のニューロン分化を抑制し、未分化性の維持に貢献している可能性が考えられる。また、**Ezh1** は **H3K27me3** 修飾を介さないメカニズムによって遺伝子発現抑制を引き起こしている可能性が考えられる。

発生後期神経系前駆細胞において **Ezh2** はニューロン分化関連遺伝子群の発現を抑制し神経系前駆細胞の運命はグリア産生へと転換される。発生早期の結果を踏まえると **Ezh1** の発現量が上昇する発生後期においても **Ezh1** が **Ezh2** と協調的に働きニューロン分化関連遺伝子群の発現を抑制することが予想された。しかし、驚くべき事に発生後期においては **Ezh1** がニューロン分化関連遺伝子の発現を正に制御することを示唆する結果が得られ、ニューロン分化関連遺伝子の発現制御において **Ezh2** とは逆の働きを行っていることが示唆された。現在、発生後期における **Ezh1** の機能として、後期神経系前駆細胞の中でもニューロン分化能を維持した特定の細胞群が存在し **Ezh1** がニューロン分化関連遺伝子群の発現を正に制御する可能性を考えている。今後は、発生早期・後期における **Ezh1** および **Ezh2** のターゲット遺伝子の違いや機能する細胞群が異なるかを明らかにしつつ、大脳新皮質発生において **Ezh1** および **Ezh2** にどのような機能的分担が為されているかを明らかにしたいと考えている。

4. 結言

本研究により、大脳新皮質神経系前駆細胞において「ニューロン分化刺激に応じた解除可能な抑制状態(早期)」および「解除不可能な抑制状態(後期)」が発生時期依存的に実現するメカニズムの一端を明らかにした。さらに、これまで機能解析が遅れていた**Ezh1**がニューロン分化関連遺伝子の発現制御に発生早期・後期で逆の効果を有する事を明らかにした。これまで、**PcG**による「可逆的な抑制状態」および「不可逆的な抑制状態」の違いを生むメカニズムについての知見はほとんどなく、本研究の成果は非常に新規性の高いものである。また、これらの知見に基づく幹細胞の分化能制御メカニズムの正しい理解は、幹細胞を用いた再生医療の観点から見ても非常に重要であると考えている。