

論文の内容の要旨

論文題目 脳におけるインプリンティング制御新規メカニズムの解析

氏名 今泉 結

【序論】

哺乳動物の体細胞は父親と母親由来の染色体を持つ二倍体であり、ほとんどの遺伝子はどちらの染色体からも同程度に発現する。一方、およそ 150 の遺伝子においては、片親由来の常染色体が抑制され発現しなくなる現象、「ゲノムインプリンティング」が知られている。ゲノムインプリンティングは、ICR (Imprinting Control Region) と呼ばれる DNA 領域が、アレル特異的にメチル化を受けることによって遺伝子発現抑制が生じると一般的に考えられている。

これまで、体細胞においてはいったんインプリントが形成されるとインプリントされたアレル (インプリント鎖) からは発現が見られないと考えられてきた。しかし近年の研究により、一部のインプリント遺伝子については、脳において発現の脱抑制 (インプリント鎖からの発現) が検出されることが報告された。さらに、母性インプリント遺伝子である *Dlk1*, *Igf2* のインプリント鎖は神経幹細胞の維持などに寄与することが示唆されてきた。これらのことから、一部のインプリント鎖は脳発生過程で脱抑制を受け、脳発生に何らかの貢献をする可能性が考えられる。しかしながら、*Dlk1*, *Igf2* 以外のインプリント遺伝子においてもインプリント鎖に機能があるかは未だ明らかとなっていない。そこで私は、1) 父性インプリント遺伝子である *Cdkn1c* に着目し、そのインプリント鎖が脳発生に寄与するかについて検討を行なった。

脳においては、インプリント鎖の脱抑制だけでなく、両アレル性発現遺伝子の一部が片アレルの発現抑制を示すことも知られており、特殊なアレル性発現制御メカニズムが存在する可能性が考えられる。しかし、アレル性発現がどのように組織ごとに制御されているかについてはほぼ未解明である。そこでこの点を明らかにするため、2) 脳発生の過程で高発現するインプリント制御因子 *Zfp57* が組織ごとのアレル性発現制御に関わるかに着目して解析を行なった。

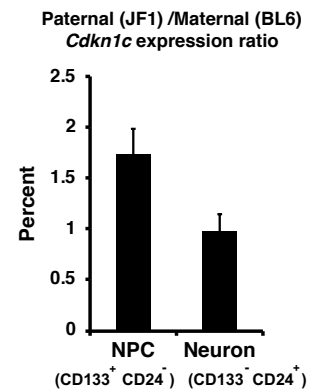


図1 *Cdkn1c* 父方鎖の母方鎖に対する発現量の定量 (Data are mean+s.e.m from three independent experiments)

【実験方法・結果】

1-1. 胎生期神経系前駆細胞における *Cdkn1c* 父方鎖からの mRNA の発現

Cdkn1c は、Cyclin-dependent kinase 阻害タンパク質ファミリーに属する父性インプリント遺伝子である。母方鎖は神経系前駆細胞において発現し脳発生に寄与するが、発現抑制される父方鎖は機能を持たないと考えられており、詳細な解析はなされていなかった。まず、*Cdkn1c* の父方鎖からそもそも mRNA の発現が検出されるかを検討するため、父方母方各鎖からの転写を区別し定量を行なった。具体的には、*Cdkn1c* 遺伝子座に一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism, SNP) を有する C57BL/6J 系統 (BL6) と

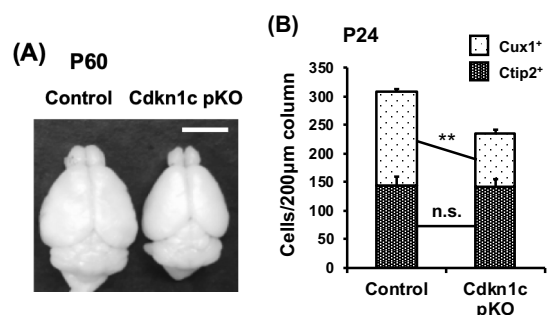


図2 *Cdkn1c* 父方鎖 KO マウスにおける (A) 脳全体の縮小 (n ≥ 3 Scale bar: 500 μm) (B) Cux1 および Ctip2 陽性細胞数の定量 (Data are mean+s.e.m. n = 3 mice for each genotype. Student's t-test ** *P* < 0.01. n.s., not significant)

JF1/MS 系統(JF1)を掛け合わせた胎仔の胎生 16 日目の大脳新皮質サンプルから、FACS を用いて未分化な神経系前駆細胞群(CD133⁺ CD24⁻)およびニューロン群(CD133⁻CD24⁺)を分取した。これら細胞群から SNP を含む配列に対する特異的なプライマーで定量逆転写 PCR を行うことで、それぞれのアレルに由来する mRNA 量の定量を行なった。その結果、Cdkn1c 父方鎖由来の mRNA は、母方鎖の約 1%程度発現することが明らかとなった(図 1)。

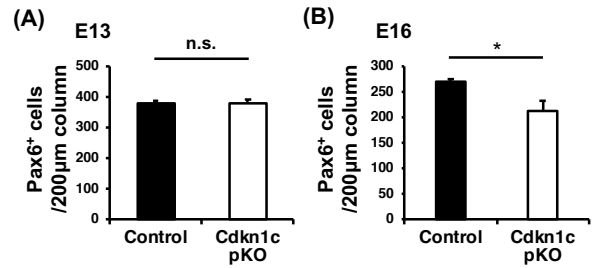


図3 コントロールおよびCdkn1c父方鎖KOにおける (A)胎生16日目(B) 胎生13日目のPax6陽性細胞数の定量 (Data are mean+s.e.m. n = 3 mice for each genotype. Student's t-test **P*<0.05. n.s., not significant)

1-2. Cdkn1c 父方鎖 KO 大脳新皮質では上層ニューロンの減少が見られた

Cdkn1c 父方鎖の脳発生における機能を調べるため、Cdkn1c flox マウスのオスと Nestin-Cre マウスのメスを掛け合わせるにより、Cdkn1c 父方鎖のみを中枢神経系特異的に遺伝子破壊したマウスを作製した(Cdkn1c 父方鎖 KO, Cdkn1c pKO)。生後 60 日目における Cdkn1c 父方鎖 KO マウスでは、脳組織全体的な縮小が見られた(図 2A)。さらに生後 24 日目の大脳新皮質においては、下層マーカーである Ctip2 陽性細胞の数には大きな変化が見られなかった一方、上層マーカーである Cux1 陽性細胞は減少していた(図 2B)。このことから、Cdkn1c 父方鎖は特定のニューロンサブタイプの数に制御している可能性が示唆された。

1-3. Cdkn1c 父方鎖 KO により上層ニューロンを産み出す時期の神経系前駆細胞が減少した

大脳新皮質において、胎生初期の神経系前駆細胞からは下層ニューロンが産み出され、後期になると上層ニューロンが産生されることが知られている。上記の実験により、Cdkn1c 父方鎖 KO は層特異的にニューロンの減少が見られたことから、時期特異的に神経系前駆細胞の数に変化する可能性がある。この点を検討するため、胎生初期および後期の Cdkn1c 父方鎖 KO において、神経系前駆細胞マーカーである Pax6 による免疫染色を行った。その結果、下層ニューロン産生期である胎生 13 日目においては Pax6 陽性細胞数には大きな変化が見られなかった一方で、上層ニューロンを産生する胎生 16 日目において、Cdkn1c 父方鎖 KO 脳の Pax6 陽性細胞数が有意に減少していた(図 3)。これらの結果から、Cdkn1c 父方鎖は胎生後期の神経系前駆細胞の数を制御し正常な数の上層ニューロンの産生に寄与することが示唆された。

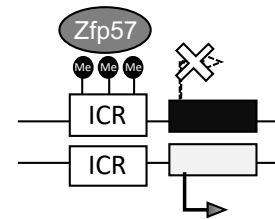


図4 Zfp57はDNAメチル化されたインプリント制御領域(ICR)に結合し、下流の遺伝子発現を抑制する

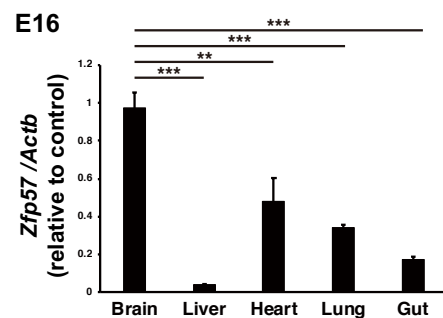


図5 Zfp57は胎生16日目において中枢神経系で高発現する (Data are mean+s.e.m from three independent experiments. Dunnett's test; ***P*<0.01, ****P*<0.001)

2-1. Zfp57 は胎生期中枢神経系において高発現する

Zfp57 は KRAB zinc finger タンパクをコードし、ゲノムインプリンティングの維持を担うことが ES 細胞の系で知られている。Zfp57 はメチル化された一部の ICR に結合すると、KAP1 複合体をリクルートし、下流の遺伝子発現を抑制する(図 4)。生体内において Zfp57 は、着床前の初期胚や生殖系列の細胞で高

発現するが、興味深いことに、胎生期中枢神経系でも一過的に高発現する。そこで私は、脳発生の過程で *Zfp57* が高発現することにより、脳における特殊なアレル性発現を制御する可能性を考えた。

まず、それぞれの組織における *Zfp57* の発現量を調べるため、胎生 16 日目における各組織を取り出し、mRNA から定量逆転写 PCR を行うことにより検討した。その結果、*Zfp57* は肝臓などの組織と比較すると、脳において高発現していることが示された(図 5)。この結果から、*Zfp57* が胎生期中枢神経系において何らかの機能を持つ可能性が示唆された。

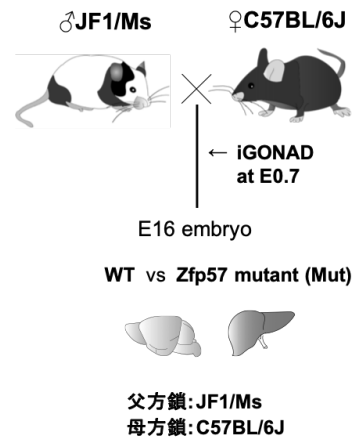


図6 F₁ハイブリッド胎児において iGONAD法による *Zfp57* の遺伝子破壊を行い、脳と肝臓のアレル性発現を比較した

2-2. *Zfp57* のノックアウトにより *Snrpn* は脳においてアレル性発現が変化する

Zfp57 の生体内におけるアレル性発現への関与を調べるためには、*Zfp57* を破壊しながらアレルを区別する必要がある。そこで私は、近年日本で開発された iGONAD 法(Ohtsuka et al., 2018)を用い、第 0 世代における *Zfp57* の遺伝子破壊を行った。このとき JF1 と BL6 を掛け合わせることで、その胎仔においては SNP を用いてアレルを区別することができる(図 6)。*Zfp57* 変異体(Mut)および野生型(WT)の胎生 16 日目の胎仔から脳と肝臓を取り出し mRNA から逆転写を行い、それぞれの組織で発現する 15 個のインプリント遺伝子の父方鎖と母方鎖由来の発現量の比を、MassARRAY プラットフォームを用いることにより解析した(図 7A-B)。その結果、*Zfp57* 変異体の脳と肝臓の両方で 5 個のインプリント遺伝子についてアレル性発現の比率が有意に変化しており、インプリント鎖の脱抑制が生じていることが示唆された。一方で、興味深いことに、父方鎖発現のインプリント遺伝子である *Snrpn* については、*Zfp57* 変異体の脳において肝臓よりも顕著にアレル性発現の比率の変化が見られた(図 7C)。以上の結果から、*Snrpn* は脳において *Zfp57* によるアレル性発現制御を受ける可能性が示唆された。

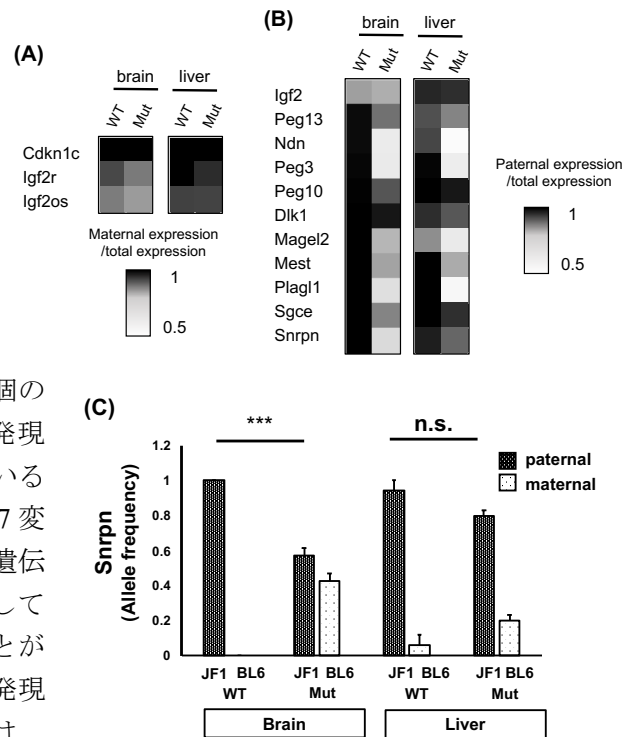


図7 野生型もしくは *Zfp57* 変異体の脳と肝臓におけるインプリント遺伝子のアレル性発現の比率の定量 (A)父性インプリント遺伝子 (B)母性インプリント遺伝子 (C)*Snrpn* のアレル性発現の比率の定量 (Data are mean+s.e.m from three independent experiments. Student's t-test ****P*<0.001. N.S., not significant)

2-3. インプリント鎖の脱抑制が起きた組織では遺伝子発現量が増加する

上記の実験により、*Zfp57* が遺伝子破壊されると、一部のインプリント遺伝子ではインプリント鎖の脱抑制が生じることが示された。そこで、インプリント鎖の脱抑制が実際に発現量の増加を引き起こすかという可能性について検討するため、*Zfp57* 変異体と野生型のそれぞれの組織におけるインプリント遺伝子の発現量を定量逆転写 PCR により比較した。脳と肝臓の両方でアレル

性発現の変化が見られた *Plagl1* は、*Zfp57* 変異体の脳と肝臓の両方で2倍以上の発現が見られる傾向にあった(図 8A)。一方、脳のみでアレル性発現に変化が見られた *Snrpn* は、*Zfp57* 変異体の脳において約 1.7 倍の発現が検出されたが、肝臓では有意な変化は見られなかった(図 8B)。すなわち、*Zfp57* の遺伝子破壊によりインプリント鎖の脱抑制が起きた組織においては、インプリント遺伝子の発現が上昇する可能性が示唆された。

【まとめと考察】

本研究により、*Cdkn1c* のインプリント鎖には機能が存在し、脳発生に必要であることが初めて示された。*Cdkn1c* 父方鎖は、母方鎖と比較し発現レベルが非常に低いにも関わらず、神経系前駆細胞の数を制御し、適切な数のニューロンの産生に貢献すると考えられる。近年の報告で、母体に低タンパク食を与え続けた胎仔では、*Cdkn1c* 父方鎖の脱抑制が特に脳において誘導されること、また別の報告で、*Cdkn1c* のインプリント鎖を脱抑制させたモデルマウスは行動に異常を示すことが明らかとなった。これらを踏まえると、本研究は脳において *Cdkn1c* 父方鎖が厳密に制御されている可能性をさらに示唆するものであり、興味深い。

また、本研究では、*Zfp57* が生体内のインプリント遺伝子のアレル性発現にどのように影響するかについて、脳と肝臓のそれぞれで解析した。*Zfp57* を破壊すると、*Plagl1* を含むいくつかのインプリント遺伝子については脳と肝臓の両方でアレル性発現の変化が見られ、*Snrpn* については、*Zfp57* 変異体の脳においてアレル性発現の変化が見られた。このことから、脳発生時における *Zfp57* の高発現が、*Snrpn* の脳におけるアレル性発現を制御している可能性が示唆された。*Snrpn* はニューライトの伸長、神経幹細胞の維持などに重要な役割を果たすことが知られている。*Zfp57* が脳においてアレル性発現を制御することにより、*Snrpn* の発現量は厳密に制御され、正常なニューロンの成熟に貢献する可能性が考えられる。

自閉症患者ではアレル性発現の異常が検出される傾向が報告されるなど、脳におけるアレル性発現が正常に制御される必要性が示唆されてきた。本研究を通して、脳における特殊なゲノムインプリンティングの意義の一端を明らかにできる可能性があると考えている。

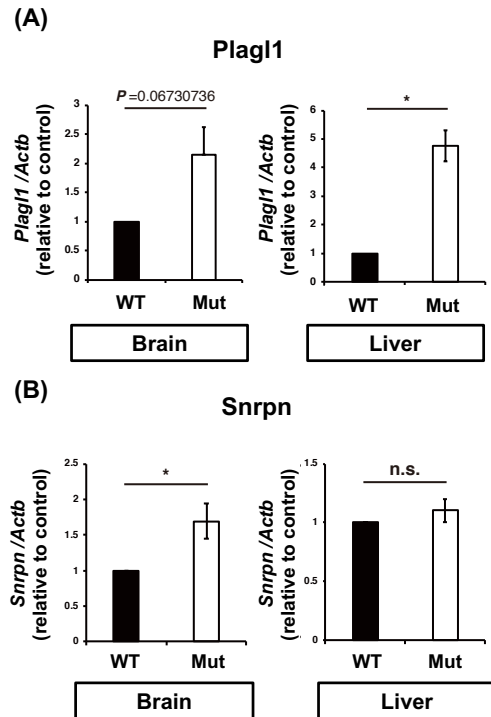


図8 野生型および*Zfp57*変異体の脳と肝臓における(A)*Plagl1*および(B)*Snrpn*の発現量 (Data are mean+s.e.m from three independent experiments. Student's t-test * $P<0.05$. n.s., not significant)