

博士論文（要約）

大脳の背腹軸領域制御における
ポリコーム構成因子Ring1A/Bの機能解析

衛藤 光

【序論】

哺乳類の脳は、発生早期に背腹軸に従って異なる組織が形成される。背側正中領域、その他の背側領域、腹側領域はそれぞれ大脳辺縁系、大脳新皮質、大脳基底核を形成し、大きく異なる機能を持つ。そのため、背腹軸に沿った大脳のパターンニングは、大脳の正常な構築の根幹となる非常に重要なステップである。この背腹軸に沿ったパターンニングにはモルフォゲンによる誘導が重要であることが知られており、骨形成因子 (BMP) と Wnt、ソニック・ヘッジホッグ (Shh) によって大脳神経幹細胞にそれぞれ背側様、腹側様の遺伝子発現パターンが誘導される (Gupta and Sen, 2016; Blaess et al., 2015)。

重要なことにこれらのモルフォゲンのリガンド遺伝子を強く発現する細胞は背側・腹側の末端領域に局限し、適切なシグナル勾配を形成する。リガンド遺伝子が異所的に発現すると異所的な領域誘導が発生することが考えられるため、正中領域に局限した発現パターンが維持される必要があるが、発現パターンを維持する機構は殆ど不明である。

そこで、細胞分裂を経ても制御状態が受け継がれるエピジェネティックな機構がモルフォゲン発現パターンの確立・維持に関与する可能性を検討し、発生制御への重要性が報告されているポリコーム群タンパク質複合体 (PcG) に注目した。脊髄などの前後軸領域制御では、PcG による Hox 遺伝子群の発現制御が重要である (Chambeyron et al., 2005)。PcG は PRC1, PRC2 という二種類の複合体により構成されるクロマチン制御因子であり、ヒストン修飾などを介し遺伝子発現の抑制に働く。そこで本研究では、PRC1 の必須構成因子である Ring1A/B (機能を重複するヒストン H2AK119 ユビキチンリガーゼ) に特に注目し、背腹軸に沿った大脳のパターンニングに対する PcG の関与を検討した。

【実験方法・結果】

1. Ring1A/B の欠損により大脳の腹側領域が背側化する

はじめに、背腹軸に沿った大脳のパターンニングに対する Ring1A/B の必要性を検討するため、Ring1A を全身で欠損する条件下で Sox1-Cre を用いて神経系特異的に Ring1B を欠損するマウス (Ring1A/B KO) を作製した。胎生 10 日目において大脳の冠状切片を作製し、領域特異的に発現する遺伝子に対する抗体免疫染色を行った結果、背側特異的な転写因子 Pax6 の発現が亢進した一方で、腹側特異的な転写因子 Gsx2, Nkx2.1 の発現は顕著に減弱した (図 1)。この傾向は Ring1B のみを神経系特異的に欠損するマウス (Ring1B KO) でも同様に観察された。以上の結果から、Ring1A/B の欠損は大脳腹側領域の神経幹細胞の背側化を引き起こすことが示唆された。

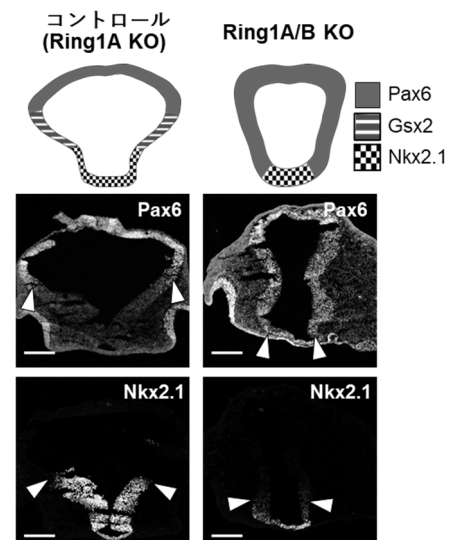


図 1. 胎生 10 日目の Ring1A/B KO 大脳における領域特異的遺伝子の発現パターン
Scale bars : 200 μ m

2. Ring1A/B の欠損により大脳の背腹軸を制御するモルフォゲンの発現パターンが変化する

Ring1A/B の欠損により発現変動する遺伝子の特徴を詳細に調べるため、Ring1B KO マウスの胎生 11 日目の大脳腹側領域の神経幹細胞に対する網羅的遺伝子発現解析を行った。KEGG パスウェイ解析の結果、発現が亢進した遺伝子に BMP, Wnt シグナルが、発現が低下した遺伝子に Shh シグナルがそれぞれ有意に濃縮した (図 2)。従って、Ring1A/B の欠損により起こる背側化にはモルフォゲンのパターンの変化を伴うことが示唆された。

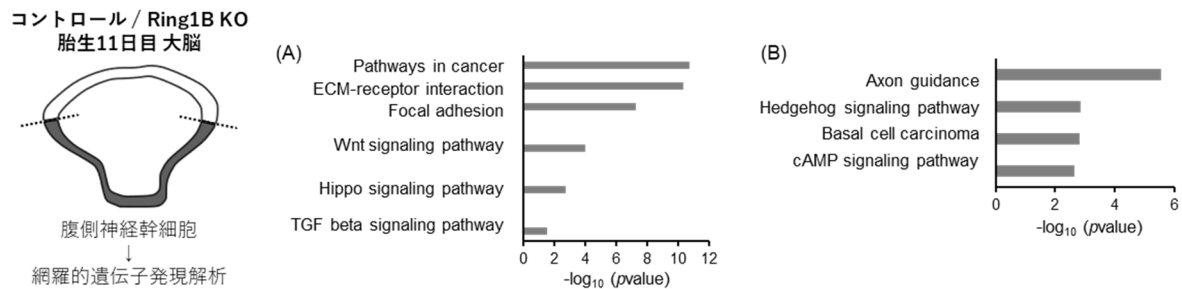


図2. Ring1B 欠損により胎生 11 日目大脳腹側領域の神経幹細胞で発現が亢進 (A) および低下 (B) した遺伝子に対する KEGG パスウェイ解析 (A は一部抜粋)

BMP, Wnt シグナルが Ring1A/B の欠損によって大脳でどのように亢進するかを評価するため、胎生 10 日目の冠状切片を用いた解析を行った。抗体免疫染色および *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現解析の結果、BMP, Wnt の下流遺伝子 *Id1*, *Axin2* はコントロールでは背側正中領域に強い発現を示したのに対して、Ring1A/B KO では大脳領域全体で発現の亢進が見られた (図 3A)。また、発生早期の大脳を制御する代表的なリガンド遺伝子である *Bmp4*, *Wnt8b* の発現パターンを同様に解析した結果、*Id1*, *Axin2* と同様に背側正中領域以外の大脳領域で発現の亢進が見られた (図 3B)。以上の結果から、Ring1A/B の欠損により BMP, Wnt シグナルが大脳全体で亢進し、その過程にはリガンド遺伝子の発現亢進を伴うことが明らかになった。

一方で、Shh シグナルのリガンド遺伝子 *Shh* の発現パターンについても *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて評価した結果、コントロールの大脳は腹側の末端領域にシグナルが検出されたのに対し、Ring1A/B KO の大脳はシグナルがほぼ検出されなかった (図 3C)。この結果から、Ring1A/B の欠損による Shh シグナルの抑制はリガンド遺伝子 *Shh* の発現減少を伴うことが明らかになった。

以上の結果から、Ring1A/B は大脳の背腹軸を制御するモルフォゲンのリガンド遺伝子の発現パターンを制御することで領域誘導を正常に制御することが示唆された。

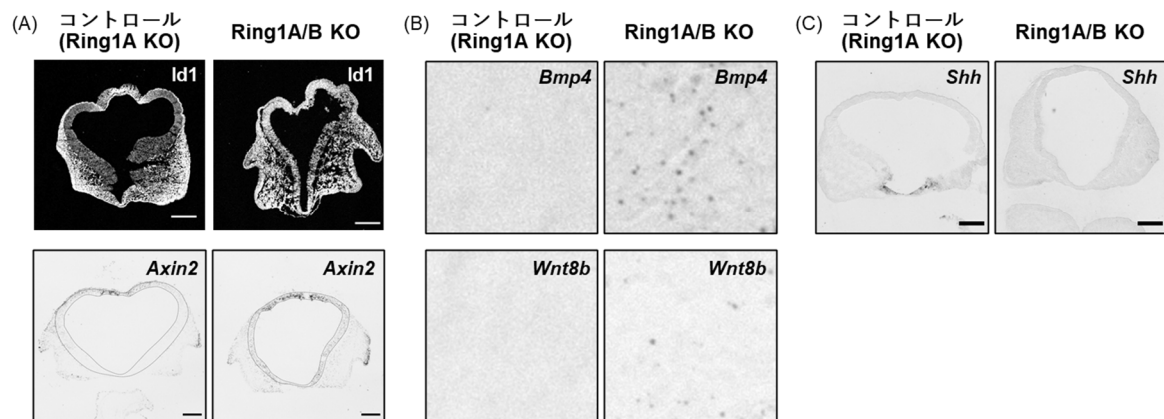


図3. 胎生 10 日目の Ring1A/B KO 大脳における BMP, Wnt, Shh 関連遺伝子の発現パターン

(A, C) Scale bars : 200 μm

(B) 大脳腹側領域拡大図 (40 μm 四方)

3. 発生早期の大脳において、BMP, Wnt シグナルは Shh に対する発現抑制能を持つ

PcG は一般的に転写抑制因子であるため、Ring1A/B の欠損による Shh の発現の低下は発現が亢進する因子による間接的な結果ではないかと考えた。そこで、Shh と対極の背側誘導に働き Ring1A/B の欠損によって亢進する BMP, Wnt シグナルが、*Shh* を抑制する可能性を検討した。

胎生 9 日目のマウス大脳を分取し、組織培養および単層培養を行った。リコンビナント BMP4, CHIR99021 の添加により BMP, Wnt をそれぞれ亢進させ、1 日後の遺伝子発現を定量 PCR により評価した。その結果、*Shh* の発現は BMP と Wnt のどちらを亢進させても抑制され、BMP と Wnt を同時に亢進させることでより顕著に抑制された (図 4)。この結果から、発生早期の大脳では過剰な BMP, Wnt シグナルによって *Shh* の発現が抑制されることが明らかになった。

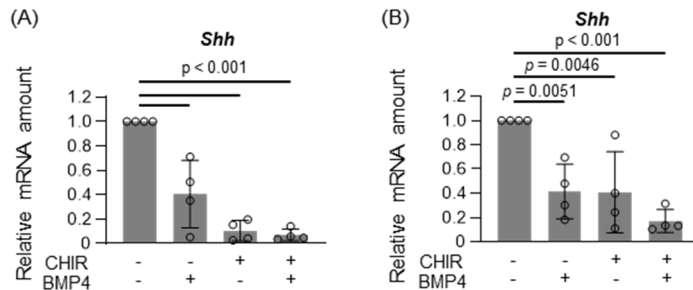


図 4. 胎生 9 日目大脳 組織培養 (A) および単層培養 (B) BMP, Wnt 活性化刺激 1 日後における *Shh* の発現 (定量 PCR)

CHIR : CHIR99021 (1 μ M)

BMP4 : リコンビナント BMP4 (50 ng/ml)

One-way ANOVA followed by Dannonett's test

4. 発生早期の大脳において、PcG は BMP, Wnt リガンド遺伝子を領域特異的に制御する

上記の結果に加えて、発生早期の大脳では PcG が BMP, Wnt リガンドの遺伝子座に分布することがクロマチン免疫沈降法により見られたことから、BMP, Wnt リガンド遺伝子の発現を PcG が直接制御することが領域制御に重要であることが示唆された。その一方、正常な大脳においても背側正中領域には BMP, Wnt リガンド遺伝子が発現することから、PcG が背側正中領域を除く大脳領域で特異的にこれらの遺伝子を制御するという仮説を立てた。

この仮説を検証するため、各領域における PcG の分布パターンを比較した。胎生 11 日目のマウス大脳を背側正中領域、背側領域、腹側領域に切り分けて神経幹細胞を分取し、PRC2 により施されるヒストン修飾 H3K27me3 と Ring1B の分布を、ゲノム上のタンパク質や修飾の分布を解析する手法 CUT&Tag を用いて解析した。その結果、*Bmp4*, *Wnt8b* 遺伝子座周辺のゲノム領域には背側正中領域と比較して背側領域、腹側領域でより多量の H3K27me3, Ring1B の分布が検出された (図 5)。この結果から、*Bmp4*, *Wnt8b* は背側正中領域を除く大脳領域でポリコーンによる発現制御をより強固に受けることが示唆された。

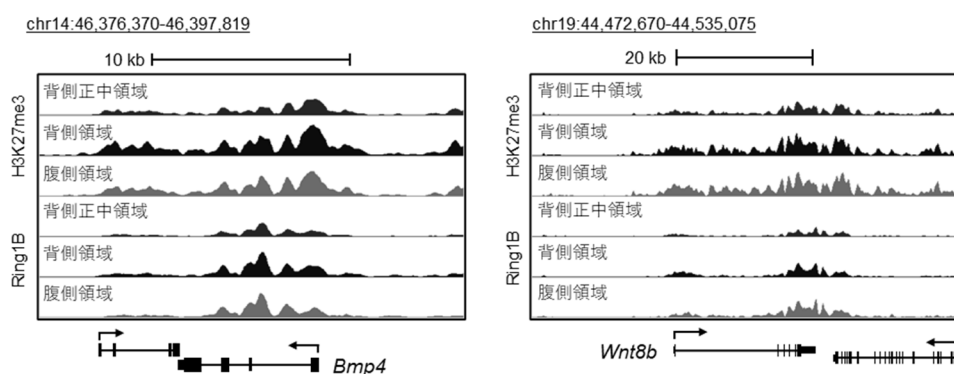


図 5. 胎生 11 日目大脳 各領域の神経幹細胞における *Bmp4*, *Wnt8b* 遺伝子座周辺の H3K27me3, Ring1B の分布

【まとめと考察】

本研究により、PcG 構成因子 Ring1A/B は背側正中領域を除く大脳領域で特異的に BMP, Wnt リガンド遺伝子の発現を制御することで BMP, Wnt シグナルを抑制し、その結果として腹側領域における Shh の発現やその後の腹側誘導に貢献することが示唆された。この発見は、正確な領域形成に必須な「モルフォゲンの発現の領域特異性」を説明する新規性の高い発見である。

今後は BMP, Wnt リガンド遺伝子に対する PcG の領域特異的な分布パターンの形成機構を解明することが重要である。モルフォゲンが大脳発生過程の領域誘導を司ることを考えると、モルフォゲンやその下流で誘導される因子が PcG の分布パターンを制御するのならば、本研究で見出した「PcG によるモルフォゲンの制御」のフィードバック機構としてさらに興味深い。

また、本要旨には記載していないものの、PcG 依存的な背側化の抑制は大脳発生の初期に特異的であることを見出しており、PcG 依存的な発現抑制状態は一過的であることが示唆される。遺伝子発現制御の PcG 依存性の転換機構などに迫ることで、発生時期・領域特異的な遺伝子発現制御に対する PcG の機能をさらに明らかにできるであろう。

結びに、大脳背腹軸領域制御は、機能の異なる様々な大脳領域の形成の根幹であり、正確な大脳の構築に必須な発生制御である。本研究をきっかけとして、PcG 分布パターンの制御機構などの解明から重要な領域制御を司る新規の因子や機構の発見に繋がることが期待される。

【学術雑誌掲載論文】

Hikaru Eto, Yusuke Kishi, Nayuta Yakushiji-Kaminatsui, Hiroki Sugishita, Shun Utsunomiya, Haruhiko Koseki and Yukiko Gotoh. “The Polycomb group protein Ring1 regulates dorsoventral patterning of the mouse telencephalon.” *Nature Communications* **11**, 5709, (2020)