

神経管形成における  
ヒストン脱メチル化酵素 Fbx110/Kdm2b の機能解析  
(Fbx110/Kdm2b Deficiency Accelerates Neural Progenitor Cell  
Death and Leads to Exencephaly)

指導教官：吉田 進昭

メディカルゲノム専攻

学籍番号：47087343

福田 剛

## 略語一覽

2-ME	2-mercaptoethanol
BrdU	bromodeoxyuridine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DT-A	diphtheria toxin A
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid
ES	embryonic stem
Fbxl10	F-box and leucine rich-repeat protein 10
FCS	fatal calf serum
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
INPs	intermediate neural progenitor cells
H&E	hematoxylin-eosin
kb	kilo bases
kDa	kilo Dalton
LIF	leukemia inhibitory factor
MEFs	mouse embryonic fibroblast cells
NTDs	neural tube defects
PBS	phosphate-buffered saline
PBST	PBS containing 0.05% Tween20
TBST	Tris-buffered saline containing 0.05% Tween20
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling

# 目次

<b>I 序論</b>	<b>3</b>
(1) 中枢神経系の発生	
(2) 神経管閉鎖不全 (NTDs)	
(3) エピジェネティクスとヒストンのメチル化	
(4) Fbxl10/Kdm2b	
<b>II 実験材料と方法</b>	<b>14</b>
<b>III 結果</b>	<b>24</b>
(1) 初期胚、および成体マウス組織における Fbxl10 mRNA の発現解析	
(2) Fbxl10 欠損マウスの作製	
(3) Fbxl10 欠損マウスの表現型	
(4) Fbxl10 欠損胚の組織学的解析	
(5) 初期胚における Fbxl10 の時空間的発現パターン解析	
(6) E9.5 の Fbxl10 欠損胚における細胞増殖、分化および細胞死	
(7) E14.5 における Fbxl10 欠損胚の細胞増殖、分化および細胞死	
(8) E8.5 における Fbxl10 欠損胚の遺伝子発現解析	
(9) MEFs における Fbxl10 ノックダウン解析	
<b>IV 考察</b>	<b>51</b>
(1) Fbxl10 欠損胚に見られた細胞死および細胞増殖亢進の分子メカニズム	
(2) ヒストンメチル化修飾遺伝子と NTDs	
(3) SF-Fbxl10 の生理的機能について	
(4) Fbxl10 欠損マウスにおける表現型の浸透度	
参考文献	58
謝辞	64

# I 序論

本研究では生体での機能が不明であったヒストン脱メチル化酵素 Fbx110 の機能を調べるため、Fbx110 欠損マウスを作製した。Fbx110 欠損マウスは一定の浸透度で神経管閉鎖不全を呈し、Fbx110 が正常な神経管形成に必須であることを明らかとした。

## (1) 中枢神経系の発生

脊椎動物の中枢神経系（脳および脊髄）の発生は、胎生初期に神経管とよばれる管状原基が形成されることに始まる。神経管はマウスでは胎生 8.5～10.5 日に、神経上皮細胞で構成される神経ヒダの両端が立ち上がり、屈曲・近接し、融合することにより形成される（ref. 1, 図 I-1）。頭部神経管はその後、前脳、中脳、後脳と領域化され、神経管内腔は脳室として維持される。前脳の一部は神経網膜として眼胞を形成し、眼胞は陥入して眼杯を形成する（42）。尾部神経管は脊髄へと分化し、神経管内腔は中心管として維持される。神経管を形成する神経上皮細胞は未分化な神経幹細胞集団から構成され、一部がニューロンへと分化しながら自己複製を繰り返す、発生に十分な神経幹細胞プールを獲得してゆく。その後、神経幹細胞は放射状グリア細胞（radial glial cell）と呼ばれる神経前駆細胞へと形態を変化させ、脳室帯に局限しながら非対称的な分裂によりニューロンやグリア細胞を産生する（ref. 27, 図 I-2）。また、胎生期の神経ヒダからは第 4 の胚葉とも呼ばれる神経堤細胞が発生する。神経堤細胞は神経管の背側細胞に由来する過渡的な細胞集団であり（図 I-1）、神経管から離れて遊走し、副腎髄質細胞や骨・軟骨、種々の末梢神経系細胞へ分化する（29）。このように神経上皮細胞に由来する細胞群は複雑な神経系を構築していく。

## (2) 神経管閉鎖不全 (NTDs)

神経管の形成異常は発生に重大な欠陥をきたす。これは神経管閉鎖不全（neural tube

defects, NTDs)と呼ばれ、ヒトでは新生児のうち約 1000 人 1 人の割合で発症する重篤な先天性疾患である (1-5)。主に神経ヒダの立ち上がりに失敗することで引き起こされ、神経上皮細胞が表皮によって覆われないため、中枢神経系が外界に露出される (図 I-3)。頭部領域の NTDs は将来的に外脳症 (ヒトにおいては無脳症として知られる)、尾部領域の NTDs は将来的に二分脊椎となって顕在化する (図 I-3)。無脳症が生じた胎児は死産となり、二分脊椎の患者は出生後の外科的手術で生存可能であるが、多くの場合重大な後遺症を持つことになる。神経管形成は脊椎動物発生の中でも最も研究されてきた領域の一つだが、ヒトの NTDs の遺伝的原因に関しては、複数の遺伝子と環境要因が関与することと、ヒトの遺伝的複雑性からよく分かっていない (1-5)。

一方で遺伝的に均一な系統が維持されたマウスモデルでは実に 200 以上の遺伝子変異マウスが NTDs を表現型に持つことが知られている (4)。これらの遺伝子の機能は主に細胞のアポトーシスや増殖、分化、極性の制御、アクチン機能の制御に関するものが多く、これらの要因が神経管形成に重要な役割を果たしていることがうかがえる (1-5)。しかし、個々の遺伝子がどのような分子メカニズムによって神経管形成に寄与しているかは未だ不明な点が残されており、それぞれの遺伝子間のネットワークについても不明な点が多い (2-6)。NTDs に関与する遺伝子にはゲノムのメチル化やクロマチンリモデリングなどエピジェネティクスに関わる遺伝子も多い (33)。エピジェネティクス制御は下流の様々な遺伝子の転写を調節するため、これらの遺伝子は神経管形成に関わる多数の遺伝子間ネットワークを統合的に制御している可能性が予想される。

### **(3) エピジェネティクスとヒストンのメチル化**

エピジェネティクスとは「遺伝情報 (DNA 配列) に依存しない遺伝子の発現制御である」こと、「体細胞ではその記憶が伝達される」という二つの特性によって定義付けられる (34)。発生・分化の過程では同一の遺伝情報を持った細胞でも、個別に組織特異的な遺伝子発現が達

成されなくてはならない。これを制御しているのがエピジェネティックな遺伝子発現制御であり、エピジェネティクス制御が破綻すると高等真核生物は発生できない。またエピジェネティクスの異常はがんを筆頭とした様々な疾患に関与することが強く示唆されている (11-13)。

エピジェネティクスを制御する要因としては大きく分けて「DNA のメチル化」と「ヒストンの化学修飾」が挙げられる (34)。DNA のシトシン塩基がメチル化されると一般的に遺伝子発現に対し抑制的に働くことが知られている。DNA のメチル化は DNA メチル化酵素群 (Dnmt) によって引き起こされ、Dnmt1 または Dnmt3b を欠損したマウスは胎生致死となる (表 I-1)。また Dnmt3b や Dnmt3l の欠損は NTDs を引き起こす (表 I-1)。一方、ヒストン修飾にはアセチル化やメチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO 化などが存在し、近傍遺伝子の転写調節に関わっている。ヒストンのアセチル化は一般的に近傍の遺伝子の転写を活性化する。ヒストンのメチル化はメチル基が付加されるリジンまたはアルギニン残基の位置や、付加されるメチル基の数などによって近傍遺伝子の転写に与える影響が異なる (図 I-4)。メチル化されるリジン残基はヒストン H3 内のリジン 4、9、27、36、79 とヒストン H4 内のリジン 20 が存在する。トリメチル化されたヒストン H3 リジン 4 (H3K4me3) や H3K36me3 は近傍遺伝子の転写活性化、H3K9me3、H3K27me3 は近傍遺伝子の転写不活性化に関与している (7, 8)。ヒストンのメチル化はヒストンメチル化酵素群によって達成され、それぞれの酵素は修飾リジン残基の種類と付加するメチル基の数に特異性をもつ。例えば G9a と Ezh2 はそれぞれ H3K9 と H3K27 に対するメチル化酵素であり、欠損マウスはどちらも胎生致死である (表 I-1)。

ヒストンのメチル化はその熱力学的安定性より、不可逆的な修飾であると長年考えられてきた (7)。しかし、2004 年に LSD1 が H3K4me2/me1 に対するヒストン脱メチル化酵素として同定され、ヒストンのメチル基は可逆的・動的に制御され得ることが示された (35)。LSD1 は amine oxidase 反応に依存した反応機構により脱メチル化を引き起こすが、この反応機構では原理的にトリメチル化されたリジン残基からメチル基をはずすことはできず、これを可能にする酵素が存在するかは不明のままであった。しかし 2006 年になり、別の反応機構により脱メ

チル化活性を呈するヒストン脱メチル化酵素 FBXL11 が同定された (9)。FBXL11 のヒストン脱メチル化活性は JmjC ドメインが担っている。FBXL11 はヒドロキシル化反応を介した反応機構による脱メチル化活性を有し、JmjC タンパクは原理的にトリメチル化リジンに対しても脱メチル化活性を持つことが示唆された (9)。その後、JmjC ドメインを持つヒストン脱メチル化酵素が数多く発見され、中にはトリメチル化リジンに対しても脱メチル化活性を持つ酵素も発見されている。このようにヒストン脱メチル化酵素が、次々に同定され、またその標的となる遺伝子もいくつか見つかっている。しかし一方で、この新たなヒストン修飾酵素群の個体発生や細胞分化における役割は、ほとんど明らかにされていない (10)。

#### (4) Fbx110/Kdm2b

Fbx11 のパラログ Fbx110 (F-box and leucine rich-repeat protein 10, 別名 Kdm2b, Jhdm1b) は 2006 年に、Fbx11 と同様に H3K36me2/me1 に対する脱メチル化活性を持つことが示された (9)。また最近になり H3K4me3 に対する脱メチル化活性も有することが示された (14)。H3K4 および K36 のメチル化は転写の活性化標識であるため、それらの脱メチル化酵素である Fbx110 は標的遺伝子の転写を抑制すると考えられている。Fbx110 は N 末端付近の JmjC ドメインと CXXC 型、PHD 型の二つのジンクフィンガー、F-box ドメイン、ロイシンリッチリピート (LRR) を有する約 150kDa のタンパクである (図 I-5A)。Fbx110 には異なる転写開始点からコードされる 3 つの isoform が存在するが、これらは 2 つに大別できる。一つは JmjC、CXXC、PHD、F-box および LRR のモチーフ全てを有する完全長型 (full-length : FL-Fbx110)、もう一方は JmjC ドメインを含む N 末端領域が欠損した JmjC ドメイン欠損型 (short-form : SF-Fbx110) である (図 I-5A)。先行研究により FL-Fbx110 は細胞の増殖やアポトーシス、老化、腫瘍形成に関与することが示唆されてきたが、研究グループまたは用いる細胞種によって異なる結果が報告され、依然として議論の余地が残されている (14-18)。例えば、ウイルスによるランダムな変異導入によって、がんを頻発する変異マウスをスクリーニングし

た実験では一つのグループは Fbx110 をがん抑制遺伝子として同定し (17)、他の一つのグループは同じ方法で Fbx110 をがん遺伝子として同定した (18)。さらに細胞増殖に関しては、あるグループは FBXL10 が増殖抑制因子としての性質をもつことを、HeLa 細胞を用いた系で報告し (14, 15)、別グループは Fbx110 は増殖を促進することを、MEFs を用いた系で報告している (16, 18)。一方、SF-Fbx110 の生物学的機能はほとんど分かっていない。

このように議論が分かれつつも Fbx110 に関する知見は蓄積している。しかしヒストン修飾酵素である FL-Fbx110 が個体発生の過程でどのような役割を果たすのか、細胞の分化に関与するかについては未だ不明のままである。データベースによると Fbx110 は卵母細胞や受精卵、胚盤胞を含む初期胚において発現量が高いことが示されており、マウスの初期発生において重要な機能を持っていることが考えられた (図 I-5B)。そこで本研究では初期発生における Fbx110 の機能を、Fbx110 欠損マウスを作製することにより解析することを目的とした。作製した Fbx110 欠損マウスは、一定の浸透度で神経管閉鎖不全に起因する外脳症を呈し、このマウスは出生直後に死亡した。神経管が形成される時期の Fbx110 欠損胚では神経上皮細胞および神経堤細胞の細胞死が亢進しており、Fbx110 が胎生期の神経管形成に重要な役割を担っていることが示唆された。



遺伝子	機能	KO マウス表現型	疾患関連	文献
Dnmt1	DNA 維持メチル化	胎生致死 (E8.5)		49
Dnmt3b	DNA <i>de novo</i> メチル化	胎生致死、NTDs	ICF 症候群	31
Dnmt3l	インプリント形成	精子形成不全、NTDs		50
MeCP2	メチル化 DNA 結合	神経機能異常	Rett 症候群	51
G9a	H3K9 メチル化	胎生致死 (E8.5-12.5)		52
ESET	H3K9 メチル化	着床前後致死		53
Ezh2	H3K27 メチル化	胎生致死		54
NSD2	H3K36 メチル化	種々の発達障害 (骨・心臓)	Wolf-Hirshhorn 症候群	55
Prdm9	H3K4 メチル化	減数分裂不全、不妊		56
MLL5	H3K4 メチル化	雄性不妊、血球異常		57
Suv39h	H3K9 メチル化	発育遅延、ゲノム不安定化	がん	58
LSD1	H3K4/9 脱メチル化	胎生致死 (E7.5)		59
Jmjd1a	H3K9 脱メチル化	雄性不妊		60

表 I-1. DNA メチル化酵素およびヒストンメチル化修飾酵素群の機能、ノックアウトマウスの表現型および関連疾患

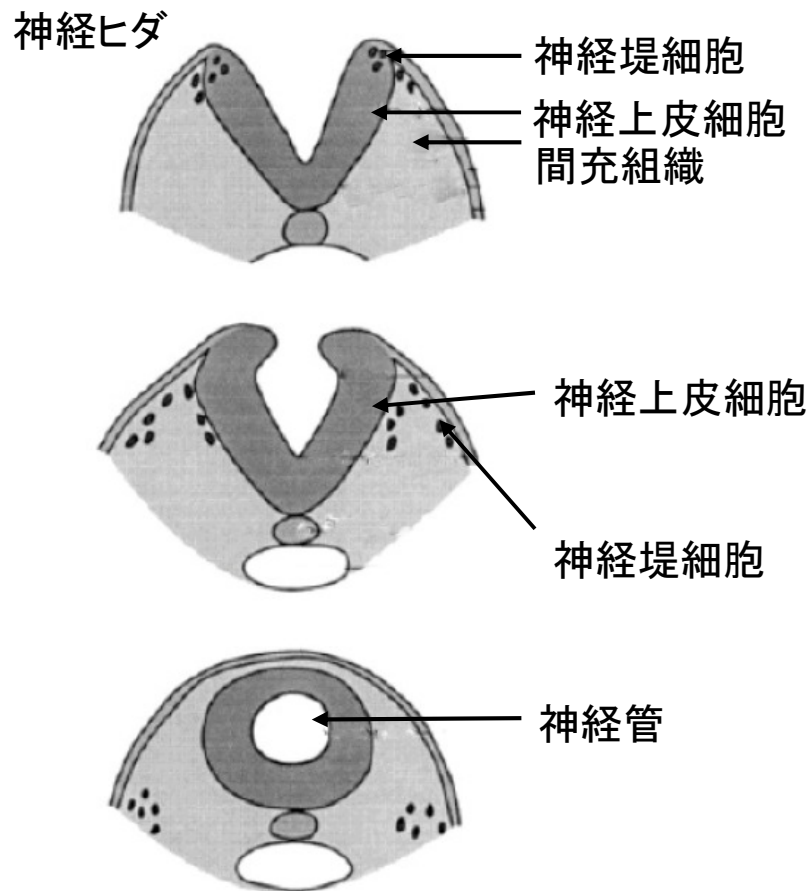


図 I-1. 神経管形成のモデル図 (文献 1 を改変)

神経管は神経ヒダの両端が立ち上がり、屈曲・近接し、融合することにより形成される。神経ヒダは神経上皮細胞と、この細胞を裏打ちする間充細胞から成る。神経ヒダの背側からは神経堤細胞が発生し、広範な体組織へと遊走していく。

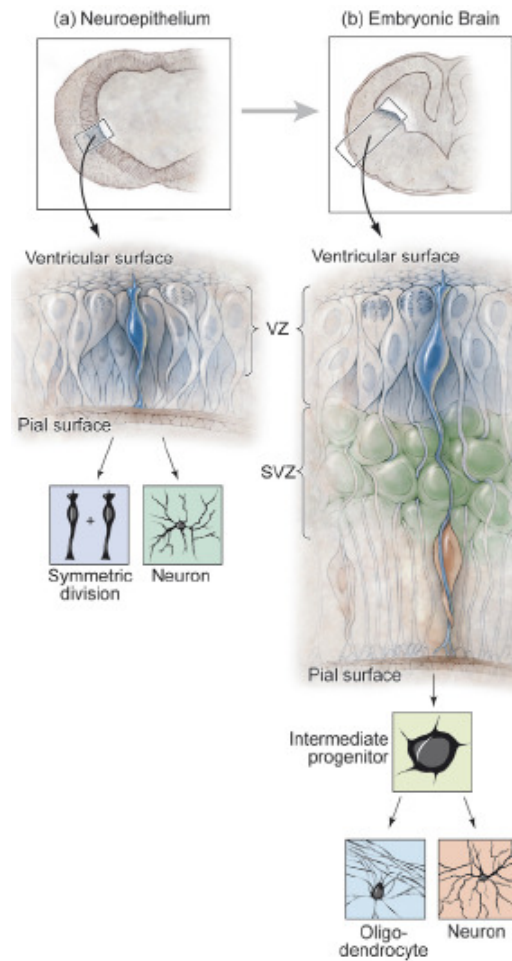
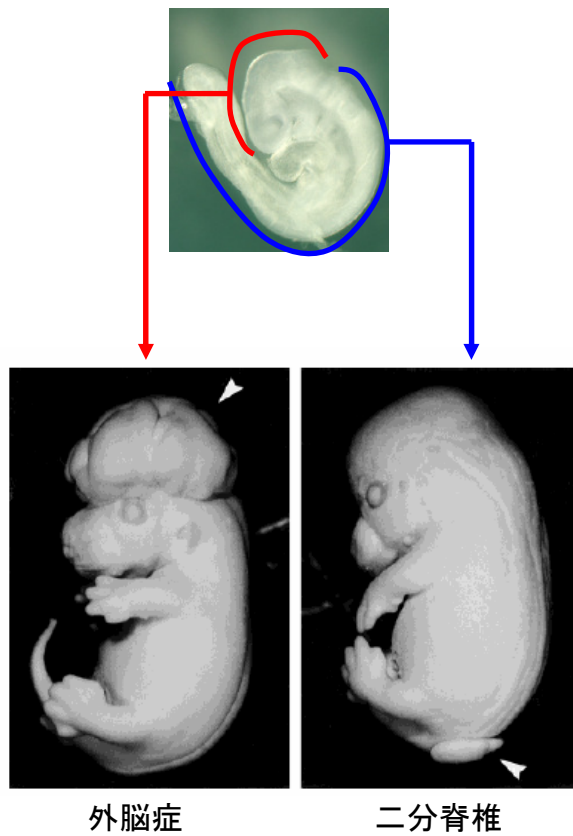


図 I-2. 胎生期における中枢神経系の発生 (文献 27 より抜粋)

神経管を形成する単層の神経上皮細胞は未分化な神経幹細胞集団から構成され、一部がニューロンに分化しながら自己複製を繰り返し、発生に十分な神経幹細胞プールを獲得する (左図)。その後、神経幹細胞は放射状グリア細胞 (radial glia) と呼ばれる神経前駆細胞へと形態を変化させ、脳室帯 (VZ) に限局しながら非対称な分裂によりニューロンやグリア細胞を産生する (右図)。



**図 I-3. 神経管閉鎖不全 (NTDs) (文献 1 を改変)**

神経管の閉鎖に失敗すると NTDs を引き起こす。頭部領域の NTDs は将来的に外脳症、尾部領域の NTDs は将来的に二分脊椎となって顕在化する。

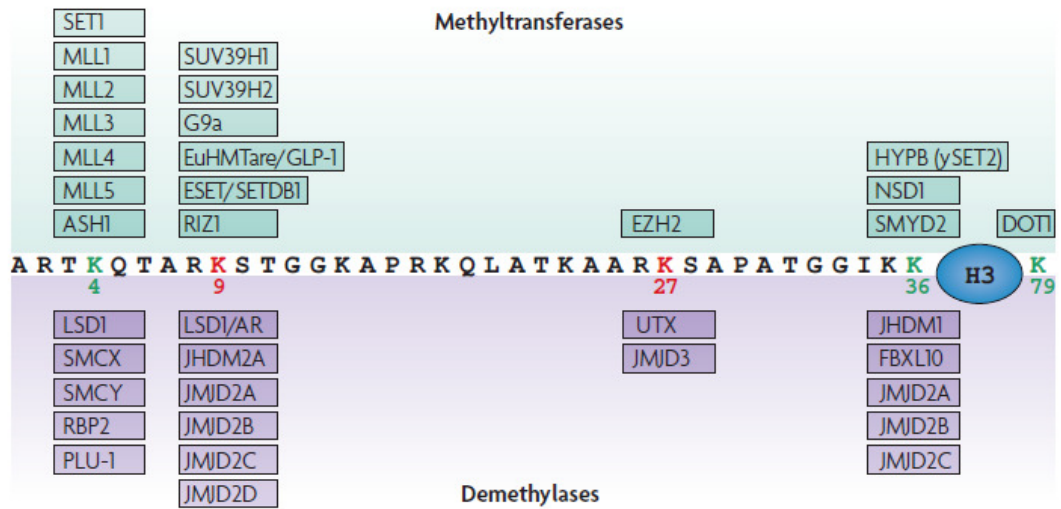


図 I-4. ヒストンのメチル化 (文献 10 より抜粋)

ヒストンのメチル化はメチル基が付加されるリジン残基の位置や、付加されるメチル基の数などによって近傍遺伝子の転写に与える影響が異なる。メチル化されるリジン残基はヒストン H3 内のリジン 4、9、27、36 および 79 が存在する。トリメチル化されたヒストン H3 リジン 4 (H3K4me3) や H3K36me3 は近傍遺伝子の転写活性化 (図中、緑字)、H3K9me3、H3K27me3 は近傍遺伝子の転写不活性化に関与している (図中、赤字)。ヒストンのメチル化状態はヒストンメチル化酵素群および脱メチル化酵素群によって制御され、それぞれの酵素は修飾リジン残基の位置に特異性をもつ。

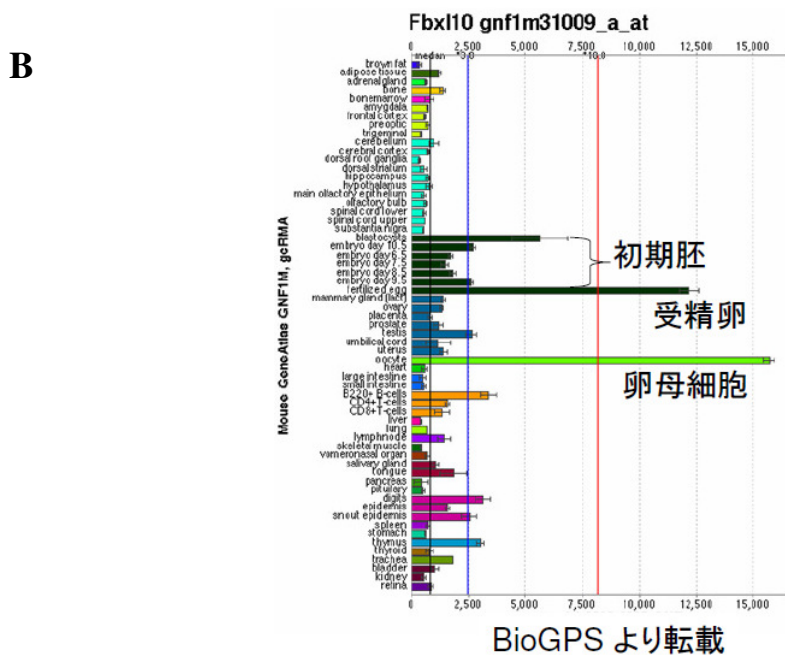
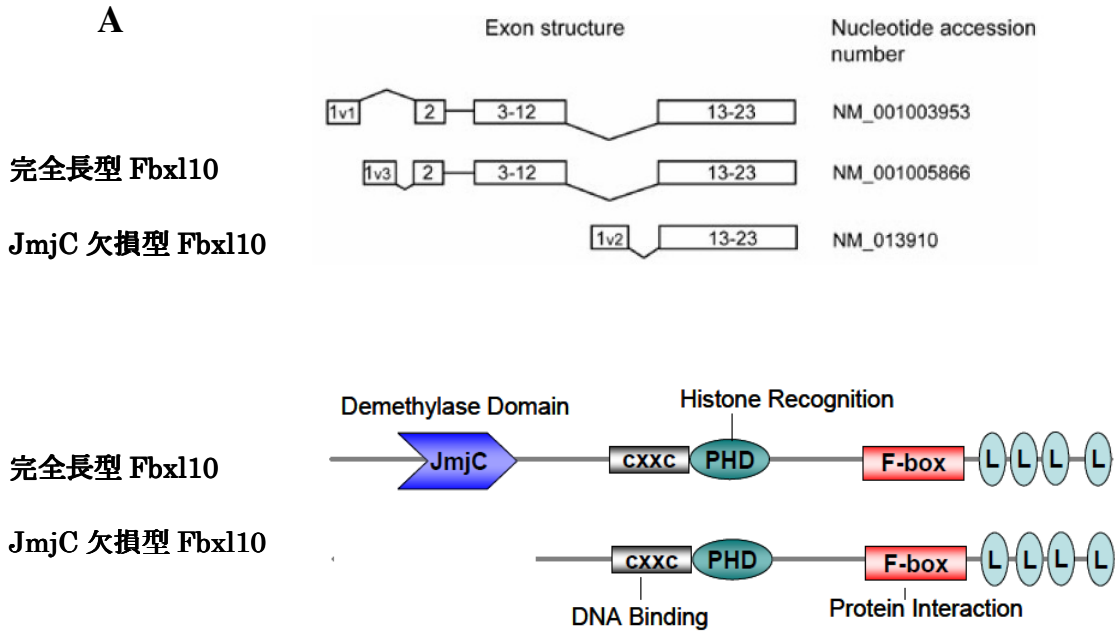


図 I-5. Fbx110 のエクソン構造とドメイン構造、および発現様式

(A) Fbx110 の 2 つの isoform。Fbx110 には完全長型と脱メチル化活性を有す JmjC ドメインが欠損した JmjC ドメイン欠損型の二種の isoform が存在する。

(B) BioGPS データベースにおける Fbx110 の組織・細胞別発現パターン。Fbx110 は卵母細胞や受精卵、胚盤胞を含む初期胚において発現量が高いことが示されている。

## II 実験材料と方法

### (1) 細胞の培養

細胞培養は全て 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で行った。E14.1 ES 細胞は、マウス胎仔繊維芽細胞(mouse embryonic fibroblasts : MEFs)をフィーダー細胞として、leukemia inhibitory factor (LIF)を添加した ES 細胞用培地 (DMEM [Nissui], 1 x 10<sup>-4</sup> M 2-mercaptoethanol : 2-ME, 0.45% Glucose, 0.06% L-Glutamine, 15% FCS)で培養した。

MEFs は胎生 13.5 日の C57BL/6J 胚より標準的な方法で調製し、10%FCS, 0.06% L-glutamine を含む DMEM にて培養した。

### (2) ベクターの構築

#### 【Fbx110 cDNA のクローニング】

E14.1 ES 細胞から単離した RNA より cDNA を作製し、完全長 Fbx110 の ORF (open reading frame) を PCR 法で増幅し、pBlueScript (Stratagene)にサブクローニングした。Fbx110 の ORF は以下のプライマーを用いて増幅した。

センスプライマー： 5'-GGATTCCATGGAGGCAGAGAAAGACTGTGG-3'

アンチセンスプライマー： 5'-GGAATTCTAACTTAGTTTTTGCAGGAGTTTCTC-3'

#### 【Fbx110 を標的とした shRNA 発現ベクター】

Fbx110 mRNA を標的とする shRNA 発現ベクターを作製した。FL-Fbx110 のみを標的としたベクター、SF-Fbx110 のみを標的としたベクター、FL-、SF-Fbx110 ともに標的としたベクターそれぞれ構築した。以下にその標的配列を示す。

shRNA-FL 5'-ATGGACTCACCTTACCGAA-3'

shRNA-SF 5'-GGACGACGACTATGAATCG-3'

shRNA-FL/SF 5'-GTTCTGCATCCCTTGTTGT-3'

これらの配列に対する shRNA を発現するオリゴヌクレオチドを pSIR (Clontech)ベクターの 3'LTR に配置したヒト H1 プロモーター下に挿入し shRNA 発現レトロウイルスベクターを作製した。コントロールとして GFP に対する shRNA (5'-GCGCGATCACATGGTCCTG-3')発現ベクターを用いた。

#### 【*Fbxl10* 遺伝子領域のクローニング】

*Fbxl10* 遺伝子の第 7 インترون内の領域 (660 bp) をプローブとして、129/SvJ マウス DNA フェージライブラリー (Stratagene #946313) をスクリーニングした。*Fbxl10* 遺伝子の構造についてはデータベースの情報 (Emsemble : EMSMUSG00000046073) を参照した。プローブは E14.1 ES 細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型にして、以下のプライマーを用いて PCR 法により増幅した。

センスプライマー： 5'-GTTGGTCACCCACCTGCCTCTAAGC-3'

アンチセンスプライマー： 5'-CAAAGCCAAGTTGTGCAGGGTTGG-3'

1 x 10<sup>6</sup> のプラークをスクリーニングして得られた陽性クローンのうち、*Fbxl10* の第 7 エクソンの前後約 7 kb (計 14 kb) を含む DNA 断片をスクリーニングにより単離し、pBluescript II SK (-) (Stratagene) にサブクローニングした。

#### 【*Fbxl10* ターゲティングベクター】

*Fbxl10* に対するターゲティングベクターを以下のように構築した。5' 側の相同領域として約 6.9 kb の *Sal*I - *Eco*RI 断片、3' 側の相同領域として約 1.8 kb の *Swa*I - *Xba*I 断片を、上記のライブラリースクリーニングによって得たゲノム断片から単離した。これらの断片をネオマイシン耐性遺伝子カセットと連結し、非相同組換え体を除くためにベクターの 3' 側相同領域の末端に diphtheria toxin A fragment (DT-A) 遺伝子を連結することでターゲティングベクターを作製した。



### (3) PCR 法による相同組換え体の同定

ES 細胞からゲノム DNA を Lysis Buffer 1 (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 0.01% gelatin, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20, 150 μg/ml proteinase K)により抽出し、PCR 反応の鋳型とした。PCR 反応に用いたプライマーと反応条件は以下の通りに行い、*Fbx110* ターゲティングにおける相同組換え体をスクリーニングした。

センスプライマー： 5'-CGTGCTTTACGGTATCGCCGCTGGCGATTC-3'

アンチセンスプライマー： 5'-GGCAATCTAGGCTACCTTAGACCCTGCC-3'

PCR 反応は (94°C、30 秒→72°C、3 分 30 秒) を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。

### (4) サザンプロット解析

サザンプロット解析は以下の方法で行った。ES 細胞またはマウスの耳断片からゲノム DNA を Lysis Buffer 2 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 20 mM EDTA, 1% SDS, 150 μg/ml proteinase K)により抽出し、フェノール/クロロホルム処理によって精製した。10 μg のゲノム DNA を *Sca* I 制限酵素で一晩完全消化し、0.6% アガロースゲルで電気泳動を行った後、アルカリ液 (0.4 M NaOH, 0.6 M NaCl)を用いてナイロン膜 (GeneScreen plus : PerkinElmer)に転写した。転写されたナイロン膜を 120 J/cm<sup>2</sup> の UV 照射により、DNA と架橋した後、ナイロン膜を中和液 (0.5 M Tris-HCl (pH 7.0), 1 M NaCl)で中和し乾燥し、ハイブリダイゼーション液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 M NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 10 x Denhardt's [0.2% Ficoll 400, 0.2% BSA, 0.2% polyvinylpyrrolidone 25], 350 μg/ml herring sperm DNA)にて 2 時間以上、プレハイブリダイゼーションを行った。BcaBEST Labeling kit (TaKaRa) を用いて[α-<sup>32</sup>P]dCTP (Amersham Pharmacia biotech または PerkinElmer)にて標識したプローブを 1 x 10<sup>6</sup> cpm/ml となるように加え、65°Cで一晩インキュベートした。ナイロン膜を洗浄液 (1 x SSC [15 mM Na<sub>3</sub>Citrate, 150 mM NaCl], 0.1% SDS) で洗浄後、Imaging Plate (Amersham Pharmacia biotech)に露光し、Typhoon 9410 (Amersham

Pharmacia biotech)によりシグナルを検出した。

### (5) Fbx110 欠損マウスの作製

*Fbx110* ターゲティングにおける相同組換え ES 細胞の選別を以下の方法で行った。20  $\mu$ g のターゲティングベクターを制限酵素で線状化し、エレクトロポレーション法によって  $1.0 \times 10^7$  の ES 細胞に導入した (230 V、500  $\mu$ F)。この ES 細胞をネオマイシン耐性のフィーダー細胞上に播き、24 時間後に G418 (400  $\mu$ g/ml, ナカライ)を添加し、8 日間培養した後、形態的に未分化状態を維持した細胞の多いコロニーをガラスキャピラリーでピックアップした。クローン化したこれらの ES 細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR 法によるスクリーニングを行い、サザンブロット解析により相同組換え体を同定した。相同組換えを起こした ES 細胞クローンを C57BL/6J マウスの胚盤胞にインジェクションし、その胚盤胞を偽妊娠 MCH マウス (日本クレア)の子宮に移植し、キメラマウスを作製した。誕生したキメラマウスの内、毛色の Agouti 色の割合が高い雄マウスを C57BL/6J 雌マウスと交配させた。この交配から得られたマウスの内、毛色が Agouti であるものを選び、生後 20 日の耳部より抽出したゲノム DNA に対して、PCR およびサザンブロット解析を行い *Fbx110*<sup>+/-</sup>マウスが誕生したことを確認した。得られた *Fbx110*<sup>+/-</sup>マウス同士を交配させ、*Fbx110*<sup>-/-</sup>マウスが誕生したことを確認した。PCR 反応に用いたプライマーは以下の通りである。

P1 : 5'-GCCTAACAAGAACTCCCTGCTCCCCACAT-3'

P2 : 5'-CCTTCCTCTGGAGACATTCGAATGTCTTCC-3'

P3 : 5'-CGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTC-3'

マウスは室温  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 40~60%の動物室内で、明暗周期を 12 時間に設定し、SPF 環境で飼育した。また本研究における全ての動物実験は、東京大学動物実験実施マニュアルに基づいて行った。

## (6) 胎生解析

Fbx110<sup>+/-</sup>マウス同士を交配させ、臍栓を確認した日の正午を受精後（胎生: E）0.5 日とした。受精後 8.5~18.5 日目の妊娠マウスを解剖し、胎児を取り出した。胎児の遺伝子型は卵黄囊または尾部より抽出したゲノム DNA に対し、PCR 反応を行い同定した（P1、P2 および P3 プライマー）。

## (7) 免疫組織学的解析

取り出した Fbx110 変異胚は PBS で洗浄した後、速やかに 4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定時間は E8.5 胚では 2~3 時間、E9.5 胚では 4~6 時間、E10.5 以降の胚は一晩、4℃にて固定した。固定した胚は段階的にエタノールで脱水し、キシレンに透徹した後、パラフィンに包埋した。作製したパラフィンブロックより、マイクロトームを用いて切片を作製した。切片厚はヘマトキシリン-エオシン（H&E）染色や免疫染色、TUNEL 解析を行う場合は 7  $\mu$  m に、*in situ* ハイブリダイゼーションを行う際は 10  $\mu$  m に設定した。作製した切片はキシレンでパラフィンを除去した後、段階的にエタノール濃度を下げ、親水化した。10 mM のクエン酸ナトリウム溶液（pH 6.0）内でマイクロウェーブ処理を行い、抗原を賦活化した後、ブロッキング溶液（0.5% blocking reagent (Roche) in PBST）とインキュベートし、続いて一時抗体と 4℃で一晩インキュベートした。二次抗体には Alexa Fluor 抗体（1:500; Molecular Probes）を用いて BZ-9000 蛍光顕微鏡下（キーエンス）でシグナルを検出した。用いた抗体と希釈濃度は以下の通りである。抗  $\beta$  III-tubulin 抗体（Tuj1, mouse, 1:1000; Covance）、抗 phospho-histone H3 抗体（PH3, mouse, 1:500; Cell Signaling）、抗 BF1 抗体（FOXG1, rabbit, 1:500; Abcam）、抗 FGFR2 抗体（Bek, rabbit, 1:300; Santa Cruz）、抗 TBR2 抗体（rabbit, 1:500; Abcam）、抗 SOX2 抗体（rabbit, 1:500; CHEMICON）、抗 SOX10 抗体（goat, 1:200; R&D Systems）。

## **(8) TUNEL 解析**

組織切片および培養細胞における細胞死は *in situ* 細胞死検出キット・フルオレセイン (Roche)を用いて検出した。概略は以下の通りである。組織切片は親水化した後、マイクロウェーブ処理を行い、続いて 10%ヒツジ血清でブロッキングした。この切片を、TdT を含む TUNEL 反応液と 37°Cで一時間インキュベートし、シグナルを蛍光で観察した。培養細胞に対しては  $2 \times 10^4$  の MEFs を CultureSlides (FALCON)上で 24 時間培養した後、スライド上の細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 1 時間固定し、0.1% Triton-X100 で浸透化した。このスライドを TUNEL 反応液とインキュベートし、シグナルを観察した。

## **(9) BrdU 標識**

Bromodeoxyuridine (BrdU, Sigma)による S 期の細胞標識は以下の通りに行った。妊娠マウスに対し、体重 20 g あたり 1 mg の BrdU を腹腔内注射により投与した。一時間後、母獣から胎児を取り出し、速やかに固定し、パラフィンに包埋した。7  $\mu$  m の切片を作製し、親水化した後、2N HCl で 37°C、30 分処理し、DNA を分断、単鎖化した。続いて 20  $\mu$  g/ml Proteinase K で 10 分間、0.1% Triton X-100 で 10 分間処理することで、細胞を浸透化した後、抗 BrdU 抗体 (mouse, 1:20, Roche)と 4°Cで一晩インキュベートした。二次抗体には Alexa Fluor 488 抗体 (1:500; Molecular Probes)を用い、蛍光顕微鏡下でシグナルを観察した。

## **(10) WST-1 を用いた細胞増殖解析**

培養細胞の細胞増殖は細胞増殖試薬 WST-1 (Roche)を用いて測定した。 $5 \times 10^3$  の MEFs を 96 well プレートに播き、48 時間培養した。その後、各 well にテトラゾリウム塩である WST-1 試薬を 10  $\mu$  l 加え 4 時間発色反応を行った。細胞内の脱水素酵素によるテトラゾリウム塩の還元によって生成されたホルマザン色素を 450 nm の吸光度を測定することで定量した。

### (11) In situ ハイブリダイゼーション

Fbx110 のセンスおよびアンチセンス cRNA プローブは以下の通り作製した。FL-Fbx110 に固有の cDNA 領域 (185-686) を pBlueScript にサブクローニングし、cRNA プローブの鋳型とした。FL-Fbx110 に特異的に相互作用するセンスおよびアンチセンス cRNA プローブは DIG RNA ラベリングキット (Roche) を用いて作製した。

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションは以下の通り行った。E8.5~10.5 の C57BL/6J マウスを取り出し、4℃下、4%パラホルムアルデヒドで固定した (E8.5 胚は2時間、E9.5 胚は4時間、E10.5 胚は8時間~一晚)。固定した胚をエタノールで脱水し、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で漂白した後、親水化し、10 μg/ml の Proteinase K で浸透化処理を行った (E8.5 胚は6分、E9.5 胚は10分、E10.5 胚は15分、常温)。この胚をハイブリダイゼーション溶液 (50% formamide, 5 x SSC, 100 μg/ml tRNA, 50 μg/ml heparin, 5 mM EDTA, 0.1% Tween20, 0.1% CHAPS) で一時間以上プレハイブリダイゼーションを行い 1 μg/ml となるようにジコキシゲニン (DIG) 標識したプローブを加え、65℃で一晩インキュベートした。プローブを洗浄後、0.5% blocking reagent でブロッキングを行い、AP 標識抗 DIG 抗体と 4℃で一晩インキュベートした。AP (アルカリフォスファターゼ) の活性を DIG nucleic acid Detection Kit (Roche) を用いて検出した。切片に対する *in situ* ハイブリダイゼーションは以下の通り行った。親水化した切片を 5 μg/ml Proteinase K で15分間浸透化し、500 ng/ml のプローブを含むハイブリダイゼーション溶液と一晚インキュベートした。その後の工程はホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションと同様に行った。

### (12) レトロウイルスの感染

shRNA を発現させる際のレトロウイルス感染は以下の方法で行った。5 x 10<sup>5</sup> の 293T 細胞を 35 mm ディッシュに播き、一晚培養した後、1.0 μg のレトロウイルスベクターと 1.0 μg の pPAMpsi2 を Gene Juice (Novagen) を用いてリポフェクションした。24 時間後、培地交

換し、さらに 24 時間培養した。レトロウイルスを含むこの培地上清を濾過し、ポリブレンを 8  $\mu$ g/ml となるように加えたものをウイルス感染溶液とした。6 x 10<sup>5</sup> の MEFs にこのウイルス感染溶液を加え、ウイルスを感染させた。24 時間後に G418 (400  $\mu$ g/ml)を加え、感染細胞を薬剤選択した。

### (13) ノザンプロット解析

Total RNA はセパゾール RNA I (ナカライ)を用いて ES 細胞またはマウス組織から抽出した。5  $\mu$ g の total RNA を蒸発固化し、変性溶液 (7.4% formaldehyde, 60% formamide, 50 mM NaPO<sub>4</sub> (pH 7.0))に溶かし、65°Cで 10 分間熱変性させた後、1% アガロースゲル (5.3% formaldehyde, 20 mM NaPO<sub>4</sub> (pH 7.0)) で電気泳動を行い、ナイロン膜 (Gene Screen plus : PerkinElmer)に転写した。転写されたナイロン膜を 120 J/cm<sup>2</sup> の UV 照射により RNA と架橋した後、0.02% メチレンブルーで染色した。ナイロン膜を乾燥後、ハイブリダイゼーション液 (500 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.2), 7% SDS, 1 mM EDTA)で 30 分間以上プレハイブリダイゼーションを行い、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTPにて標識したプローブを 1 x 10<sup>6</sup> cpm/ml となるように加え、65°Cで一晩インキュベートした。ナイロン膜を洗浄液 (1% SDS, 40 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.2)) で洗浄後、Imaging Plate (Amersham Pharmacia biotech)に露光し、Typhoon 9410 (Amersham Pharmacia biotech)によりシグナルを検出した。

### (14) 抗 Fbx110 抗体の作製

抗原として以下の合成ペプチドを用いた。

CGQVEEKLLQKLS (C 末端)

合成ペプチドをキャリアであるヘモシアニンに結合させてウサギ (JW/♀)に免疫した。得られた抗血清を、抗原ペプチドを固定したアフィニティーカラムを用いて精製し、Fbx110 特異的抗体を得た。

### **(15) SDS-PAGE とウエスタンブロット解析**

核および細胞質分画のタンパク抽出液は NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent (Thermo Scientific)を用いて抽出した。タンパク濃度はブラッドフォード法により、Protein Assay キット (Bio Rad) を用いて 595 nm の吸光度を測定して算出した。

SDS-PAGE は以下の方法で行った。10  $\mu$ g の核タンパク抽出液を SDS-PAGE loading buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% Glycerol, 2% SDS, 0.3% BPB, 1.6 M 2-ME)に懸濁し 100°Cで 2 分間処理した。その試料を泳動バッファー (25 mM Tris, 200 mM Glycine, 0.1% SDS)中で濃縮ゲル (4.5% polyacrilamide, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS)にて濃縮し、分離ゲル (6~15% polyacrilamide, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 5% Glycerol)で分離した。ゲルを transfer buffer (48 mM Tris, 39 mM Glycine 20% Methanol)に浸し、1.5 mA/cm<sup>2</sup>で通電することにより PVDF (polyvinylidene fluoride)膜に転写した。転写した PVDF 膜上のタンパクは抗 Fbx110 抗体 (1:200)、抗 p19ARF 抗体 (rabbit, 1:500, Abcam)および抗 CREB 抗体 (rabbit, 1:500, SantaCruz)を用いて ECL システム (Amersham Pharmacia biotech)により生じた発光を FUJI MEDICAL X-RAY FILM (FIJIFILM)に露光してシグナルを検出した。

### **(16) 定量的 RT-PCR 解析**

E8.5 胚および MEFs の Total RNA はそれぞれ FastPure RNA Kit (TaKaRa)およびセパゾール RNA I を用いて抽出した。非特異的な PCR 増幅を防ぐため、RNA 溶液は DNase I 処理を施した。鋳型となる cDNA は 200 ng~1000 ng の Total RNA から High Capacity RNA to cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems)を用いて合成した。リアルタイム PCR 反応は Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)を用いて行い、StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて解析した。サンプル間の遺伝子発現量の差は検量線に

よる相対定量法を用いて評価した。プライマーは以下のものを用いた。

表. 定量的 RT-PCR に用いたプライマーの配列または由来

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
full-length Fbx110	gtttcactgacttccacattgacttt	gcagggttggagggatcag
short form of Fbx110	ccgaggacgacgactatgaatc	acctccaaacttctcatgtcctt
p15INK4b	agatcccaacgcctgaac	cccatcatcatgacctggatt
p16INK4a	cccaacgccccgaact	aacggtgcccatcatcatca
p19ARF	gctctggctttctgtaacatg	tcgaatctgcaccgtagttgag
pre-rRNA	cgcctgcactctcccgtt	ccaggttaagggagcgcga
Ring1B	acggacccaaaacctctgatg	ggagccatttaaacggtga
Ezh2	actgctggcaccgtctgatg	tcctgagaaataatctccccacag
Gapdh	ccagcctcgtcccgtaga	cgcccaatacggccaaa
Fbx111	QuantiTect Primer Assay (Qiagen, QT01062166)	
c-jun	QuantiTect Primer Assay (Qiagen, QT00296541)	



### III 結果

#### (1) 初期胚、および成体マウス組織における Fbxl10 mRNA の発現解析

マウスの初期発生における Fbxl10 の発現様式を確認するため、胎生 (E)8.5~18.5 日胚より RNA を抽出し、ノザンブロット解析を行った。その結果、完全長型である FL-Fbxl10 と JmjC 欠損型である SF-Fbxl10 に対応する 2 つのシグナルが検出された (図 1)。FL-Fbxl10 は ES 細胞や E8.5 胚において発現量が高く、胎齢の経過にしたがって発現量が低下した。一方、SF-Fbxl10 は調べた全てのステージにおいて明瞭なシグナルが検出できたが、特に E12.5~14.5 において発現量が高いことが分かった。Fbxl10 のパラログである Fbxl11 の発現はユビキタスであった (図 1 上)。

同様に成体マウス (生後 10 週齢) の各組織より RNA を抽出し、ノザンブロット解析を行った。FL-Fbxl10 は胸腺や脳、脾臓で発現が確認できたほか、精巣において顕著に高い発現が見られた。SF-Fbxl10 と Fbxl11 はどの組織においても発現が確認できた (図 1 下)。

このことから FL-Fbxl10 はマウス発生の初期において発現量が高く、この時期において何らかの役割を持っていることが考えられた。そこで FL-Fbxl10 がマウスの初期発生においてどのような機能を果たしているかを調べるため、FL-Fbxl10 欠損マウスの作製を試みた。以下、特に記載のない場合は Fbxl10 とは FL-Fbxl10 を意味することとする。

#### (2) Fbxl10 欠損マウスの作製

初期発生における Fbxl10 の機能を解析するため、ジーンターゲティング法を用いて Fbxl10 欠損マウスを作製した。ターゲティングでは FL-Fbxl10 のヒストン脱メチル化活性を欠損させることを目的とした戦略をとった (図 2A)。ヒストン脱メチル化活性を持つ JmjC ドメインはエクソン 5 からエクソン 9 にわたりコードされている。JmjC ドメインの活性中心を担うアミノ酸は His 211 と Glu 213、His 283 であるが、このうち His 211 と Glu 213 はエク

ソン 7 にコードされている (16)。そこでエクソン 7 とエクソン 8 を含む領域をネオマイシン耐性遺伝子に置き換え、同時にフレームシフトを起こし、エクソン 7 以降のタンパクが正常にコードされないようにした (エクソン 7 および 8 がスキップされるとエクソン 9 で終始コドンが現れる)。作製したターゲティングベクターを ES 細胞に導入し、G418 で薬剤選択した後、コロニーをピックアップし、PCR 法によるスクリーニングを行い、サザンブロット解析によって相同組換え体を同定した。612 個のクローンをスクリーニングした中で 5 個が *Fbxl10* 遺伝子座で相同組換えを起こした ES 細胞クローン (*Fbxl10*<sup>+/-</sup>) であった。*Fbxl10*<sup>+/-</sup> ES 細胞を C57BL/6J 由来の胚盤胞にインジェクションし、キメラマウスを得た。誕生したキメラマウスは生殖細胞系列伝播に成功し、*Fbxl10* ヘテロ欠損マウスが得られた。誕生した *Fbxl10* ヘテロ欠損マウスは雌雄ともに外観上、正常で生殖可能であった。得られた *Fbxl10*<sup>+/-</sup> マウス同士を交配させ、*Fbxl10* ホモ欠損 (-/-) マウスが得られたことを PCR およびサザンブロット解析で確認した (図 2B)。また、*Fbxl10*<sup>-/-</sup> マウスの胸腺より核タンパクを抽出し、抗 *Fbxl10* 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行い、*Fbxl10*<sup>-/-</sup> マウスにおいて FL-*Fbxl10* が消失していることを確認した (図 2C)。同時にこのターゲティング戦略では FL-*Fbxl10* とは転写開始点の異なる SF-*Fbxl10* の発現に影響を与えないことが確かめられた (図 I-1 および図 2C)。

### (3) *Fbxl10* 欠損マウスの表現型

*Fbxl10*<sup>+/-</sup> 同士の交配より得られた子孫の中には *Fbxl10*<sup>-/-</sup> マウスが存在していた。このことから *Fbxl10* は一見、マウスの初期発生にとって必要でないことが疑われた。しかし、これらの子孫の遺伝子型を生後 20 日の段階で調べたところ、*Fbxl10*<sup>-/-</sup> マウスの割合がメンデルの割合よりも明らかに少ないことがわかった (表 1、333 匹中 31 匹)。このことから、*Fbxl10*<sup>-/-</sup> マウスの多くが胎生期または生後 20 日までの間に死亡していることが考えられた。そこで発生のどの時期に *Fbxl10*<sup>-/-</sup> マウスが致死となっているかを調べるため、E18.5 胚に対し胎生解析を行った。すると一部の *Fbxl10*<sup>-/-</sup> マウスが外脳症 (exencephaly) を呈していることが分か

った (図 3)。これらのマウスは蘇生不可能で (他のマウスは E18.5 の段階では呼吸を誘発することで蘇生が可能である)、摘出後、間もなく死亡した。また、頭部からの出血のため、全身が青白く、体の大きさも同腹仔より小さかった (図 3A)。

一般的に外脳症は胎生期の神経管閉鎖不全 (neural tube defects, NTDs)によって引き起こされる (1-4)。そこで Fbx110 欠損胚に見られた外脳症が胎生期の NTDs によるものかを調べるため、頭部神経管が閉鎖した直後である E9.5 胚を観察した。するとコントロールの Fbx110<sup>+/+</sup>胚では正常に神経管が形成されているのに対し、一部の Fbx110 欠損胚では神経ヒダが開いたままであった (図 4A,B)。同様の現象は E10.5 でより顕著に現れ、コントロールでは脳胞構造が形成されているのに対し、Fbx110 欠損胚では依然として神経ヒダが閉鎖していなかった (図 4C,D)。E14.5 では外脳症としての表現型が明瞭に確認できた (図 4E,F)。様々な時期において同様の胎生解析を行い、胎児の遺伝子型と表現型を解析したところ、E9.5 以降の全てのステージにおいて Fbx110 欠損胚における NTDs が観察され、その割合は約 44% (40/91)であった (表 1)。さらに Fbx110 欠損胚は外脳症以外にも網膜欠損 (Retinal Coloboma) や巻き尾 (Curled Tail)を呈しており、その浸透率はそれぞれ、約 40% (12/30)と 10% (3/30)であった (図 4F)。一般的に網膜欠損は、神経管由来の構造である眼杯裂の閉鎖不全によって引き起こされる (42)。また巻き尾は NTDs を引き起こすマウスにおいてしばしば見られる表現型であり、尾部神経管の形成異常が原因であると考えられている (43)。また巻き尾は NTDs を回避し生存した成体 Fbx110<sup>-/-</sup>マウスにおいても確認された (図 4G、31 匹中 2 匹)。以上の結果から、Fbx110 は胎生期の神経管形成に必要な遺伝子であることが明らかとなった。

#### (4) Fbx110 欠損胚の組織学的解析

Fbx110 欠損胚の表現型をより詳細に解析するため、E14.5 のコントロール(Fbx110<sup>+/+</sup>)および Fbx110 欠損胚の頭部切片を作製し、組織学的解析を行った。図 5A に示された位置での冠状切片を作製し、ヘマトキシリン-エオシン (H&E)染色を施した。前脳付近では Fbx110 欠

損胚の側脳室において構造異常が確認され、脳組織は表皮によって覆われていなかった (図 5B-E)。またコントロール胚には存在しない異常組織が頭頂部を覆っている様子が観察された (図 5C、矢じり)。後脳付近での冠状切片を観察すると、コントロールでは神経管由来の中脳胞および第 4 脳室が観察されるが、Fbx110 欠損胚では NTDs によってこれらの構造が完全に欠損していた (図 5F-I)。さらに閉鎖しなかった中・後脳の神経上皮細胞が反転、肥大化し、脳全体を覆っている様子が確認できた。この現象は別個体から作製した矢状切片および水平断切片でも見ることが出来た (図 6J-M)。反転・拡大した異常脳組織が中・後脳由来であることを確かめるため、冠状切片に対し、免疫染色を行った。この異常脳組織は前脳特異的マーカーである BF1 陰性だったが、ニューロンマーカーTuj1 陽性であった (図 7A-D)。さらに神経前駆細胞マーカーの FGFR2 陽性の細胞と、分裂期細胞マーカーである PH3 (phospho-histone H3)陽性の細胞を含んでおり、増殖能の高い神経前駆細胞が存在することが示唆された (図 7E-H)。このことから、Fbx110 欠損胚に見られる異常脳組織は中・後脳領域の神経上皮細胞が反転、肥大化した結果、生じたものであることが確かめられた。Fbx110 欠損胚は網膜欠損を呈したが、眼部の切片を作製したところ、神経上皮細胞由来の神経網膜が肥大化し、水晶体の大きさは減少していた (図 6N, O)。

以上の結果から Fbx110 は脳および神経網膜の正常な発生に必要であることが明らかとなった。また Fbx110 欠損胚では神経前駆細胞の肥大化が見られたことから、Fbx110 がこれらの細胞の増殖を負に制御していることが考えられた。

##### **(5) 初期胚における Fbx110 の時空間的発現パターン解析**

これまでに数多くの遺伝子変異マウスが NTDs を呈することが示されているが、それらの遺伝子のほとんど全ては胎生期の神経上皮細胞において発現している (4)。特に外脳症を引き起こす場合は頭部の神経上皮細胞に高発現している場合が多い (4)。そこで Fbx110 が胎生期の頭部神経上皮細胞に発現しているかを調べるため、神経管が形成される E8.5~10.5 の時

期の C57BL/6J (野生型)胚に対し、*in situ* ハイブリダイゼーション (ISH)解析を行った (ホールマウントおよび切片)。その際、Fbx10 プローブは FL-Fbx10 に特異的に相互作用する様に作製した。その結果、E8.5 胚において Fbx10 mRNA は頭部の神経上皮細胞特異的に発現していることを明らかにした (図 8A)。また、神経堤細胞が発生する神経ヒダの先端において特にシグナルが強いことから、Fbx10 は神経堤細胞においても発現していることが予想された。そこで、E8.5 胚の切片を作製し、Fbx10 に対する ISH と神経堤細胞のマーカーである Sox10 および FGFR2 免疫染色の三重染色を行った。その結果、Fbx10 は神経上皮細胞以外にも神経堤細胞および周囲の間充織細胞に発現していることが分かった (図 8B)。同様の実験を E9.5 胚に対して行ったところ、この時期においても Fbx10 の発現は頭部の神経上皮細胞と神経堤細胞、周囲間充織細胞に限局されていた (図 8C, D)。ところが E10.5 になると、Fbx10 の発現は全身の神経上皮細胞に分布するようになり、眼杯において強いシグナルが生じるようになった (図 8E, F)。Fbx10 センスプローブでは E10.5 の耳胞以外に、上記の試料においてシグナルは検出されなかった (図 8G)。頭部神経管は E9.0~9.5 の間に閉鎖し、尾部神経管は E10.0~10.5 の間に閉鎖する。よって Fbx10 mRNA の発現パターンは Fbx10 欠損マウスに見られた頭部 NTDs や巻き尾、さらには網膜欠損といった表現型を説明するのに合理的なものである。また E14.5 胚の脳において Fbx10 は神経前駆細胞が存在する脳室帯において強く発現していた (図 9)。以上の結果から Fbx10 は胎生期の神経上皮細胞および神経堤細胞に強く発現しており、これらの細胞において何らかの役割を担っていることが予想された。

#### **(6) E9.5 の Fbx10 欠損胚における細胞増殖、分化および細胞死**

神経管形成は神経ヒダ両端の「立ち上がり」、「屈曲」、「融合」といった多段階からなる複雑な形成過程を経る。したがって正常な神経管の形成には神経ヒダを構成する神経上皮細胞と、神経ヒダを裏打ちする神経堤細胞を含む間充織細胞の増殖やアポトーシス、神経分化が絶妙なバランスで制御されていることが必須である (1-4)。一方でヒト FBXL10 は c-Jun の発現抑

制を介して、細胞の増殖およびアポトーシスを負に制御することが報告されている (15)。そこで Fbx110 欠損マウスに見られた NTDs の発生機構を調べるため、E9.5 胚の組織切片を作製し Fbx110 欠損胚の増殖、アポトーシスおよび神経分化をそれぞれ、リン酸化ヒストン H3 抗体 (PH3 : 分裂期細胞マーカー) による免疫染色、TUNEL 解析およびニューロンマーカー Tuj1 による免疫染色で評価した。胎児はコントロール (Fbx110<sup>+/+</sup>)、NTDs を回避した Fbx110 欠損胚および NTDs を呈した Fbx110 欠損胚を用いた。Fbx110 欠損胚を二種類に分けたのは現れた表現型が Fbx110 の欠損によって生じた現象か、NTDs によってもたらされた二次的な現象かを判定するためである。分裂期の細胞数および神経分化についてはコントロールと Fbx110 欠損胚において顕著な差は見られなかった (図 10)。しかしアポトーシスを起こしている細胞数はコントロールに比べ、Fbx110 欠損胚において有意に亢進していた (図 11A-D)。この現象は NTDs の有無に関わらず確認された。次にアポトーシスの亢進が生じている細胞種を同定するために、神経上皮細胞と神経堤細胞を染色できる FGFR2 と TUNEL の二重染色を行った。その結果、細胞死の亢進は主に神経上皮細胞と神経堤細胞および周囲間充織細胞で生じていることが明らかとなった (図 11E-G)。これらの結果から Fbx110 は胎生期の神経上皮細胞および神経堤細胞のアポトーシスを負に制御していることが示唆された。また Fbx110 欠損胚に見られる NTDs の直接的原因はこのアポトーシスの亢進である可能性が示唆された。

#### **(7) E14.5 における Fbx110 欠損胚の細胞増殖、分化および細胞死**

ヒト FBXL10 は標的遺伝子として c-Jun のや rRNA の転写を抑制することで細胞増殖を抑制していることが報告されている (14, 15)。本研究においても Fbx110 欠損胚において中・後脳および神経網膜の肥大化が確認された。また E9.5 の組織切片においても有意な差ではないが、わずかに Fbx110 欠損胚において分裂期の細胞数が多く観察された。これらのことから私は Fbx110 の欠損は神経前駆細胞の増殖能亢進を引き起こしていることを予想した。そこで、この仮定を検証するため、神経細胞の肥大化が確認された E14.5 日胚の前脳組織切片を作製

し、Fbx110 欠損胚の増殖、アポトーシスおよび神経分化を III-6 と同様の方法で評価した。その結果、コントロールに比べ Fbx110 欠損胚では、脳室帯 (FGFR2 陽性の領域) に存在する神経前駆細胞中の分裂期細胞数が有意に増加していた (図 12A-C)。この現象は外脳症を呈す・呈さないに関わらず見られた。脳室帯規定膜 1 mm あたりの PH3 陽性細胞数を測定したところ、コントロールに比べ、Fbx110 欠損胚では外脳症を持たない個体で 1.7 倍に、外脳症を持つ個体で 2.1 倍に増加していた (図 12D)。次に神経分化を神経前駆細胞マーカーである FGFR2 とニューロンマーカーである Tuj1 との二重染色で評価した。外脳症を持つ Fbx110 欠損胚では大脳皮質における Tuj1 陽性の領域が有意に減少し、FGFR2 陽性の領域が拡大していた (図 12E-H)。しかし、外脳症を回避した Fbx110 欠損胚ではコントロールと同程度の割合で Tuj1 陽性の領域が存在した。このことは外脳症を呈す Fbx110 欠損胚に見られた Tuj1 陽性領域の減少は Fbx110 の欠損によって引き起こされたのではなく、NTDs により二次的に誘発された現象であることを意味する。神経前駆細胞 (Radial glial cells) は中間体前駆細胞 (Intermediate neural progenitor cells, INPs) を経ることで神経細胞 (neuron) へと分化する (27)。そこで神経前駆細胞から INPs への分化に対する Fbx110 の影響を評価するため、INPs のマーカーである Tbr2 で免疫染色を行った。Tbr2 陽性の細胞数と染色パターンはコントロールと Fbx110 欠損胚間で顕著な差は見られなかった (図 12I, J)。またこの時期の胚ではアポトーシスを起こしている細胞数はコントロールと Fbx110 欠損胚間でほとんど差は見られなかった (図 14A, B)。

次に神経網膜の細胞増殖を BrdU による S 期の細胞標識で評価した。Fbx110 欠損胚では BrdU 陽性の S 期細胞数がコントロール胚に比べ、有意に増加していた (図 13A-C)。一方、網膜の神経分化パターンを Tuj1 と神経前駆細胞マーカー Sox2 による免疫染色で評価したところ、Tuj1 および Sox2 陽性領域の割合はコントロールと Fbx110 欠損胚間で同程度であった (図 13D, E)。また細胞死の割合は個体間での変動が大きいものの Fbx110 欠損胚においてアポトーシスを起こしている細胞が多く観察された (図 14C, D)。

以上の結果をまとめると、この時期の胚において **Fbxl10** の欠損は、脳および眼における神経前駆細胞の増殖亢進を引き起こすことが明らかとなり、**Fbxl10** が増殖抑制因子としての機能を果たしていることが示唆された。一方で **Fbxl10** はこの時期の神経分化には影響しないことが示唆された。

#### **(8) E8.5における Fbxl10 欠損胚の遺伝子発現解析**

本研究により **Fbxl10** の欠損は E9.5 において細胞死の亢進を引き起こし、これが原因の一つとなり NTDs を誘起することが示唆された。先行研究によると **Fbxl10** が転写を抑制する標的遺伝子として **c-Jun** や **rRNA**、**p15Ink4b**、**p16Ink4a**、**p19ARF** などが報告されている (14-16, 39)。これらの遺伝子の中で **c-Jun** および **p19ARF** はアポトーシスの誘導因子としての機能が知られている (28, 40)。そこで **Fbxl10** 欠損胚に見られたアポトーシスの亢進はこれらの遺伝子発現量が増加したために引き起こされたことを予想した。この仮定を検証するため、また **Fbxl10** の欠損が標的遺伝子の転写に及ぼす影響を調べるため、コントロールおよび **Fbxl10** 欠損 E8.5 胚から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を用いてこれら標的遺伝子の発現量を解析した。その結果、**p19ARF** の発現量が **Fbxl10** 欠損胚において有意に亢進していた (図 15)。一方で **c-Jun** や **rRNA**、**p15Ink4b**、**p16Ink4a** の発現量に顕著な差は確認されなかった (図 15)。**Ezh2** は **Fbxl10** との発現が相関することが報告された遺伝子であるが (39)、コントロールと **Fbxl10** 欠損胚間で差は見られなかった。また、FL-**Fbxl10** の欠損は SF-**Fbxl10** および **Fbxl11** の転写量に影響を及ぼさないことが確認された。このことから **Fbxl10** は E8.5 において **p19ARF** の発現量を抑制していることが示唆された。

#### **(9) MEFsにおける Fbxl10 ノックダウン解析**

**Fbxl10** が **p19ARF** の転写を抑制することをさらに確かめるため、マウス胎児線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast cells, MEFs) において、shRNA による **Fbxl10** ノックダウン実



験を行った。shRNAはSF-Fbx110のみを標的とするもの、FL-Fbx110のみを標的とするもの、FL-Fbx110、SF-Fbx110の両方を標的とする配列の3種類を作製した(図16A)。これらのshRNAをMEFsにレトロウイルスを用いて発現させたところ、効果的にそれぞれのFbx110 isoformの発現量を抑制することができた(図16B)。これらのMEFにおけるFbx110標的遺伝子の発現量を定量的RT-PCR法を用いて解析したところ、FL-Fbx110をノックダウンしたMEFsにおいてp19ARFおよびp16Ink4aの発現量が有意に亢進した(図16B, C)。また先行研究の通り、Ezh2の発現量もFL-Fbx110の発現量と相関した。このことからMEFsにおいてもFL-Fbx110はp19ARFの転写を抑制することが確かめられた。一方でrRNAとp15Ink4bの転写量はFL-Fbx110を抑制しても変化が見られなかった。またc-Junの発現量はFL-Fbx110の発現抑制に相関して減少する傾向が見られた(図16B)。これらの遺伝子発現に対してSF-Fbx110の抑制は影響を与えなかった。

興味深いことにFL、SF-Fbx110の両isoformをノックダウンしたMEFsではFL-Fbx110の発現のみを抑制したMEFsよりもp16Ink4a、p19ARFおよびEzh2の転写量に及ぼす効果が弱くなっていた(図16B)。このことからSF-Fbx110はこれらの遺伝子調節に対してFL-Fbx110と逆方向の作用を持っていることが考えられた。

これらのMEFの細胞死をTUNEL解析により評価したところ、Fbx110欠損胚で見られた結果と同様にFL-Fbx110のノックダウンで細胞死の亢進が引き起こされた(図17)。また細胞増殖をWST-1解析により評価したところ、FL-Fbx110の発現抑制は細胞増殖の亢進を引き起こした(図17)。面白いことにSF-Fbx110の発現を抑制したMEFsでは細胞増殖能が低下していた。またFL/SF-Fbx110をノックダウンしたMEFsではコントロールと有意な差が得られなかった(図17)。

以上の結果からFL-Fbx110はMEFにおいてもp19ARFの転写を抑制し、また細胞の増殖とアポトーシスを負に制御していることが示唆された。

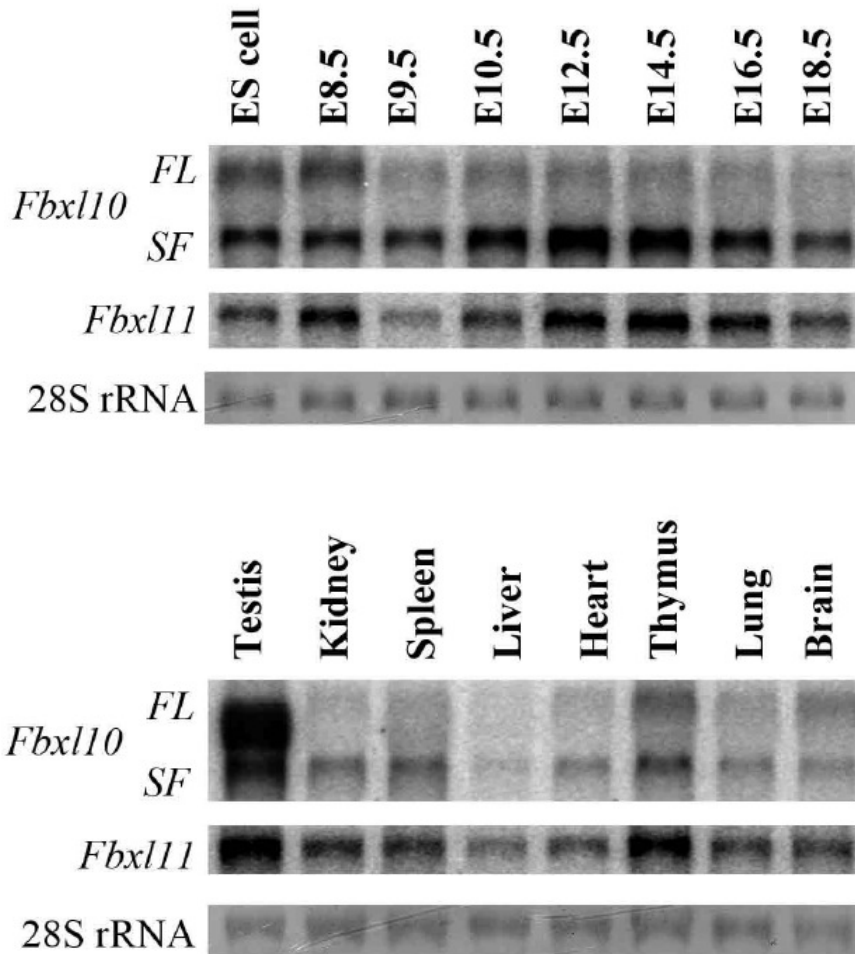
Stage	Total embryos	+/+	+/-	-/-	NTD or EX
		n (% total embryos)			n (% -/- embryos)
<b>Embryo</b>					
E9.5	35	6 (17.1)	17 (48.6)	12 (34.3)	6 (50.0)
E10.5	36	6 (16.7)	22 (61.1)	8 (22.2)	3 (37.5)
E11.5	34	9 (26.5)	14 (41.2)	11 (32.4)	5 (45.5)
E14.5	88	20 (22.7)	37 (42.0)	31 (35.2)	15 (48.4)
E16.5	40	14 (35.0)	14 (35.0)	12 (30.0)	3 (25.0)
E18.5	86	23 (26.7)	46 (53.5)	17 (19.8)	8 (47.1)
Total	319	78 (24.5)	150 (47.0)	91 (28.5)	40 (44.0)
<b>Postnatal</b>					
P20	333	96 (38.8)	206 (61.9)	31 (9.3)	

NTD: 神経管閉鎖不全 (neural tube defect)

EX: 外脳症 (exencephaly)

### 表 1. Fbx10<sup>+/-</sup>マウス同士の交配における、新生仔および胎児の遺伝子型解析

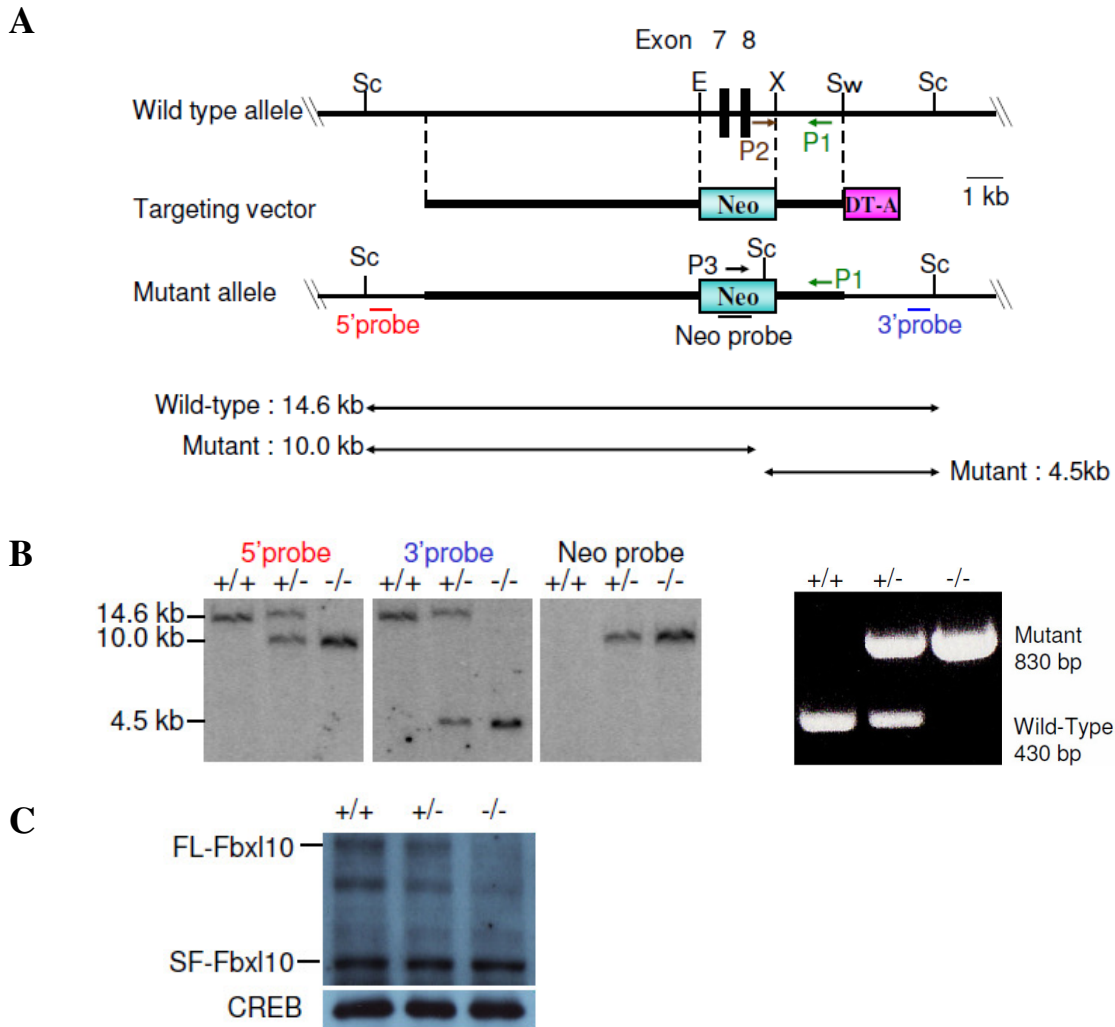
Fbx10<sup>+/-</sup>同士の交配より得られた子孫の遺伝子型を PCR およびサザンブロット法により解析した。生後 20 日の段階では Fbx10<sup>-/-</sup>マウスの割合がメンデルの割合よりも明らかに少なかった。胎生期の胚の遺伝子型を解析したところ、E9.5 以降の全てのステージにおいて Fbx10 欠損胚における NTDs が観察され、その割合は約 44%であった。



**図 1. Fbxl10 mRNA の発現解析**

(上図) 胎生 (E)8.5~18.5 日胚より RNA を抽出し、ノザンブロット解析を行った。FL-Fbxl10 と SF-Fbxl10 に対応する 2 つのサイズのシグナルが検出された。FL-Fbxl10 は ES 細胞や E8.5 胚において発現量が高く、胎齢の経過にしたがって発現量が低下した。SF-Fbxl10 および Fbxl11 は調べた全てのステージにおいて明瞭なシグナルが検出できた。

(下図) 生後 10 週齢マウスの各組織より RNA を抽出し、ノザンブロット解析を行った。FL-Fbxl10 は胸腺や脳、脾臓で発現が確認できたほか、精巣において顕著に高い発現が見られた。SF-Fbxl10 と Fbxl11 はどの組織においても発現が確認できた。



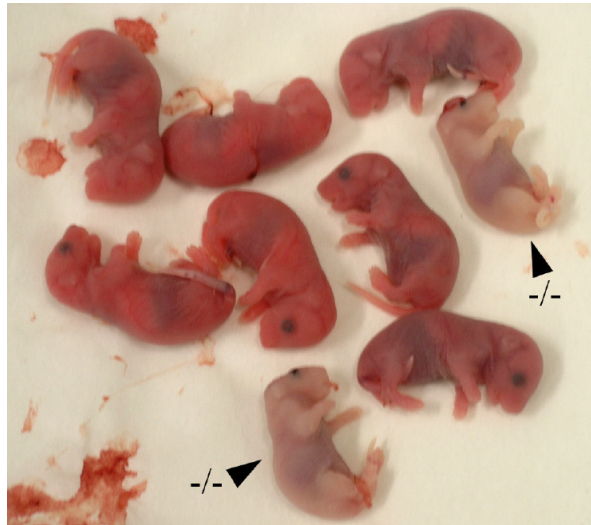
## 図 2. Fbx110 遺伝子のターゲティング

(A) Fbx110 の遺伝子座 (上図)、ターゲティングベクター (中図)および相同組換えにより変異が導入された Fbx110 遺伝子座を (下図)模式的に示した。サザンロットおよび PCR 解析に用いたプローブ (5'probe、3'probe)およびプライマー (P1、P2、P3)の位置を示した。Sc, *Sca* I; Sw, *Swa* I; E, *Eco*RI; X, *Xba* I。

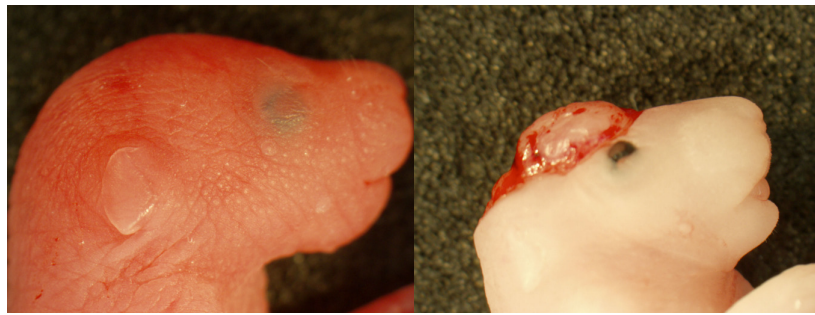
(B) 野生型、Fbx110 ヘテロおよびホモ欠損マウスのサザンロット (左図)、PCR 解析 (右図)。ゲノムは *Sca* I で消化し、図中に示したプローブでゲノム断片を検出した。PCR 反応には(A)に示した 3 つのプライマーを用いた。P1/P2 で野生型のアレル (430 bp)を、P1/P3 で変異アレル (830 bp)を増幅した。

(C) 野生型、Fbx110 ヘテロ欠損および Fbx110 ホモ欠損マウスのウエスタンロット解析。Fbx110 欠損マウスの胸腺より核タンパクを抽出し、ウエスタンロット解析を行った。Fbx110 欠損マウスでは FL-Fbx110 のタンパク発現が消失していたが SF-Fbx110 の発現量に影響は無かった。核タンパクの内部標準として CREB を用いた。

**A**



**B**



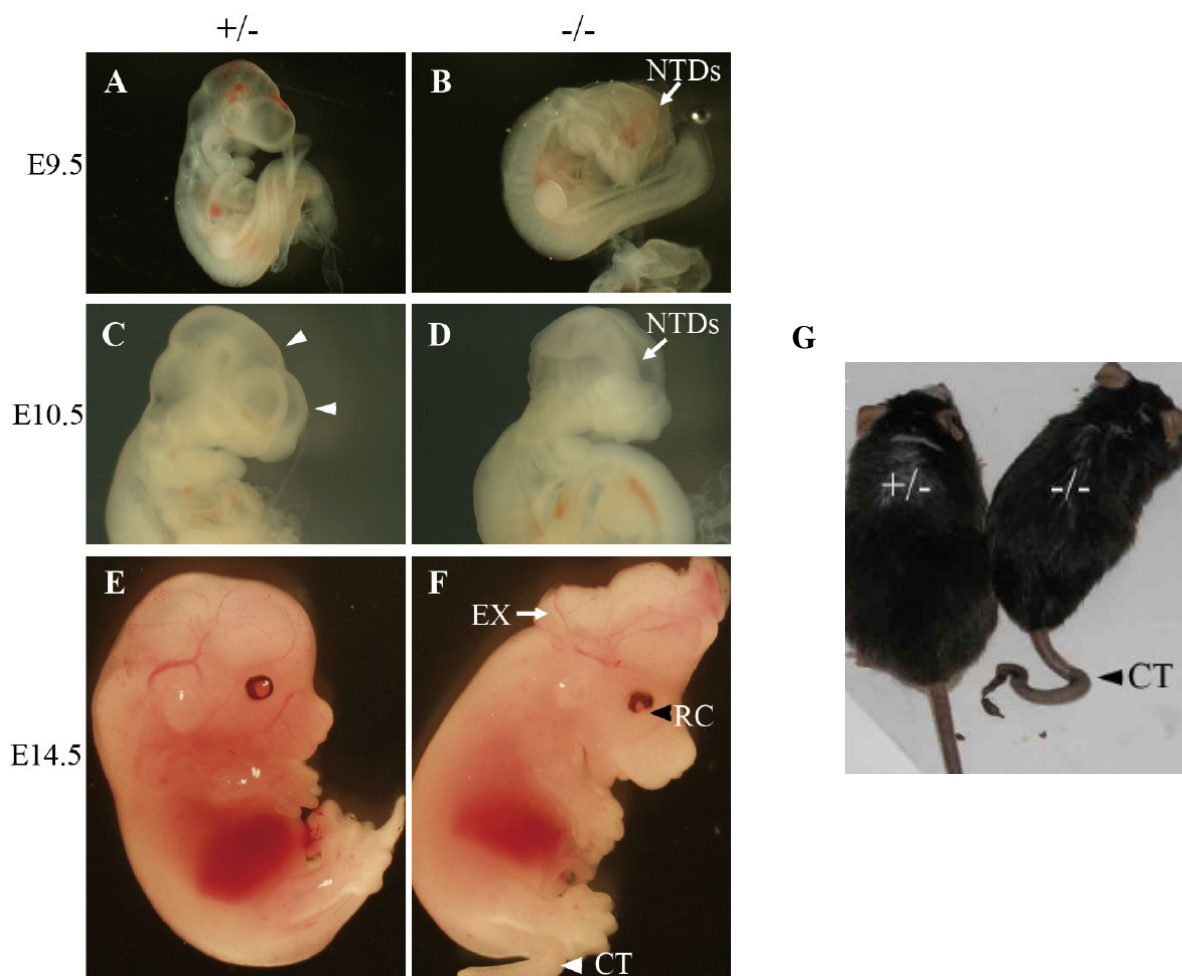
**Fbx110 +/-**

**Fbx110 -/-**

### 図 3. Fbx110 欠損胚の胎生解析

(A) Fbx110<sup>+/-</sup>マウス同士を交配し、受精後 18 日目に帝王切開により胎児を取り出した。一部のマウスが外脳症を呈し、これらのマウスは蘇生不可能で摘出後、間もなく死亡した。また、頭部からの出血のため、全身が青白く体の大きさも同腹仔より小さかった。

(B) 外脳症を呈すマウスの遺伝子型を解析したところ、これらの個体は全て Fbx110 欠損マウスであった (右図)。野生型または Fbx110 ヘテロ欠損マウスは正常に発生していた (左図)。



#### 図 4. *Fbx110* 欠損マウスの表現型

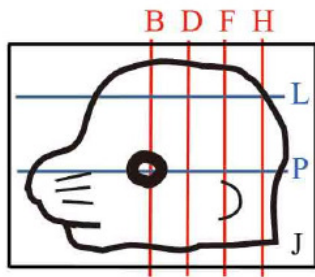
(A, B) E9.5 における *Fbx110* 欠損胚の表現型。コントロール胚では神経管が形成されているが (A)、一部の *Fbx110* 欠損胚では神経ヒダが開いたままであった (B)。

(C, D) E10.5 における *Fbx110* 欠損胚の表現型。コントロール胚では脳胞構造 (矢じり) が形成されているが (C)、一部の *Fbx110* 欠損胚では依然として神経ヒダが開いた状態であった (D)。

(E, F) E14.5 における *Fbx110* 欠損胚の表現型。コントロール胚は正常に発生しているが (E)、一部の *Fbx110* 欠損胚では外脳症や網膜欠損、巻き尾等の様々な発達障害を呈した (F)。

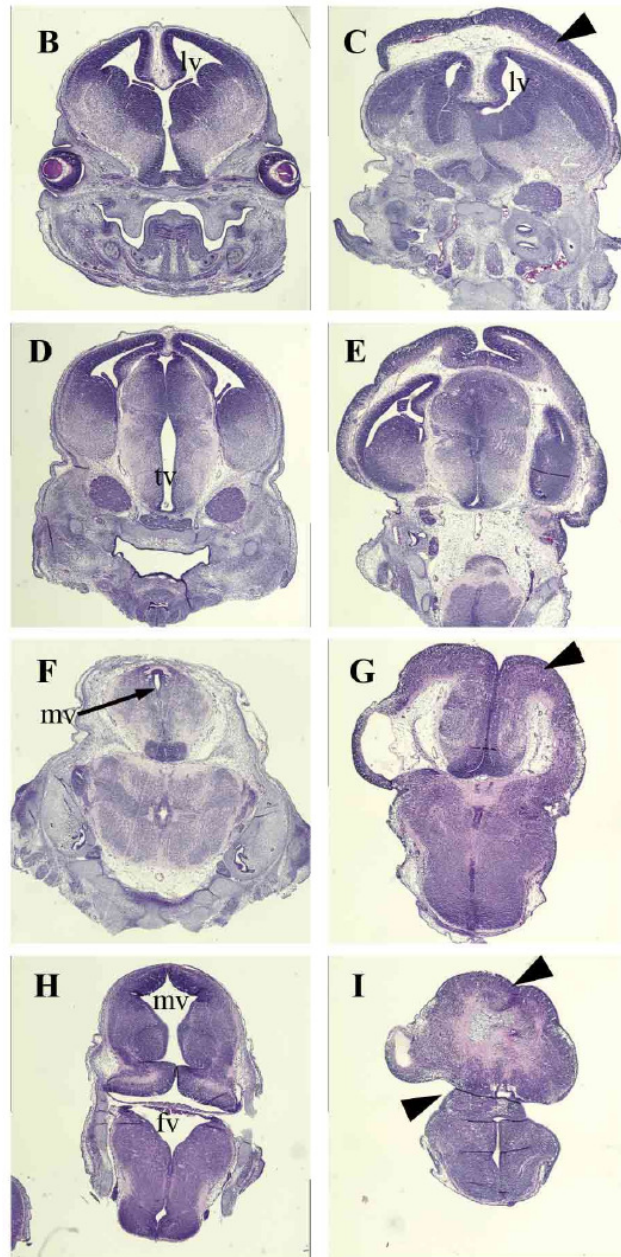
(G) Adult における *Fbx110* 欠損マウスの表現型。一部の *Fbx110* 欠損マウスは巻き尾を呈した。  
NTDs, 神経管閉鎖不全 : EX, 外脳症 : RC, 網膜欠損 : CT, 巻き尾

A



Fbx110+/-

Fbx110-/-



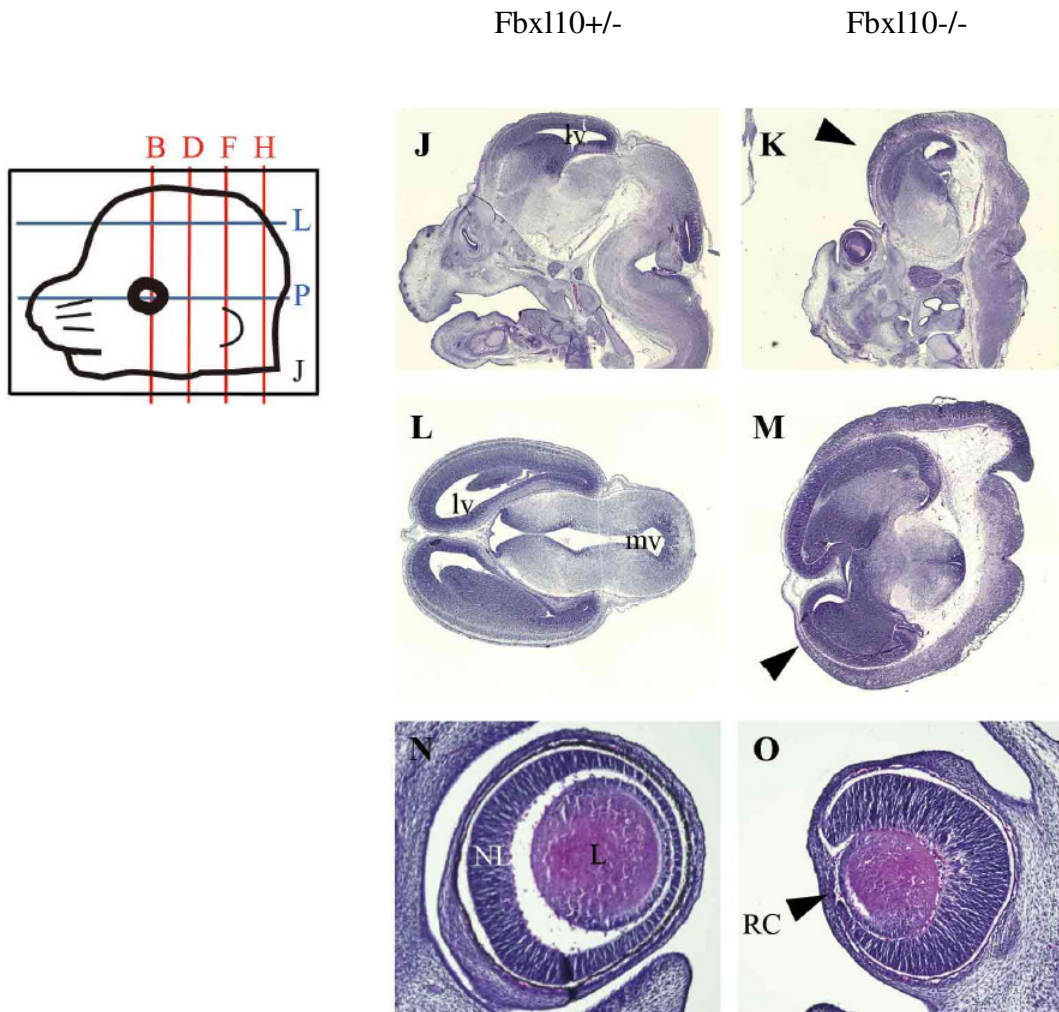
**図5. E14.5 における Fbx110 欠損胚の組織学的解析 (1)**

(A) 切片作製における薄切方向と位置

(B-I) コントロール胚 (B, D, F, H)および Fbx110 欠損胚 (C, E, G, I)の冠状断切片に対する H&E 染色。Fbx110 欠損胚では側脳室の構造異常が見られ、また中脳および後脳領域の神経上皮細胞が反転・肥大化した異常組織が確認できた (C, G, I, 矢じり)。

lv, 側脳室 : tv, 第三脳室 : mv, 中脳胞 : fv, 第四脳室

A

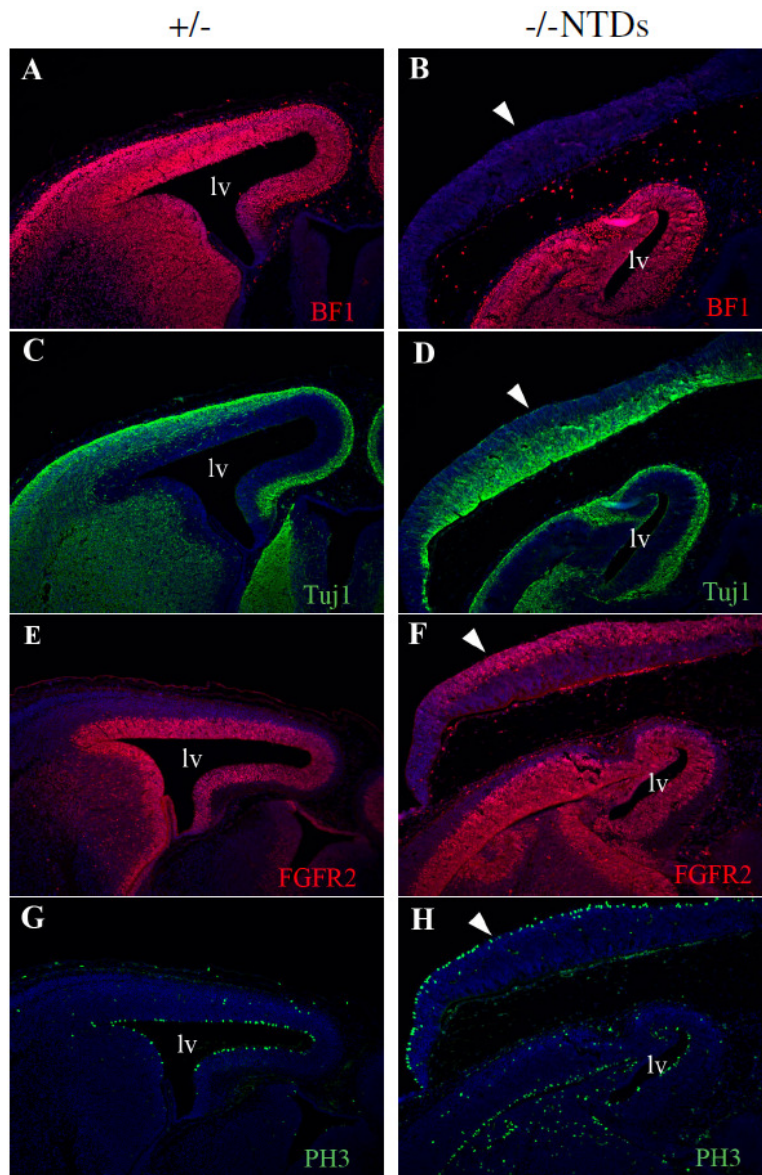


**図 6. E14.5 における Fbx110 欠損胚の組織学的解析 (2)**

(A) 切片作製における薄切方向と位置

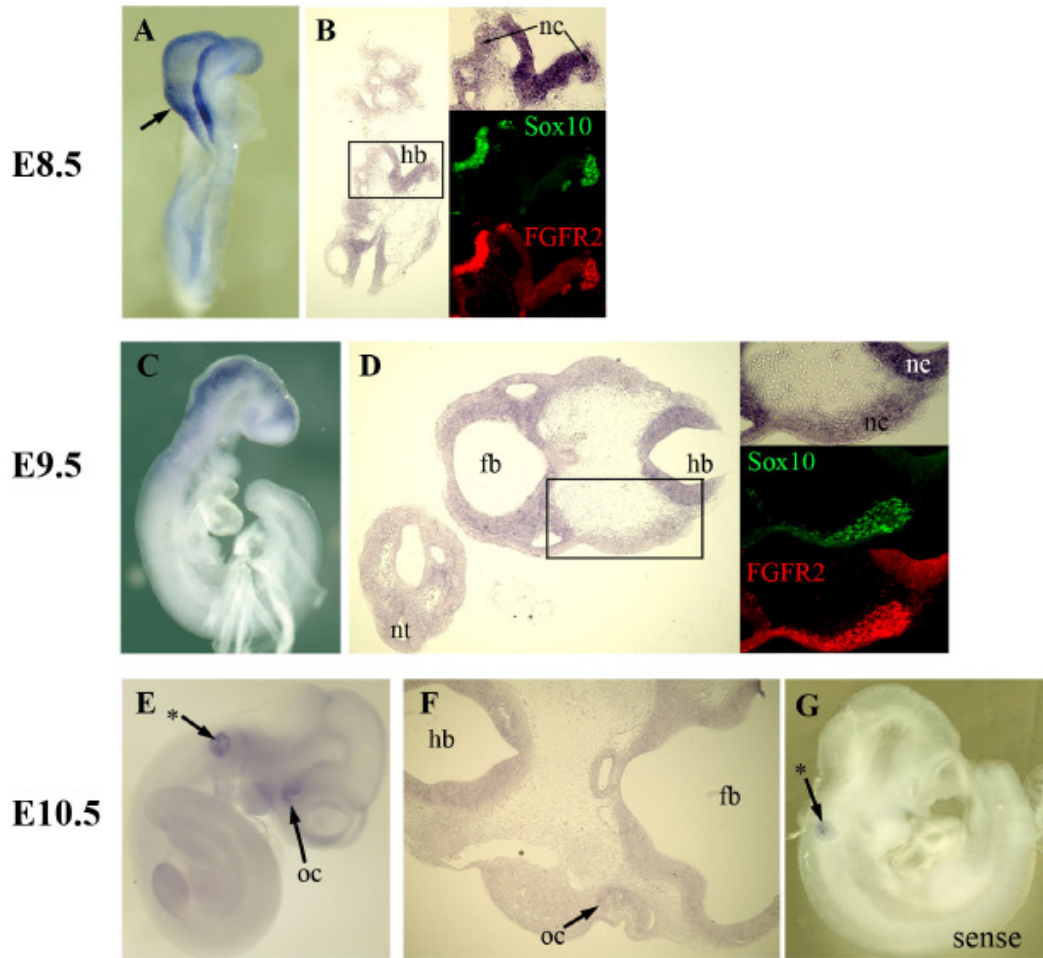
(J-O) コントロール胚 (J, L, N)および Fbx110 欠損胚 (K, M, O)の矢状断切片 (J, K, N, O)および水平断 (L, M)に対する H&E 染色。Fbx110 欠損胚では中脳および後脳領域の神経上皮細胞が反転・肥大化した異常組織が脳全体を覆っている (K, M, 矢じり)。Fbx110 欠損胚の神経網膜はコントロールに比べ肥大化し、一部の Fbx110 欠損胚は網膜欠損を呈した (O, 矢じり)。  
lv, 側脳室； mv, 中脳胞； NR, 神経網膜； L, 水晶体； RC, 網膜欠損





**図 7. Fbx110 欠損胚に見られる異常脳組織の免疫組織学的解析**

(A-H) E14.5 におけるコントロールおよび Fbx110 欠損胚の冠状切片に対し、免疫染色を行った。Fbx110 欠損胚の異常脳組織 (図中、矢じり) は前脳特異的のマーカである BF1 陰性だったが (A, B)、ニューロンマーカー Tuj1 陽性であった (C, D)。さらに神経前駆細胞マーカーの FGFR2 陽性の細胞と、分裂期細胞マーカーである PH3 (phosphor-histone H3) 陽性の細胞を含んでおり、増殖能が高いことが示唆された (E-H)。



### 図 8. 胎生期における Fbxl10 の空間的発現パターン

(A) E8.5 胚における Fbxl10 のホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション解析。Fbxl10 は頭部の神経上皮細胞および神経ヒダの先端 (A, 矢) に強く発現していた。

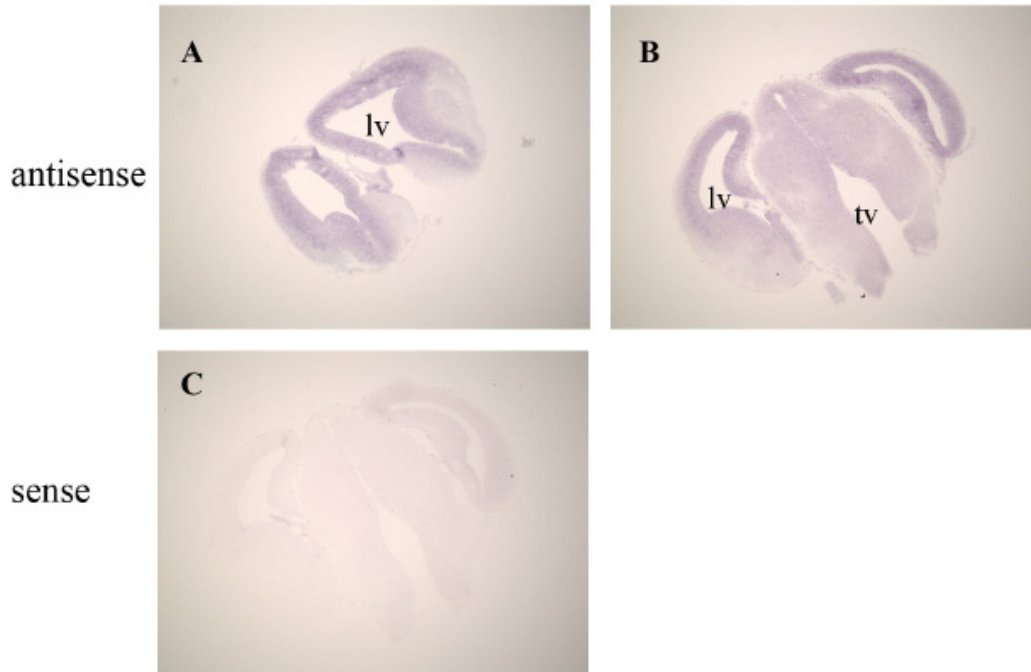
(B) E8.5 水平断切片に対する *in situ* ハイブリダイゼーションおよび神経堤細胞マーカー (Sox10 および FGFR2) に対する免疫染色。Fbxl10 は神経上皮細胞、神経堤細胞および周囲の間充織細胞に発現していた。

(C, D) E9.5 胚における Fbxl10 のホールマウント (C) および切片 (D) *in situ* ハイブリダイゼーション解析。

(E-G) E9.5 胚における Fbxl10 のホールマウント (E) および切片 (F) *in situ* ハイブリダイゼーション解析。この時期の Fbxl10 は全身の神経管および眼杯で発現していた。Fbxl10 センスプローブでは E10.5 の耳胞を除き、シグナルを検出しなかった (G, \*)。

fb, 前脳 : hb, 後脳 : ne, 神経上皮細胞 : nc, 神経堤細胞 : oc, 眼杯 : \*, 非特異的シグナル

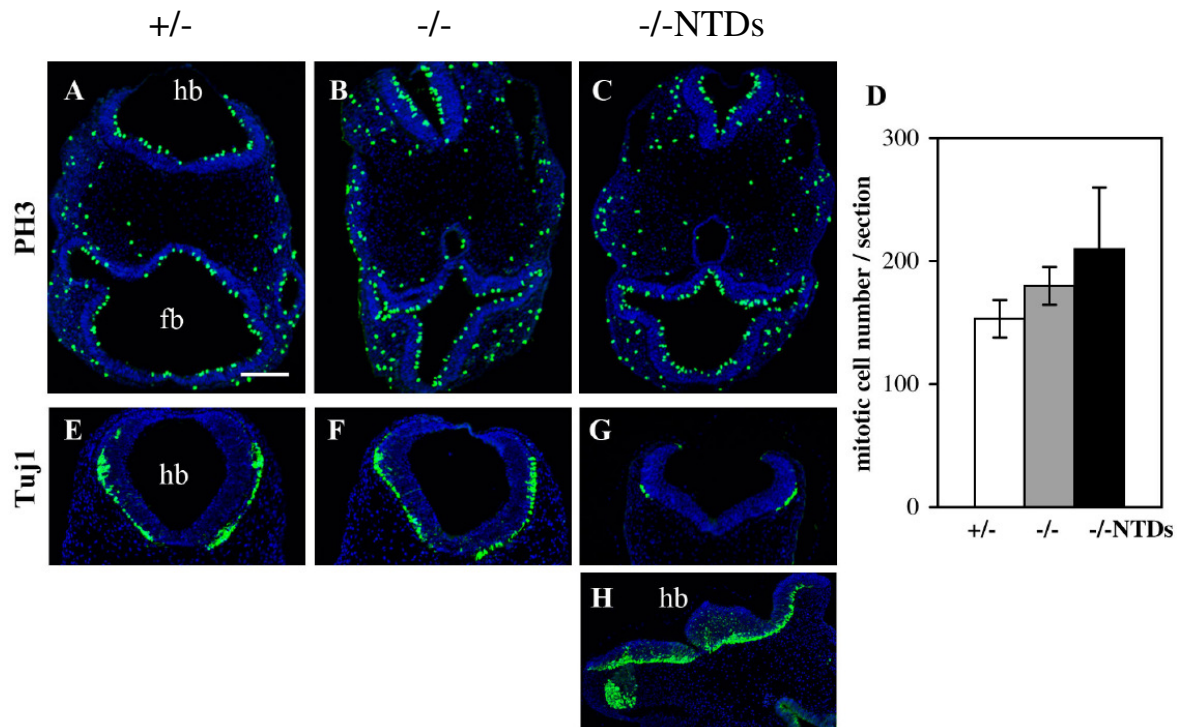
## Fbx110 mRNA



**図9. E14.5 胚の脳における Fbx110 mRNA の空間的発現パターン解析**

(A-C) E14.5 胚における脳の冠状切片を作製し *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った。Fbx110 の発現は脳全体において確認できたが、神経前駆細胞で構成される脳室帯領域において強いシグナルが見られた (A, B)。Fbx110 センスプローブではシグナルを検出しなかった (C)。

lv, 側脳室 : tv, 第三脳室



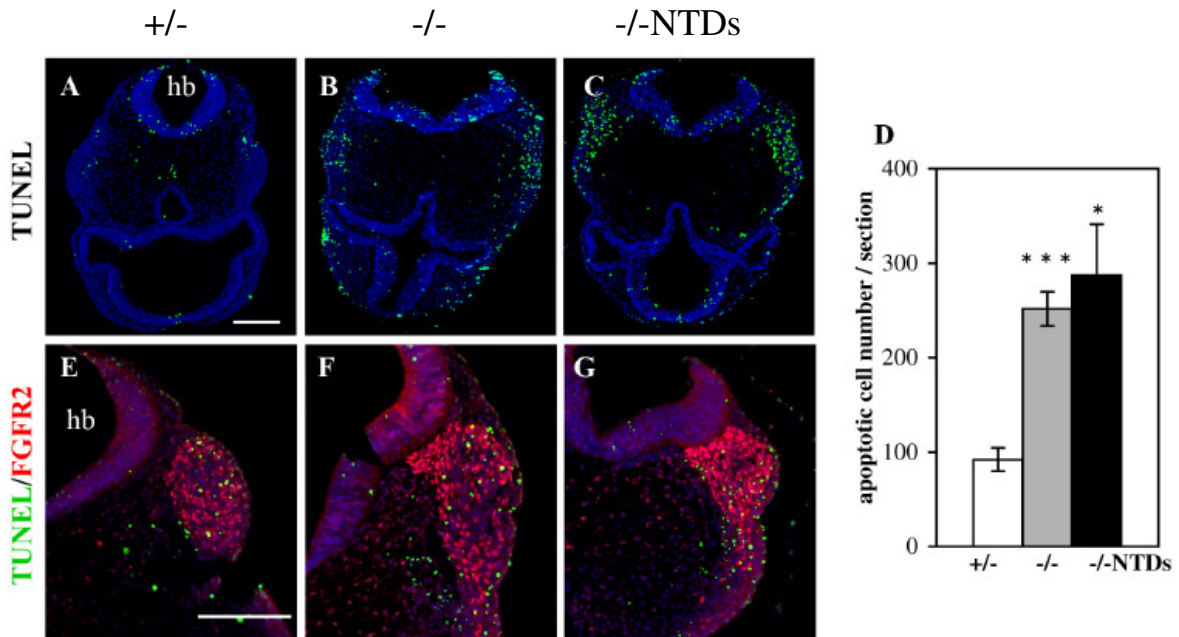
**図 10. E9.5 の Fbx110 欠損胚における細胞増殖および神経分化**

(A-C) E9.5 でのコントロール胚 (A) および Fbx110 欠損胚 (B, C) の水平断切片を作製し、分裂期細胞のマーカーであるリン酸化ヒストン H3 の免疫染色を行った。Fbx110 欠損胚は正常に神経管を形成した個体 (B) と NTDs を呈した個体 (C) を区別した。

(D) コントロール胚 (N = 6)、神経管を形成した Fbx110 欠損胚 (N = 4) および NTDs を呈した Fbx110 欠損胚 (N = 5) の切片における分裂期細胞の数を計測した。分裂期細胞数は Fbx110 欠損においてわずかに増加したが有意な差ではなかった。グラフは平均値 ± 標準誤差で表し、統計解析方法として Student' *t*-test を行った。

(E-H) 各遺伝子型胚の切片における、ニューロンマーカー TuJ1 の免疫染色。NTDs を呈した Fbx110 欠損胚ではクローン間のバリエーションが大きく見られたもののコントロールと Fbx110 欠損胚の間に一貫した差は認められなかった。

fb, 前脳 : hb, 後脳 スケールバー, 100  $\mu$  m



**図 11. E9.5 の Fbx110 欠損胚における細胞死**

(A-C) E9.5 でのコントロール胚 (A) および Fbx110 欠損胚 (B, C) の水平断切片を作製し、細胞死の指標として TUNEL 解析を行った。Fbx110 欠損胚は正常に神経管を形成した個体 (B) と NTDs を呈した個体 (C) を区別した。Fbx110 欠損胚ではコントロールに比べ TUNEL 陽性細胞数が増加していた。

(D) コントロール胚 (N = 6)、神経管を形成した Fbx110 欠損胚 (N = 5) および NTDs を呈した Fbx110 欠損胚 (N = 5) の切片における TUNEL 陽性細胞の数を計測した。細胞死は Fbx110 欠損において有意に亢進した。グラフは平均値 ± 標準誤差で表し、統計解析は Student' *t*-test を用いた。\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.0001$

(E-G) それぞれの遺伝子型切片に対する FGFR2 の免疫染色と TUNEL の二重染色。細胞死の亢進は主に FGFR2 陽性の神経堤細胞および周囲の間充織細胞で生じていた。

hb, 後脳 スケールバー, 100  $\mu$ m

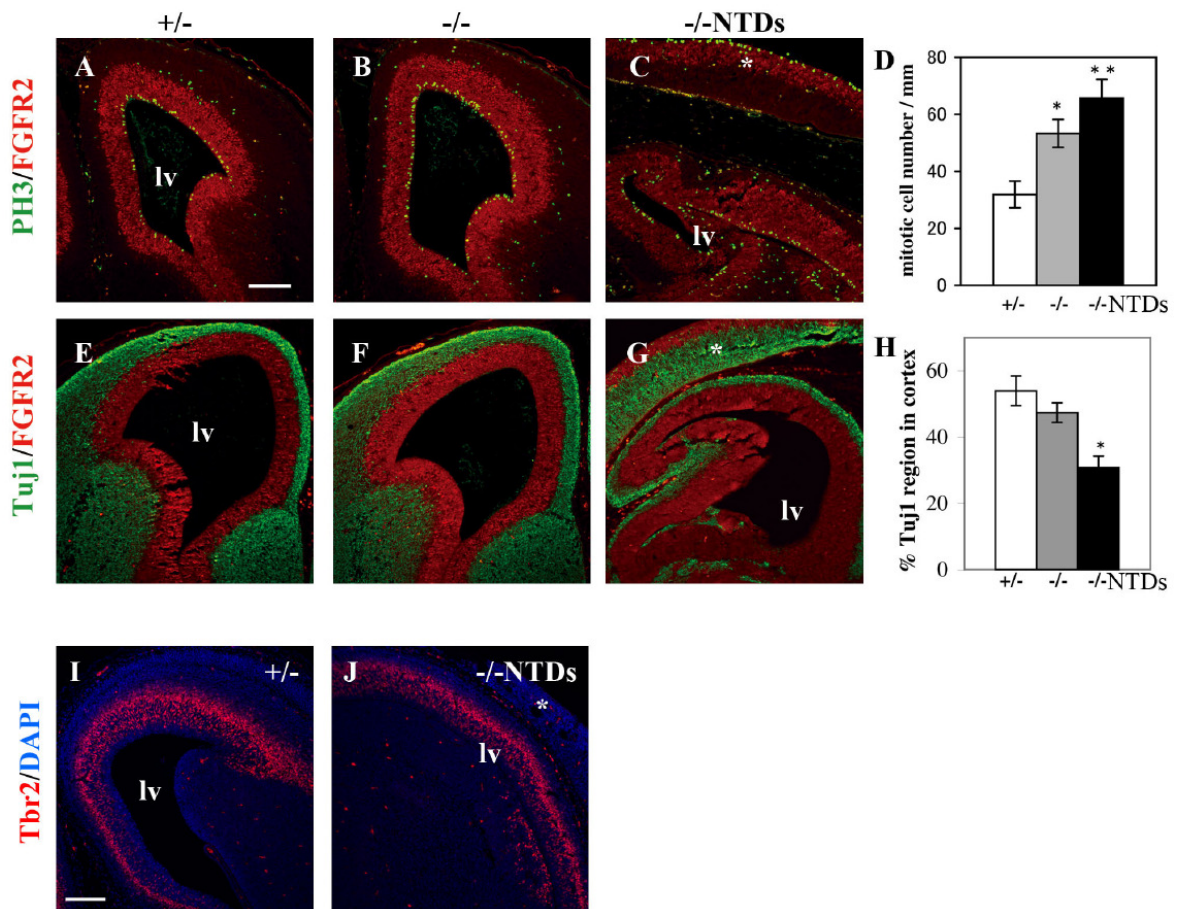


図 12. E14.5 大脳皮質における Fbx110 欠損胚の細胞増殖および神経分化

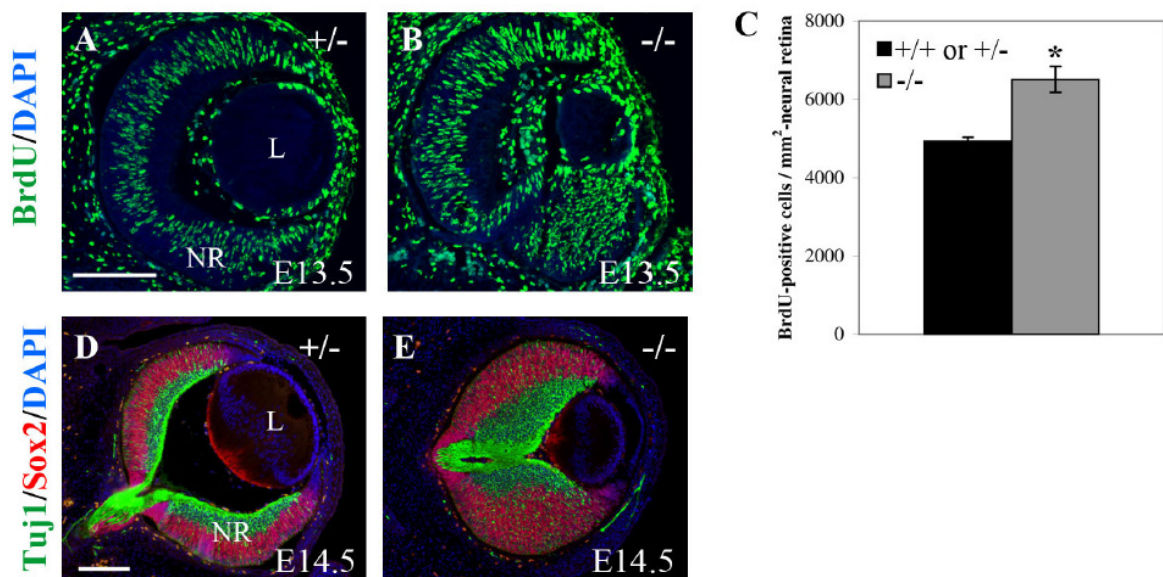
(A-D) E14.5 でのコントロール胚 (A)および Fbx110 欠損胚 (B, C)の冠状断切片を作製し、分裂期細胞のマーカであるリン酸化ヒストン H3 の免疫染色を行った。Fbx110 欠損胚は正常に神経管を形成した個体 (B)と外脳症を呈した個体 (C)を区別した。(D)コントロール胚 (N = 5)、Fbx110 欠損胚 (N = 5)および外脳症 Fbx110 欠損胚 (N = 5)における脳室帯長あたりの分裂期細胞の数を計測した。分裂期細胞数は Fbx110 欠損において有意に増加した。

(E-G) 各遺伝子型胚の切片における、ニューロンマーカーTuj1 の免疫染色。

(H) Tuj1 陽性領域は外脳症 Fbx110 欠損胚で有意に減少した(それぞれ N = 5)。グラフは平均値±標準誤差で表し、統計解析方法として Student' ttest を行った。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

(I, J) 各遺伝子型胚の切片における、INPs マーカーTbr2 の免疫染色。

lv, 側脳室 スケールバー, 100  $\mu$ m

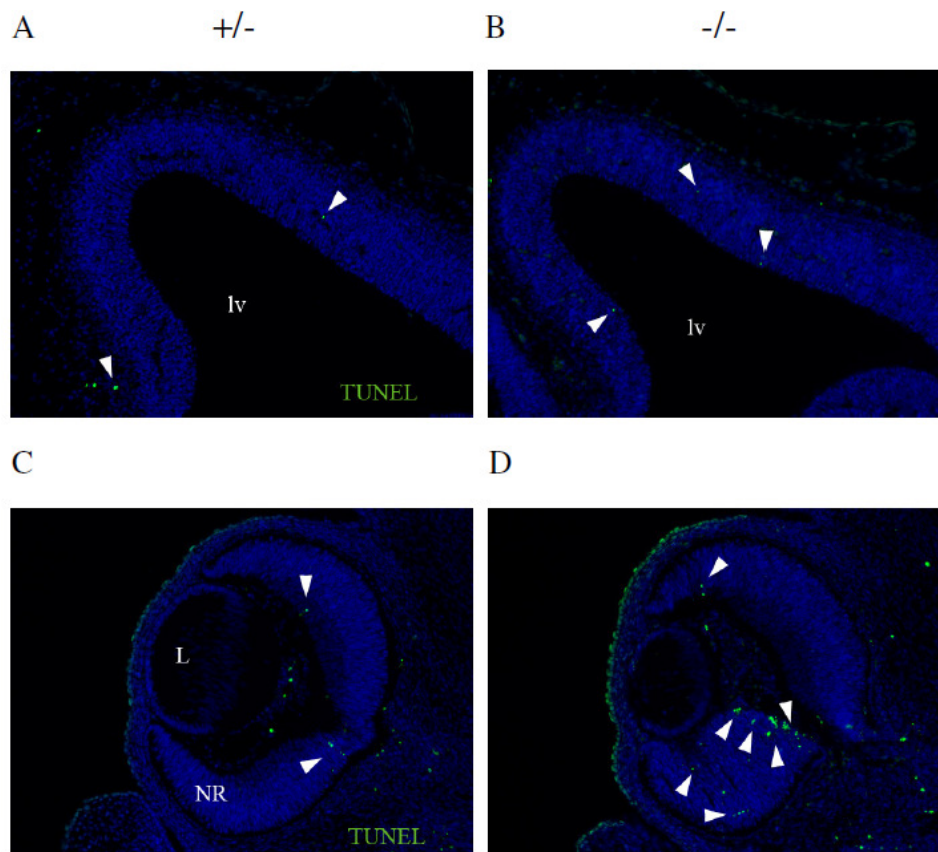


### 図 13. E13.5-14.5 神経網膜における Fbx110 欠損胚の細胞増殖および神経分化

(A-C) E13.5 でのコントロール胚 (A)および Fbx110 欠損胚 (B)の冠状断切片を作製し、S 期の細胞集団を BrdU で標識した。(C) コントロール胚 (+/+または+/-, N = 6)および Fbx110 欠損胚 (-/-, N = 6)の神経網膜 1 mm<sup>2</sup>あたりの BrdU 陽性細胞数を計測した。神経網膜における BrdU 陽性の細胞数は Fbx110 欠損胚において有意に亢進した。グラフは平均値±標準誤差で表し、統計解析方法として Student' *t*test を行った。\* *P* < 0.01。

(D, E) 各遺伝子型胚の切片における、ニューロンマーカーTuj1 と神経前駆細胞マーカー Sox2 の免疫染色。

NR, 神経網膜 : L, 水晶体 スケールバー, 100 μm



**図 14. E14.5 大脳皮質および神経網膜における Fbx110 欠損胚の細胞死**

(A-D) E14.5 でのコントロール胚 (A, C) および Fbx110 欠損胚 (B, D) の冠状断切片を作製し、大脳皮質 (A, B) および神経網膜 (C, D) の細胞死を TUNEL 解析により観察した。この時期の大脳皮質ではコントロールと Fbx110 欠損胚の間でアポトーシスの差は認められなかった (A, B)。神経網膜においては Fbx110 欠損胚において細胞死が亢進する傾向が見られた (C, D)。



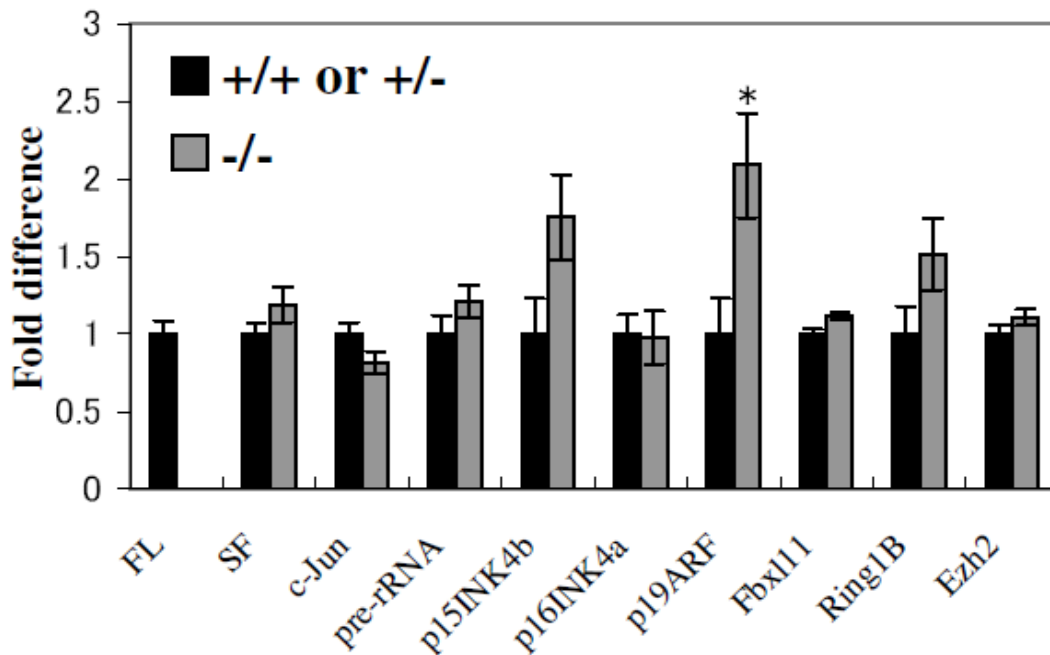
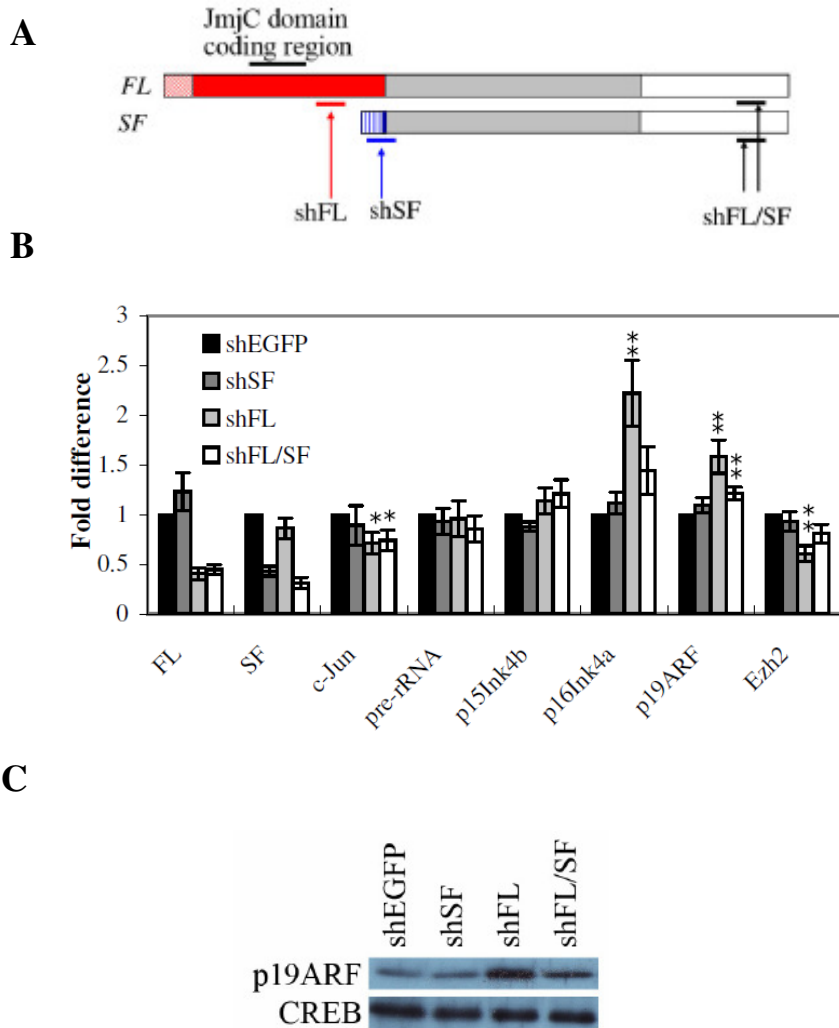


図 15. E8.5 の Fbxl10 欠損胚における遺伝子発現解析

E8.5 のコントロール胚 (N = 12) および Fbxl10 欠損胚 (N = 8) における Fbxl10 の標的遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法により解析した。Fbxl10 欠損胚では p19ARF の発現量が有意に亢進していた。一方で Fbxl10 の標的遺伝子として報告されていた c-Jun や rRNA、p15Ink4b、p16Ink4a および Ezh2 の発現量に有意な差は見られなかった。FL-Fbxl10 の欠損は SF-Fbxl10、Fbxl11 および Ring1B の発現量に影響を与えなかった。それぞれの遺伝子発現量は GAPDH を内部標準として規格化した。グラフは平均値 ± 標準誤差で表し、統計解析方法として Student' *t*-test を行った。\*  $P < 0.05$ 。

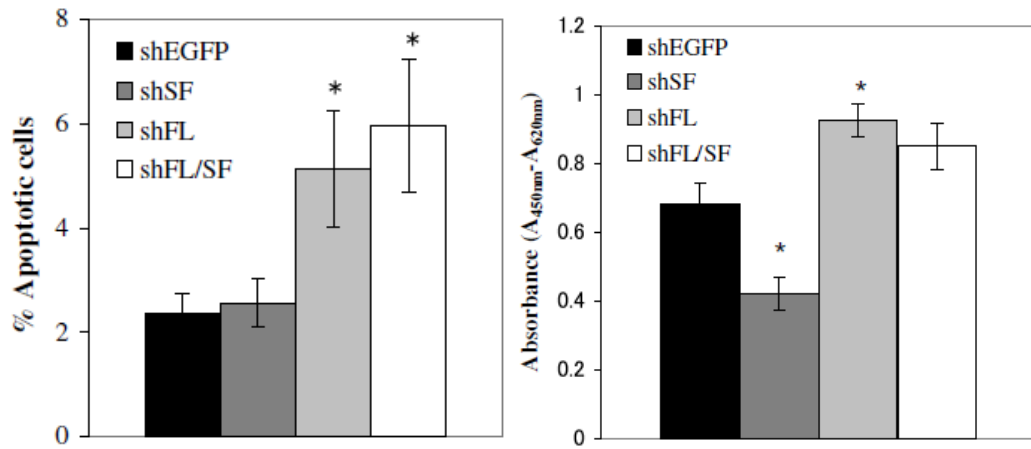


**図 16. Fbxl10 をノックダウンした MEFs の遺伝子発現解析**

(A) 三種の shRNA が標的とする Fbxl10 の領域。shFL は FL-Fbxl10 を、shSF は SF-Fbxl10、shFL/SF は両 isoform をそれぞれ標的にする。赤色、青色領域はそれぞれ FL-Fbxl10、SF-Fbxl10 に固有の領域。灰色、白領域は両 isoform 共通のコーディング領域および 3'UTR。

(B) それぞれの shRNA を発現させた MEF の遺伝子発現解析。FL-Fbxl10 の発現を抑制した MEF では p16Ink4a および p19ARF の発現量が亢進し、c-Jun および Ezh2 の発現量が減少した。SF-Fbxl10 のノックダウンではこれらの遺伝子発現に影響は無かった。グラフは 7 回の独立実験 (N = 7) について平均値 ± 標準誤差で表し、統計解析方法として Student' *t* test を行った。\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ 。

(C) それぞれの shRNA を発現させた MEF における p19ARF タンパクの発現量をウェスタンブロット解析により調べた。FL-Fbxl10 の発現を抑制した細胞ではタンパクレベルでも p19ARF の発現量亢進が確認できた。核タンパクの内部標準として CREB を用いた。



**図 17. Fbx110 をノックダウンした MEFs の細胞死および増殖**

FL-Fbx110 をノックダウンした MEF では細胞死が亢進したが、SF-Fbx110 のノックダウンは細胞死に影響を及ぼさなかった (左図)。FL-Fbx110 をノックダウンした MEFs では vivo の結果同様、細胞増殖が亢進した。一方 SF-Fbx110 のノックダウンは細胞増殖を抑制し、両 isoform をノックダウンした MEFs 増殖能はコントロールと同程度であった。グラフは 5 回の独立実験 (N = 5) をもとに平均値 ± 標準誤差で表し、統計解析方法として Student' *t*-test を行った。\*  $P < 0.05$ 。

## IV 考察

本研究によりヒストン脱メチル化酵素 Fbxl10 は神経管が形成される E8.5～E10.5 日胚の神経上皮細胞および神経堤細胞に発現し、正常な神経管形成に重要な役割を持っていることが明らかにされた。Fbxl10 の欠損は神経上皮細胞および神経堤由来間充織細胞のアポトーシス亢進を引き起こし、この原因の一つとして Fbxl10 の標的遺伝子 p19ARF の発現量亢進が考えられた。また Fbxl10 は脳および眼の神経前駆細胞の細胞増殖を負に制御していることが示唆された。

### (1) Fbxl10 欠損胚に見られた細胞死および細胞増殖亢進の分子メカニズム

200 以上の遺伝子変異マウスが神経管閉鎖不全 (NTDs) を表現型に持つ一方で、それらの遺伝子が神経管の形態形成に関与する分子メカニズムについては不明な点が多い (3, 4)。生物学的機能のレベルでは NTDs はアポトーシスの破綻や細胞骨格の変異、細胞周期異常、神経分化の異常調節によって引き起こされることが分かっている (19-23)。中でもアポトーシスは正常な神経管形成にとって重要な要因であり、神経管の融合部や、形態変化の激しい屈曲部位などにクラスター状に細胞死が観察される。この細胞死は神経管形成時のダイナミックな形態変化に関与していると考えられている (33)。アポトーシスの実行遺伝子である Apaf-1、caspase-3 および caspase-9 を欠損したマウスは NTDs を呈し、正常な神経管形成にとって部位特異的な細胞死は必須である (19, 24, 25)。一方で、異所的または過剰な細胞死も NTDs を引き起こす。Bcl10、Brca1 および Tulp3 欠損マウスでは神経管での過剰な細胞死が確認され、NTDs を引き起こす (26, 36, 37)。本研究において、Fbxl10 欠損マウスは E9.5 の神経上皮細胞および神経堤細胞において細胞死が亢進していた。これは神経管が正常に形成された Fbxl10 欠損胚でも見られたことから、Fbxl10 の欠損により生じた表現型であると考えられる。よって Fbxl10 欠損胚に見られる NTDs は神経管形成期における細胞死の亢進によってもたらされ

たとえられる。

先行研究より、Fbx110 はマウス第4染色体の *Ink4a/Arf* 領域に結合し、H3K4me3 と H3K36me2 を脱メチル化することにより、p16Ink4a および p19ARF の転写を抑制することが知られている (39)。p19ARF は p53 タンパクを安定化することで細胞周期および細胞死を調節している。p19ARF は p53 に対するユビキチンライゲースである MDM2 と相互作用し、MDM2 依存的な p53 の分解を阻害する。その結果 p53 タンパクが蓄積し、p53 依存性の細胞周期停止または細胞死が引き起こされる (40)。本研究において Fbx110 欠損 E8.5 胚では p19ARF の転写量が亢進していた。さらに MEFs において FL-Fbx110 をノックダウンしたところ、やはり p19ARF の発現量が亢進し、この MEFs ではアポトーシスが亢進していた。これらの結果から Fbx110 欠損胚に見られた細胞死の亢進の原因としては、Fbx110 欠損による p19ARF 発現量亢進が一端を担っていることが考えられる。しかしながら、p19ARF の発現量亢進のみでは Fbx110 欠損胚で見られた細胞増殖の亢進や MEFs の増殖能亢進を説明できない。MEFs においては FL-Fbx110 をノックダウンすることで増殖抑制因子 p16Ink4a の発現量が亢進し、増殖を正に制御する c-Jun の発現量が低下した。それにも関わらず細胞増殖が亢進していたことから、FL-Fbx110 を抑制した細胞では未知の増殖促進因子の作用が亢進し、その遺伝子発現を Fbx110 が制御している可能性が考えられる。

## (2) ヒストンメチル化修飾遺伝子と NTDs

数多くの遺伝子の変異が NTDs を引き起こすことが知られているが、エピジェネティクスに関与する遺伝子も正常な神経管形成に大きく寄与することが分かっている (33)。例えば DNA メチル化酵素 Dnmt3b やクロマチンリモデリング因子 Cecr2、ポリコームタンパク Rybp, Yy1、ヒストンアセチル化酵素 Gen5、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC4 などのノックアウトマウスは NTDs を呈する (30-32, 44-46)。このことはエピジェネティックな制御が神経管形成においても重要であることを示唆するが、これらのタンパクの欠損がどの下流遺伝子の発現

調節異常を招き、NTDs を引き起こすかについてはほとんど分かっていない (33)。意外なことに、これまでヒストンのメチル化および脱メチル化に関わる遺伝子の中で NTDs に関わるものは同定されてこなかった。つまり本研究はヒストンのメチル化を制御する遺伝子が NTDs に関与することを示した最初の報告である。Fbxl10 には JmjC ドメイン以外に F-box ドメインを持っている。一般的に F-box タンパクは SCF 複合体を形成し、標的タンパクをポリユビキチン化することで分解経路へ導く (38)。本研究では Fbxl10 の欠損がヒストン脱メチル化以外の機能 (例えば F-box タンパクとしての機能) 不全によってもたらされた可能性を否定できていない。しかし、後述するように JmjC ドメイン以外のモチーフを共通にもつ SF-Fbxl10 の発現が Fbxl10 欠損マウスにおいて維持されていることから、Fbxl10 によるヒストンのメチル化制御は神経管発生において重要な役割を持っていることが強く示唆される。

### (3) SF-Fbxl10 の生理的機能について

Fbxl10 には大別して FL-Fbxl10 (完全長) と SF-Fbxl10 (JmjC 欠損型) の 2 つの isoform が存在する。FL-Fbxl10 は JmjC ドメイン、CXXC ジンクフィンガー、PHD ジンクフィンガー、F-box ドメインおよび LRR の全てのモチーフを持つ。SF-Fbxl10 は JmjC ドメインを含む N 末端領域が欠損しているが、その他の全てのモチーフは FL-Fbxl10 と共通している。Fbxl10 はその標的遺伝子に対し、CXXC ジンクフィンガーを介して相互作用する (15)。したがって、JmjC ドメインを持たない (脱メチル化活性を持たない) SF-Fbxl10 も FL-Fbxl10 と同様に標的遺伝子に相互作用できる可能性がある。このことから、SF-Fbxl10 は FL-Fbxl10 の標的遺伝子に対する結合および脱メチル化を介した発現制御を、競合的に阻害するモデルが想像できる。本研究において、FL-Fbxl10 のみの発現を抑制した MEFs では p16Ink4a および p19ARF の発現量が増加し、Ezh2 の発現量が減少した。しかし FL/SF-Fbxl10 の両者をノックダウンすると FL-Fbxl10 に対するノックダウン効率はほとんど変わらないにも関わらず、これらの遺伝子発現に与える影響が緩和される傾向が見られた。また細胞増殖に関しては FL-Fbxl10 の

ノックダウンが増殖亢進を引き起こすのに対し、SF-Fbx110 のノックダウンは増殖能の低下を引き起こした。また両者をノックダウンした MEFs の増殖能はコントロールと有意な差がなかった。これらの結果は SF-Fbx110 が FL-Fbx110 とは逆方向の機能を持っている可能性を示唆するものである。そのメカニズムが本当に FL-Fbx110 と標的遺伝子の相互作用に対し、競合的に働くためかを調べるためにはさらなる実験が必要である。しかしこのモデルが事実ならば何故、多くの組織で SF-Fbx110 は発現し、かつ FL-Fbx110 よりも発現量が高いのだろうか。あるいは生体において FL-Fbx110 による脱メチル化活性は一定以下に抑制されている必要があるのかもしれない。組織においては FL-Fbx110 と SF-Fbx110 の発現パターンは空間的に共局在しているのだろうか。また SF-Fbx110 特異的ノックアウトマウス、ならびに両 isoform ノックアウトマウスの表現型解析も興味深い課題である。

#### (4) Fbx110 欠損マウスにおける表現型の浸透度

NTDs を表現型に持つ変異マウスのほとんどが、100%未満の浸透度で表現型を呈すると同様に、Fbx110 欠損マウスも全ての個体で NTDs を呈すわけではない。この原因としては「解析した変異マウスの遺伝的背景による影響」と「Fbx110 のホモログによる機能代償」などが考えられる。遺伝的背景の違いはしばしば表現型の浸透度に影響を与える (41)。例えば Cecr2 欠損マウスは BALB/c 背景においては 74%の割合で外脳症を呈すが、FVB/N 背景ではその割合が 0%になる。このことから FVB/N 系統は Cecr2 遺伝子欠損による NTDs に対し抵抗性を持つ修飾遺伝子を持っていると考えられている (41)。

本研究では C57BL/6J-129P2/Ola の混合遺伝的背景の Fbx110 変異マウスを解析した。そこで Fbx110 欠損マウスの表現型浸透度が遺伝的背景に依存するかを調べるため、現在 C57BL/6J 系統へ戻し交配を行っている。まだ予備段階の結果ではあるが、97%-C57BL/6J (N5 戻し交配)の遺伝的背景において Fbx110 欠損胚の表現型浸透率は外脳症 (17%)網膜欠損 (75%)巻き尾 (58%)と混合遺伝的背景に比べ変化した (表 IV-1)。面白いことに外脳症の割合は

減少し (44%⇒17%)、網膜欠損 (40%⇒75%)と巻き尾 (10%⇒58%)のマウスが増加した。このことから、おそらく **Fbxl10** 変異マウスにおいても遺伝的背景は表現型の浸透度に影響を及ぼすことが示唆された。他の原因として **Fbxl11** が **Fbxl10** の機能を一部代償している可能性が考えられる。**Fbxl11**は**Fbxl10**と高い相同性 (**JmjC** ドメインでは約80%)を持つパラログであり、**Fbxl10** 同様 **H3K36me2** に対する脱メチル化酵素である (9)。**Fbxl11** の生物学的機能はほとんど分かっていないが、最近になりヒト **FBXL11** は **NF- $\kappa$ B** や **rRNA** の転写を抑制することが報告された (47, 48)。**rRNA** はヒト **FBXL10** の標的遺伝子でもあることから、両者の機能的重複性は高いことがうかがえる。本研究において **Fbxl11** は胎生期の胚および成体の様々な組織に発現していることが示された。また **Fbxl11** に対する *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行ったところ、**Fbxl11** は空間的にもユビキタスに発現し、**E9.5** 胚の神経上皮細胞と神経堤細胞、および **E14.5** の神経前駆細胞においても発現が確認された (図 IV-1)。よって胎生期の神経管形成において **Fbxl11** が **Fbxl10** の機能を代償している可能性は十分に考えられる。両遺伝子の機能的重複を調べるためには、**Fbxl10/11** ダブルノックアウトマウスを作製することが今後の課題といえる。



Genotype	Embryos (n)	EX (n)	RC (n)	CT (n)
+/+	16	0	0	0
+/-	28	0	0	0
-/-	12	2	9	7

**表 IV-1. C57BL/6J 遺伝的背景における表現型の浸透度**

約 97% C57BL/6J 背景の Fbx110<sup>+/-</sup>マウス同士を交配させ、得られた胎児 (E13.5-E14.5) の遺伝子型を PCR 法により解析した。C57BL/6J-129P2/Ola 混合背景において得られた浸透度に比べ、C57BL/6J 遺伝的背景では外脳症の割合が低く、網膜欠損と巻き尾の割合が高くなった (表 1 参照)。EX, 外脳症; RC, 網膜欠損; CT, 巻き尾。

## Fbx11 mRNA



### 図 IV-1. E9.5 胚の頭部および E14.5 胚の脳における Fbx11 の空間的発現パターン解析

E9.5 における頭部、および E14.5 における脳の組織切片を作製し Fbx11 に対する *in situ* ハイブリダイゼーション解析を行った。Fbx11 の発現は空間的にもユビキタスに発現していた。

## 参考文献

1. Harris, M.J. and Juriloff, D.M. (1999) Mini-review: toward understanding mechanisms of genetic neural tube defects in mice. *Teratology*, **60**, 292-305.
2. Greene, N.D. and Copp, A.J. (2005) Mouse models of neural tube defects: investigating preventive mechanisms. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, **135C**, 31-41.
3. Juriloff, D.M. and Harris, M.J. (2000) Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet*, **9**, 993-1000.
4. Harris, M.J. and Juriloff, D.M. (2007) Mouse mutants with neural tube closure defects and their role in understanding human neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, **79**, 187-210.
5. Greene, N.D., Stanier, P. and Copp, A.J. (2009) Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet*, **18**, R113-29.
6. Lomaga, M.A., Henderson, J.T., Elia, A.J., Robertson, J., Noyce, R.S., Yeh, W.C. and Mak, T.W. (2000) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) deficiency results in exencephaly and is required for apoptosis within the developing CNS. *J Neurosci*, **20**, 7384-93.
7. Klose, R.J. and Zhang, Y. (2007) Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 307-18.
8. Martin, C. and Zhang, Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 838-49.
9. Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P. and Zhang, Y. (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, **439**, 811-6.
10. Shi, Y. (2007) Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat Rev Genet*, **8**, 829-33.
11. Cloos, P.A., Christensen, J., Agger, K., Maiolica, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K.H. and Helin, K. (2006) The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature*, **442**, 307-11.
12. Iwase, S., Lan, F., Bayliss, P., de la Torre-Ubieta, L., Huarte, M., Qi, H.H., Whetstine, J.R., Bonni, A., Roberts, T.M. and Shi, Y. (2007) The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell*, **128**, 1077-88.

13. Tahiliani, M., Mei, P., Fang, R., Leonor, T., Rutenberg, M., Shimizu, F., Li, J., Rao, A. and Shi, Y. (2007) The histone H3K4 demethylase SMCX links REST target genes to X-linked mental retardation. *Nature*, **447**, 601-5.
14. Frescas, D., Guardavaccaro, D., Bassermann, F., Koyama-Nasu, R. and Pagano, M. (2007) JHDM1B/FBXL10 is a nucleolar protein that represses transcription of ribosomal RNA genes. *Nature*, **450**, 309-13.
15. Koyama-Nasu, R., David, G. and Tanese, N. (2007) The F-box protein Fbl10 is a novel transcriptional repressor of c-Jun. *Nat Cell Biol*, **9**, 1074-80.
16. He, J., Kallin, E.M., Tsukada, Y. and Zhang, Y. (2008) The H3K36 demethylase Jhdm1b/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15(Ink4b). *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 1169-75.
17. Suzuki, T., Minehata, K., Akagi, K., Jenkins, N.A. and Copeland, N.G. (2006) Tumor suppressor gene identification using retroviral insertional mutagenesis in Blm-deficient mice. *Embo J*, **25**, 3422-31.
18. Pfau, R., Tzatsos, A., Kampranis, S.C., Serebrennikova, O.B., Bear, S.E. and Tsiichlis, P.N. (2008) Members of a family of JmjC domain-containing oncoproteins immortalize embryonic fibroblasts via a JmjC domain-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 1907-12.
19. Honarpour, N., Du, C., Richardson, J.A., Hammer, R.E., Wang, X. and Herz, J. (2000) Adult Apaf-1-deficient mice exhibit male infertility. *Dev Biol*, **218**, 248-58.
20. Hirata, H., Tomita, K., Bessho, Y. and Kageyama, R. (2001) Hes1 and Hes3 regulate maintenance of the isthmus organizer and development of the mid/hindbrain. *Embo J*, **20**, 4454-66.
21. Chen, J., Chang, S., Duncan, S.A., Okano, H.J., Fishell, G. and Aderem, A. (1996) Disruption of the MacMARCKS gene prevents cranial neural tube closure and results in anencephaly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6275-9.
22. Herrera, E., Samper, E. and Blasco, M.A. (1999) Telomere shortening in mTR<sup>-/-</sup> embryos is associated with failure to close the neural tube. *Embo J*, **18**, 1172-81.
23. Kim, T.H., Goodman, J., Anderson, K.V. and Niswander, L. (2007) Phactr4 regulates neural tube and optic fissure closure by controlling PP1-, Rb-, and E2F1-regulated cell-cycle progression. *Dev Cell*, **13**, 87-102.
24. Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., Elia, A., de la Pompa, J.L., Kagi, D., Khoo, W. *et al.* (1998) Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*, **94**, 339-52.

25. Houde, C., Banks, K.G., Coulombe, N., Rasper, D., Grimm, E., Roy, S., Simpson, E.M. and Nicholson, D.W. (2004) Caspase-7 expanded function and intrinsic expression level underlies strain-specific brain phenotype of caspase-3-null mice. *J Neurosci*, **24**, 9977-84.
26. Ikeda, A., Ikeda, S., Gridley, T., Nishina, P.M. and Naggert, J.K. (2001) Neural tube defects and neuroepithelial cell death in Tulp3 knockout mice. *Hum Mol Genet*, **10**, 1325-34.
27. Merkle, F.T. and Alvarez-Buylla, A. (2006) Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 704-9.
28. Shaulian, E. and Karin, M. (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, **20**, 2390-400.
29. Kulesa, P.M., Bailey, C.M., Kasemeier-Kulesa, J.C. and McLennan, R. (2010) Cranial neural crest migration: new rules for an old road. *Dev Biol*, **344**, 543-54.
30. Banting, G.S., Barak, O., Ames, T.M., Burnham, A.C., Kardel, M.D., Cooch, N.S., Davidson, C.E., Godbout, R., McDermid, H.E. and Shiekhhattar, R. (2005) CECR2, a protein involved in neurulation, forms a novel chromatin remodeling complex with SNF2L. *Hum Mol Genet*, **14**, 513-24.
31. Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. and Li, E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, **99**, 247-57.
32. Vega, R.B., Matsuda, K., Oh, J., Barbosa, A.C., Yang, X., Meadows, E., McAnally, J., Pomajzl, C., Shelton, J.M., Richardson, J.A. *et al.* (2004) Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell*, **119**, 555-66.
33. Copp, A.J. and Greene, N.D. (2010) Genetics and development of neural tube defects. *J Pathol*, **220**, 217-30.
34. van Vliet, J., Oates, N.A. and Whitelaw, E. (2007) Epigenetic mechanisms in the context of complex diseases. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 1531-8.
35. Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A. and Casero, R.A. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, **119**, 941-53.
36. Ruland, J., Duncan, G.S., Elia, A., del Barco Barrantes, I., Nguyen, L., Plyte, S., Millar, D.G., Bouchard, D., Wakeham, A., Ohashi, P.S. *et al.* (2001) Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell*, **104**, 33-42.

37. Gowen, L.C., Johnson, B.L., Latour, A.M., Sulik, K.K. and Koller, B.H. (1996) Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet*, **12**, 191-4.
38. Kipreos, E.T. and Pagano, M. (2000) The F-box protein family. *Genome Biol*, **1**, REVIEWS3002.
39. Tzatsos, A., Pfau, R., Kampranis, S.C. and Tschlis, P.N. (2009) Ndy1/KDM2B immortalizes mouse embryonic fibroblasts by repressing the Ink4a/Arf locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 2641-6.
40. Ivanchuk, S.M., Mondal, S., Dirks, P.B. and Rutka, J.T. (2001) The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. *J Neurooncol*, **51**, 219-29.
41. Davidson, C.E., Li, Q., Churchill, G.A., Osborne, L.R. and McDermid, H.E. (2007) Modifier locus for exencephaly in Cecr2 mutant mice is syntenic to the 10q25.3 region associated with neural tube defects in humans. *Physiol Genomics*, **31**, 244-51.
42. Lamb, T.D., Collin, S.P. and Pugh, E.N., Jr. (2007) Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 960-76.
43. Gustavsson, P., Copp, A.J. and Greene, N.D. (2008) Grainyhead genes and mammalian neural tube closure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, **82**, 728-35.
44. Pirty, M.K., Locker, J. and Schreiber-Agus, N. (2005) Rybp/DEDAF is required for early postimplantation and for central nervous system development. *Mol Cell Biol*, **25**, 7193-202.
45. Donohoe, M.E., Zhang, X., McGinnis, L., Biggers, J., Li, E. and Shi, Y. (1999) Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality. *Mol Cell Biol*, **19**, 7237-44.
46. Bu, P., Evrard, Y.A., Lozano, G. and Dent, S.Y. (2007) Loss of Gcn5 acetyltransferase activity leads to neural tube closure defects and exencephaly in mouse embryos. *Mol Cell Biol*, **27**, 3405-16.
47. Lu, T., Jackson, M.W., Singhi, A.D., Kandel, E.S., Yang, M., Zhang, Y., Gudkov, A.V. and Stark, G.R. (2009) Validation-based insertional mutagenesis identifies lysine demethylase FBXL11 as a negative regulator of NFkappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 16339-44.
48. Tanaka, Y., Okamoto, K., Teye, K., Umata, T., Yamagiwa, N., Suto, Y., Zhang, Y. and Tsuneoka, M. JmjC enzyme KDM2A is a regulator of rRNA transcription in response

- to starvation. *Embo J*, **29**, 1510-22.
49. Li, E., Bestor, T.H. and Jaenisch, R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, **69**, 915-26.
  50. Hata, K., Okano, M., Lei, H. and Li, E. (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, **129**, 1983-93.
  51. Guy, J., Hendrich, B., Holmes, M., Martin, J.E. and Bird, A. (2001) A mouse Mesp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet*, **27**, 322-6.
  52. Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H. *et al.* (2002) G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev*, **16**, 1779-91.
  53. Dodge, J.E., Kang, Y.K., Beppu, H., Lei, H. and Li, E. (2004) Histone H3-K9 methyltransferase ESET is essential for early development. *Mol Cell Biol*, **24**, 2478-86.
  54. O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S.C., Surani, M.A. and Jenuwein, T. (2001) The polycomb-group gene Ezh2 is required for early mouse development. *Mol Cell Biol*, **21**, 4330-6.
  55. Nimura, K., Ura, K., Shiratori, H., Ikawa, M., Okabe, M., Schwartz, R.J. and Kaneda, Y. (2009) A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nkx2-5 to Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature*, **460**, 287-91.
  56. Hayashi, K., Yoshida, K. and Matsui, Y. (2005) A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature*, **438**, 374-8.
  57. Madan, V., Madan, B., Brykczynska, U., Zilbermann, F., Hogeveen, K., Dohner, K., Dohner, H., Weber, O., Blum, C., Rodewald, H.R. *et al.* (2009) Impaired function of primitive hematopoietic cells in mice lacking the Mixed-Lineage-Leukemia homolog MLL5. *Blood*, **113**, 1444-54.
  58. Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A. *et al.* (2001) Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell*, **107**, 323-37.
  59. Wang, J., Scully, K., Zhu, X., Cai, L., Zhang, J., Prefontaine, G.G., Kronen, A., Ohgi, K.A., Zhu, P., Garcia-Bassets, I. *et al.* (2007) Opposing LSD1 complexes function in

- developmental gene activation and repression programmes. *Nature*, **446**, 882-7.
60. Okada, Y., Scott, G., Ray, M.K., Mishina, Y. and Zhang, Y. (2007) Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature*, **450**, 119-23.



## 謝辞

まず、本研究を行う機会を与えてくださった吉田進昭教授に深く感謝いたします。東京大学医科学研究所疾患プロテオミクスラボラトリ蛋白質解析室の大海忍先生には抗 Fbx110 抗体作製の際、抗原となるペプチドを合成していただきました。深く御礼申し上げます。本研究を進めるにあたって実験技術を親切に指導していただき、またデータに対し活発に議論していただいた徳永暁憲先生をはじめとする研究室の諸先輩方ならび、後輩に心から感謝いたします。

井上純一郎先生（東京大学医科学研究所 分子発癌分野）、宮島篤先生（東京大学分子細胞生物学研究所 発生・再生研究分野）、村上善則先生（東京大学医科学研究所 人癌病因遺伝子分野）、渡邊俊樹先生（東京大学医科学研究所 病態医療科学分野）には本論文を査読していただき、貴重なアドバイスを頂きました。深く御礼申し上げます。