

博士学位論文

ツメガエルにおけるヒストン修飾依存的な
転写制御による予定プラコード・神経堤の
境界形成機構の解明

東京大学大学院総合文化研究科

広域科学専攻生命環境科学系

松川晋也

目次

1. 略語一覧 p. 3
2. 要旨 p. 4
3. 背景 p. 6
 - 3-1. 初期原腸胚における BMP シグナルの調節的变化 p. 6
 - 3-2. 神経板境界の発生運命 p. 8
 - 3-3. 予定プラコードと神経堤形成に関連する分子シグナル p. 12
 - 3-4. 予定プラコードと神経堤形成に関連する転写因子 p. 13
 - 3-5. 予定プラコードと神経堤を作り分けるメカニズム p. 14
 - 3-6. 初期発生のヒストン修飾による転写調節 p. 15
 - 3-7. PRDM family について p. 16
 - 3-8. ツメガエルを用いる利点 p. 17
4. 結果 p. 19
 - 4-1. *PRDM12* は神経胚期で予定プラコード側方と神経板に、
尾芽胚期で *profundal* プラコードと三叉神経プラコードに発現する p. 19
 - 4-2. *PRDM12* は BMP と Wnt シグナルによって制御され、
Pax3 によって転写される p. 23
 - 4-3. *PRDM12* の過剰発現はヒストン H3K9 のトリメチル化を介して
神経堤遺伝子の発現を抑制する p. 28
 - 4-4. *PRDM12* の機能は PR ドメインと ZNF ドメインを必要とする p. 33
 - 4-5. *PRDM12* は *Foxd3*, *Slug*, *Sox8* プロモーター領域でヒストン H3K9 の
トリメチル化を促進する p. 42
 - 4-6. *PRDM12* のノックダウンは予定三叉神経プラコード遺伝子の発現を抑制し、
神経堤遺伝子の発現を拡大させる p. 49
 - 4-7. *Kdm4a* の過剰発現は *PRDM12* のノックダウンと同様の効果を示し、
PRDM12 の過剰発現の効果をレスキューする p. 57
 - 4-8. *G9a* は *PRDM12* や *Msx1* と協調的に機能する p. 67

5. 考察	p. 74
5-1. PRDM12 の発現領域と上流因子	p. 74
5-2. PRDM12 ノックダウン胚と <i>Kdm4a</i> 過剰発現胚の差異	p. 75
5-3. 神経堤遺伝子の発現制御によって予定三叉神経プラコード遺伝子の発現抑制が起こる理由	p. 76
5-4. ヒストン H3K9 のメチル化が広領域でおこる理由	p. 77
5-5. G9a の選択性が予定プラコードと神経堤におけるパターン制御をする可能性	p. 78
5-6. 予定プラコードと神経堤へ分化するためのコンピテンス	p. 80
5-7. PRDM12 が他因子に結合する可能性	p. 81
5-8. 最後に	p. 81
6. 実験方法	p. 83
6-1. DNA コンストラクション	p. 83
6-2. 胚の取扱い	p. 88
6-3. Whole-mount in situ hybridization、Double in situ hybridization、Red gal 染色	p. 88
6-4. ゲノム抽出	p. 89
6-5. Total RNA の単離、RT-PCR 法、および RT-qPCR 法	p. 89
6-5. ウェスタンブロッティング法	p. 92
6-6. ルシフェラーゼレポーター解析	p. 93
6-7. ChIP-qPCR 法	p. 93
6-8. ゲルシフトアッセイ	p. 94
6-9. 培養細胞の取り扱い	p. 94
6-10. 免疫沈降法	p. 95
7. 謝辞	p. 96
8. 引用文献	p. 97

1. 略語一覧

APC: Adenomatous polyposis coli

BMP: Bone Morphogenetic Protein

Chd: Chordin

CNS: Conserved non-coding sequence

DAI: Dorsoanterior index

Dkk1: Dickkopf 1

DISH: Double in situ hybridization

EnR domain: Engrailed repressor domain

ES 細胞: Embryonic Stem Cell

FGF: Fibroblast Growth Factor

H3K4me3: トリメチル化したヒストン H3K4

H3K9me3: トリメチル化したヒストン H3K9

H3K27me3: トリメチル化したヒストン H3K27

HP1: Heterochromatin protein 1

Kdm: lysine (K) specific demethylase

MO: Morpholino Oligo

PHD: Plant homeodomain

PR domain: PRDI-BF1 and RIZ homology domain

PRDM12: PR domain containing 12

Szl: Sizzled

WISH: Whole-mount in situ hybridization

ZNF: Zinc Finger

2. 要旨

脊椎動物の初期発生において、予定プラコードと神経堤は神経板境界から派生する。2つの組織がモルフォゲンの勾配や複数の転写因子による調節を受け、それぞれの発生運命が位置づけられる一方で、2つの組織に関連するヒストン修飾に依存した転写調節の影響は未解明な点が多く存在する。私は予定プラコードと神経堤の発生運命がヒストン修飾に依存した転写調節によって決定されているという仮説を立て、予定プラコード特異的に発現する *PRDM12* に注目した。本研究は主に *PRDM12* の詳細な機能、発生における役割、*PRDM12* 以外のヒストン修飾因子が2つの組織に与える影響について評価した。まず、ツメガエルにおける *PRDM12* の発現領域を Whole-mount in situ hybridization によって検出した。その結果、初期神経胚から予定プラコード側方領域に発現することが明らかとなった。また、*PRDM12* の過剰発現胚では、神経堤遺伝子の発現抑制が観察されたのに対して、予定プラコード遺伝子の発現に変化はみられなかった。*PRDM12* がヒストンのメチル化を促進するかどうか、ウェスタンブロットによって調査した結果、*PRDM12* 依存的にヒストン H3K9 のトリメチル化の増加が観察された。*PRDM12* の標的遺伝子を探索した結果、*Foxd3* が *PRDM12* の標的遺伝子の候補としてあげられた。そこで、*PRDM12* がジンクフィンガー (ZNF) ドメインを介して *Foxd3* プロモーターに結合するか検証するため、ルシフェラーゼ解析と ChIP-qPCR 解析を行った。ルシフェラーゼ解析の結果、*PRDM12* の結合配列依存的に *PRDM12* の過剰発現によるルシフェラーゼの発現抑制が観察された。また ChIP-qPCR 解析では、*PRDM12* に依存した、*Foxd3* プロモーター上におけるヒストン H3K9 のトリメチル化が観察された。加えて、*Foxd3* 以外の神経堤遺伝子 *Sox8* や *Slug* のプロモーターにおいても同様に、*PRDM12* の発現に依存するヒストン H3K9 のメチル化が観察された。これらの結果は *PRDM12* が神経堤遺伝子のプロモーターに結合し、ヒストン H3K9 のメチル化を介して、神経堤遺伝子の発現抑制を行っていることを示唆する。一方、神経堤領域ではヒストン脱メチル化酵素 *Kdm4a* が発現していることが明らかとなった。*Kdm4a* を過剰発現した胚では、神経堤遺伝子の発

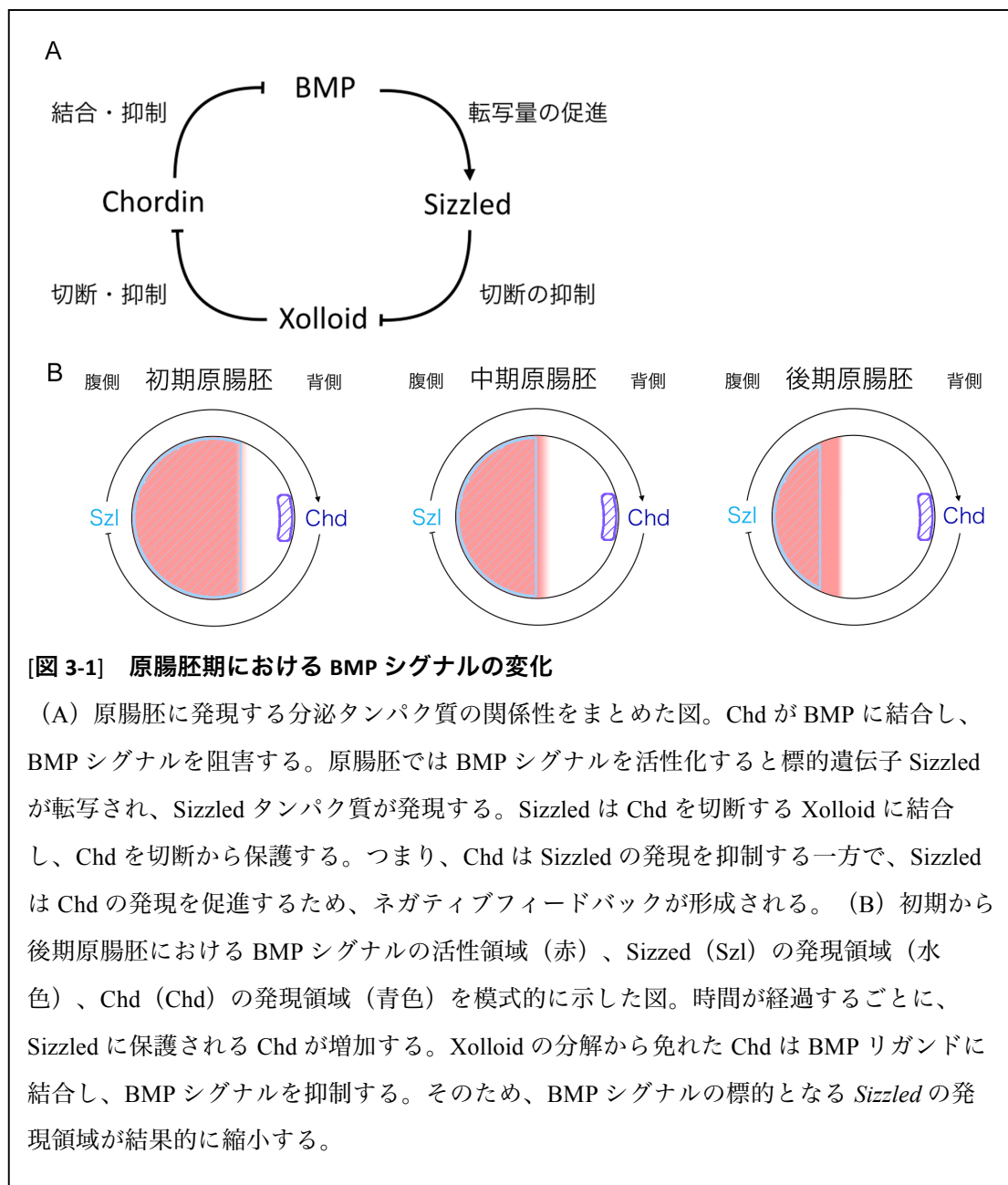
現に変化がない一方で、予定プラコード遺伝子の発現抑制が観察された。この結果から、Kdm4a と PRDM12 が相補的な関係にあることが示唆された。そこで PRDM12 と Kdm4a の mRNA を共注入したところ、予想通り PRDM12 の過剰発現で生じる神経堤遺伝子の発現抑制と Kdm4a による過剰発現で起こる予定プラコード遺伝子の抑制がそれぞれ解除された。また、ChIP-qPCR の結果から、PRDM12 の過剰発現によって促進された Foxd3 プロモーター上のヒストン H3K9 のトリメチル化が Kdm4a の過剰発現によって相殺されることがわかった。これらの結果から、予定プラコード側方領域において、PRDM12 が神経堤遺伝子のプロモーター上のヒストン H3K9 のメチル化を促進し、神経堤遺伝子の発現抑制を行う一方で、神経堤領域では Kdm4a が神経堤遺伝子のプロモーター上のヒストン H3K9 の脱メチル化を行い、転写可能な状態を維持することが示唆された。他にも、ヒストンメチル化転移酵素 G9a が結合パートナーを選択する事によって、予定プラコードと神経堤のパターンを決定する可能性を見出した。以上の結果から、ヒストン修飾による転写制御が予定プラコードと神経堤におけるパターン化に必要であり、2つの組織の境界形成に貢献していることが示された。

3. 背景

3-1. 初期原腸胚における BMP シグナルの調節的变化

脊椎動物における胚発生は精子と卵の接合から始まる。接合した受精卵は分裂を繰り返して、様々なイベントを経て複雑な構造を作り、やがて約 200 種類の組織を有する個体として発生する。一見、複雑に感じる発生現象は受精卵における物質の不均一な偏りを引き金とする連鎖的な反応によって起こり、結果として分子シグナルに依存したパターンが形成される。ツメガエル初期胚のパターン形成において、主要な役割を担う領域は胚の背側植物局側に位置する原口背唇部（オーガナイザー）であり、オーガナイザーは神経を含む背側領域全体の誘導活性を有する（Spemann and Mangold, 1924）。その後、分子生物学的手法を取り入れたことで、初期胚発生を制御する分子が数多く同定された。例えば、オーガナイザーから背側領域の構造を誘導する分子実体として *Chordin* (Chd) が同定され（Sasai et al., 1994）、Chd が神経誘導活性を有することが明らかとなった（Sasai et al., 1995）。アフリカツメガエル胚におけるアニマルキャップと呼ばれる胞胚期の外胚葉領域では BMP4 (Bone morphogenetic protein 4) が存在し、BMP4 による BMP シグナルの活性化がアニマルキャップの発生運命を表皮へ決定づける（Fainsod et al., 1994）。Chd は BMP4 に直接結合し BMP シグナルを抑制するため、Chd を過剰発現させたアニマルキャップは神経に分化する事が知られている（Sasai et al., 1995）。Chd と BMP に加え、初期胚では Xolloid や Sizzled など他の分泌タンパク質も外胚葉の予定運命形成に重要な役割を果たす（Piccolo et al., 1997; Hojoo et al., 2006）。Xolloid は Chd に対するメタロプロテアーゼとして機能し、Chd に対して抑制的に働く（Piccolo et al., 1997）。この Xolloid による切断から Chd を保護するタンパク質が Sizzled であり、Sizzled は Xolloid に直接結合し、Chd に対する切断活性を抑制する（Hojoo et al., 2006）。また、Sizzled は原腸胚における BMP シグナルの直接的なターゲットとなっているため、腹側に局在し転写される（Marom et al., 1999; Hojoo et al., 2006）。これら 4 つの分泌タ

ンパク質は背腹軸上で長距離ネガティブフィードバックを構成する（図 3-1A）。そして、初期原腸胚から後期原腸胚にかけて、ネガティブフィードバックに依存した *Sizzled* の発現領域と BMP シグナルの活性領域の変化が生じる（図 3-1B：Inomata et al., 2013）。その結果、背側領域から腹側領域にかけて、BMP シグナルを受容しない細胞集団、中間的に受容する細胞集団、受容する細胞集団が生じ、最終的に BMP シグナルの強弱に応じた遺伝子発現のパターンが形成される。

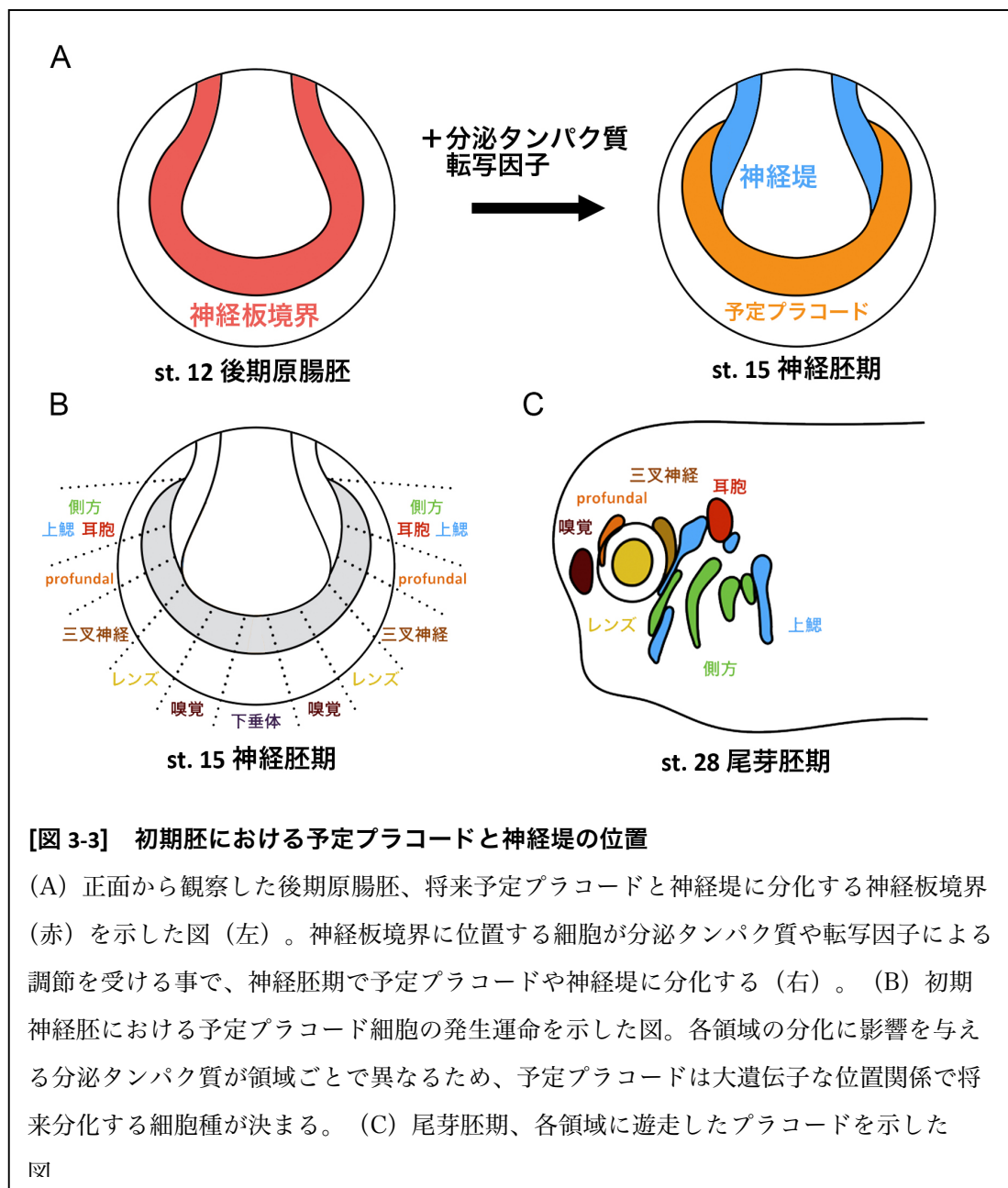


3-2. 神経板境界の発生運命

原腸胚期における BMP シグナルの変化に応じて、外胚葉は大きくわけて3つの組織に分化する（図 3-3）。BMP シグナルを受容する細胞は将来表皮へ分化する非神経領域、BMP シグナルを受容しない細胞は将来中枢神経へ分化する神経領域、そして中間的に BMP シグナルを受容する細胞は神経板境界へ分化する（図 3-2: 図 3-3A; Dincer et al., 2013; Reichert et al., 2013; Tribulo et al., 2003）。その後、神経板境界は stage 15（神経胚期）に、遊走性を持った組織である予定プラコードと神経堤へ細分化した後、様々な細胞へ分化する（図 3-3A, B）。例えば、予定プラコードは下垂体プラコード、レンズプラコード、嗅覚プラコード、三叉神経プラコード、上鰓プラコード、耳胞プラコード、側方プラコードなどに分化することが報告されている（図 3-3C; reviewed in Baker and Bronner-Fraser, 2001; Saint-Jeannet and Moody, 2014; Schlosser, 2010）。下垂体プラコードは前方神経から発生する視床下部と相互作用し、下垂体を形成し（Suga et al., 2011）、レンズプラコードは独立的に水晶体に分化し、間脳の一部から発生する眼胞と協調して目を形成する（Bailey et al., 2006; Eiraku et al., 2011）。



また、嗅覚プラコード、三叉神経プラコード、上鰓プラコード、耳胞プラコード、側方プラコードは中枢神経とそれぞれの感覚器を接続する脳神経に分化することが知られている（表 3-1）。これらのプラコードに対し、神経堤の一部も同様に感覚器と中枢神経を接続する脳神経に分化する（表 3-1）一方で、神経堤細胞は色素細胞、心臓の平滑筋、歯を含む頭蓋骨などにも分化する事が知られている（表 3-2; reviewed in Grenier et al., 2009; Minoux and Rijli, 2010; Steventon et al., 2014; Theveneau and Mayor, 2012）。



神経堤細胞は神経胚期の位置に応じて将来分化する細胞の種類が全て決定されているのではなく、複数の細胞種に分化できる多能性を有した状態で遊走することが明らかとなっている（Bronner-Fraser and Fraser, 1988）。神経堤細胞における分化の方向性は、Sox9 や Sox10 など神経堤に発現する転写因子がそれぞれの特性を獲得させる遺伝子群の発現を誘導することによって決定されることが知られている（Meulemans and Bronner-Fraser, 2004）。このように多様な発生運命を持つ予定プラコードと神経堤が神経板境界から派生する際には、それぞれの分化に関連する分泌タンパク質と転写因子が関わっている。

脳神経一覧

名称	番号	機能	起原
嗅神経	I	嗅覚	プラコード
視神経	II	視覚	プラコード
動眼神経	III	眼瞼	
滑車神経	IV	眼球運動	
三叉神経	V	知覚	プラコードと神経堤
外転神経	VI	眼球運動	
顔面神経	VII	主に運動性	神経堤
内耳神経	VIII	聴覚	プラコード
舌咽神経	IX	混合性	プラコードと神経堤
迷走神経	X	混合性	プラコードと神経堤
副神経	XI	肩や首	
舌下神経	XII	舌の運動	

[表 3-1] 脳神経はプラコードと神経堤に由来する

12 ある脳神経の内、プラコードと神経堤に由来する脳神経をまとめた表。ウィルト発生生物学（2006）より引用、一部改変。

主な神経堤の派生物

組織	派生物
色素細胞	メラノサイト
知覚神経系	脊髄神経および脳神経
自律神経系（交感）	頸部、椎骨神経節 内臓と腸管神経節
自律神経系（副交感）	頭部と頸部の副交感神経 内臓内在性神経節
骨格	魚類と両生類、ひれの間充織 頭部柱状骨、歯の象牙芽細胞、頭蓋膜性骨
結合組織	頭部間充織 心臓の大動脈壁
内分泌腺	副腎髄質 カルシトニン産生細胞
支持細胞	グリア細胞 シュワン細胞

[表 3-2] 神経堤は様々な組織へ派生する

神経堤は遊走後、様々な組織へ分化する性質を持つ。神経堤に由来するとされる組織をまとめた表。ウィルト発生生物学（2006）より引用、一部改変。

3-3. 予定プラコードと神経堤形成に関連する分子シグナル

予定プラコードと神経堤の分化を制御する分泌タンパク質に関する報告はいくつか存在する。予定プラコードの分化誘導に関連するヒト ES 細胞を用いた研究では、BMP 阻害因子 Noggin と FGF (Fibroblast Growth Factor) リガンドの添加により予定プラコード様細胞が誘導できることを報告している (Dincer et al., 2013)。また、マウス ES 細胞を用いた研究は BMP4 と TGF- β シグナルの阻害物質 SB1431542 を加え数日培養した後、FGF を添加し培養することで、予定プラコード様細胞が誘導できることを示している (Koehler et al., 2013)。ヒト ES 細胞とマウス ES 細胞の大きな違いの 1 つは、ヒト ES 細胞では BMP リガンドを分泌する一方で、マウス ES 細胞は BMP リガンドを分泌しないことにある。予定プラコード様細胞を誘導するためには、Noggin や BMP リガンドの添加による BMP シグナルの調節が必要であると考えられる。加えて、ツメガエルの研究は FGF シグナルの阻害物質 SU5402 で FGF シグナルを抑制した胚では予定プラコード遺伝子 *Six1* の発現が抑制される一方で、*FGF8* の過剰発現が異所的な *Six1* の発現を誘導することを明らかにしている (Ahrens and Schlosser, 2005)。これらの報告から、脊椎動物の予定プラコードの形成には、中間的な BMP シグナルと FGF シグナルの活性が必要と考えられる (図 3-3A)。

これらに対して、神経板から神経堤への分化は初期発生における後方化シグナルとして機能する FGF、レチノイン酸、Wnt シグナルを必要とし、特に FGF と Wnt シグナルの活性化が効率よく神経堤を誘導するために必要である事が報告されている (Villanueva et al., 2002)。別の研究グループは FGF8 と Wnt シグナルが神経堤形成に重要であることを示し、FGF8 を抑制した胚で観察できる神経堤遺伝子の発現抑制が *Wnt8* の過剰発現によって回復できることから FGF シグナルは Wnt シグナルを介して神経堤形成に寄与していることを報告している (Carmona-Fontine et al., 2007)。加えて、Wnt 阻害因子である *Dkk1* (Dickkopf 1) の過剰発現胚では神経堤細胞の形成が抑制され、また、*Dkk1* をノックアウトしたマウスでは神経堤領域が頭部領域まで拡大する事を報告している

(Carmona-Fontaine et al., 2007)。更に、マウス ES 細胞における研究は上述した FGF シグナルに加えて中間的な BMP シグナルの活性が神経堤の誘導に必要であることを報告している (Aihara et al., 2010)。神経堤への分化は中程度の BMP シグナルの活性に加え、FGF や Wnt シグナルの活性を必要とする事が示唆される (図 3-3A)。

3-4. 予定プラコードと神経堤形成に関連する転写因子

予定プラコードと神経堤の分化に関連する転写因子も、これまでに多く同定されている。中でも神経板境界遺伝子 *Dlx3* は予定プラコードの分化に寄与する (Hans et al., 2004; Kaji and Artinger, 2004; Woda et al., 2003)。Dlx3 は BMP シグナルを受容することで誘導され、予定プラコード遺伝子 *Six1* や *Eya1* の発現を促進し、予定プラコードへの分化を促す (Woda et al., 2003)。また、近年の報告から Dlx3 は予定プラコード遺伝子の発現を促すだけでなく、非神経細胞のコンピテンスを調節し、非神経細胞における分化のポテンシャルを決定する働きを持つ事が明らかになっている (Pieper et al., 2012)。Dlx3 の過剰発現は神経板遺伝子、神経板境界遺伝子、そして神経堤遺伝子の発現を制限する一方で、Dlx3 MO によるノックダウン胚ではそれらの遺伝子発現領域が非神経領域まで拡大する (Pieper et al., 2012)。このことから *Dlx3* が予定プラコード形成に必須な遺伝子であると考えられる (図 3-3A)。

これに対して、神経板境界遺伝子 *Msx1* は神経堤の前駆細胞で発現し、神経堤への分化を促す役割を持っている (Monsoro-Burq et al., 2005)。先行研究は *Msx1-GR* による時期特異的な *Msx1* の活性がいくつかの神経堤遺伝子の発現を誘導する事を報告している (Tribulo et al., 2003)。また、別の先行研究は Wnt や FGF シグナル存在下で、*Msx1* と *Pax3* の共発現が神経堤遺伝子の発現を誘導し、神経堤細胞を模倣する事ができることを報告している (Monsoro-Burq et al., 2005)。加えて、*Noggin* と *Msx1* を過剰発現したアニマルキャップでは、神経堤形成に必須な遺伝子として知られる *Pax3* と *Zic1* の発現を誘導することができる (Milet et al., 2013; Monsoro-Burq et al., 2005; Sato et al., 2005)。こ

これらの結果から、*Msx1* は神経堤形成に重要な役割を持つ遺伝子といえる（図 3-3A）。

3-5. 予定プラコードと神経堤を作り分けるメカニズム

予定プラコードと神経堤は非神経と神経に由来する組織であるとの見解もある（reviewed in Saint-Jeannet and Moody, 2014）。しかし、2つの組織の前駆細胞である神経板境界の細胞は予定プラコードと神経堤どちらにも分化するコンピテンスを持ち、各細胞に発現する転写因子が徐々に分化するためのコンピテンスを失わせ、分化方向を決定するという報告も存在する（Pieper et al., 2013）。実際に、運命未決定な予定表皮領域を神経板境界に移植すると、より後期の発生ステージから切除した移植片の方が予定プラコード遺伝子 *Six1* を発現する一方で、神経堤遺伝子 *Foxd3* は移植片に発現しにくくなる（Pieper et al., 2013）。しかし、運命未決定な予定神経領域を神経板境界へ移植した移植片では、*Six1* と *Foxd3* が共に発現しなくなる（Pieper et al., 2013）。この結果から、非神経と神経領域に由来する因子が予定プラコードと神経堤の領域化を行っているわけではなく、他の要素によって予定プラコードと神経堤の領域化が行われている事が予想され、少なくとも神経板境界に局在する物質が2つの組織の形成に貢献していることが考えられる。1つの可能性として、神経板境界に局在する転写因子 *Dlx* と *Msx* が予定プラコードと神経堤における明確な境界を形成するのに貢献することがあげられる。*Dlx* と *Msx* は互いに結合し合うことで互いを抑制する働きを有している（Zhang et al., 1997）。つまり、予定プラコード領域では *Dlx* の高い転写活性化レベルによって誘導される一方で、神経堤遺伝子は *Msx* の高い転写活性化レベルによって誘導され、これらの相互抑制が初期の予定プラコードと神経堤の境界形成に貢献している可能性が示唆される。しかしながら、近年の研究報告は *Dlx3* MO を顕微注入した胚において、神経堤領域が予定プラコード領域へ拡大しないこと（Pieper et al., 2013）を示しているため、*Dlx* と *Msx* による転写制御メカニズムとは異なる制御メカニズムによって予定プラコードと神経堤が形成されることが示唆される。

3-6. 初期発生のヒストン修飾による転写調節

近年、エピジェネティックな制御因子が初期胚における分化を制御するという報告が数多く存在する。DNAメチル化酵素 Dnmt3a は神経板境界に発現し、神経板遺伝子 *Sox2* や *Sox3* の転写を抑制することで神経堤の分化に寄与する (Hu et al., 2012)。同様にゼブラフィッシュ胚における先行研究は Dnmt3 が三叉神経など末梢神経の形成に関与することを報告している (Rai et al., 2010)。Dnmt3 に対して、Dnmt1 はより組織特異的な分化を調節し、ヒストンメチル化酵素 Suv39h1 と協調的に目の形成に関与する (Rai et al., 2006)。また、APC (Adenomatous polyposis coli) をノックアウトしたゼブラフィッシュ胚では、脱メチル化酵素が発現しなくなり、脱メチル化を介した遺伝子調節が機能しなくなる (Rai et al., 2010)。これらの結果から DNA のメチル化は初期胚における分化に対して重要な役割を持つことが考えられる。また、DNAメチル化酵素だけでなくヒストン修飾酵素も初期胚の分化に寄与する。ゼブラフィッシュ胚における先行研究は、ヒストンメチル化酵素 G9a のノックダウン胚が中枢神経および末梢神経系に異常をきたすことから G9a が神経全般の分化に貢献していることを報告している (Rai et al., 2010)。また、ニワトリ胚を用いた先行研究はエピジェネティックな制御因子であるヒストン脱メチル化酵素 Kdm4a (Lysine (K) specific demethylase 4a) がニワトリ胚の神経堤領域に発現し、神経堤遺伝子のプロモーター領域のヒストン H3K9 を脱メチル化し、転写可能な状態を保つ役割を持つと報告している (Strobl-Mazzulla et al., 2010)。加えて、Hirabayashi and Gotoh はヒストン修飾による遺伝子発現の調節が神経発生に重要な役割を果たすと報告している (reviewed in Hirabayashi and Gotoh, 2010)。

これらの研究結果から、私はヒストン修飾因子が外胚葉における分化の制御に関連する可能性が高いと考え、予定プラコード欠損胚と正常胚を比較した比較型マイクロアレイの結果 (Tanibe et al., 2008) から、予定プラコード特異的に発現するエピジェネティックな制御因子を探索し、PRDM12 (PR domain containing 12) を選出した。

3-7. PRDM family について

PRDM12 はヒストンメチル化関連因子として知られ、PRDM family に属するタンパク質である。PRDM family に属するタンパク質は PRDM1 から PRDM16 まで報告され、いくつかは初期発生における機能や役割が明らかとなっている (reviewed in Hohenauer and Moore, 2012)。マウス初期胚では、PRDM1/Blimp1 と PRDM14 は共に BMP シグナルによって誘導され、将来生殖細胞へ分化する始原生殖細胞に発現し、始原生殖細胞の形成に重要な役割を持つ (Ohinata et al., 2005; Ohinata et al., 2009)。特に PRDM14 は生殖細胞だけでなく、内部細胞塊が分化全能性を獲得する際に必要なエピジェネティックな修飾を制御する機能を持つ (Yamaji et al., 2013)。また、始原生殖細胞だけでなく、Blimp1 は原腸胚期、前方内胚葉に発現し、頭部形成遺伝子 *Cerberus* の発現を誘導する (de Souza et al., 1999)。加えて、Blimp1 は *Foxd3* と *AP2* のエンハンサー領域のメチル化を介して転写を促進し、神経堤の分化に貢献する (Powell et al., 2013)。PRDM family に属するタンパク質はヒストンのメチル化に関わる PR ドメイン (PRDI-BF1 and RIZ homology domain) を持つが、Blimp1 や PRDM14 のようにヒストンメチル化酵素活性を持たないタンパク質が存在する一方で、PRDM2 や PRDM9 のように自らヒストン修飾を行う機能を持つものも存在する (Kim et al., 2003; Hayashi et al., 2005)。マイクロアレイによって同定した PRDM12 はゼブラフィッシュ胚やマウス胚では中枢神経系の側方領域と頭蓋プラコードに発現する (Kinameri et al., 2008; Sun et al., 2008)。加えて、マウス胚性腫瘍細胞である P19 細胞において、PRDM12 が細胞増殖を制御することが報告されている (Yang and Shinkai, 2013)。しかし、胚発生における PRDM12 の役割や重要性については未だ明らかになっていない。そこで、私は神経発生における知見が豊富なアフリカツメガエルを用いて初期発生における PRDM12 の機能について明らかにすることにした。

3-8. ツメガエルを用いる利点

ツメガエルは多卵性で適切な温度管理をすれば四季を問わず採卵することができ、ツメガエルは受精からわずか3日間で頭部や体節などの基本構造が形成されるため、スピーディな実験が可能である。ツメガエル胚は直径約1mmと大きく、DNA、RNA、タンパク質などを容易に注入することができる。また、上述した神経発生を始め初期発生に関する知見が豊富に存在し、それらを評価するアッセイ系が確立している。特に胞胚期の外胚葉領域であるアニマルキャップを単離培養するアニマルキャップアッセイは条件を付け加えることで単一あるいは複数の組織を効率的に誘導することができる。例えば、BMPシグナルの抑制とWntシグナルの促進によって神経堤が誘導されることが知られているが、BMP抑制因子*Chd*と*Wnt8*のmRNAを注入した胚からアニマルキャップを切り出し単離培養した場合、単離したアニマルキャップは神経堤様細胞に分化することが知られる(Sato et al., 2005)。他にも、BMP抑制因子Nogginのタンパク質を含む培養液でアニマルキャップを培養した場合、培養したアニマルキャップは予定プラコード様細胞に分化する(Brugmann et al., 2004)。また、切り出したアニマルキャップが外胚葉に由来する組織に分化するメカニズムは明らかとなっている。アニマルキャップでは外胚葉に発生運命を方向付ける転写因子*XFDL156*が発現し、*XFDL156*は中胚葉誘導を促進する因子p53に対する競合阻害因子として機能する(Sasai et al., 2008)。そのため、アニマルキャップは人為的に中胚葉誘導因子を作用させない限り外胚葉に由来する組織へ分化することから、ツメガエルは外胚葉に由来する表皮や神経だけでなく、予定プラコードや神経堤を研究する最適なモデル生物の一つと言えるだろう。

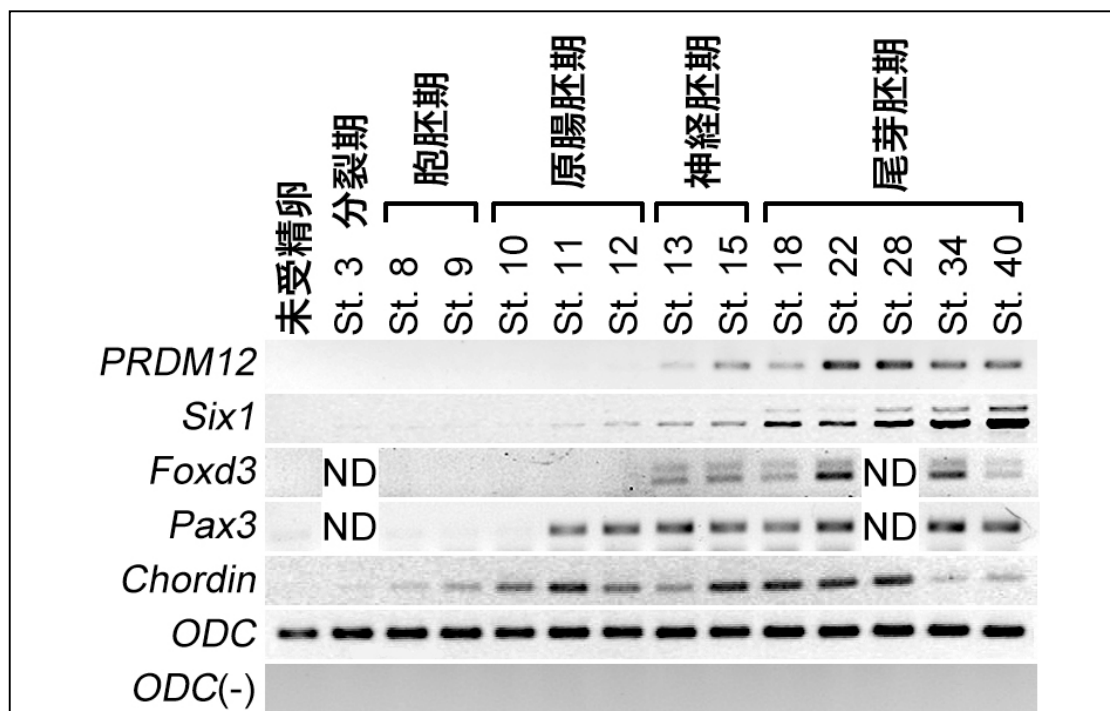
本研究は神経板境界から分化する予定プラコードと神経堤の境界がどのようにして明確化されていくか、ヒストン修飾関連因子に焦点をあて、詳細なメカニズムを解明する事を目標とした。特に、初期発生における役割が明らかとなっていないPRDM12がどのような機能を持ち、予定プラコードと神経堤の分化に関わるかを明らかにする。そして、

予定プラコードと神経堤に派生する細胞がどのようなヒストン修飾によって調節を受けるのか、本研究は PRDM12 以外の修飾因子についても議論する。

4. 結果

4-1. *PRDM12* は神経胚期で予定プラコード側方と神経板に、尾芽胚期で *profunda* プラコードと三叉神経プラコードに発現する

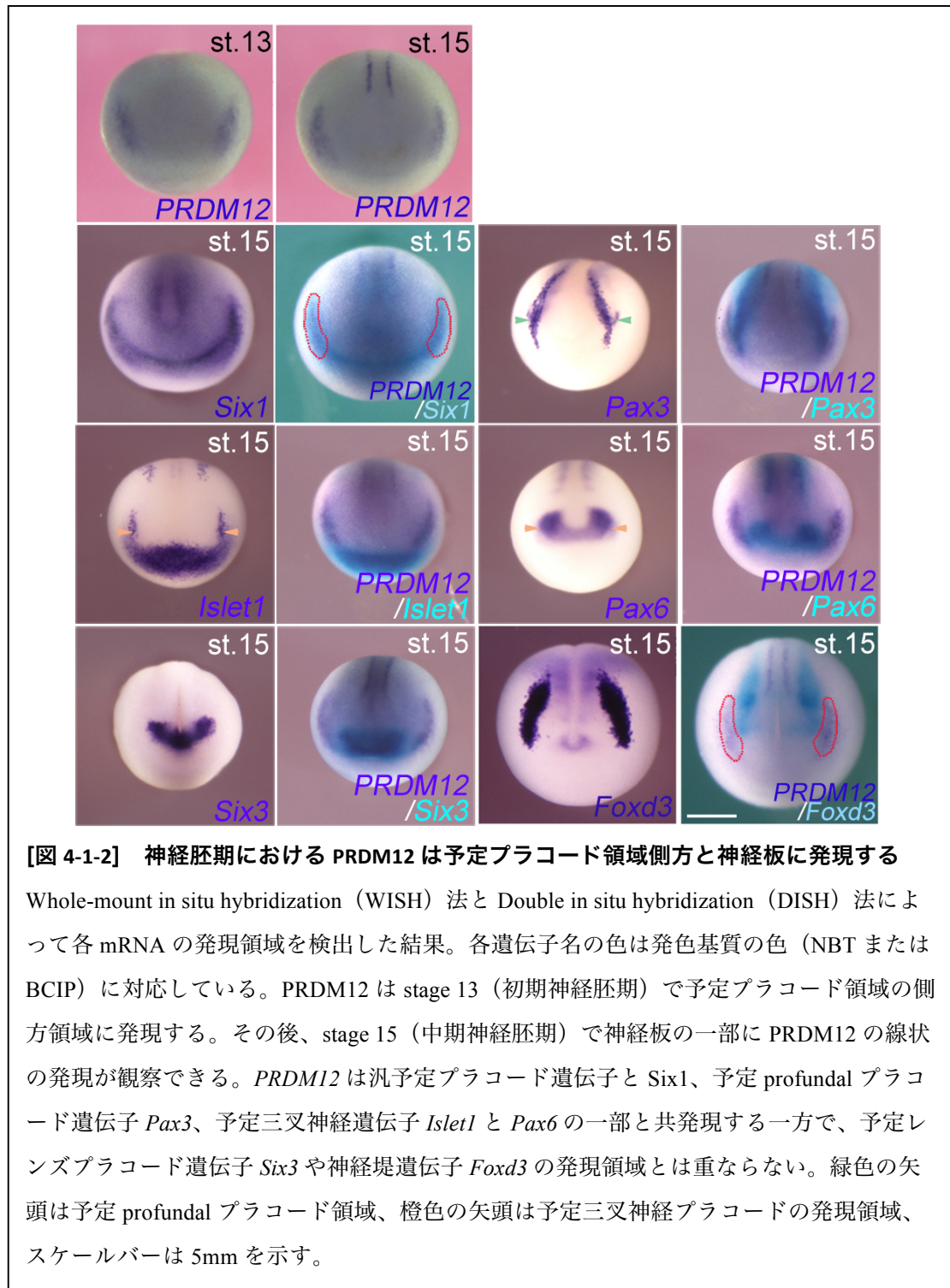
ツメガエルにおける *PRDM12* の時空間的発現パターンは未だ明らかとなっていない。そのため、stage RT-PCR 法と Wholemount in situ hybridization (WISH) 法によってツメガエルの *PRDM12* の時空間的パターンを調査した。stage RT-PCR の結果から *PRDM12* は stage 13 (初期神経胚期) から尾芽胚期にかけて継続して発現することが明らかとなった (図 4-1-1)。



[図 4-1-1] *PRDM12* は初期神経胚期から発現する

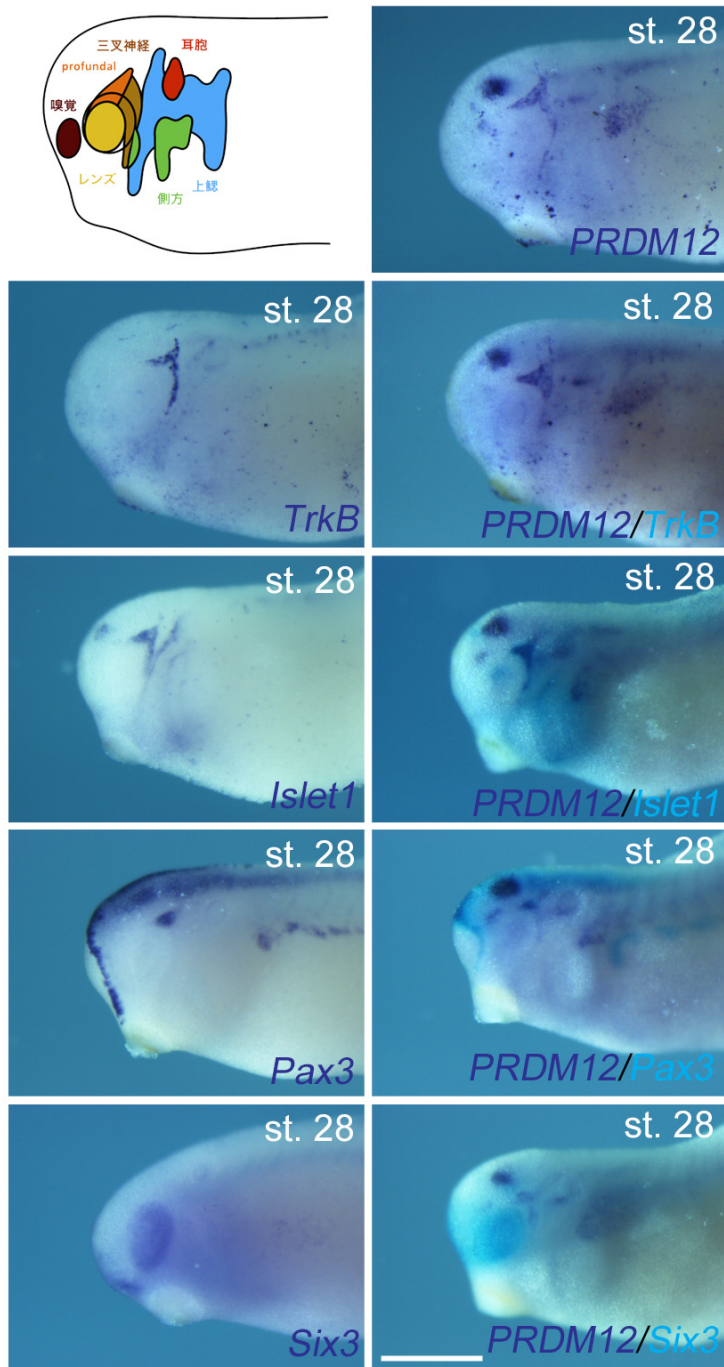
Stage RT-PCR によって *PRDM12* の発現時期を調査した結果。 *PRDM12* は初期神経胚期である stage 13 (初期神経胚期) 以降から発現する。比較対象として、汎プラコード遺伝子 *Six1*、神経堤遺伝子 *Foxd3*、神経板境界遺伝子 *Pax3*、中軸中胚葉遺伝子 *Chd* を検出した。 *PRDM12* mRNA は *Six1* や *Pax3* の発現後、 *Foxd3* の発現開始と同時期に発現を開始する。内在性コントロールとして *ODC* を用いた。ND は検出しなかった stage を表す。

また、神経堤遺伝子 *Foxd3* も stage 13（初期神経胚期）から発現することや、予定プラコード形成因子 *Six1* や神経板境界因子 *Pax3* が stage 11（初期原腸胚期）から発現することも確認された（図 4-1-1）。これらの結果は PRDM12 が予定プラコードや神経堤が本格的に形成され始める stage 13（初期神経胚期）から機能し始めることを示唆する。



WISH 法によって *PRDM12* mRNA の発現領域を詳細に検討した結果、*PRDM12* は stage 13 (初期神経胚) で予定プラコード側方領域に発現した後、stage 15 (中期神経胚期) から神経板領域で 2 本の線状の発現が観察された (図 4-1-2)。続いて発現する領域を詳細に検証するため、Double in situ hybridization (DISH) 法を行った。その結果、予定プラコードで発現する *Six1* と *PRDM12* は重なって発現し、同様に予定 profundal プラコード遺伝子 *Pax3*、予定三叉神経プラコード遺伝子 *Islet1* や *Pax6* と *PRDM12* では一部で重複が観察された (図 4-1-2)。それに対して、予定レンズプラコード遺伝子 *Six3* や神経堤遺伝子 *Foxd3* の発現と *PRDM12* の発現が重複した領域はみられない (図 4-1-2)。これらの結果は、*PRDM12* が神経堤に発現せず、予定 profundal プラコードや予定三叉神経プラコードが局在する予定プラコード側方領域特異的に発現することを示している。

また、尾芽胚期における *PRDM12* は profundal プラコードや三叉神経プラコードに限定して発現するほか、松果体や予定腎臓領域においても発現が観察された (図 4-1-3)。DISH 法の結果から、*PRDM12* と profundal や三叉神経プラコード遺伝子である *TrkB*、*Islet1*、そして *Pax3* の発現領域の重なり合いが観察される一方で、*PRDM12* とレンズプラコード遺伝子 *Six3* の共発現は見られなかった (図 4-1-3)。これらの結果から、ツメガエル *PRDM12* は神経胚期で予定プラコード側方領域と神経板に発現し、尾芽胚期で profundal プラコードや三叉神経プラコードに発現すると結論づけた。

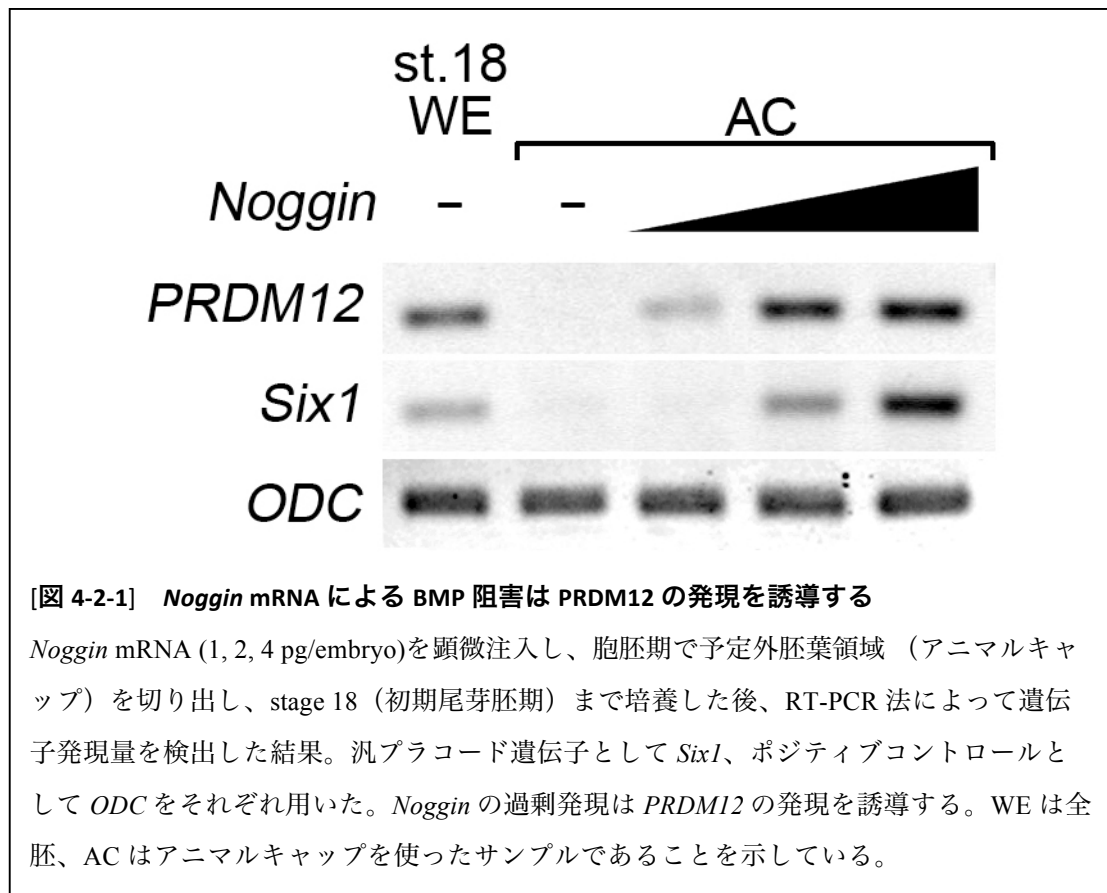


[図 4-1-3] 尾芽胚期における PRDM12 の発現は profundal プラコードおよび三叉神経プラコードに局在する

WISH 法と DISH 法によって stage 28 に達した尾芽胚における各 mRNA の発現領域を検出した結果。各遺伝子名の色は発色基質の色に対応している。profundal プラコード遺伝子として *TrkB*、*Islet1*、および *Pax3* を、三叉神経プラコード遺伝子として *TrkB* および *Islet1* を、レンズプラコード遺伝子として *Six3* をそれぞれ用いた。*PRDM12* は *TrkB*、*Islet1*、*Pax3* の発現領域と重なる事から profundal プラコードと三叉神経プラコードに発現する。スケールバーは 2.5 mm を示す。

4-2. PRDM12 は BMP と Wnt シグナルによって制御され、Pax3 によって転写される

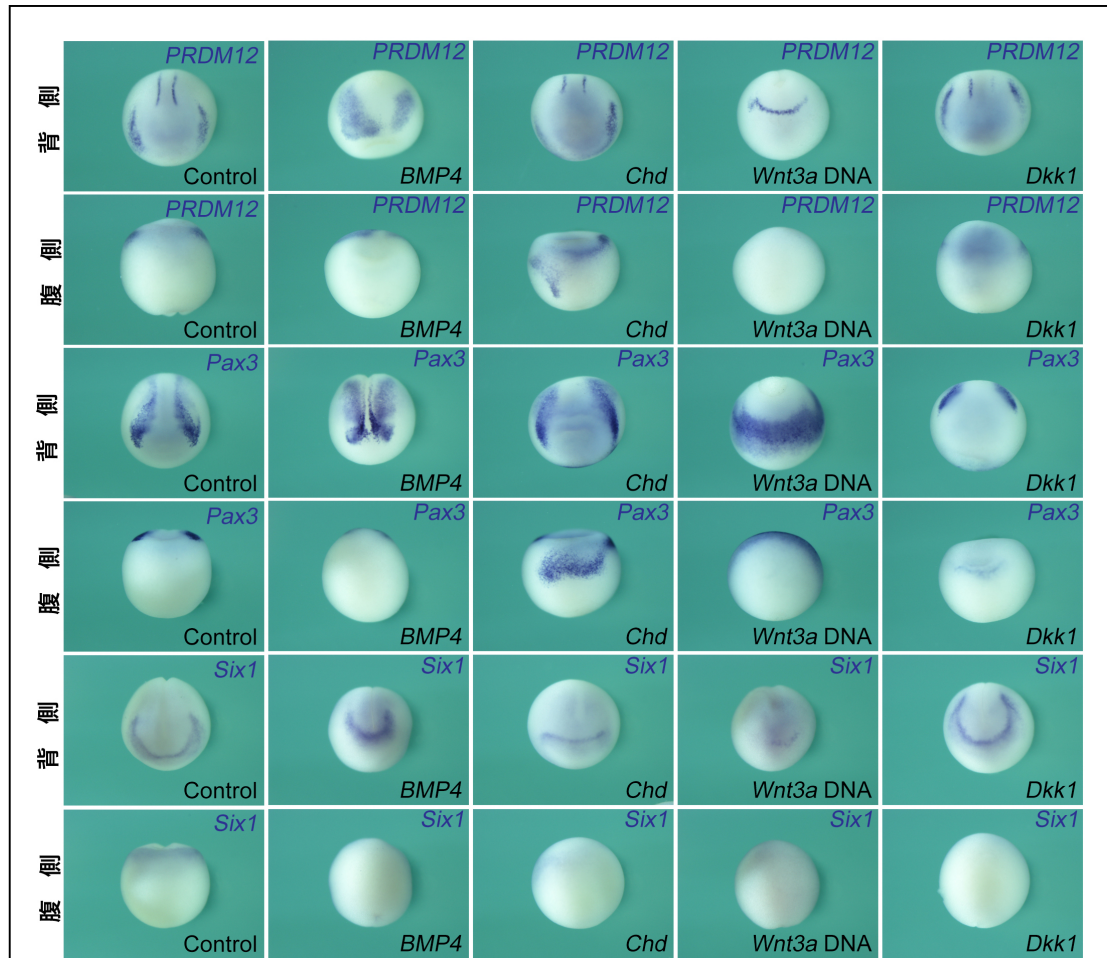
予定プラコードと神経堤の前駆領域にあたる神経板境界は中程度の BMP シグナル活性を必要とする。胞胚期の予定外胚葉領域であるアニマルキャップは BMP4 を放出し、最終的に表皮へ分化する予定運命を持つ (Grunz and Tacke, 1989; Sato and Sargent, 1989)。そのため、アニマルキャップに BMP 阻害因子を強制発現させ、そのシグナル強度を調節することで神経板境界様細胞を誘導できると考えた。Chd と同様に BMP 阻害因子として知られる *Noggin* をコードする mRNA を注入したアニマルキャップでは、*Noggin* mRNA の注入量に依存する PRDM12 の発現が観察された (図 4-2-1)。また濃度依存的に PRDM12 の発現が上昇する一方で、予定プラコード遺伝子 *Six1* も強い濃度で発現が強くなる傾向が観察された (図 4-2-1)。この結果から、PRDM12 は *Six1* のように神経板境界の誘導条件においても発現が観察できる事が明らかとなった。



[図 4-2-1] *Noggin* mRNA による BMP 阻害は PRDM12 の発現を誘導する

Noggin mRNA (1, 2, 4 pg/embryo)を顕微注入し、胞胚期で予定外胚葉領域 (アニマルキャップ)を切り出し、stage 18 (初期尾芽胚期)まで培養した後、RT-PCR 法によって遺伝子発現量を検出した結果。汎プラコード遺伝子として *Six1*、ポジティブコントロールとして *ODC*をそれぞれ用いた。*Noggin* の過剰発現は *PRDM12* の発現を誘導する。WE は全胚、AC はアニマルキャップを使ったサンプルであることを示している。

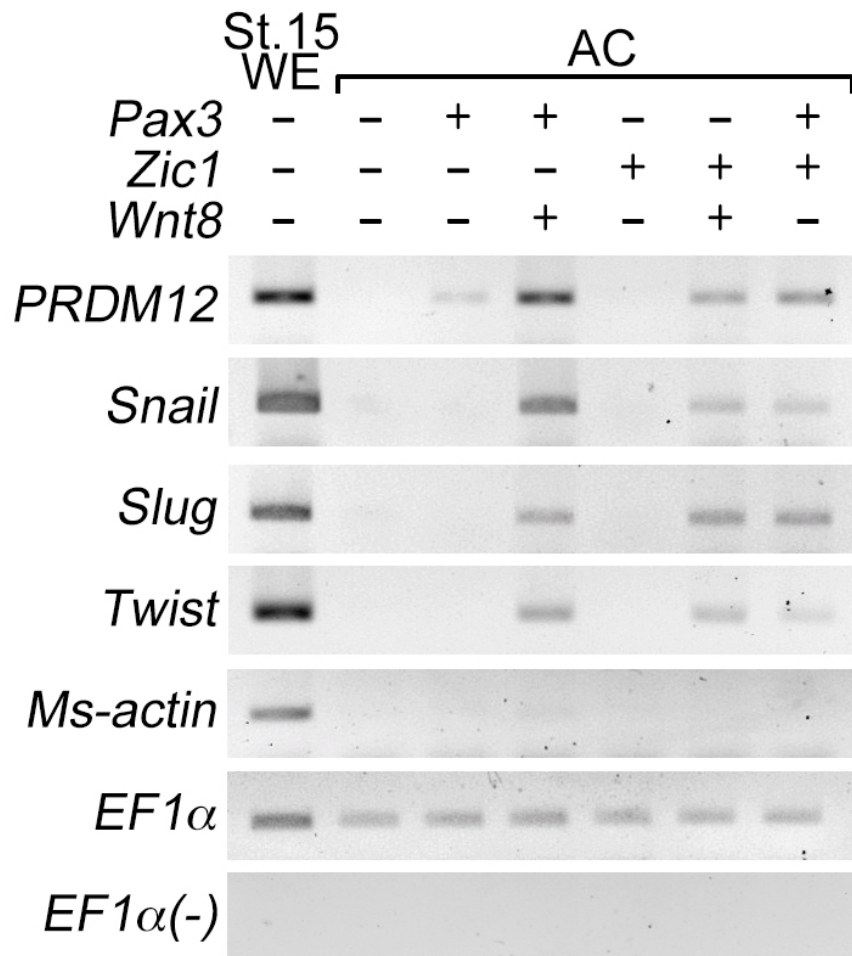
神経板境界の遺伝子は BMP シグナルと Wnt シグナルの影響を受けて発現する。そのため、BMP と Wnt シグナルを変化させた時、*PRDM12* の発現領域が変化するか WISH 法によって検証した。BMP シグナル促進因子 *BMP4* の過剰発現によって腹側化した胚では、*PRDM12* の発現は背側領域に限定した発現が観察される (図 4-2-2)。同様に、*Pax3* と *Six1* も本来発現する領域より背側領域での発現が観察された (図 4-2-2)。



[図 4-2-2] PRDM12 の発現は BMP と Wnt シグナルによって調節を受ける

BMP mRNA (20 pg/embryo)、*Chd* mRNA (100 pg/embryo)、pCS2-*Wnt3a* (50 pg/embryo)、そして *Dkk1* mRNA (10 pg/embryo)を顕微注入し、神経胚期まで培養した胚に対し WISH 法を行い、*PRDM12*、*Pax3*、および *Six1* の発現領域を検出した結果。各胚は背側と腹側からそれぞれ撮影している。また、BMP の過剰発現は *PRDM12*、*Pax3*、*Six1* の発現を背側領域に制限する一方で、*Chd* の過剰発現胚では *PRDM12* と *Pax3* が腹側領域で異所的に発現する。また、*Wnt3a* DNA による後方化した胚では各 mRNA の前方領域への発現が抑制されるのに対し、*Dkk1* mRNA の顕微注入では各 mRNA の発現領域が後方へシフトする。

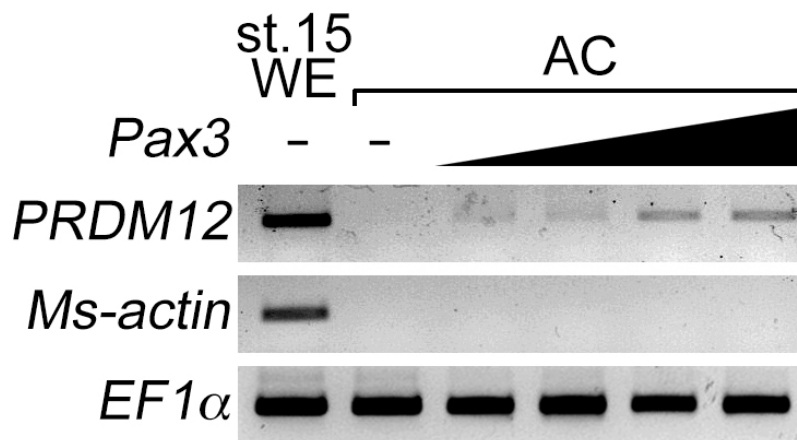
さらに、BMP シグナル阻害因子 *Chd* の過剰発現によって BMP シグナルを阻害した胚では、腹側領域で異所的な *PRDM12* の発現が観察された (図 4-2-2)。 *Pax3* の発現領域においても、腹側領域での発現が観察された一方で、 *Six1* では腹側領域における異所的な発現は観察できなかった (図 4-2-2)。 Wnt シグナル促進因子 *Wnt3a* DNA を注入した胚では、 *PRDM12*、 *Pax3*、 *Six1* の前方領域における発現が制限されている (図 4-2-2)。 前方領域における各遺伝子の発現が抑制されていることから、胚の後方化が起こっていると考えられる。これらの表現型に対して、Wnt シグナル阻害因子 *Dkk1* を過剰発現した胚では、 *PRDM12* と *Pax3* の発現が後方にシフトして見られる一方で、 *Six1* の発現はコントロール胚と比較して後方領域へ拡大している (図 4-2-2)。これは、 *Dkk1* の過剰発現によって引き起こされた前方化によって前方領域が拡大したことに起因する表現型と考えられる。以上の結果から *PRDM12* は BMP と Wnt シグナルによる影響を受け、予定プラコード遺伝子 *Six1* ではなく、神経板遺伝子 *Pax3* と類似した調節機構によって発現することが示唆された。神経板遺伝子 *Pax3* は神経堤形成に強く関連する遺伝子の 1 つであり、 *Pax3* は神経堤形成に必須な遺伝子とされている (Sato et al., 2005)。 *PRDM12* の発現パターンが *Pax3* と類似した挙動を見せたことから、 *PRDM12* は神経堤細胞の誘導条件によって発現するか検証することにした。神経堤細胞は *Pax3* と Wnt シグナル、 *Zic1* と Wnt シグナル、または *Pax3* と *Zic1* の発現によって誘導される事が明らかとなっている (Sato et al., 2005; Milet et al., 2013)。上記した神経堤誘導条件の内、 *PRDM12* がどの条件で発現するか検証したところ、どの神経堤誘導条件においても *PRDM12* の発現が観察された (図 4-2-3)。また、 *Snail*、 *Slug*、 *Twist* など神経堤遺伝子の発現が *Pax3* と Wnt シグナル、 *Zic1* と Wnt シグナル、 *Pax3* と *Zic1* の過剰発現でも発現する一方で、中胚葉遺伝子である Ms-actin の発現は観察されなかった (図 4-2-3)。また、神経堤細胞誘導条件に限らず、 *Pax3* 単独の過剰発現において、 *PRDM12* の発現上昇が観察された一方で、神経堤遺伝子の発現上昇が観察されなかった (図 4-2-3)。これらの結果は *Pax3* が *PRDM12* の転写制御を調節する因子として生体内で機能している事を示唆している。



[図 4-2-3] PRDM12 は神経堤細胞誘導条件においても発現する

Pax3 mRNA (20 pg/embryo)、*Zic1* mRNA (100 pg/embryo)、および *Wnt8* mRNA (10 pg/embryo)を顕微注入し、胞胚期でアニマルキャップを切り出し、st. 15 まで培養した後、RT-PCR 法によって各遺伝子の発現量を検出した結果。*Pax3* と *Wnt8*、*Zic1* と *Wnt8*、または *Pax3* と *Zic1* を共注入することで神経堤様細胞を模倣することができる (Sato et al., 2005; Milet et al., 2013)。神経堤遺伝子として *Snail*、*Slug*、および *Twist*、アニマルキャップ切り出し時に中胚葉の混入がないか確認するため中胚葉遺伝子として *Ms-actin*、内在性コントロールとして *EF1α* をそれぞれ用いている。WE は全胚、AC はアニマルキャップを使ったサンプルであることを示している。

Pax3 が *PRDM12* の転写調節を行うのであれば、Pax3 の濃度依存的に *PRDM12* の発現量が調節されるかもしれない。Pax3 が *PRDM12* の発現調節を行っているかを調べるために、*Pax3* を過剰発現したアニマルキャップにおける遺伝子発現の変化を調査することにした。*Pax3* を過剰発現したアニマルキャップにおける遺伝子発現の変化を調べたところ、*Pax3* の mRNA の濃度依存的に *PRDM12* の発現上昇が観察された (図 4-2-4)。これらのデータは *PRDM12* が直接的か間接的かわからないが、*Pax3* の発現によって誘導される事を示している。



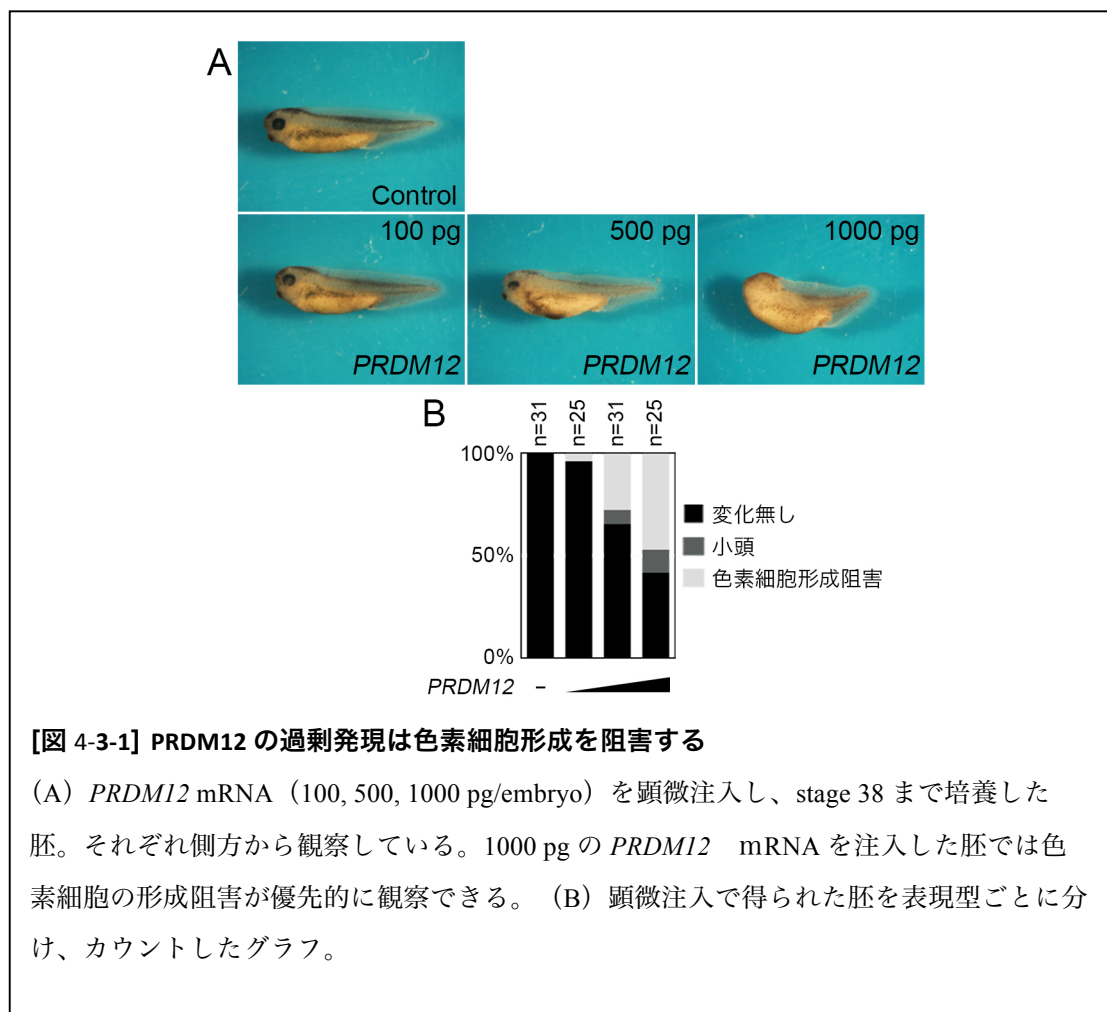
【図 4-2-4】 Pax3 は *PRDM12* の発現を誘導する

Pax3 mRNA (20、30、40、50 pg/embryo)を顕微注入し、胞胚期でアニマルキャップを切り出し、stage 15 (中期神経胚期)で RT-PCR で遺伝子発現を調査した結果。中胚葉遺伝子として *Ms-actin*、内在性コントロールとして *EF1α* を用いた。*Pax3* mRNA の濃度依存的に *PRDM12* の発現が誘導される。WE は全胚、AC はアニマルキャップを使ったサンプルであることを示している。

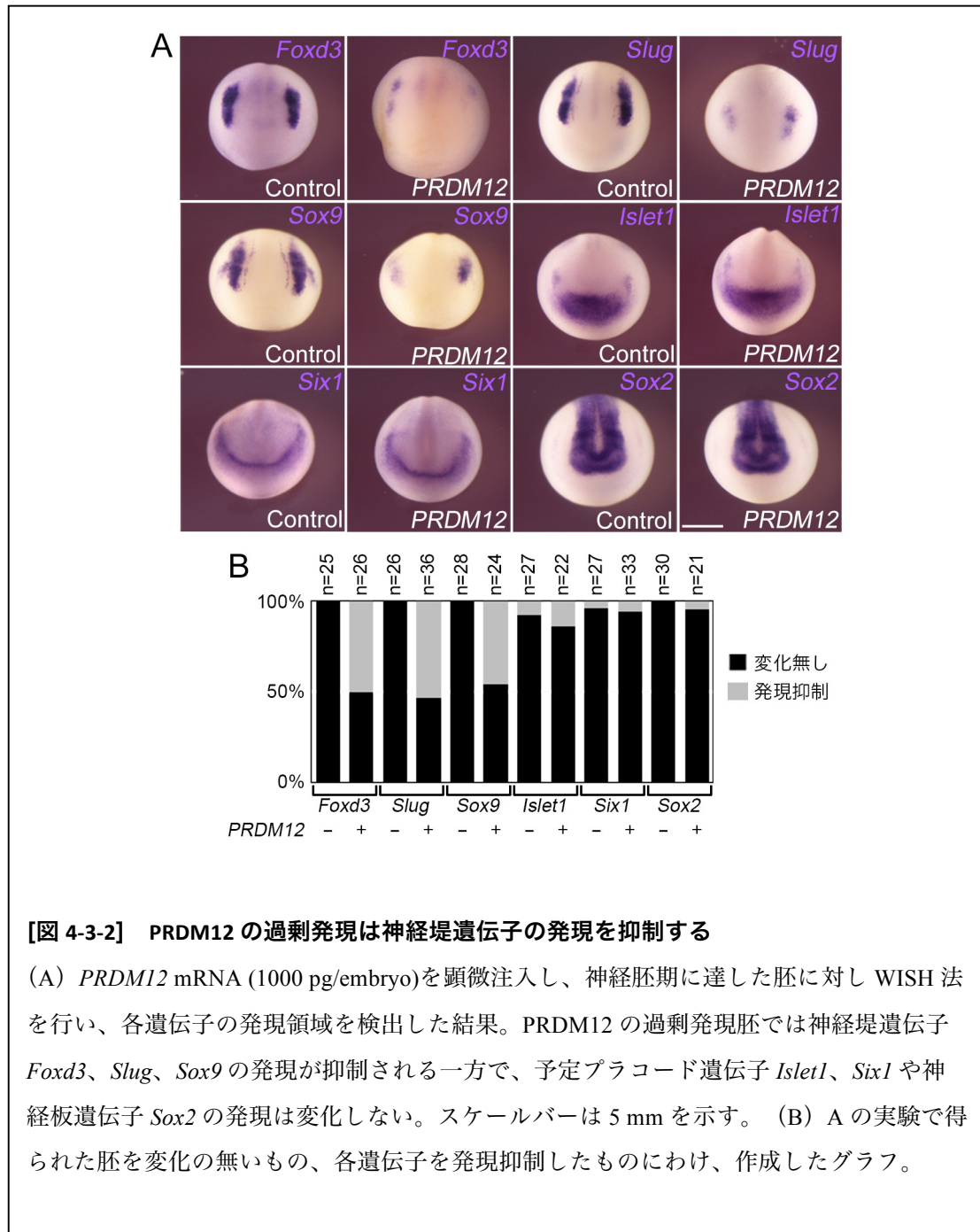
3-3. *PRDM12* の過剰発現はヒストン H3K9 のトリメチル化を介して神経堤遺伝子の発現を抑制する

初期発生における *PRDM12* の役割はこれまでのところ、明らかとなっていない。そこで初期発生における *PRDM12* の機能を調べるため、*PRDM12* の過剰発現を行った。

PRDM12 の過剰発現胚では、濃度依存的に小頭と色素細胞の形成阻害が生じ、特に色素細胞の形成阻害が多く観察された (図 4-3-1)。色素細胞は神経堤細胞に由来することが知られている (Aoki et al., 2003)。stage RT-PCR の結果では、*PRDM12* が stage 13 (初期神経胚期) から発現していたことから、stage 38 よりも以前の段階で *PRDM12* が色素細胞あるいは神経堤細胞の形成を阻害していた可能性が高い。



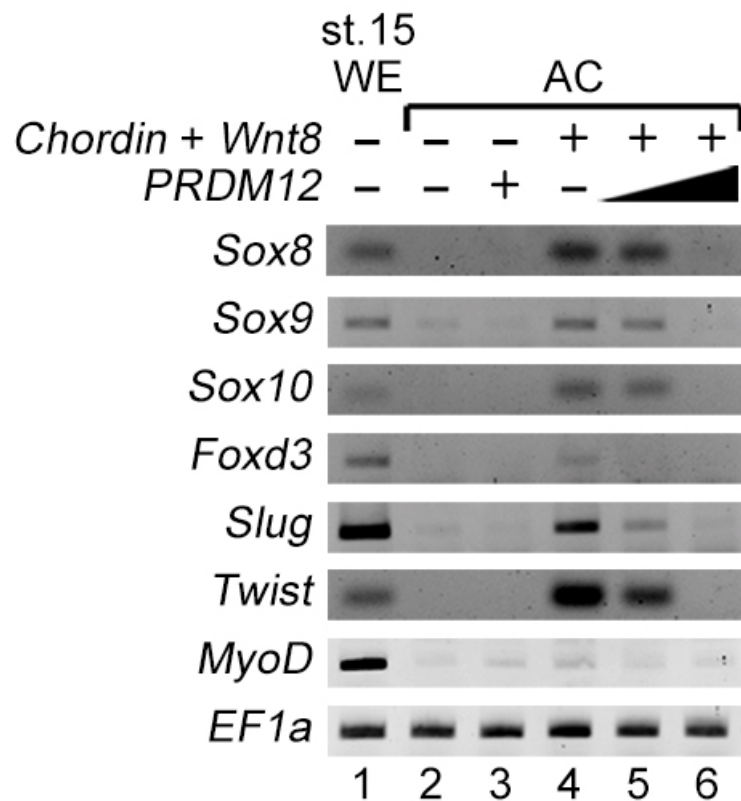
そのため、色素細胞の形成阻害は神経胚期の神経堤遺伝子の発現抑制に依存した現象なのか調査するため、*PRDM12* mRNA を顕微注入した神経胚の遺伝子発現パターンを WISH 法によって評価することにした。*PRDM12* を過剰発現した胚では、神経堤遺伝子 *Foxd3* の発現抑制が高い割合で観察された (図 4-3-2A, B)。



[図 4-3-2] PRDM12 の過剰発現は神経堤遺伝子の発現を抑制する

(A) *PRDM12* mRNA (1000 pg/embryo) を顕微注入し、神経胚期に達した胚に対し WISH 法を行い、各遺伝子の発現領域を検出した結果。PRDM12 の過剰発現胚では神経堤遺伝子 *Foxd3*、*Slug*、*Sox9* の発現が抑制される一方で、予定プラコード遺伝子 *Islet1*、*Six1* や神経板遺伝子 *Sox2* の発現は変化しない。スケールバーは 5 mm を示す。(B) A の実験で得られた胚を変化の無いもの、各遺伝子を発現抑制したものにわけ、作成したグラフ。

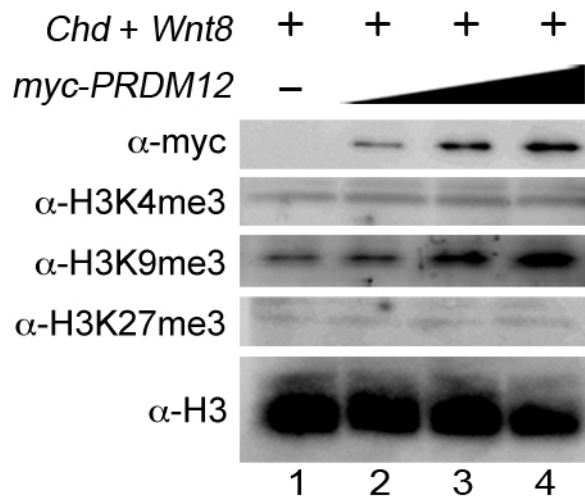
同様に、神経堤遺伝子 *Slug* や *Sox9* の発現においても顕著な発現抑制が見られた (図 4-3-2A, B)。一方で、予定プラコード遺伝子 *Islet* や *Six1* の発現領域の大きな拡大は見られず、また、神経板遺伝子 *Sox2* の発現に大きな変化は認められなかった (図 4-3-2A, B)。これらの結果は、PRDM12 が神経堤遺伝子特異的に発現を抑制している事を示している。また、近年の研究結果は BMP シグナルの抑制と Wnt8 シグナルの促進により、アニマルキャップ上で神経堤細胞を模倣できることを報告している (Sato et al., 2005)。



[図 4-3-3] PRDM12 の過剰発現は神経堤遺伝子の発現量を濃度依存的に減少させる

Chd (50 pg/embryo)、*Wnt8* (50 pg/embryo)、および *PRDM12* (1000 pg/embryo) の mRNA を顕微注入した後、胞胚期でアニマルキャップを切り出し、st. 15 まで培養した後、RT-PCR 法によって遺伝子発現量を検出した結果。予定外胚葉への *Chd* と *Wnt8* の共注入は神経堤細胞を模倣するために用いた。*PRDM12* の過剰発現は濃度依存的に神経堤遺伝子の発現を抑制する。神経堤遺伝子として *Sox8*、*Sox9*、*Sox10*、*Foxd3*、*Slug*、および *Twist* を、中胚葉遺伝子として *MyoD* を、内在性コントロールとして *EF1a* をそれぞれ用いた。WE は全胚、AC はアニマルキャップを使ったサンプルであることを示している。

BMP シグナルの抑制に *Chd* mRNA を、Wnt シグナルの促進に *Wnt8* mRNA をそれぞれ用いることで神経堤細胞を模倣し、模倣した神経堤様細胞上で PRDM12 の過剰発現による神経堤遺伝子の発現量が変化するか調査した (図 4-3-3, lane 4)。模倣した神経堤様細胞では神経堤遺伝子 *Sox8*、*Sox9*、*Sox10*、*Foxd3*、*Slug*、*Twist* が発現するのに対し、PRDM12 を過剰発現させたところ、濃度依存的に神経堤遺伝子の発現抑制がみられた (図 4-3-3, lane 5, 6)。これらの結果は PRDM12 が神経堤遺伝子の発現を抑制する機能を持つことを示唆する。また、PRDM12 はヒストンメチル化活性への関連性が予想される PR ドメインを有している。一般的にヒストンメチル化酵素はヒストン H3K4 のメチル化を介して転写を正に調節する因子とヒストン H3K9 やヒストン H3K27 のメチル化を介して転写を負に調節する因子に大別される。PRDM12 が正負どちらの調節因子として機能するか調査するために、各トリメチル化抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。神経堤遺伝子の効果が見られた神経堤様細胞において PRDM12 がヒストンのメチル化を行っているか評価し、その結果、PRDM12 がヒストン H3K4 や K27 のトリメチル化に影響を与えない一方で、濃度依存的にヒストン H3K9 のトリメチル化を促進する働きを持つことが明らかとなった (図 4-3-4)。この結果は PRDM12 がヒストン H3K9 のトリメチル化を介して、神経堤遺伝子特異的な発現抑制する働きを持つことを示唆する。

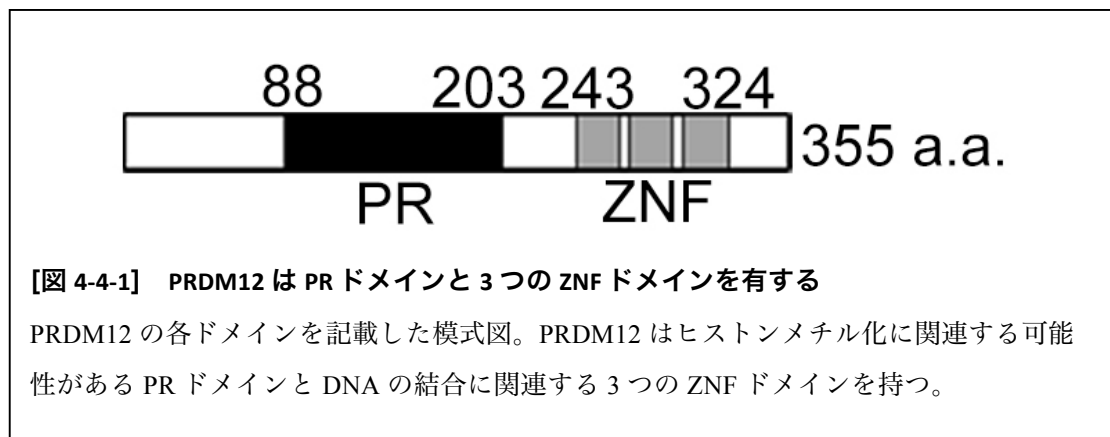


[図 4-3-4] PRDM12 はヒストン H3K9 のトリメチル化を促進する

Wnt8 mRNA (50 pg/embryo)、*Chd* mRNA (50 pg/embryo)、および *myc-PRDM12* mRNA (250, 500, 1000 pg/embryo) を顕微注入し、胞胚期でアニマルキャップを切り出し、stage 15 (中期神経胚期) まで培養した後、ウェスタンブロットを行った結果。抗 *myc* 抗体、各トリメチル化抗体、およびヒストン H3 抗体を用いて検出した。H3K4me3 はトリメチル化した H3K4、H3K9me3 はトリメチル化した H3K9、H3K27me3 はトリメチル化した H3K27 をそれぞれしている。*myc-PRDM12* mRNA の濃度依存的にヒストン H3K9 のトリメチル化が増幅する。

3-4. PRDM12 の機能は PR ドメインと ZNF ドメインを必要とする

PRDM12 はヒストンメチル化活性ドメインとして機能する可能性を持つ PR ドメインと DNA 配列に結合する可能性がある 3 つ Zinc Finger (ZNF) ドメインを持つ (図 4-4-1)。



PRDM12 の過剰発現によりヒストン H3K9 のトリメチル化が促進するが、PRDM12 の PR ドメインが酵素活性を持つのか明らかにされていない。また、PRDM12 が持つ 3 つの ZNF は本当にゲノム DNA と結合するのか、これらのドメインの重要性について評価することにした。まず、PR ドメインの変異体を作製するため、既知のヒストンメチル化転移酵素 Dim5、G9a、Suv39h1 の SET ドメインの配列と PRDM12 の PR ドメインの配列を比較した (図 4-4-2)。その結果、各メチルトランスフェラーゼと PRDM12 の相同性は決して高くはないものの、PRDM12 の PR ドメインが既知のヒストンメチル化酵素の SET ドメインと共通したアミノ酸配列を一部持つことがわかった (図 4-4-2)。この結果をもとに PR ドメインに対し、先行研究のメチル基転移酵素活性を失わせる変異体を模倣し (Collins et al., 2009)、PRDM12F117A、PR ドメインの一部もしくは全てを欠損させた PRDM12 Δ 111-119 と Δ PR、3 つの ZNF ドメインを削除した PRDM12 Δ ZNF を作成し、各コンストラクトを評価することにした (図 4-4-3)。

nc	DIM-5	LQIFRTKD-RGWGVKCPVNIKRGQFVDRYLGEIITSEEADRRRAESTIARRKDVYLFALD	59
human	SUV39H1	LQLYRTAK-MGWGVRALQTIPOGTFICEYVGEIISDAEADVREDDSYLFDLD	51
human	G9a	LCIFRTDDGRGWGVRTLEKIRKNSFVMEYVGEIITSEEAEARRG--QIYDRQGATYLFDL	58
X. laevis	PRDM12	LIAQSSIPGEGLGIFSKTWIKAGTEMGFPTGRVISPEHVDLCK-----NNNLMWEVF	52

*

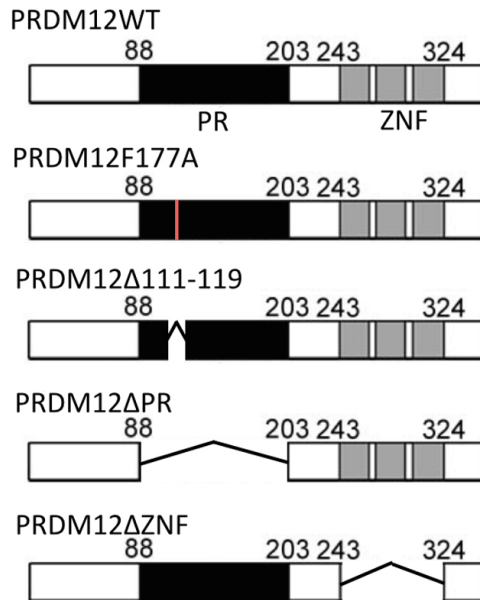
nc	DIM-5	KFSDPDSLDPDLLAGQPLEVDGEYMSGPTRFINHSCDPNMAIFARVGDHADKHIHDLALFA	119
human	SUV39H1	NKD-----GEVYCIDARYYGNISRFINHLCDPNIIPVRVFMHLQDLRFPRLAFFS	101
human	G9a	YVE-----DVYTVDAAYYGNISHFVNHSQVYVNFIDNLDLRLPRLAFFA	107
X. laevis	PRDM12	NED-----GTVRYFIDASQEDPRSWMTYIKCARNEQEQNLVVOIGN---SIFYKA	100

nc	DIM-5	IKDTPKGTETLTFDYVN-----GLTGLESDAH-DPSKISEMTK	155
human	SUV39H1	SRDTRTGEELGFDYGDRFW-----DIKSKYFTCCQCGSEKCKH-SAEAIALEQS	148
human	G9a	TRTTRAGEELTFDYNMQVD-----PVDMESTRMSDNFGLAGLPG-SPKRRVR-IE	155
X. laevis	PRDM12	TETTPPQELLVWYGNSLSSFLGIPGVPMEEEQKKNQEEFGIVDSTGPSLAGRMRCVI	160

nc	DIM-5	CLCGTAKCRGYLW-----	168
human	SUV39H1	RLARLDPHPPELLPELGLSPPVNT	171
human	G9a	CKCGTESCRKYL-----	168
X. laevis	PRDM12	CHRGFNRSNLR-----	173

[図 4-4-2] PRDM12 と各メチル基転移酵素の SET ドメインのアミノ酸配列は部分的に保存されている

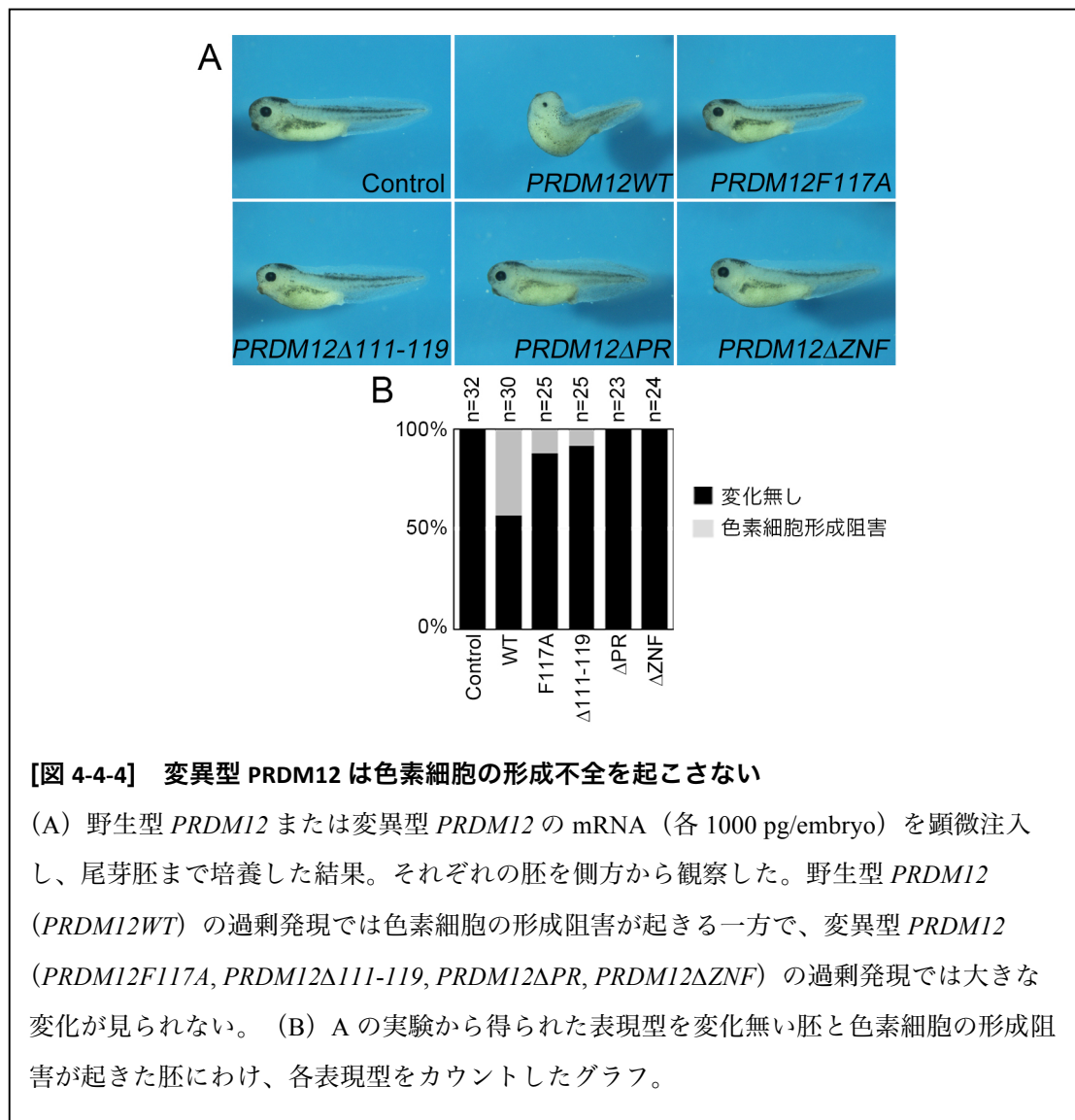
ヒストンに対するメチル基転移酵素活性の報告がされている *Dim-5* (Collins et al., 2009)、*Suv39h1* (Rea et al., 2000)、*G9a* (Tachibana et al., 2001) の SET ドメインと PRDM12 が持つ PR ドメインのアミノ酸配列を比較した結果。赤枠は作成した PRDM12 Δ 111-119 において欠損させた配列を、アスタリスクは点変異によって置換した配列を、黄色背景で示す領域は同一配列を、緑色背景で示す領域は相同配列をそれぞれ示す。



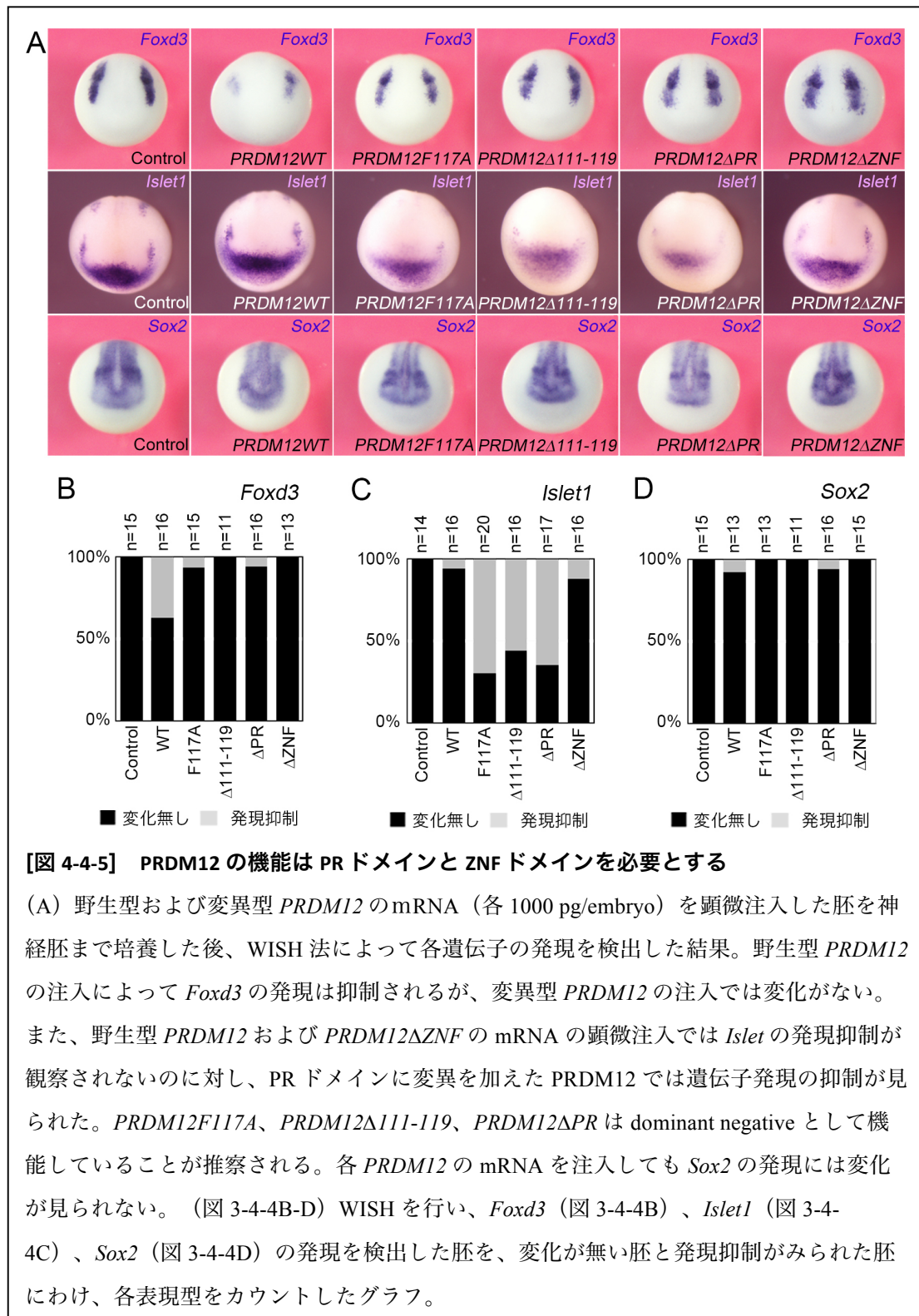
[図 4-4-3] 作成した PRDM12 変異体の概略

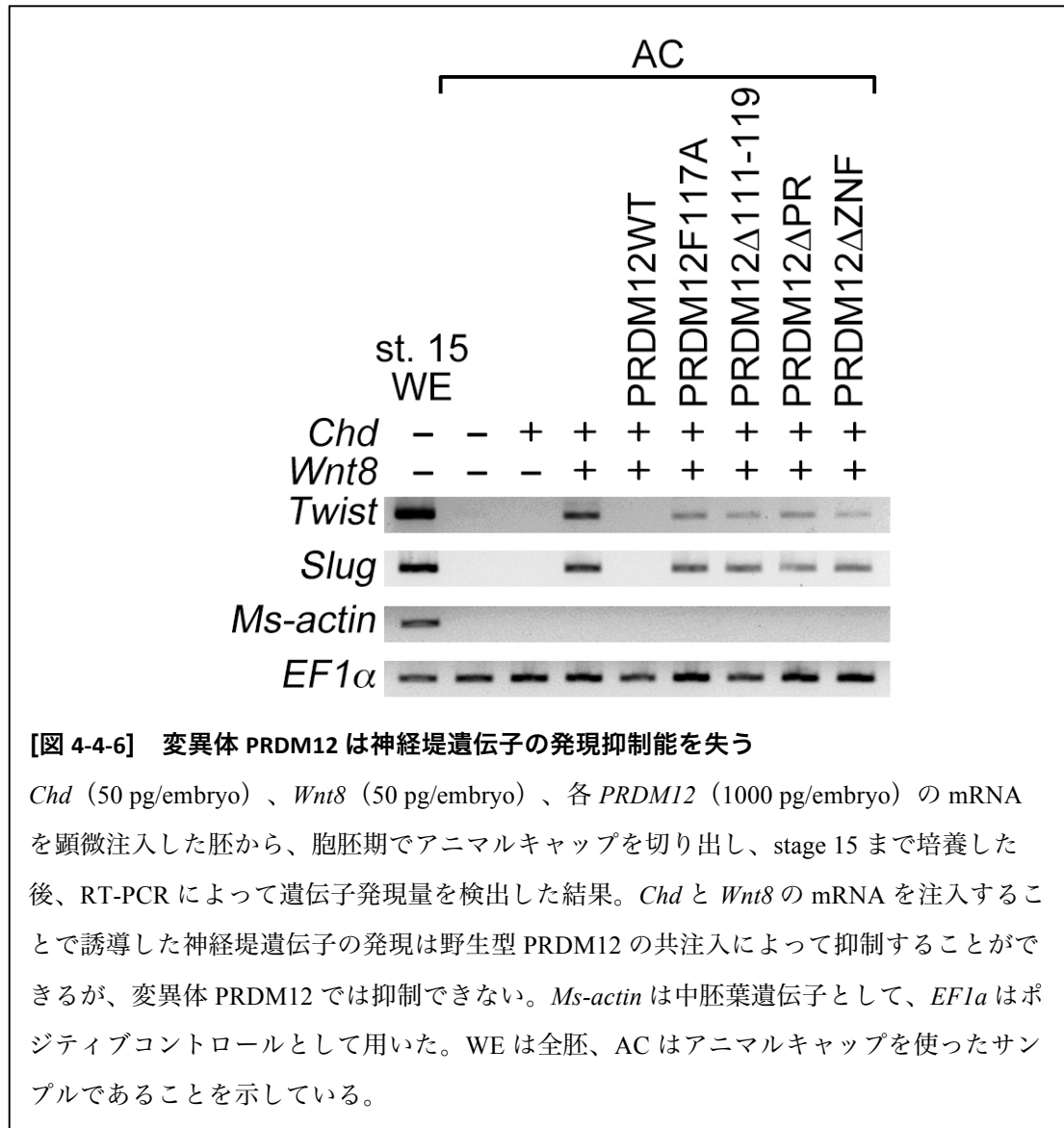
PRDM12 plasmid に対する point mutation および deletion によって作成した PRDM12 変異体の模式図。上から赤色は point mutation によって変異を加えた領域を示している。

上述した通り、野生型 *PRDM12* の過剰発現は神経堤遺伝子の発現抑制を行い、色素細胞の形成阻害を引き起こす（図 4-4-4A, B）。これに対して、*PRDM12F117A* の過剰発現では野生型で見られる色素細胞の形成阻害は観察されない（図 4-4-4A, B）。同様に、*PRDM12Δ111-119*、*PRDM12ΔPR*、*PRDM12ΔZNF* の過剰発現においても、色素細胞の形成阻害は確認できなかった（図 4-4-4A, B）。これらの結果は *PRDM12* における色素細胞形成阻害には PR ドメインと ZNF ドメイン、どちらのドメインも必要であり、作成した *PRDM12* の変異体が神経堤遺伝子の発現抑制能を持たないことを示唆している。

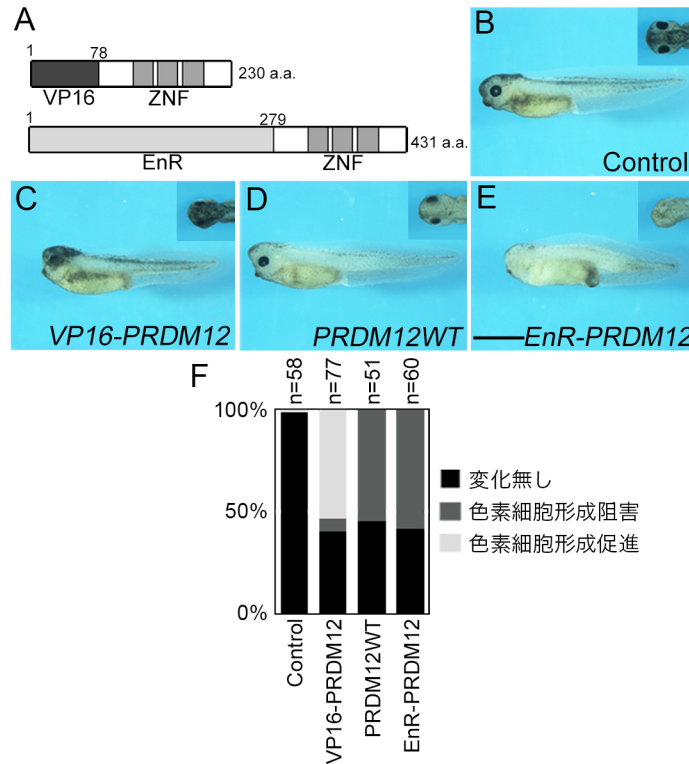


次に、各変異型 *PRDM12* の過剰発現が本当に神経堤遺伝子の発現阻害を起こしていないか、WISH 法を用いて評価した。その結果、野生型 *PRDM12* の過剰発現で *Foxd3* の発現抑制が観察できるのに対して、*PRDM12F117A* の過剰発現胚では *Foxd3* の発現抑制が起らなかった。同様に、*PRDM12Δ111-119*、*PRDM12ΔPR*、*PRDM12ΔZNF* の過剰発現においても *Foxd3* の発現抑制は観察されなかった (図 4-4-5A, B)。また、図 4-4-4 に示す表現型と同様に変異体 *PRDM12* の過剰発現では神経堤遺伝子の発現抑制が見られなかった。この結果に対して、野生型 *PRDM12* の過剰発現胚では、予定プラコード遺伝子 *Islet1* の発現は変化しなかった (図 4-4-5A, B)。一方で、*PRDM12F117A* の過剰発現胚では、*Islet1* の発現抑制が観察された (図 4-4-5A, B)。同様に *PRDM12Δ111-119*、*PRDM12ΔPR* の過剰発現では *Islet1* の発現抑制が見られたのに対して、*PRDM12ΔZNF* の過剰発現胚では *Islet1* の発現は抑制されなかった (図 4-4-5A, B)。つまり、PR ドメインに関連する変異体を過剰発現させた胚と ZNF ドメインに関する変異体を過剰発現させた胚で *Islet1* の発現調節に関する差異が観察された。PR ドメインはヒストンメチル基転移酵素活性に貢献することが知られる。そのため、ヒストンメチル基転移酵素活性を失った *PRDM12F117A*、*PRDM12Δ111-119*、*PRDM12ΔPR* が野生型 *PRDM12* の結合領域に対して優先的に結合し、競合阻害が起こった可能性が考えられる。つまり、PR ドメインに関する 3 つの変異体は dominant negative として機能する可能性が示唆された。また、野生型 *PRDM12* と変異型 *PRDM12* の過剰発現胚においても *Sox2* の発現は変化しなかった (図 4-4-5A, B)。加えて、遺伝子の発現量についても RT-PCR によって調査した。*Chd* と *Wnt8* の mRNA で誘導した神経堤様細胞では神経堤遺伝子 *Twist* や *Slug* が発現した (図 4-4-6)。野生型 *PRDM12* を過剰発現した場合、これら神経堤遺伝子の発現は抑制された (図 4-4-6)。一方、変異型 *PRDM12* を過剰発現した場合、野生型 *PRDM12* を過剰発現した時に観察された神経堤遺伝子の発現抑制が見られなかった。これらの結果は *PRDM12* の PR ドメインと ZNF ドメインが *PRDM12* の機能に必要なことを示唆する。





また、先行研究 (de Souza et al., 1999) を参考にして、*PRDM12* の ZNF ドメインの必要性を評価するため、転写活性化ドメインである VP16 ドメインと転写抑制ドメインとして知られる EnR ドメイン (Engrailed repressor ドメイン) を結合したフュージョンコンストラクトを作成した (図 4-4-7A)。もし、*PRDM12* の ZNF が直接ゲノム領域に結合し、機能するのであれば、これらのフュージョンタンパク質は神経堤遺伝子に対して促進的、もしくは抑制的に機能することが予想される。

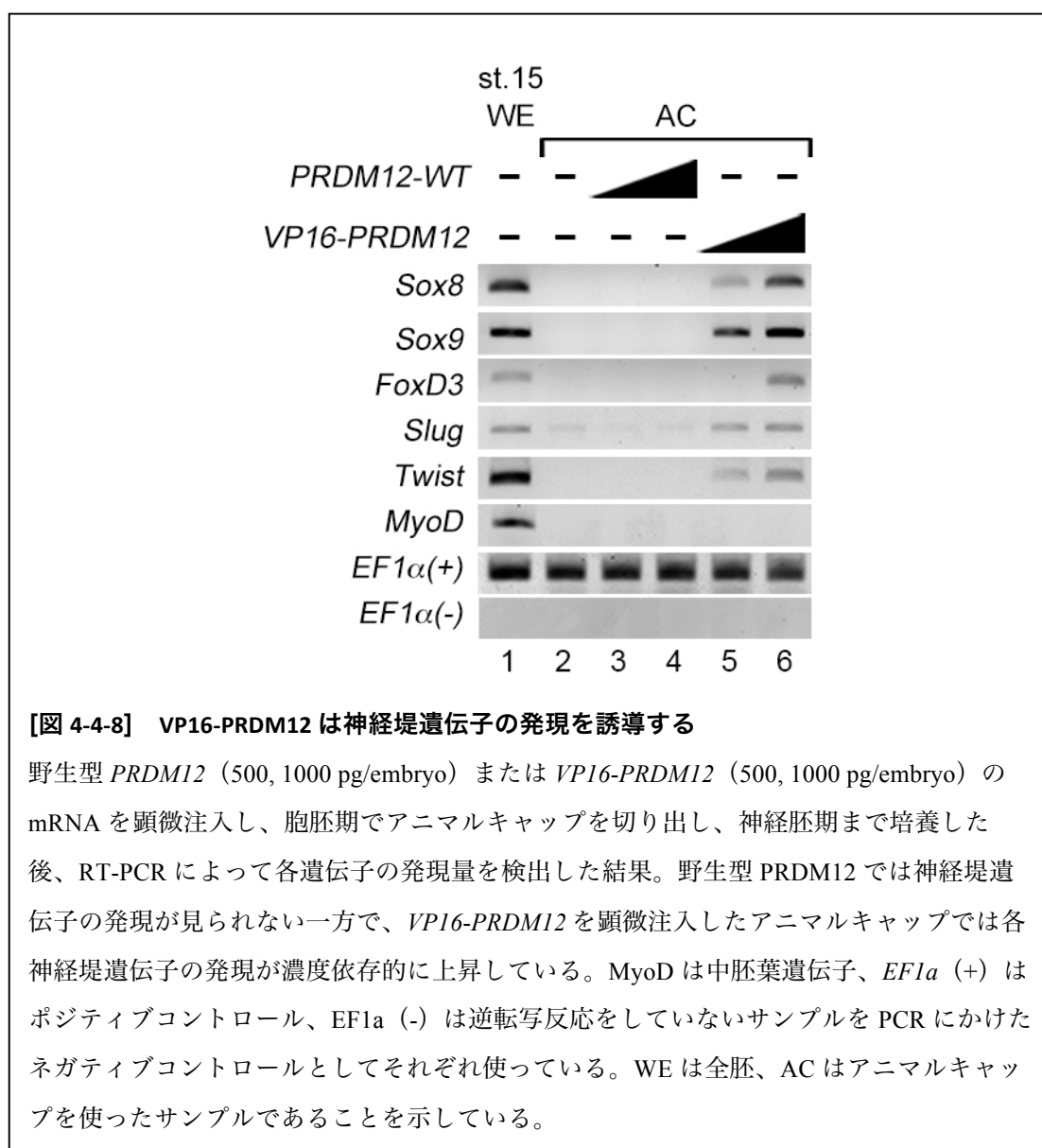


【図 4-4-7】 PRDM12 は転写抑制的に機能する

(A) 作成した融合 PRDM12 コンストラクトの模式図。PRDM12 の PR ドメインを削除し、代わりに VP16 (上) もしくは EnR (下) ドメインを融合させたコンストラクトを作成した。(B-E) *VP16-PRDM12* (1000 pg/embryo)、*EnR-PRDM12* (1000 pg/embryo)、または *PRDM12WT* (1000 pg/embryo) の mRNA を顕微注入し、stage 38 まで培養した時の表現型 (B) コントロール胚。(C) *VP16-PRDM12* の過剰発現胚では色素細胞数の増加が観察されたのに対して、(D) 野生型 *PRDM12* の過剰発現と同様に (E) *EnR-PRDM12* の過剰発現では色素細胞の形成阻害が観察された。各胚の写真は側方から、右上の写真は背側方向から頭部を撮影した。(F) 各表現型を分類し、カウントしたものをグラフにまとめた。

野生型 *PRDM12* を過剰発現した胚と比較して、*VP16-PRDM12* を過剰発現した胚では色素細胞の増加が観察された (図 4-4-7B, C, F)。一方で、*EnR-PRDM12* の過剰発現胚では野生型 *PRDM12* の発現と同様に色素細胞の抑制が見られた (図 4-4-7D, E, F)。これらの結果は *PRDM12* の ZNF ドメインが特定のゲノム領域に結合する機能を持つことを示唆している。*PRDM12* はヒストンのメチル化を介して転写調節を行うのに対して、*EnR-PRDM12* は EnR ドメインによる古典的な転写因子として機能する可能性が高い。しかし、野生型 *PRDM12* と *EnR-PRDM12* の過剰発現胚が同じ表現型を示していることから、

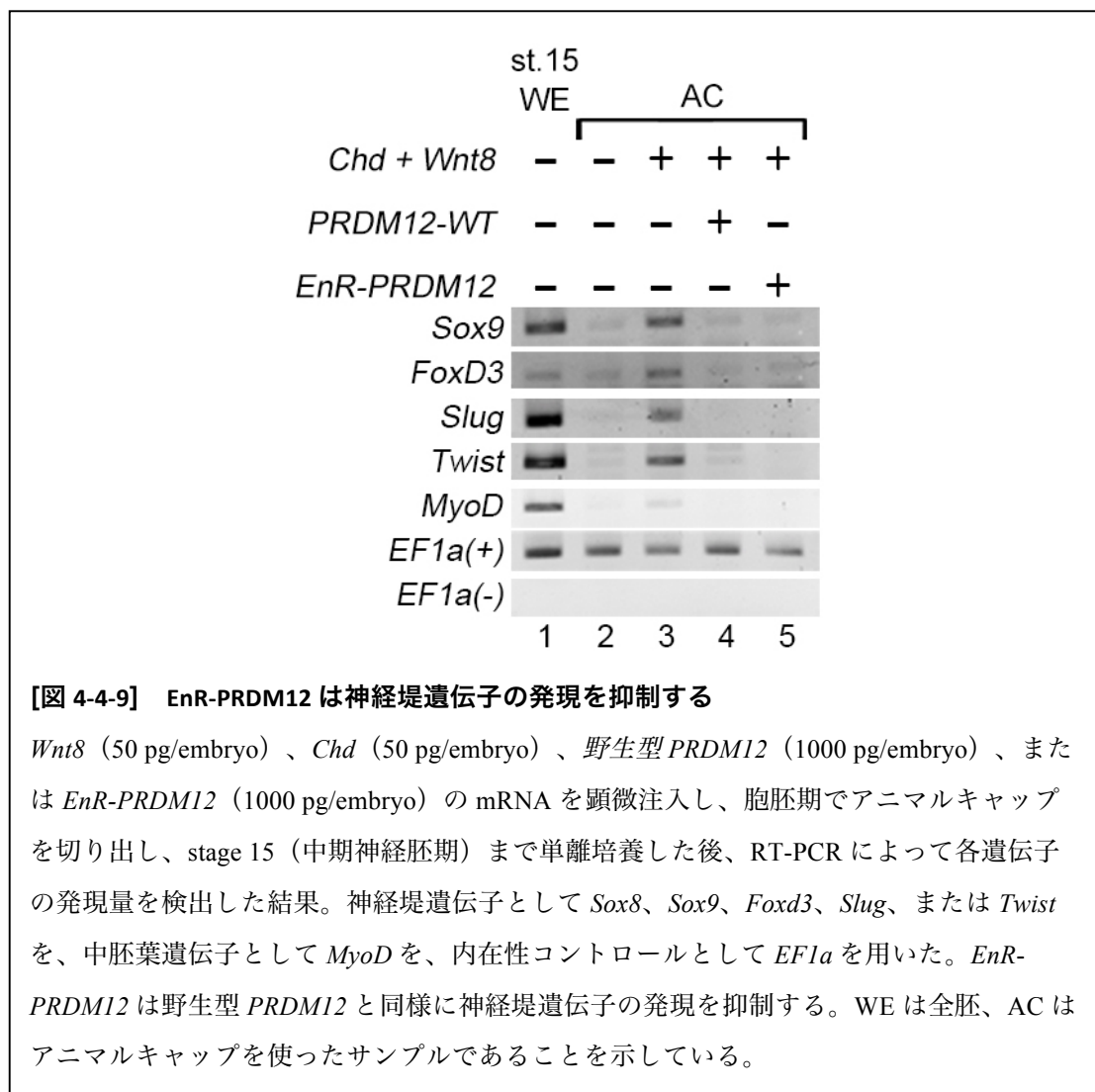
PRDM12 は転写抑制的な機能を持っていることが考えられる。次に、色素細胞形成に対して促進的に働く *VP16-PRDM12* をアニマルキャップに過剰発現した場合、神経堤遺伝子の発現を促進する可能性が考えられる。そこで、*VP16-PRDM12* mRNA を注入したアニマルキャップにおける遺伝子発現が変化するか、調査した。その結果、*VP16-PRDM12* を顕微注入したアニマルキャップでは、*Sox8*、*Sox9*、*Foxd3*、*Slug*、*Twist* など神経堤遺伝子の発現促進が観察された (図 4-4-8)。一方で、野生型 *PRDM12* を過剰発現したアニマルキャップでは神経堤遺伝子の誘導は起こらなかった (図 4-4-8)。



[図 4-4-8] *VP16-PRDM12* は神経堤遺伝子の発現を誘導する

野生型 *PRDM12* (500, 1000 pg/embryo) または *VP16-PRDM12* (500, 1000 pg/embryo) の mRNA を顕微注入し、胞胚期でアニマルキャップを切り出し、神経胚期まで培養した後、RT-PCR によって各遺伝子の発現量を検出した結果。野生型 *PRDM12* では神経堤遺伝子の発現が見られない一方で、*VP16-PRDM12* を顕微注入したアニマルキャップでは各神経堤遺伝子の発現が濃度依存的に上昇している。*MyoD* は中胚葉遺伝子、*EF1α (+)* はポジティブコントロール、*EF1α (-)* は逆転写反応をしていないサンプルを PCR にかけてネガティブコントロールとしてそれぞれ使っている。WE は全胚、AC はアニマルキャップを使ったサンプルであることを示している。

また、野生型 *PRDM12* を過剰発現したアニマルキヤップでは、神経堤遺伝子の発現は抑制される（図 4-4-9）。EnR-*PRDM12* を過剰発現したサンプルにおいても神経堤遺伝子の発現抑制が観察できるか調査したところ、*EnR-PRDM12* を顕微注入したアニマルキヤップでは、*Chd* と *Wnt8* の発現により誘導された神経堤遺伝子の発現が EnR-*PRDM12* の発現依存的に抑制された（図 4-4-9）。つまり、表現型と同様に EnR-*PRDM12* は野生型 *PRDM12* と同様の神経堤遺伝子に対する転写抑制能を持つことを示す。以上の結果は *PRDM12* の ZNF ドメインが遺伝子発現の調節に必須な領域である事を示し、そして、ヒストンメチル化酵素としての活性ドメインの代わりに転写調節ドメインを結合させた場合においても従来の転写因子のような振る舞いを見せることから、*PRDM12* が ZNF ドメインを介してゲノム領域へ結合する可能性を示唆している。



3-5. PRDM12 は *Foxd3*, *Slug*, *Sox8* プロモーター領域でヒストン H3K9 のトリメチル化を促進する

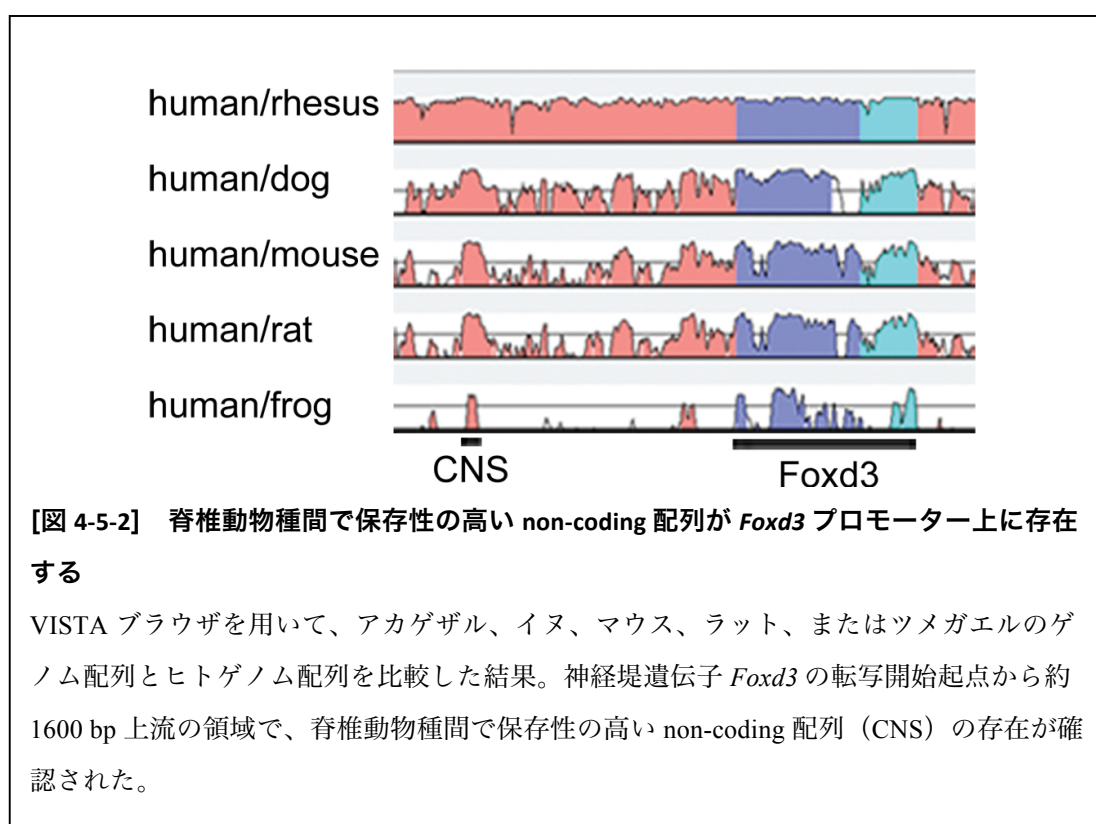
PRDM12 は生物種間で高度に保存された ZNF ドメインを有している (図 4-5-1)。仮に、PRDM12 の ZNF ドメインが特定のゲノム DNA 領域に直接結合するとした場合、結合する DNA 配列も生物種間で高度に保存されていると仮定した。

human	PRDM12	MMGSVLPAAEALVVKTKGLKAPGLALAEVITSDILHSFLYGRWRNVLGEOLFEDKSHHASPK	60
mouse	PRDM12	MMGSVLPAAEALVVKTKGLKAPGLALAEVITSDILHSFLYGRWRNVLGEOLLEDKSHHASPK	60
rat	PRDM12	MMGSVLPAAEALVVKTKGLKAPGLALAEVITSDILHSFLYGRWRNVLGEOLLEDKSHHASPK	60
chick	PRDM12	MMGSVLPAAEALVVKTKGLKAPGLALAEVITSDILHSFLYGRWRNVLGEOLFEEKS---	57
xlaevis	PRDM12	MMGSVLPAAEALVVKTKGLKAPGLALAEVITSDILHSFLYGRWRNVLGEOLFEEKNNHISPK	60
zebra	PRDM12	-MGSVLPADALVVKAGFKQOGLALSIIITSDILHSFLYGRWRNVLGEHLFEKATATVSPK	59
		*****:***** *:*	
human	PRDM12	TAFTAQVLAQSFSGEVOKLSSLVLPVEVIIAQQSIPGEGGLGIFSKTWIKAGTEMGPFTGR	120
mouse	PRDM12	TAFTAQVLAQSFSGEVOKLSSLVLPVEVIIAQQSIPGEGGLGIFSKTWIKAGTEMGPFTGR	120
rat	PRDM12	TAFTAQVLAQSFSGEVOKLSSLVLPVEVIIAQQSIPGEGGLGIFSKTWIKAGTEMGPFTGR	120
chick	PRDM12	TAFTAQVLAQSFSGEVOKLSSLVLPVEVIIAQQSIPGEGGLGIFSKTWIKAGTEMGPFTGR	117
xlaevis	PRDM12	TAFTAQVLAQSFSGEVOKLSSLVLPVEVIIAQQSIPGEGGLGIFSKTWIKAGTEMGPFTGR	120
zebra	PRDM12	TAFTAQVLAQSFSGEVOKLSSLVLPVEVIIAQQSIPGEGGLGIFSKTWIKAGTEMGPFTGR	119
		*****:***** *:*	
human	PRDM12	VIAPQVLDICKNNMLMVEVFNEDGTVRYFIDASQEDHRSWMTYIKCARNEQONLEVVQI	180
mouse	PRDM12	VIAPQVLDICKNNMLMVEVFNEDGTVRYFIDASQEDHRSWMTYIKCARNEQONLEVVQI	180
rat	PRDM12	VIAPQVLDICKNNMLMVEVFNEDGTVRYFIDASQEDHRSWMTYIKCARNEQONLEVVQI	180
chick	PRDM12	VISPQVLDICKNNMLMVEVFNEDGTVRYFIDASQEDHRSWMTYIKCARNEQONLEVVQI	177
xlaevis	PRDM12	VISPQVLDICKNNMLMVEVFNEDGTVRYFIDASQEDHRSWMTYIKCARNEQONLEVVQI	180
zebra	PRDM12	VISPQVLDICKNNMLMVEVFNEDGTVRYFIDASQEDHRSWMTYIKCARNEQONLEVVQI	179
		*****:***** *:*	
human	PRDM12	QTSIFVKAIEMLPPDQELLVWYGNSHNTFLGIPGVPGLEEDQ-KKNKHEDFHPADS----	235
mouse	PRDM12	QTSIFVKAIEMLPPDQELLVWYGNSHNTFLGIPGVPGLEEDQ-KKNKHEDFHPADS----	235
rat	PRDM12	QTSIFVKAIEMLPPDQELLVWYGNSHNTFLGIPGVPGLEEDQ-KKNKHEDFHPADS----	235
chick	PRDM12	QTSIFVKAIEMLPPDQELLVWYGNSHNTFLGIPGVPGLEEDQ-KKNKHEDFHPAVET---	232
xlaevis	PRDM12	QTSIFVKAIEMLPPDQELLVWYGNSHNTFLGIPGVPGLEEDQ-KKNKHEDFHPAVET---	236
zebra	PRDM12	* ***** * ***** :***** **:* * * * ::* *	239
		*****:***** *:*	
human	PRDM12	AAGPAGRMRCVLCRHRGFSRNLRSNLRSHMIRIHTLDKPFVCRFCNRRFSQSSTLRNHVRLHTG	295
mouse	PRDM12	ATGTAGRMRCVLCRHRGFSRNLRSNLRSHMIRIHTLDKPFVCRFCNRRFSQSSTLRNHVRLHTG	295
rat	PRDM12	ATGTAGRMRCVLCRHRGFSRNLRSNLRSHMIRIHTLDKPFVCRFCNRRFSQSSTLRNHVRLHTG	295
chick	PRDM12	GASTTGRMRCVLCRHRGFSRNLRSNLRSHMIRIHTLDKPFVCRFCNRRFSQSSTLRNHVRLHTG	292
xlaevis	PRDM12	GPSLAGRMRCVLCRHRGFSRNLRSNLRSHMIRIHTLDKPFVCRFCNRRFSQSSTLRNHVRLHTG	296
zebra	PRDM12	ALSTASRMRCVLCRHRGFSRNLRSNLRSHMIRIHTLDKPFVCRFCNRRFSQSSTLRNHVRLHTG	299
		: *****	
human	PRDM12	ERPDKCOVCSAYSOLAGLRAHOKSARHRPPST----ALQAHSPALP----APHAHAPAL	347
mouse	PRDM12	ERPDKCOVCSAYSOLAGLRAHOKSARHRPPST----ALQAHSPALP----APHAHAPAL	347
rat	PRDM12	ERPDKCOVCSAYSOLAGLRAHOKSARHRPPST----ALQAHSPALP----APHAHAPAL	347
chick	PRDM12	ERPDKCOVCSAYSOLAGLRAHOKSARHRPPNA----SLQAHSPALP----VPH-----	339
xlaevis	PRDM12	ERPDKCOVCSAYSOLAGLRAHOKSARHRPPNG----SLQTHSPTLP----VPH-----	343
zebra	PRDM12	ERPDKCHVCSAYSOLAGLRAHOKSARHRPPANTGAVVGLQAHSPPPPQLAQVPH-----	354
		*****:***** *:*	
human	PRDM12	AAAAAAAAAAAAHHLPAHVL	367
mouse	PRDM12	AAAAAAAAAAAA--HHLPAHVL	365
rat	PRDM12	AAAAAAAAAAAA--HHLPAHVL	365
chick	PRDM12	-----ASLA--HHIPTMVL	351
xlaevis	PRDM12	-----ATLA--HHIPTMVL	355
zebra	PRDM12	-----ASLV--HHIPTMVL	366
		*: *****	

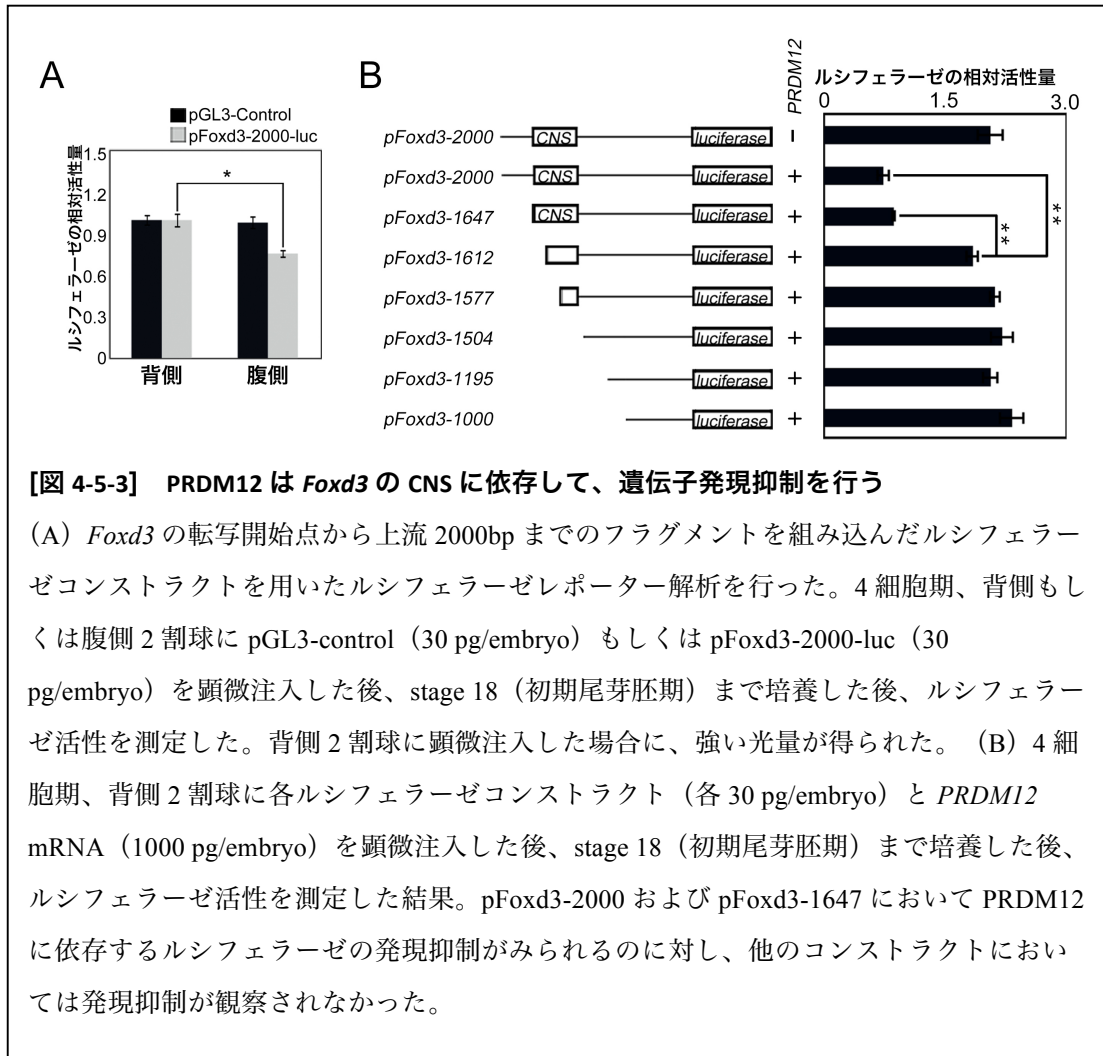
【図 4-5-1】 PRDM12 の PR ドメイン及び ZNF ドメインのアミノ酸配列は脊椎動物種間で高度に保存されている

ClastralW を用いて、ヒト (NM_021619.2)、マウス (NM_001123362.1)、ラット (XM_001067974.4)、ニワトリ (XM_415465.3)、ツメガエル (NM_001086385.1)、およびゼブラフィッシュ (DQ851836.1) の PRDM12 のアミノ酸配列を比較した結果。全アミノ酸配列中 87% のアミノ酸配列が同一配列 (*) を、90% が相同配列 (:) を示した。赤領域は PR ドメイン、青領域は ZNF ドメインを示す。

生物種間で保存されている遺伝子配列は VISTA browser を用いて検索し、特に神経堤遺伝子の周辺配列の中で、生物種間で保存性の高い配列があるか調査した。ヒトと各脊椎動物の神経堤遺伝子の上下 7 kbp の遺伝子配列を比較した結果、*Foxd3* のプロモーター上に 48bp の保存性の高い配列 CNS (Conserved non-coding sequence) が存在することが確認できた (図 4-5-2)。また、PRDM12 は *Foxd3* の発現を抑制する事から、PRDM12 が *Foxd3* の CNS に結合し、転写調整する可能性が示唆された。

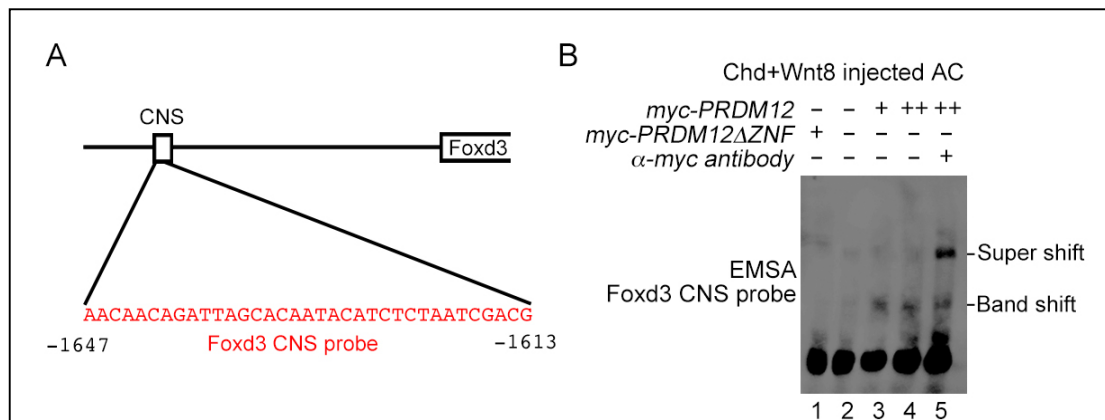


PRDM12 が *Foxd3* プロモーターの CNS 領域に結合する可能性を探るため、CNS 配列を含む *Foxd3* プロモーターの一部を挿入したルシフェラーゼコンストラクト (pFoxd3-2000-luc) を用いたルシフェラーゼ解析により仮説が正しいか検証した。まず、作成したコンストラクトが正常に機能しているか評価するため、ルシフェラーゼコンストラクトを背腹に打ち分け、ルシフェラーゼコンストラクトの評価を行った。



Foxd3 は背側領域において発現し、原腸胚期では中胚葉誘導因子 *Nodal* を誘導することで背側中胚葉の形成に貢献する (Steiner et al., 2006)。そのため、背側領域におけるルシフェラーゼの発現量が腹側領域より高い事が期待される。その結果、背腹に打ち分けたサンプルを比較して、pFoxd3-2000-luc を背側に注入した胚の方が腹側に注入した胚より強いルシフェラーゼ活性を示していることが明らかとなった (図 4-5-3A)。つまり、背側領域で *Foxd3* の発現が強いという先行研究と一致した結果が得られた。このことから、作成した pFoxd3-2000-luc は機能する *Foxd3* プロモーターが組み込まれている可能性が高いと考えられる。次に、*PRDM12* が CNS に対して応答性を持っているか評価するため、CNS 欠損コンストラクトを用いたルシフェラーゼ解析を行った (図 4-5-3B)。pFoxd3-2000-luc のみを注入したサンプルと比較して、*PRDM12* と pFoxd3-2000-luc を注入した胚ではルシフェラーゼの発現量が著しく低下した (図 4-5-3)。同様に CNS 領域を含む

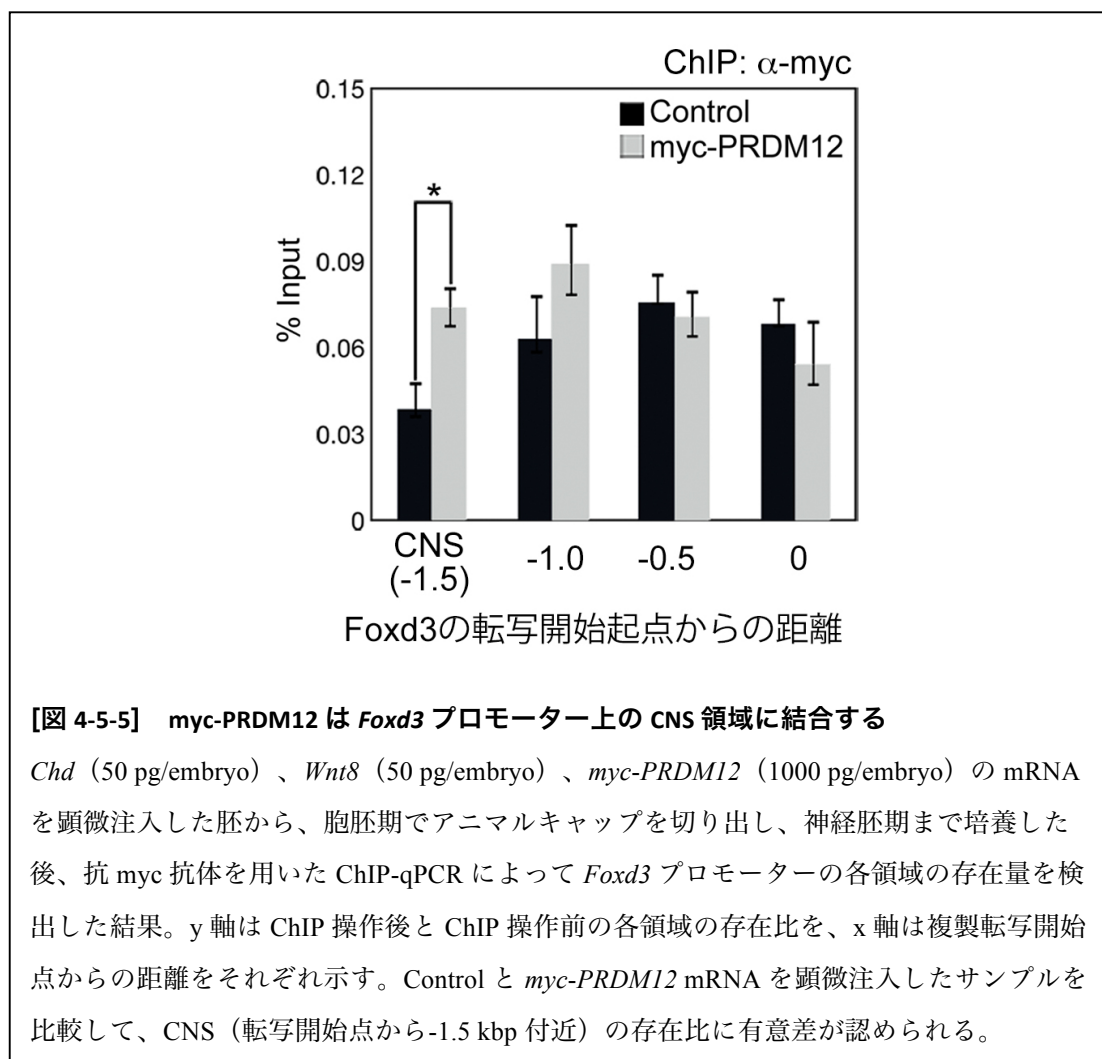
pFoxd3-1647-luc と *PRDM12* を注入した胚ではルシフェラーゼの発現抑制が観察された (図 4-5-3B)。これらの結果に対し、CNS の一部 (転写開始点の上流 1612 塩基から 1647 塩基の領域) を含まない pFoxd3-1612-luc や pFoxd3-1577-luc と *PRDM12* を共注入したサンプルではルシフェラーゼの発現抑制は観察されなかった (図 4-5-3B)。同様に他の CNS を含まないレポーターベクターを注入した胚においても *PRDM12* 依存的なルシフェラーゼの発現抑制は見られなかった (図 4-5-3B)。これらの結果は *PRDM12* の発現抑制が *Foxd3* プロモーター上の CNS 領域に依存している事を示唆している。また、1612 塩基から 1647 塩基までの領域は *PRDM12* と結合する可能性が高い。この CNS の一部 (図 4-5-4A) の配列と *PRDM12* が結合するか評価するため、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、CNS の一部の配列を元に作成した *Foxd3* CNS probe は *PRDM12* の発現に依存してバンドシフトする事が明らかとなった。(図 4-5-4B)。一方、ZNF ドメイン欠損型 *PRDM12* を発現させたサンプルではバンドシフトが観察されなかった (図 4-5-4B)。



[図 4-5-4] PRDM12 の ZNF ドメインは *Foxd3* プロモーターの CNS 配列に結合する

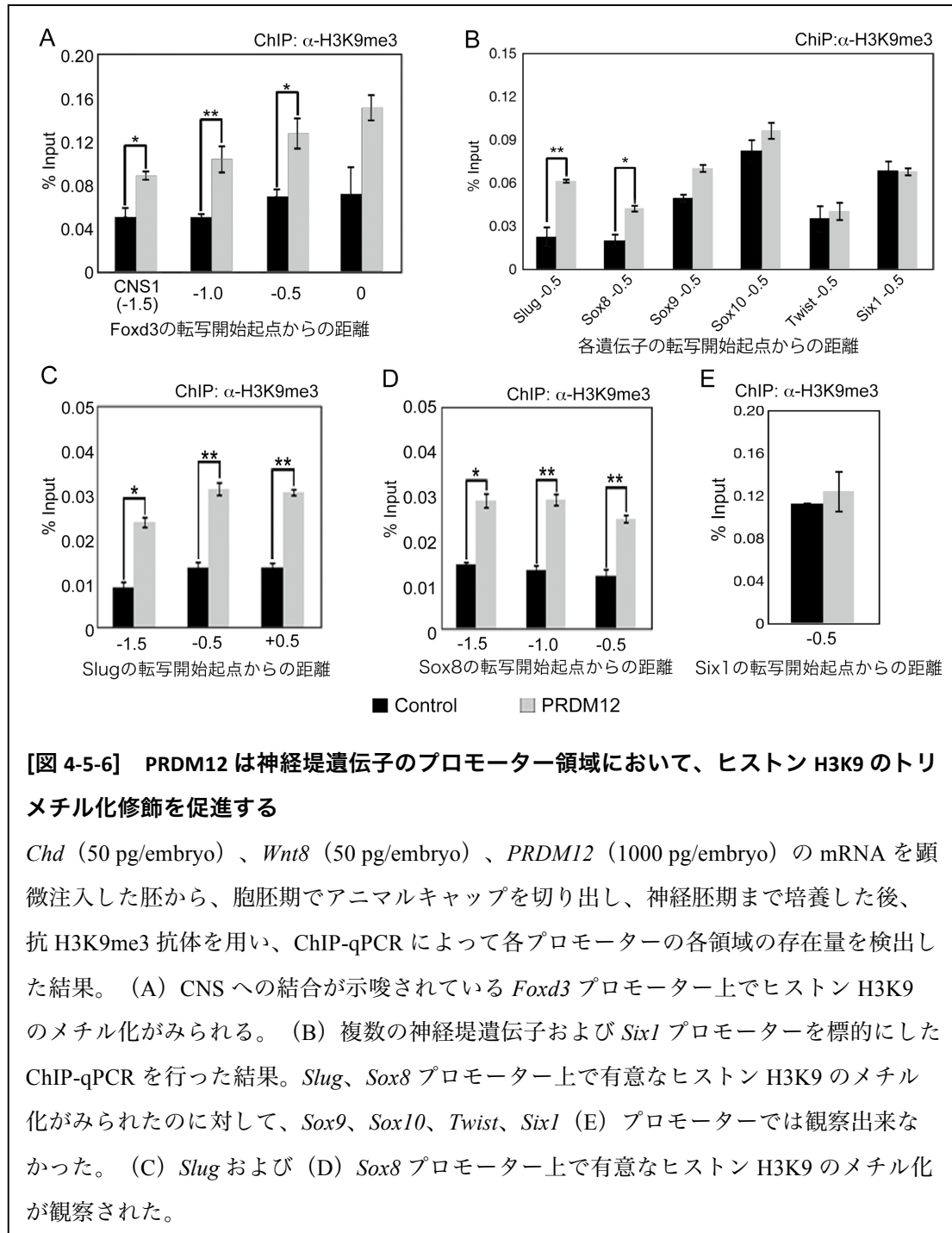
Chd (50 pg/embryo)、*Wnt8* (50 pg/embryo)、*myc-PRDM12* (1000 pg/embryo) の mRNA を共注入し、胞胚でアニマルキャップを切り出し、stage 15 まで培養したサンプルを用いたゲルシフトアッセイの結果。(A) 図 24 の結果から *PRDM12* が結合することが想定される CNS 配列をもとにした DNA プロブの配列。(B) *myc-PRDM12* を含むライセートではバンドシフトが観察され、*myc-PRDM12ΔZNF* のライセートではシフトが観察されなかった。また、抗 *myc* 抗体を加えたサンプルではスーパーシフトが観察された (レーン 5)。

加えて、PRDM12 と抗 myc 抗体を加えたサンプルではスーパーシフトが観察された (図 4-5-4B)。これらの結果から、PRDM12 の ZNF ドメインは *Foxd3* プロモーターの CNS と結合する性質を持ち、PRDM12 の過剰発現によるルシフェラーゼの抑制は PRDM12 が CNS に直接結合し、抑制している事を示唆する。次に、PRDM12 が *Foxd3* 周辺領域のヒストン H3K9 のメチル化を促進するか調査するため、抗 myc 抗体と抗トリメチル化ヒストン H3K9 (H3K9me3) 抗体を用いた ChIP-qPCR 解析を行った。まずは、ルシフェラーゼ解析やゲルシフトアッセイで得られた結果と一致する ChIP-qPCR の結果が得られるか評価した。*myc-PRDM12* を注入したアニマルキャップと非注入アニマルキャップを用いて抗 myc 抗体を用いて ChIP を行ったサンプルでは、CNS 領域を標的とした PCR において強い増幅が観察された (図 4-5-5)。



これに対して、*Foxd3* の転写開始点から-1.0 kbp 離れた領域を標的とした PCR 断片の増幅はコントロールと myc-PRDM12 を注入したサンプル間で、変化しなかった (図 4-5-5)。同様に、転写開始点から-0.5 kbp までの領域を標的とした PCR 断片の増幅においても有意差は観察できなかった (図 4-5-5)。この結果はルシフェラーゼ解析やゲルシフトアッセイの結果と一致し、PRDM12 が *Foxd3* プロモーターの CNS に結合する事を示唆している。次に PRDM12 を過剰発現した細胞で実際に *Foxd3* プロモーターにおいてヒストン H3K9 のメチル化が起こるか検証した。抗 H3K9me3 抗体を用いて ChIP を起こったサンプルでは PRDM12 非注入と PRDM12 の過剰発現を比較して、*Foxd3* プロモーターの CNS 領域を標的とした PCR 断片の有意な増幅が観察された (図 4-5-6A)。また面白い事に CNS 領域を標的とした PCR だけでなく、*Foxd3* プロモーターの -1.0 kbp、-0.5 kbp、複製転写開始点を標的とする PCR においても、PRDM12 を注入したサンプルにおいて強い増幅が見られた (図 4-5-6A)。この結果は PRDM12 の発現に依存して *Foxd3* プロモーター上のヒストン H3K9 のトリメチル化が促進されている事を示唆している。また、PRDM12 が *Foxd3* だけでなく、他の神経堤遺伝子のプロモーター上のヒストン H3K9 に対してもメチル化修飾を行う可能性は高い。そこで、PRDM12 が *Foxd3* 以外の神経堤遺伝子プロモーター領域でヒストン H3K9 のトリメチル化を促進するのか調査する事にした。各遺伝子の複製転写開始点から-0.5 kbp の領域を標的とする ChIP-qPCR を行ったところ、*Slug* と *Sox8* プロモーターを標的とした PCR において、PRDM12 依存的な強い増幅が観察された (図 4-5-6B)。また、わずかではあるが *Sox9* と *Sox10* プロモーターを標的にした PCR においても PRDM12 の発現に依存する強い PCR の増幅が観察された (図 4-5-6B)。これらの結果に対して、*Twist* や *Six1* のプロモーターを標的とした PCR では有意差が得られなかった (図 4-5-6B)。以上の結果は、PRDM12 が *Foxd3* プロモーターの他に、*Slug* や *Sox8* などの遺伝子に対して直接転写調節を行う可能性を示唆する。では実際に *Slug* や *Sox8* プロモーター上の他の領域に変化が見られるかどうか検証した。その結果、*Slug* と *Sox8* プロモーターでは-0.5 kbp 以外の領域においても、PCR 断片の増幅に有意差が観察できた (図 4-5-6C, D)。この結果に対して、*Six1* プロモーターを標的に

した PCR では有為な差は観察できなかつた (図 4-5-6E)。これらの結果は、PRDM12 が *Foxd3* プロモーターだけでなく、*Slug* や *Sox8* プロモーターにおけるヒストン H3K9 のトリメチル化を促進し、各遺伝子の転写抑制を行っている事を示唆している。

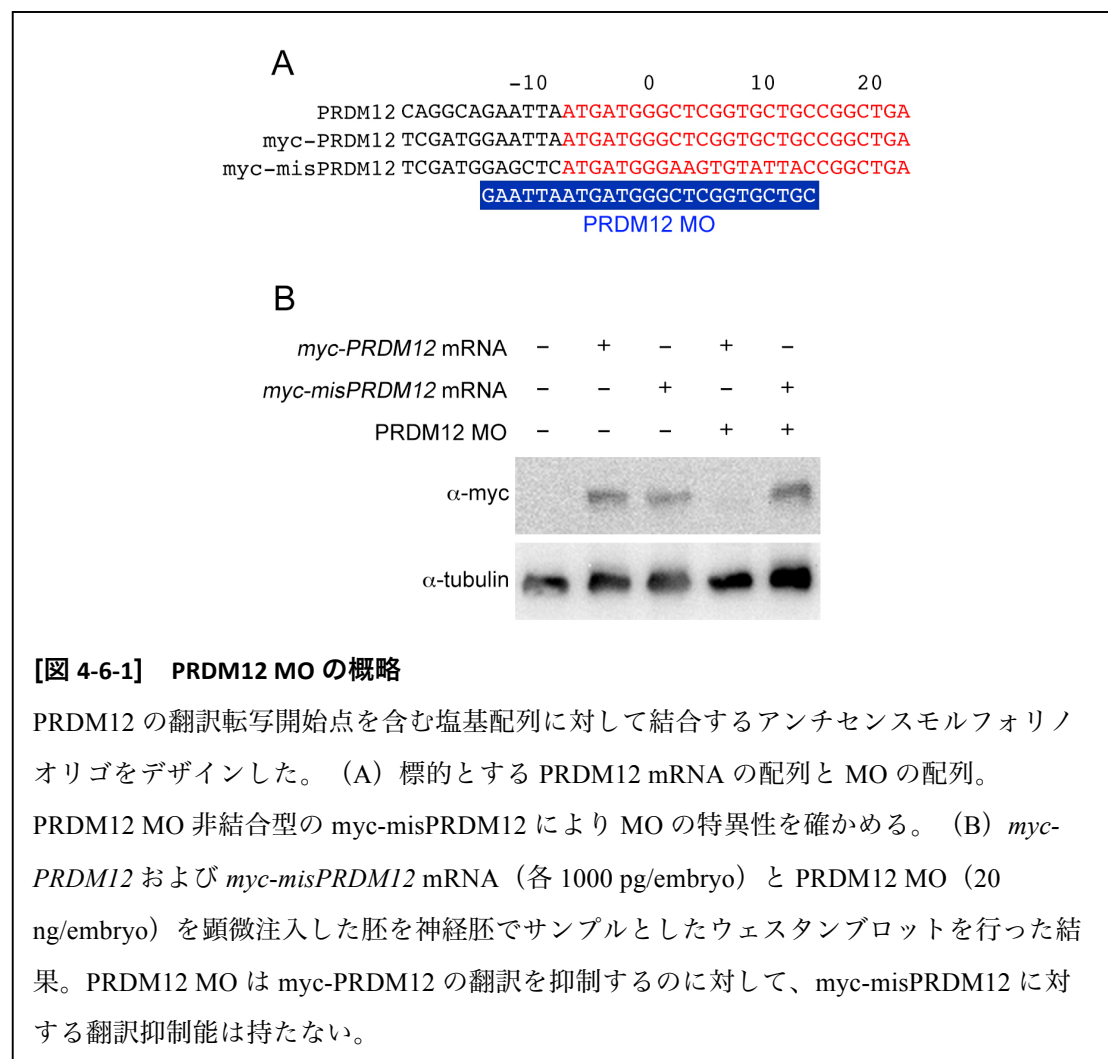


【図 4-5-6】 PRDM12 は神経堤遺伝子のプロモーター領域において、ヒストン H3K9 のトリメチル化修飾を促進する

Chd (50 pg/embryo)、*Wnt8* (50 pg/embryo)、*PRDM12* (1000 pg/embryo) の mRNA を顕微注入した胚から、胞胚期でアニマルキャップを切り出し、神経胚期まで培養した後、抗 H3K9me3 抗体を用い、ChIP-qPCR によって各プロモーターの各領域の存在量を検出した結果。(A) CNS への結合が示唆されている *Foxd3* プロモーター上でヒストン H3K9 のメチル化がみられる。(B) 複数の神経堤遺伝子および *Six1* プロモーターを標的にした ChIP-qPCR を行った結果。*Slug*、*Sox8* プロモーター上で有意なヒストン H3K9 のメチル化がみられたのに対して、*Sox9*、*Sox10*、*Twist*、*Six1* (E) プロモーターでは観察出来なかつた。(C) *Slug* および (D) *Sox8* プロモーター上で有意なヒストン H3K9 のメチル化が観察された。

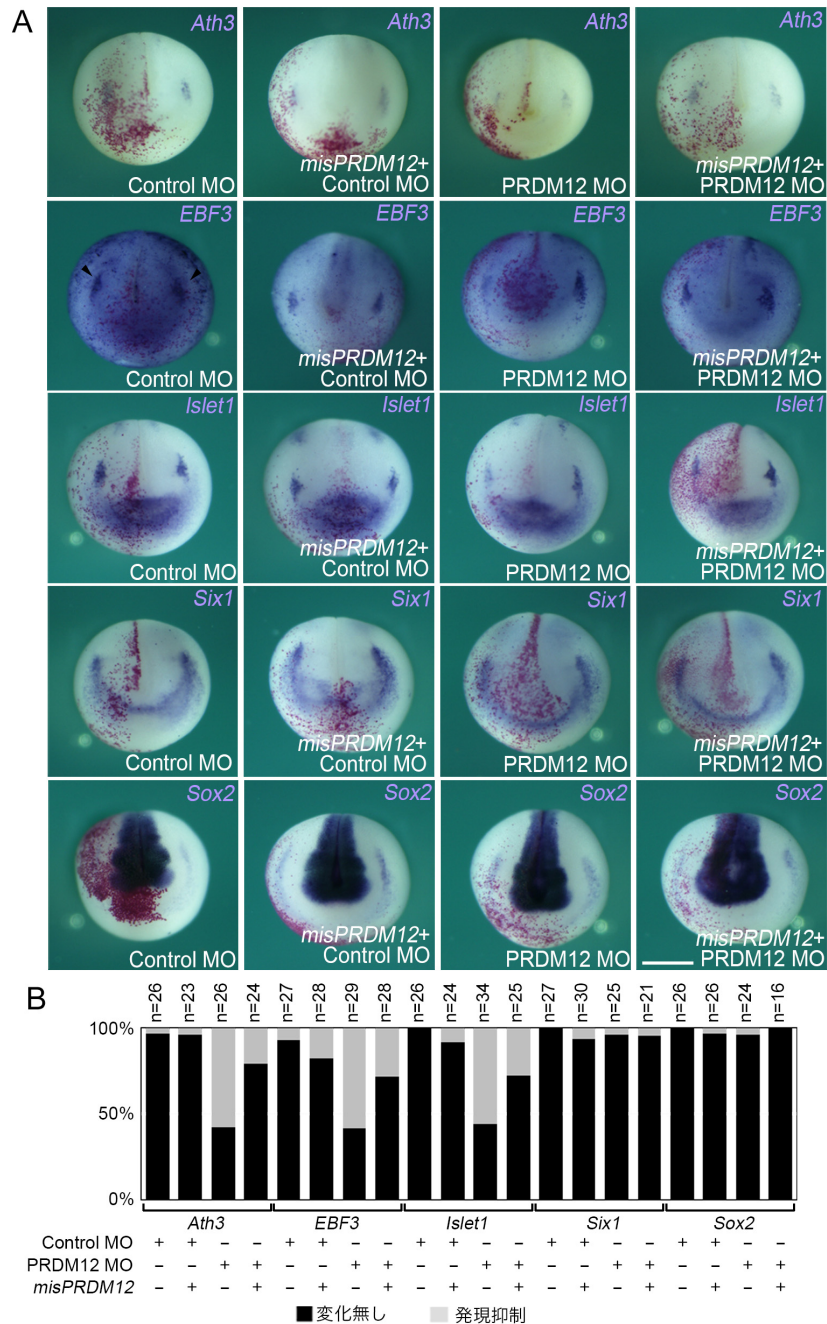
3-6. PRDM12 のノックダウンは予定三叉神経プラコード遺伝子の発現を抑制し、神経堤遺伝子の発現を拡大させる

過剰発現により初期発生における PRDM12 の機能を評価してきたが、内在性 PRDM12 の発生における役割に関しては未だ明らかになっていない。そのため、生体における PRDM12 の必要性を評価するために、PRDM12 に対して特異的な翻訳阻害を行う Morpholino oligo (PRDM12 MO) を作成した (図 4-6-1A)。また、PRDM12 MO の配列特異性を評価するため、PRDM12 MO と結合する myc-PRDM12 と結合しない myc-misPRDM12 を作成し、共注入して特異性を評価した (図 4-6-1B)。



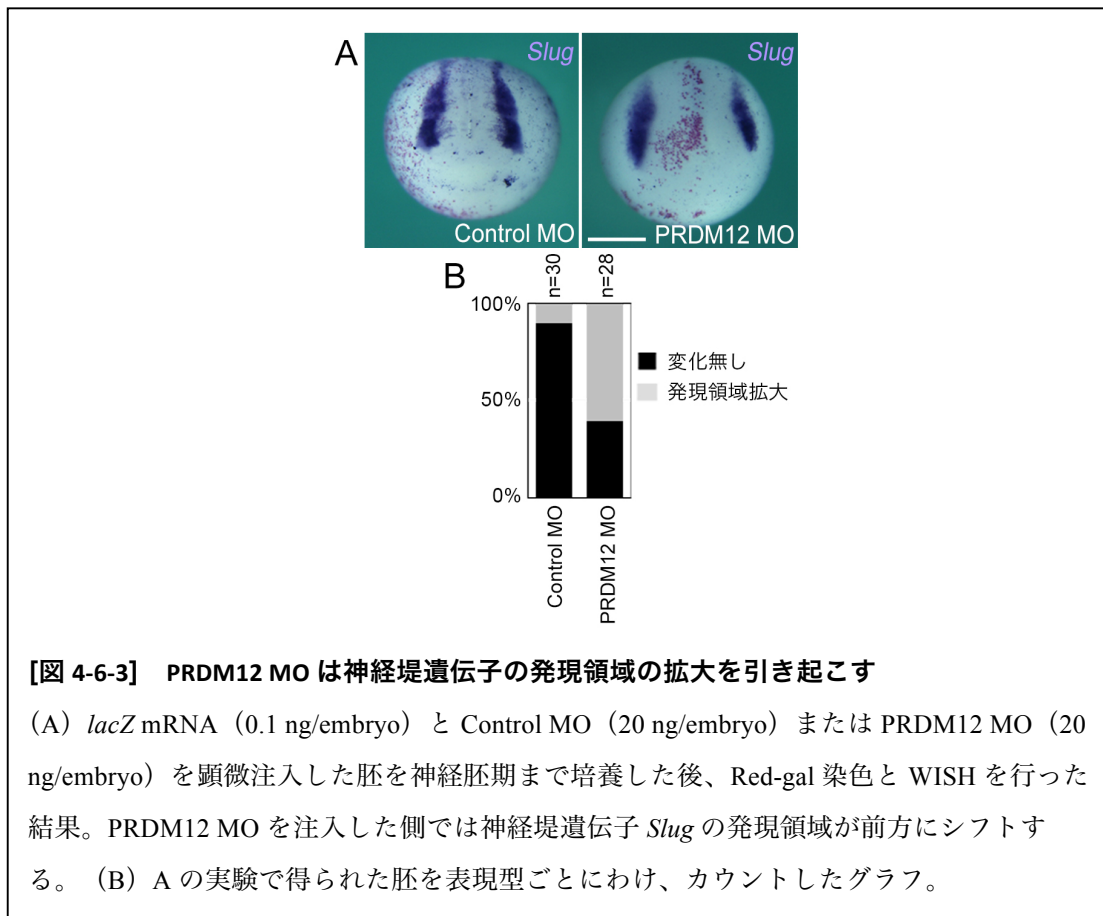
myc-PRDM12 と PRDM12 MO を共注入した場合、myc-PRDM12 タンパク質が翻訳されないのに対して、myc-misPRDM12 と PRDM12 MO の共注入ではタンパク質の翻訳が阻害されなかった (図 4-6-1B)。この結果は PRDM12 MO が PRDM12 の配列特異的に結合し、翻訳阻害する事を示す。内在性 PRDM12 が果たす初期胚発生における役割を明らかにするため、PRDM12 MO を注入した胚における遺伝子発現を WISH 法によって評価することにした。PRDM12 MO を顕微注入した胚では、予定三叉神経プラコード遺伝子 *Ath3* の発現が抑制されていることが明らかとなった (図 4-6-2A, B)。同様に、予定三叉神経プラコード遺伝子 *EBF3*、*Islet1* の発現が注入した領域で抑制されていることが観察された (図 4-6-2A, B)。これら PRDM12 MO を注入した胚における遺伝子発現の変化に対して、Control MO を注入した胚では予定三叉神経プラコード変化しなかった (図 4-6-2A, B)。その一方で、PRDM12 MO と Control MO を注入した胚における汎プラコード遺伝子 *Six1* や神経板遺伝子 *Sox2* の発現について、大きな影響は観察できなかった (図 4-6-2A, B)。また、PRDM12 MO によって抑制された予定三叉神経プラコード遺伝子の発現は *misPRDM12* mRNA の過剰発現によって回復した (図 4-6-2A, B)。これらの結果は、PRDM12 が予定三叉神経プラコードの正常な発生に必要であることを示唆している。

予定三叉神経プラコード遺伝子の発現抑制が起こった領域が、神経堤領域への置換していないか評価するため、片側割球に PRDM12 MO を打った胚の神経堤遺伝子の発現を観察した。Control MO を注入した胚では注入した側の神経堤遺伝子 *Slug* の発現に大きな変化はなかった。これに対して、PRDM12 MO を注入した領域と非注入領域を比較した結果、神経堤遺伝子の発現領域が前方方向へ拡大が観察された (図 4-6-3A, B)。この結果は PRDM12 MO によって、神経堤遺伝子を抑制していた内在 PRDM12 が抑制されたため、神経堤遺伝子の発現が変化したものと考えられる。

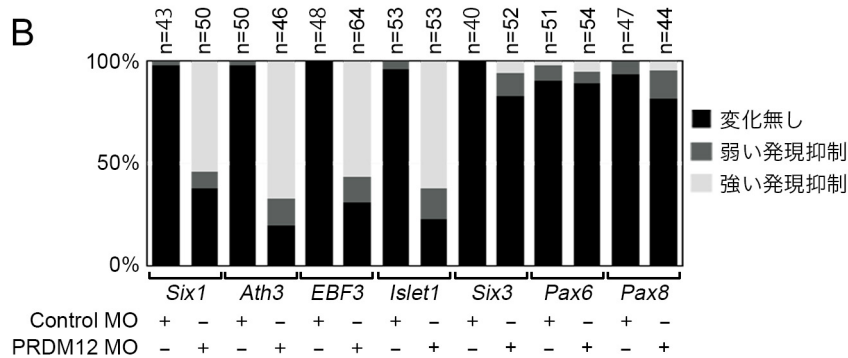
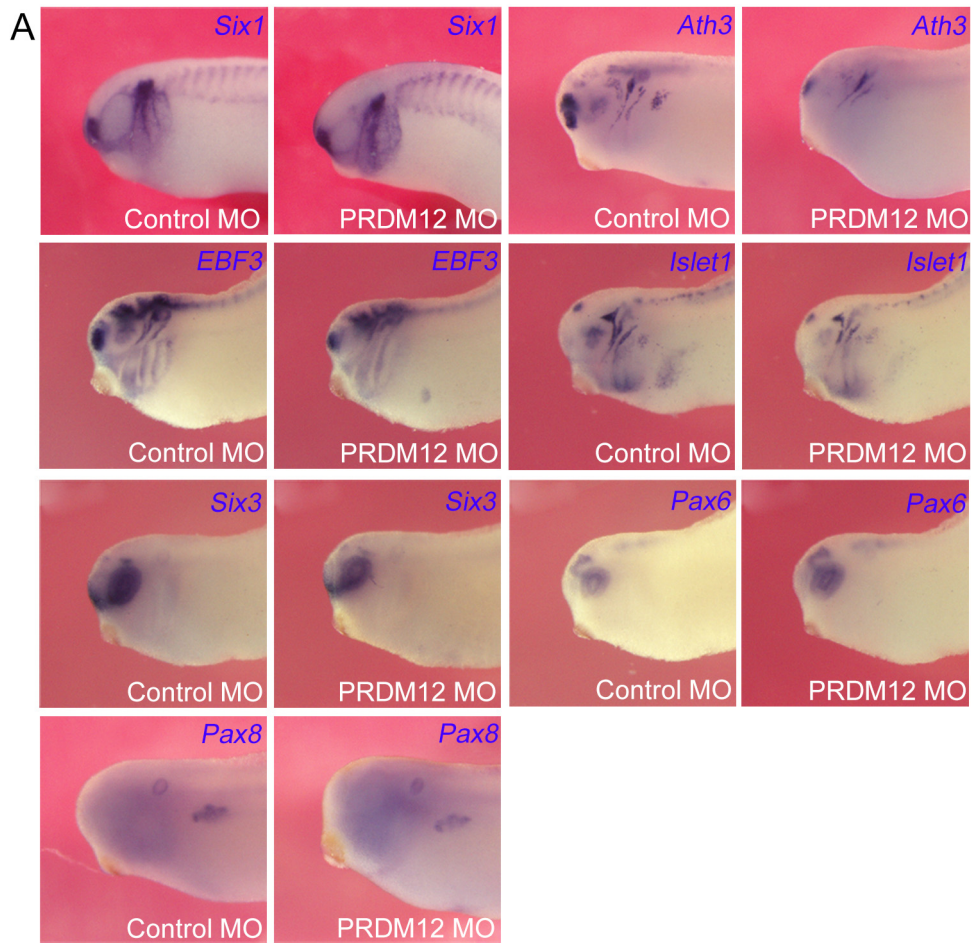


[図 4-6-2] PRDM12 ノックダウン胚は予定三叉神経プラコード遺伝子の発現抑制を引き起こす

(A) Control MO (20 ng/embryo)、PRDM12 MO (20 ng/embryo)、*misPRDM12* mRNA (1 ng/embryo)、*lacZ* (0.1 ng/embryo) を顕微注入し、神経胚まで培養し、Red gal 染色後、WISH を行った結果。PRDM12 MO は予定三叉神経プラコード遺伝子 *Ath3*、*EBF3*、*Islet1* の発現を抑制する。一方、汎プラコード遺伝子 *Six1* や神経板遺伝子 *Sox2* の発現は大きく影響を受けない。(B) A の実験結果から得た表現型を変化がない胚と発現抑制が観察された胚にわけ、まとめたグラフ。PRDM12 MO の効果は *misPRDM12* の mRNA の共注入によって解除される。



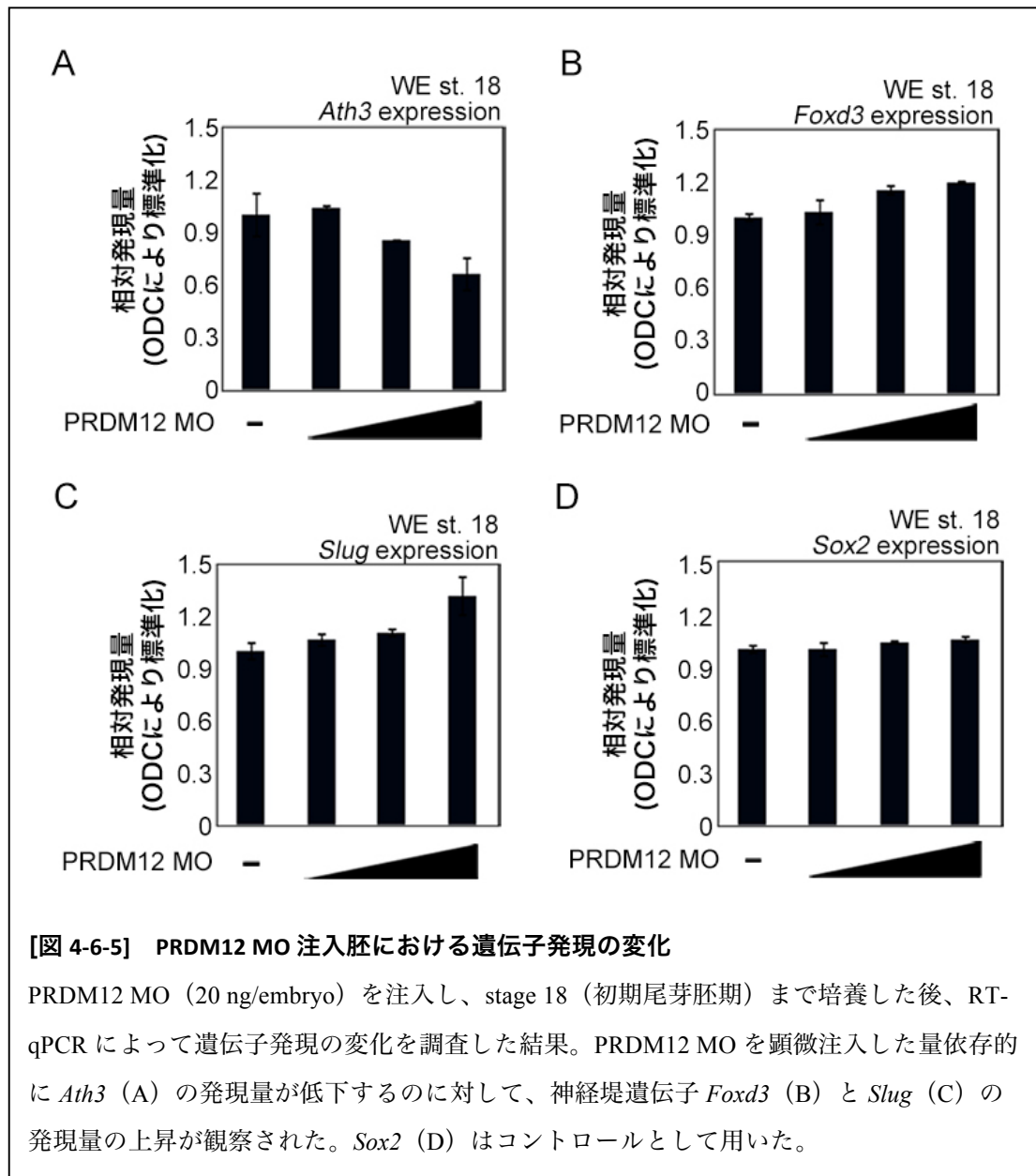
また、PRDM12 MO の注入による影響が尾芽胚期においてもみられるか検証した。PRDM12 MO の注入により、汎プラコード遺伝子 *Six1* の発現がわずかながら抑制された (図 4-6-4A, B) 。また、三叉神経または profundal プラコード遺伝子である *Ath3*、*EBF3*、*Islet1* の発現もまた著しく阻害されている (図 4-6-4A, B) 。それに対して、レンズプラコード遺伝子 *Six3* や *Pax6*、耳胞プラコード遺伝子 *Pax8* の発現は大きく変化しなかった (図 4-6-4A, B) 。以上の結果は、PRDM12 MO による PRDM12 のノックダウンが三叉神経や profundal プラコードの形成に対して特異的に働きかける事を示す。



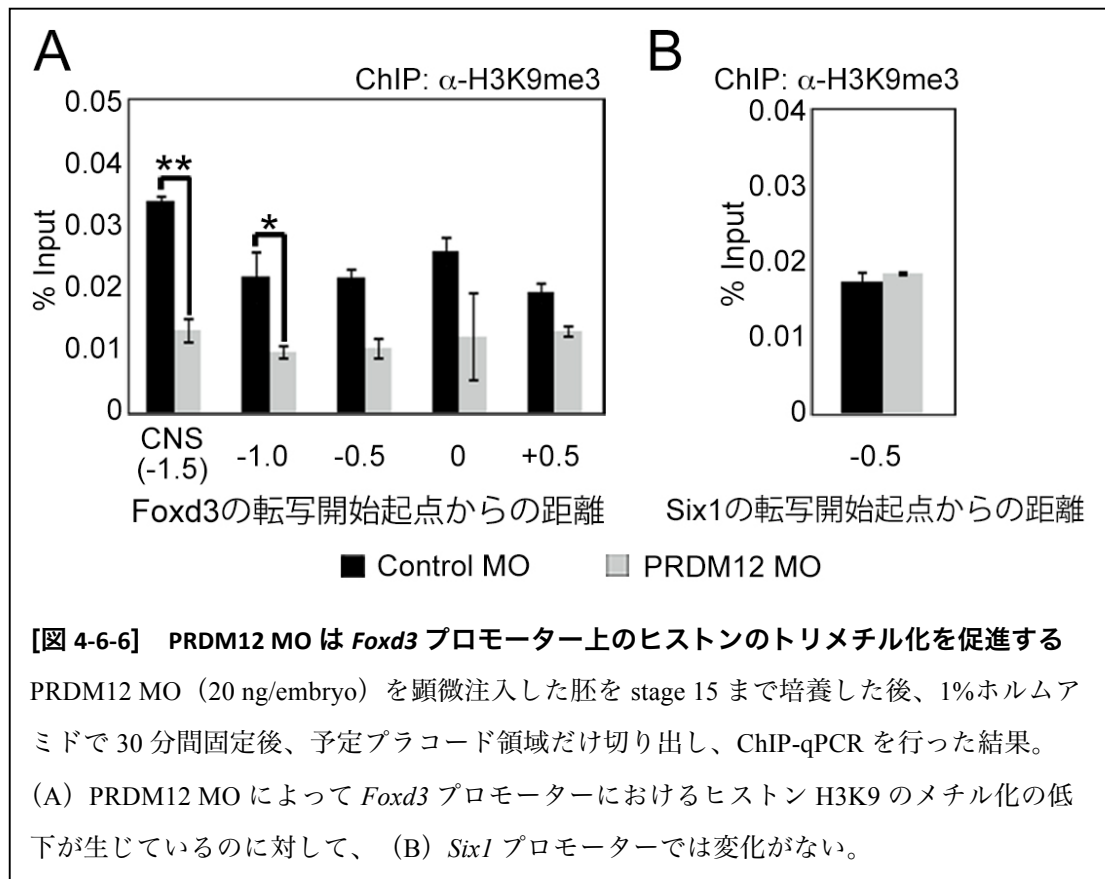
[図 4-6-4] PRDM12 MO は尾芽胚期において三叉神経節の形成不全を起こす

Control MO (20 ng/embryo) または PRDM12 MO (20 ng/embryo) を顕微注入した胚を尾芽胚まで培養した後、各遺伝子プローブを用いて WISH を行った結果。PRDM12 MO は profundal プラコード遺伝子および三叉神経プラコード領域の遺伝子発現を抑制する一方でレンズ、下垂体、耳胞プラコード遺伝子の発現は抑制しない。(B) A の実験で得られた胚を表現型ごとに分類し、作成したグラフ。

PRDM12 MO によって各遺伝子の発現領域の変化が観察された。特に予定プラコード遺伝子の発現は抑制される一方で、神経堤遺伝子の発現は予定プラコード領域まで拡大している事が明らかとなった。実際に PRDM12 MO を注入した胚では各遺伝子の発現量に変化が見られるか、RT-qPCR 解析を行い、PRDM12 MO の注入によって予定三叉神経、神経堤、神経板遺伝子の発現に変化が生じるか評価した。PRDM12 MO を 4 細胞期の全割球に注入した胚では予定三叉神経プラコード遺伝子である *Ath3* (図 4-6-5A) の発現が抑制される傾向が観察された (図 4-6-5A)。一方で、神経堤遺伝子である *Foxd3* (図 4-6-5B) と *Slug* (図 4-6-5C) の発現量はわずかながら上昇した。

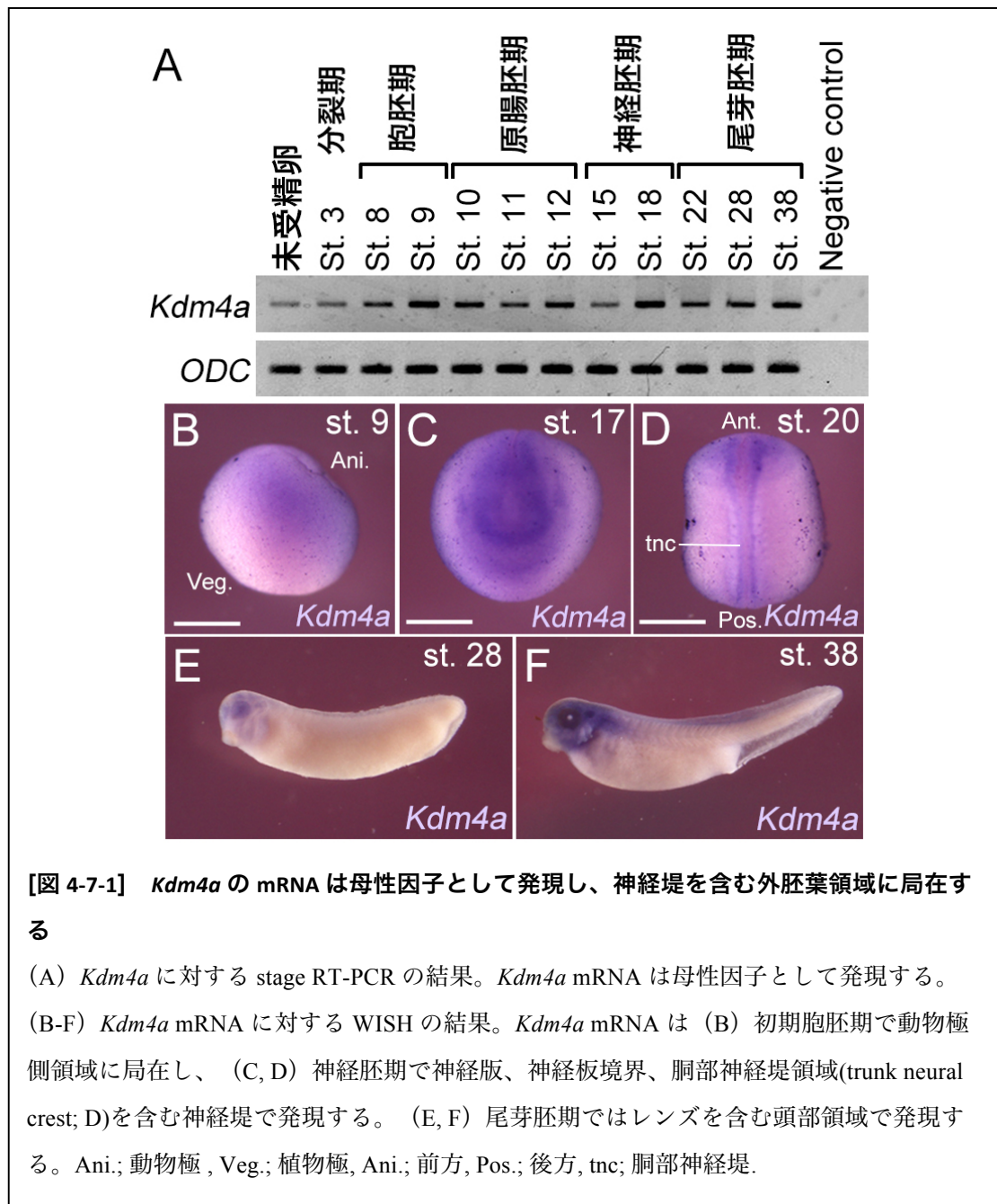


この結果に対して、神経板遺伝子である *Sox2* (図 4-6-5D) の発現量において、大きな変化が観察出来なかった。以上の結果は、PRDM12 MO が内在性 PRDM12 の神経堤遺伝子の発現抑制を阻害することで神経堤だけでなく予定プラコード遺伝子の発現量にも影響を与えることを示唆する。PRDM12 の過剰発現による解析結果から、PRDM12 MO によるノックダウンした胚では内在性 PRDM12 が発現しにくくなるため、*Foxd3* プロモーターにおけるトリメチル化したヒストン H3K9 の総量が減る事が予想される。*Foxd3* プロモーターにおけるヒストン H3K9 がトリメチル化されるか、Control MO または PRDM12 MO を注入した胚の予定プラコード領域を切り出したサンプルと抗 H3K9me3 抗体を用いた ChIP-PCR を行った。その結果、CNS を標的とした PCR において、Control MO を注入したサンプルより、PRDM12 MO を注入したサンプルで弱い増幅が観察された (図 4-6-6A)。加えて、*Foxd3* の転写開始点から -1.0 kbp、-0.5kbp、0 kbp、+0.5 kbp を標的とした PCR においても同様に、PRDM12 MO を注入したサンプルで弱い増幅が観察された (図 4-6-6A)。この結果に対して、*Six1* プロモーターを標的とした PCR では PRDM12 MO と PRDM12 MO を注入したサンプル間において大きな差は観察されなかった (図 4-6-6B)。これらの結果は PRDM12 MO によって *Foxd3* プロモーター上のヒストン H3K9 のトリメチル化が抑制された事を示し、PRDM12 が *Foxd3* プロモーター上のヒストン H3K9 をトリメチル化する役割を持つ事が示唆された。

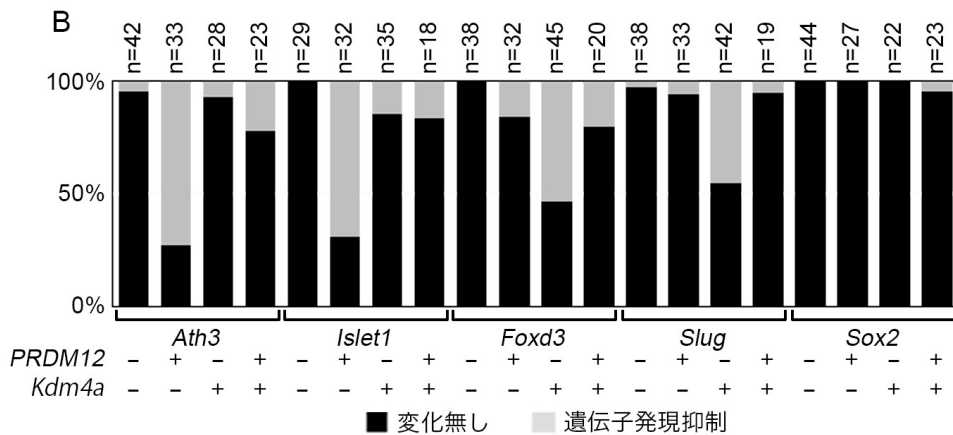


3-7. *Kdm4a* の過剰発現は PRDM12 のノックダウンと同様の効果を示し、PRDM12 の過剰発現の効果を解除する

近年のニワトリ胚における研究結果から、ヒストン脱メチル化酵素である *Kdm4a*/*Jmjd2a* が神経堤発生に重要な役割を持つことが知られている (Strobl-Mazzulla et al., 2010)。*Kdm4a* はヒストンリジンに対する脱メチル化活性を示す jumonji ドメインを持ち、ヒストン K9 または H3K36 に対し脱メチル化活性を持つことが報告されている。



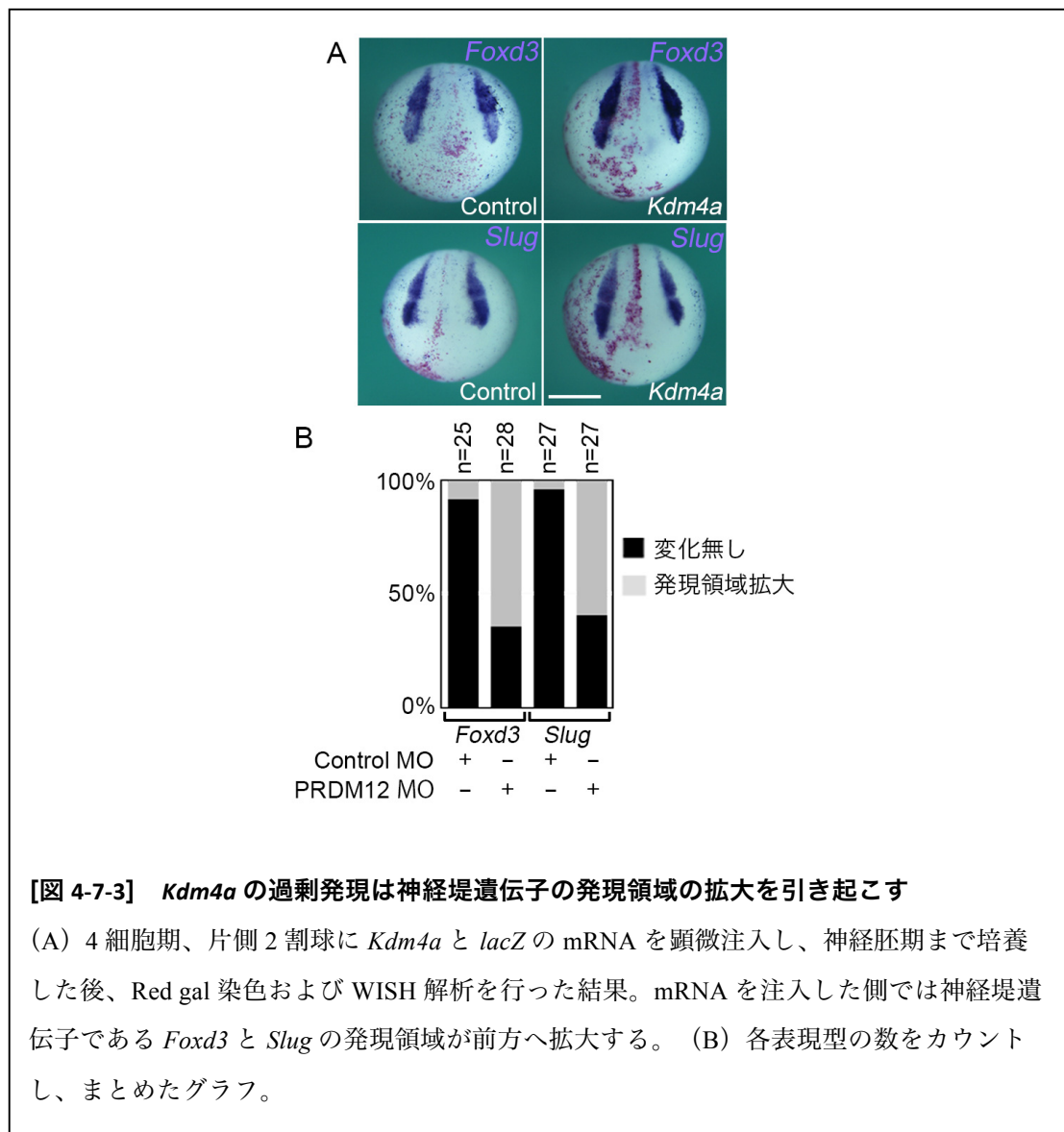
そのため、Kdm4a は予定プラコード領域と神経堤のパターン形成において重要であることが予想される。ニワトリ胚の *Kdm4a* の発現領域は調査済みだが、ツメガエルにおける *Kdm4a* の役割は未だ明らかになっていない。そのため *Kdm4a* の時空間的発現パターンを調査することにした。stage RT-PCR から *Kdm4a* は母性 mRNA として発現し、後期ステージにおいても発現が維持されることがわかった (図 4-7-1A)。WISH 解析の結果から、予定外胚葉領域に発現した後、神経胚期において神経板、神経板境界、胴部神経堤領域で発現し、さらに後期の胚では目を中心とする前方神経で発現することが明らかとなった (図 4-7-1B-F)。これらの発現パターンはニワトリ胚の *Kdm4a* の発現パターンと概ね一致した結果である。ニワトリ胚における先行研究では *Kdm4a* のノックダウンで神経堤形成不全が引き起こされる事を報告している (Strobl-Mazzulla et al., 2010)。しかし、*Kdm4a* の過剰発現胚がどのような表現型を示すのか未だ報告はないことから、*Kdm4a* を過剰発現した胚に対して各遺伝子を検出する WISH 法を行った。*Kdm4a* を過剰発現した胚では、予定三叉神経プラコード遺伝子である *Ath3* と *Islet1* の発現抑制が観察された (図 4-7-2A, B)。これに対して、*Kdm4a* を過剰発現した胚での神経堤遺伝子の発現には変化がない (図 4-7-2A, B)。また、神経板遺伝子 *Sox2* も同様に変化は見られなかった (図 4-7-2A, B)。*Kdm4a* の過剰発現は予定プラコード遺伝子の発現抑制という点において *PRDM12* をノックダウンした時に見られる表現型と類似した結果が得られた。*Kdm4a* の過剰発現に対して、*PRDM12* の過剰発現胚は対照的な表現型を見せた。上述した通り、*PRDM12* の過剰発現は神経堤遺伝子の発現を抑制する一方で、予定プラコード遺伝子 *Ath3* や *Islet1* や神経板遺伝子 *Sox2* の発現には大きな影響を与えない (図 4-7-2A, B)。*Kdm4a* と *PRDM12* の過剰発現胚が相補的な効果が見られた事から、共注入する事で互いの効果を打ち消しあうことができないか検証した結果、予想通り、互いの影響を打ち消し合う事ができた (図 4-7-2A, B)。これらの結果から、*Kdm4a* の過剰発現胚は *PRDM12* のノックダウン胚と類似した表現型と予定プラコード遺伝子を抑制する効果を示した。



[図 4-7-2] *Kdm4a* の過剰発現は予定三叉神経遺伝子の発現を抑制し、*PRDM12* の効果を解除する

(A) *Kdm4a* (200 pg/embryo)、*PRDM12* (1000 pg/embryo)、*Kdm4a* および *PRDM12* の mRNA を注入した胚に対して、各遺伝子プローブを用いて WISH を行った結果。*Kdm4a* の過剰発現は予定三叉神経プラコード遺伝子 *Ath3* と *Islet1* の発現を抑制する。一方で神経堤や神経板遺伝子の発現には影響を与えない。また、*PRDM12* の過剰発現による神経堤遺伝子 (*Foxd3* と *Slug*) の発現阻害は *Kdm4a* の過剰発現によって解除することができる。(B) 各表現型の数をカウントし、まとめた表。

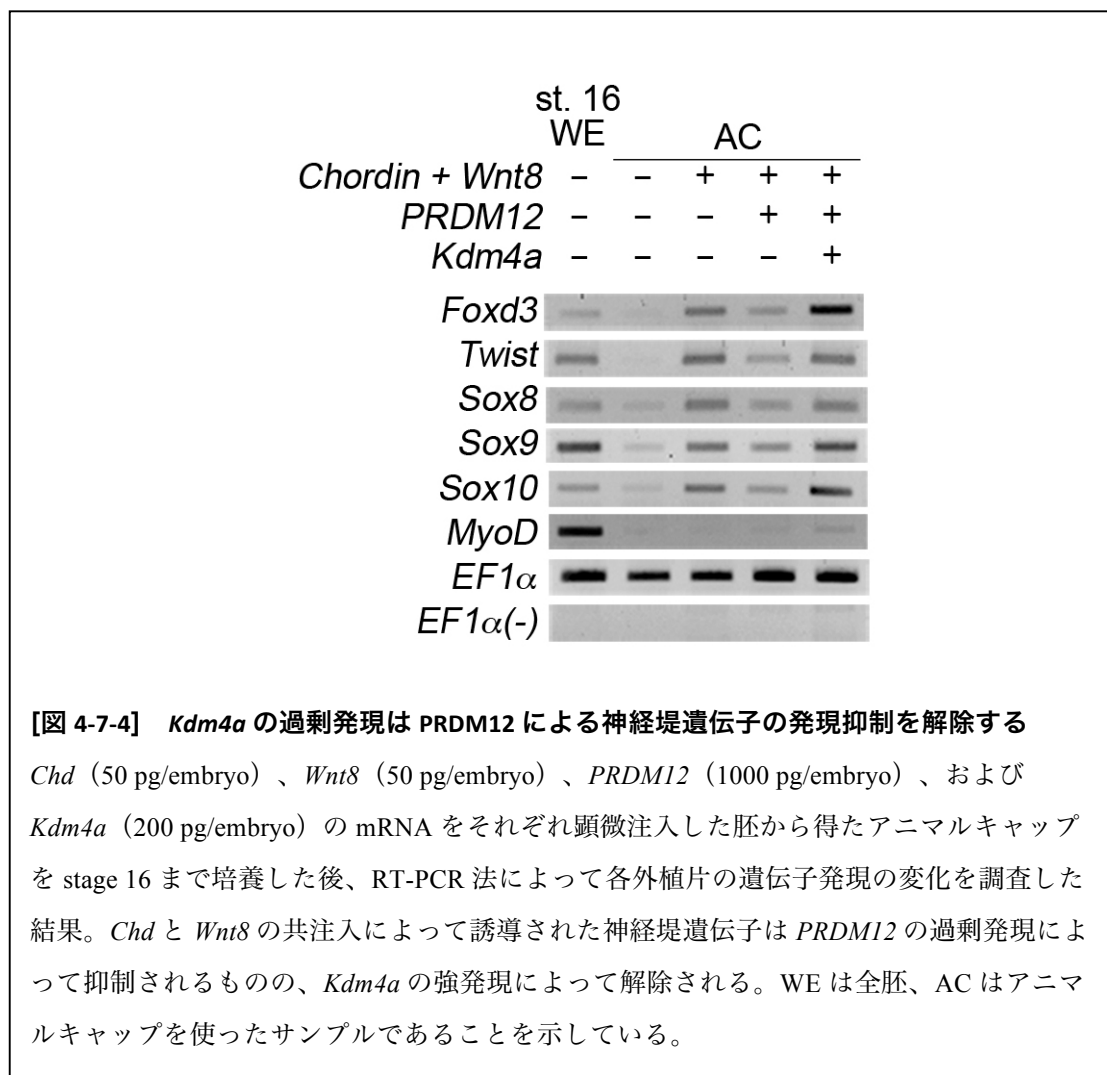
PRDM12 MO によってノックダウンした胚で観察された神経堤遺伝子の前方への発現領域の拡大が観察された。PRDM12 MO によるノックダウン胚と *Kdm4a* の過剰発現胚との表現型は類似していたことから、*Kdm4a* の過剰発現胚においても神経堤遺伝子の発現領域の拡大が観察されるか調査した。コントロールとして使用した *lacZ* の mRNA を注入した胚では *Slug*、*Foxd3* の発現領域の拡大が観察されなかった一方で、*Kdm4a* を注入した胚ではそれら遺伝子の領域の拡大が見られた（図 4-7-3A, B）。以上の結果から、*Kdm4a* も PRDM12 と同様に神経堤遺伝子を標的とし、神経堤遺伝子の転写を促進する機能を持つ事が示唆された。



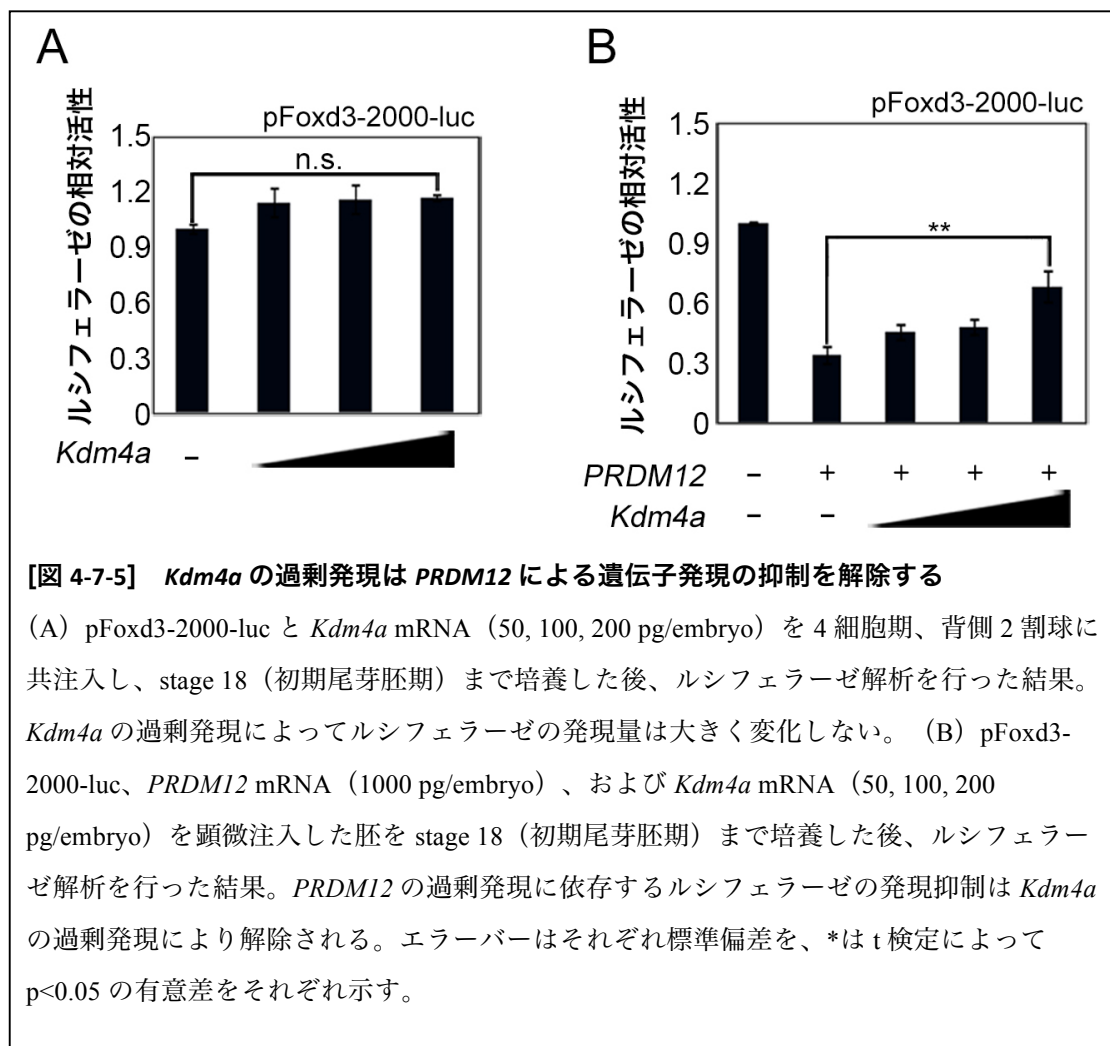
[図 4-7-3] *Kdm4a* の過剰発現は神経堤遺伝子の発現領域の拡大を引き起こす

(A) 4細胞期、片側2割球に *Kdm4a* と *lacZ* の mRNA を顕微注入し、神経胚期まで培養した後、Red gal 染色および WISH 解析を行った結果。mRNA を注入した側では神経堤遺伝子である *Foxd3* と *Slug* の発現領域が前方へ拡大する。(B) 各表現型の数をカウントし、まとめたグラフ。

神経堤細胞を模倣した系において、*PRDM12* を過剰発現した場合、神経堤遺伝子の発現量が低下する事が *PRDM12* の過剰発現の実験で明らかとなっている。そこで *PRDM12* の過剰発現によって抑制される神経堤遺伝子の発現が *Kdm4a* の過剰発現によって回復するか調査した。*Chd* と *Wnt* の mRNA によって神経堤細胞を誘導したアニマルキャップでは、*Foxd3* を始め、*Twist*、*Sox8*、*Sox9*、*Sox10* などの神経堤遺伝子の発現が観察される (図 4-7-4)。上述した結果と同様に、*PRDM12* を同時に過剰発現した場合、神経堤遺伝子の発現が抑制される (図 4-7-4)。この結果に対して、*PRDM12* と *Kdm4a* を同時に過剰発現させたアニマルキャップでは、*PRDM12* によって抑制された神経堤遺伝子の発現が回復することが明らかとなった (図 4-7-4)。

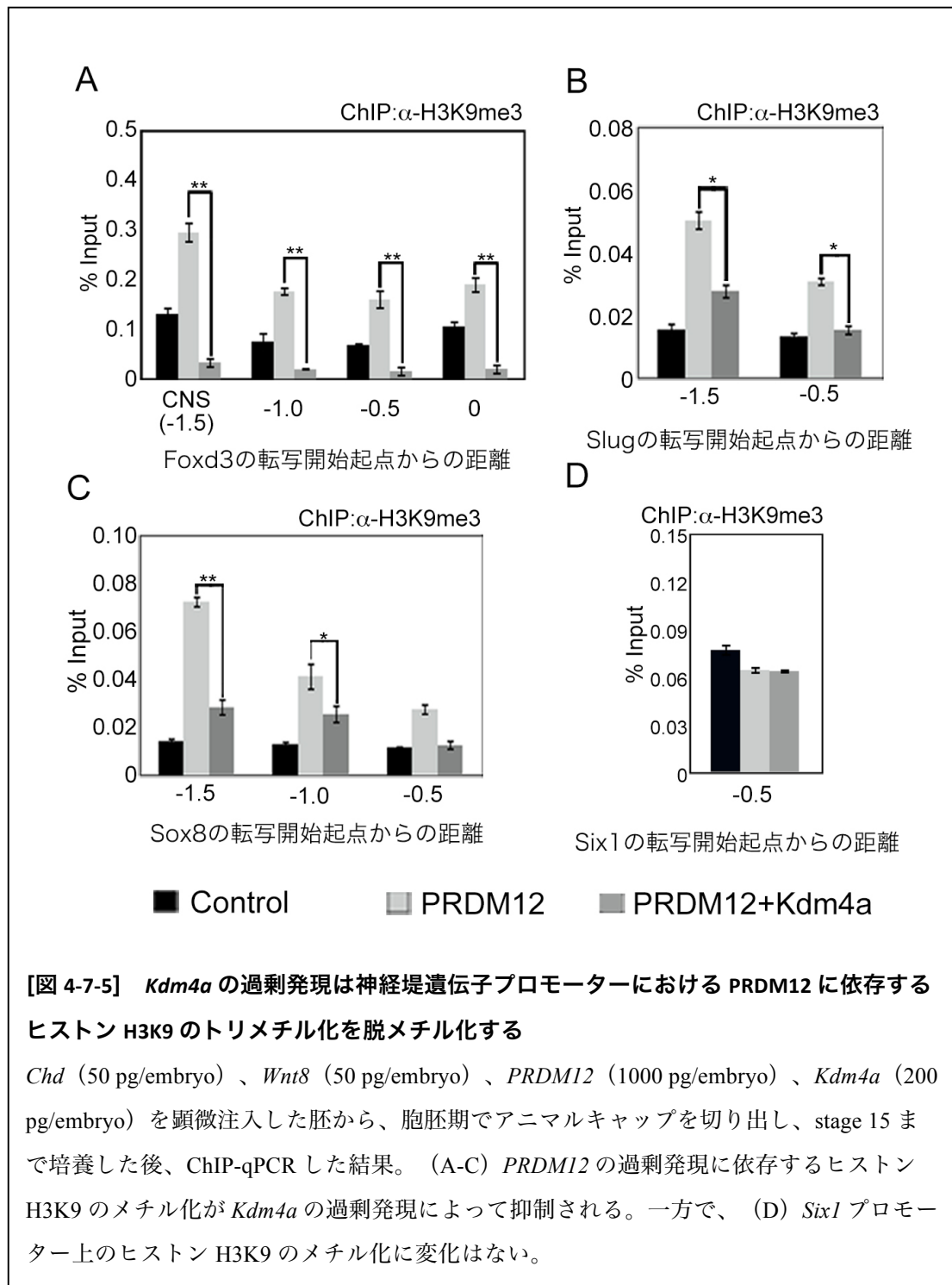


RT-PCR の結果に加えて、ルシフェラーゼアッセイにおいても *Kdm4a* が *PRDM12* による発現抑制を解除することができるか、pFoxd3-2000-luc を用いたルシフェラーゼアッセイを行った (図 4-7-5)。*Kdm4a* を単独で過剰発現した場合、ルシフェラーゼ活性に大きな変化は観察されなかった (図 4-7-5A)。*PRDM12* の過剰発現によってルシフェラーゼ活性が抑制されるのに対して、*Kdm4a* を同時に過剰発現させた場合、*PRDM12* によるルシフェラーゼの発現抑制が解除されることが明らかとなった (図 4-7-5B)。この結果は表現型や RT-PCR の結果と同様、*PRDM12* に依存する遺伝子発現抑制は *Kdm4a* の過剰発現によって解除されることを示し、*PRDM12* と *Kdm4a* は共通の神経堤遺伝子の発現調節を行っていることを示唆している。



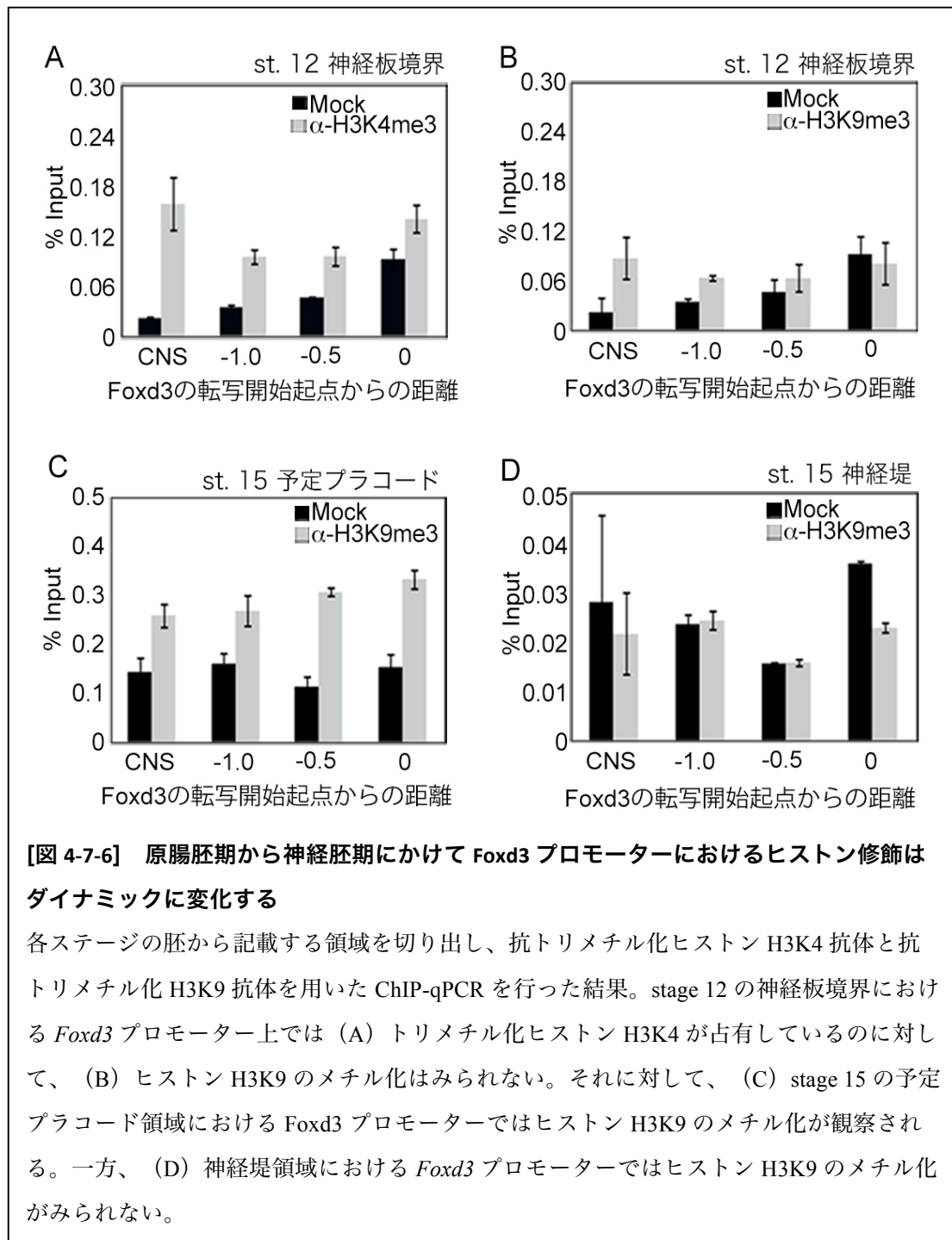
過剰発現や機能欠損実験の結果から、PRDM12は神経堤遺伝子プロモーター上のヒストン H3K9 のメチル化を促進することによって神経堤遺伝子の発現を調節していることが示唆されている。Kdm4a はヒストン H3K9 に対する脱メチル化酵素として機能することが報告されている事 (Strobl-Mazzulla et al., 2010) から、PRDM12 に依存する神経堤遺伝子の発現抑制を解除する過程の中で、Kdm4a は PRDM12 によって促進されたヒストン H3K9 を脱メチル化している可能性が高い。Kdm4a によって神経堤遺伝子プロモーター上のヒストン H3K9 が脱メチル化されるか、抗 H3K9me3 抗体を用いた ChIP-qPCR によって評価することにした。上述した結果と同様に、神経堤誘導細胞において PRDM12 を過剰発現させると *Foxd3*、*Slug*、*Sox8* のプロモーターを標的とした PCR では、強い増幅が確認できた (図 4-7-5A-C)。一方で、PRDM12 だけでなく *Kdm4a* を過剰発現したサンプルでは PRDM12 に依存する増幅がいずれの領域を標的にした PCR においても抑制される事が明らかとなった (図 4-7-5A-C)。これらの結果は、PRDM12 によって促進された神経堤遺伝子プロモーター上のヒストン H3K9 のトリメチル化が Kdm4a によって脱メチル化されたことを示唆している。この結果に対して、*Six1* プロモーターを標的とした PCR では、3つのサンプル間において大きな変化が観察されなかった (図 4-7-5D)。これらの結果は、Kdm4a が PRDM12 によって促進される神経堤プロモーター上のヒストン H3K9 のトリメチル化を脱メチル化し、神経堤遺伝子の発現調節を行っていることを示唆している。

本研究は PRDM12 が ZNF ドメインを介して *Foxd3* プロモーターに結合する事を示した。しかし、Kdm4a が神経堤遺伝子のプロモーターに結合するかについては、明らかになっていない。先行研究から、Kdm4a が特定のメチル化ヒストンに結合する PHD ドメイン (Plant homeodomain) と Tudor ドメインを持ち、トリメチル化 H3K4 (H3K4me3) や H4K20 (H3K20me3) に直接、結合する事が知られている (Hillringhaus et al., 2011)。仮に Kdm4a が神経堤遺伝子のプロモーター上に結合するのであれば、プロモーター上のヒストン H3K4 もしくはヒストン H4K20 がトリメチル化されている状態でなくてはならない。



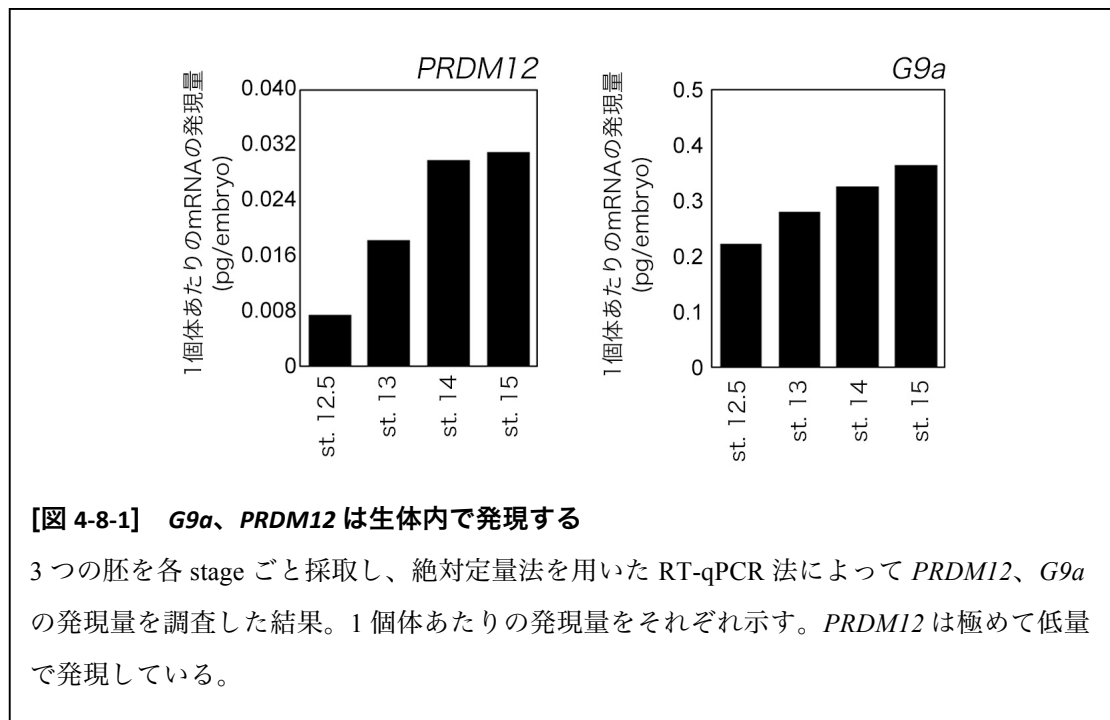
ツメガエル初期胚における神経板境界、予定プラコード、神経堤細胞の神経堤遺伝子プロモーター上のヒストン修飾状況は明らかとなっていない。そのため、各領域の細胞における神経堤遺伝子のプロモーター上のヒストン修飾状況を抗 H3K4me3 抗体と抗 H3K9me3 抗体を用いた ChIP-qPCR を行い、明らかにすることにした (図 4-7-6)。予定プラコードと神経堤が形成される前駆組織、神経板境界の細胞を切り出し、抗 H3K4me3

抗体を用いて ChIP-qPCR を行った結果、神経堤遺伝子 *Foxd3* プロモーターを標的とする PCR では抗 H3K4me3 抗体を用いて ChIP を行ったサンプルで MOCK よりも強い増幅が観察された (図 4-7-6A)。これに対して、抗 H3K9me3 抗体を用いて ChIP を行ったサンプルと MOCK では、各 PCR において大きな差はみられなかった (図 4-7-6B)。この結果は stage 12 (原腸胚期)、神経板境界細胞において *Foxd3* プロモーターのヒストン H3K4 がトリメチル化されている一方、ヒストン H3K9 はトリメチル化修飾されていない事を示している。この結果に対して、stage 15 (神経胚期) の予定プラコードを切り出し、抗 H3K9me3 抗体を用いて ChIP-qPCR を行った結果では、MOCK と比較して、*Foxd3* プロモーターの各領域を標的とした PCR で強い増幅が観察された (図 4-7-6C)。一方、stage 15 (神経胚期) の神経堤を切り出し、抗 H3K9me3 抗体を用いて ChIP-qPCR を行った結果では、MOCK と ChIP サンプルの PCR の増幅において大きな差は観察できなかった (図 4-7-6D)。これらの結果は、stage 15 (神経胚) の予定プラコード細胞において、*Foxd3* プロモーター上のヒストン H3K9 がトリメチル化されているのに対して、神経堤細胞ではヒストン H3K9 がトリメチル化されていない状態にあることを示している。以上の結果と先行研究の結果と照らし合わせると、神経板境界細胞では *Foxd3* プロモーター上のヒストン H3K4 がトリメチル化され、Kdm4a が結合可能な状態を保つことを示唆している。また、stage 15 (神経胚期) の予定プラコードにおける *Foxd3* プロモーターのヒストン H3K9 のトリメチル化と神経堤におけるヒストン H3K9 の脱メチル化は、PRDM12 と Kdm4a の発現に依存して修飾が起こっている可能性が示唆される。

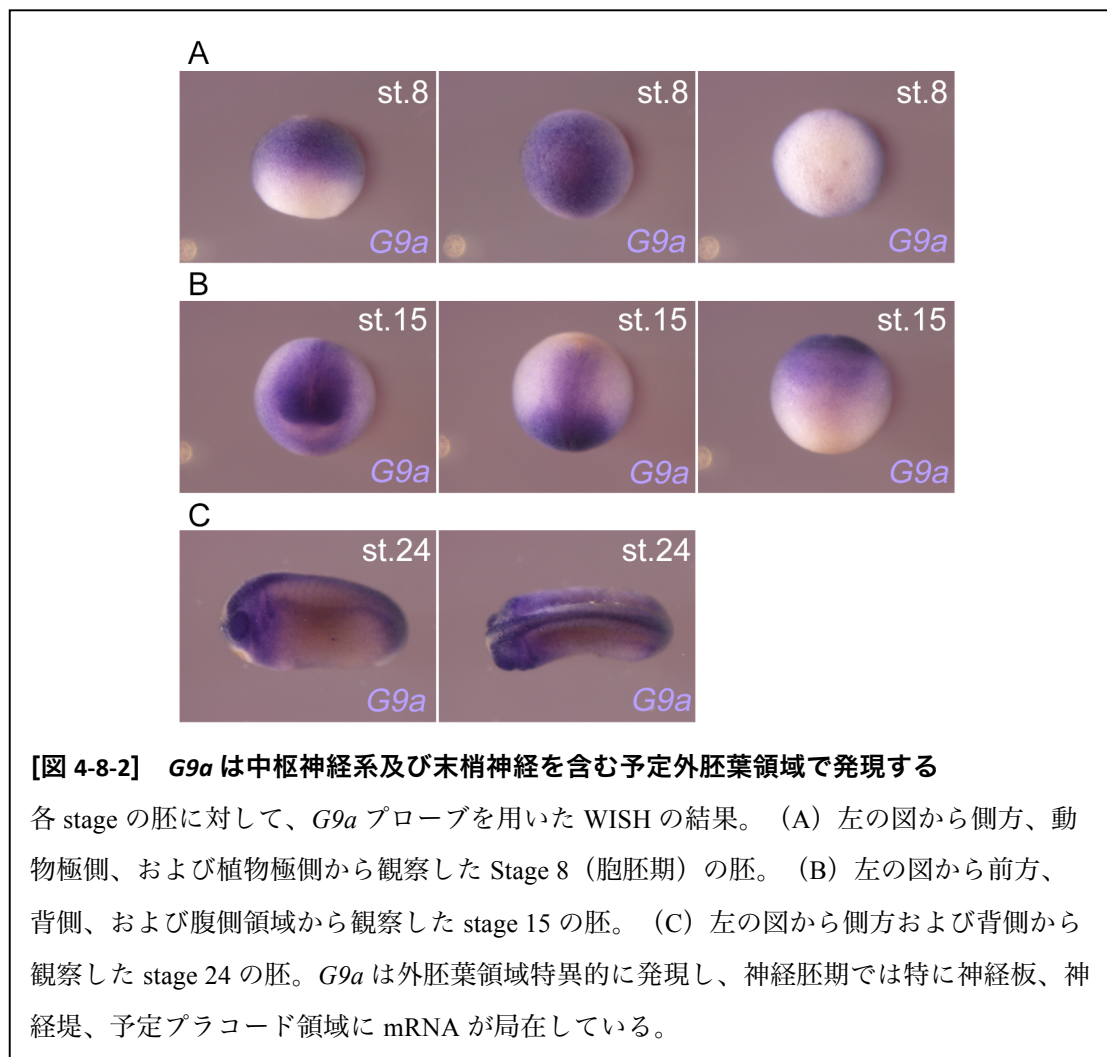


3-8. G9a は PRDM12 や Msx1 と協調的に機能する

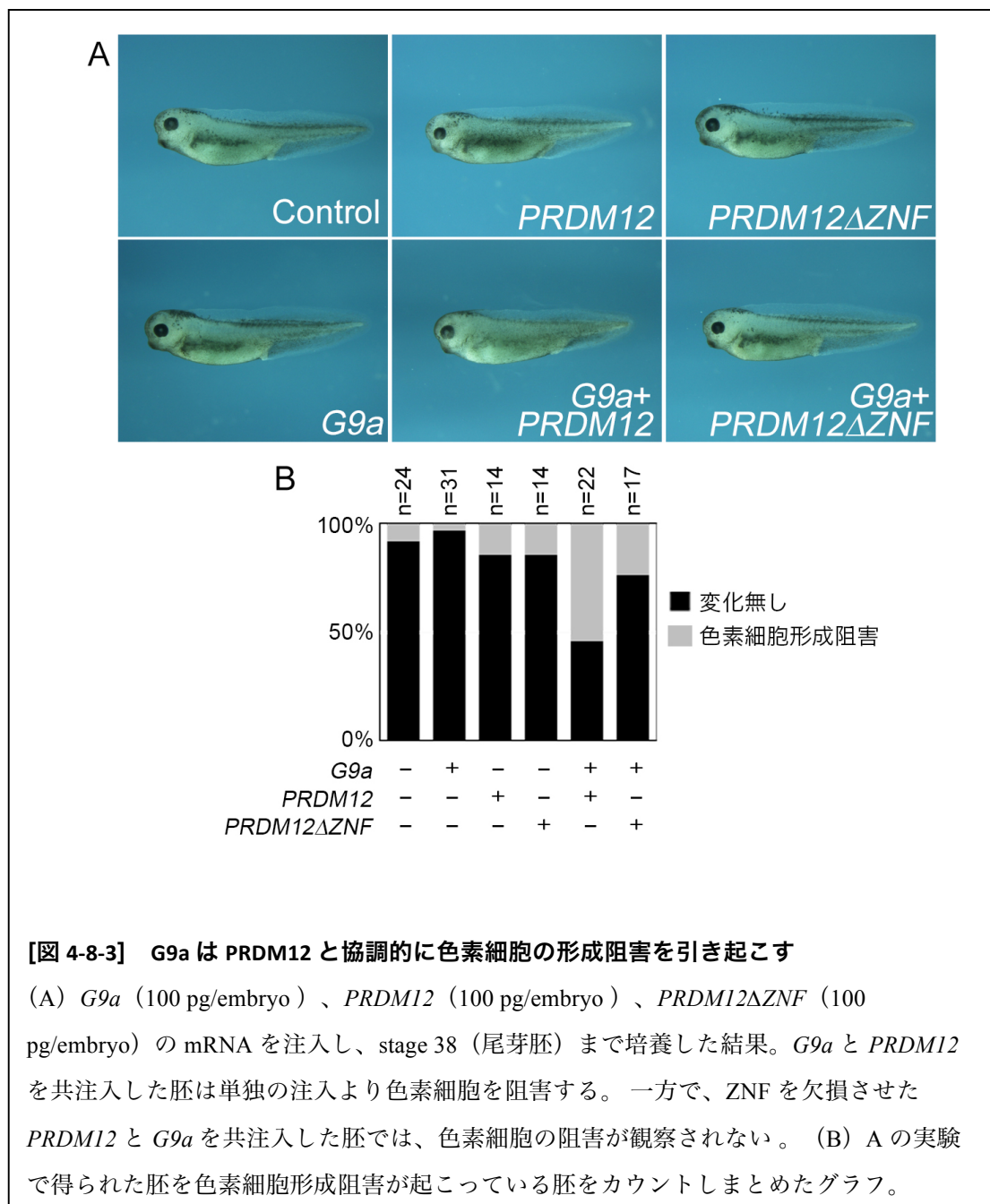
上述した実験結果から、神経堤遺伝子のプロモーター上のヒストン修飾が予定プログラムと神経堤の発生に大きく関わっている事が示唆された。特に PRDM12 の機能や初期胚における役割が明確化された。しかし、実際に PRDM12 は他のヒストン修飾因子と結合せずに単独で機能するタンパク質なのかどうか、疑問が残る。先行研究は、マウス胚性腫瘍細胞である P19 細胞においてヒストンメチル化酵素 G9a が PRDM12 の ZNF ドメインを介し、PRDM12 と相互作用する事を報告している (Yang and Shinkai, 2013)。初期胚において、P19 細胞と同様に G9a と PRDM12 が協調的に働く可能性は未知ではあるが、RT-qPCR の結果から、PRDM12 と G9a の mRNA は共に stage 12.5 (後期原腸胚) から stage 15 (神経胚) にかけて発現している (図 4-8-1)。この結果から、G9a と PRDM12 が協調的に機能するか検証することにした。



ツメガエルの初期胚において *G9a* がどの領域に局在して発現するか明らかになっていない。そのため、*G9a* の空間的パターンを WISH 法によって検出した。stage 8 (胞胚期) の胚では、*G9a* が母性因子として動物極側領域特異的に発現していた (図 4-8-2A)。stage 15 (神経胚期) では、神経板を中心に、神経堤領域や予定プラコード領域においても *G9a* の発現が観察され (図 4-8-2B)、stage 24 (尾芽胚) では中枢神経、目、そして神経堤に由来する鰓で *G9a* 発現が観察された (図 4-8-2C)。これらの結果から、ツメガエル胚においても *G9a* が発現し、中枢神経及び末梢神経系の細胞に対して影響を与える可能性が示唆される。また、予定プラコード領域においても発現していることから P19 細胞のように *G9a* と PRDM12 が結合している可能性は高い。そこで、*G9a* と PRDM12 が相互作用するか明らかにするため、*G9a* と PRDM12 の mRNA の共注入を行った。

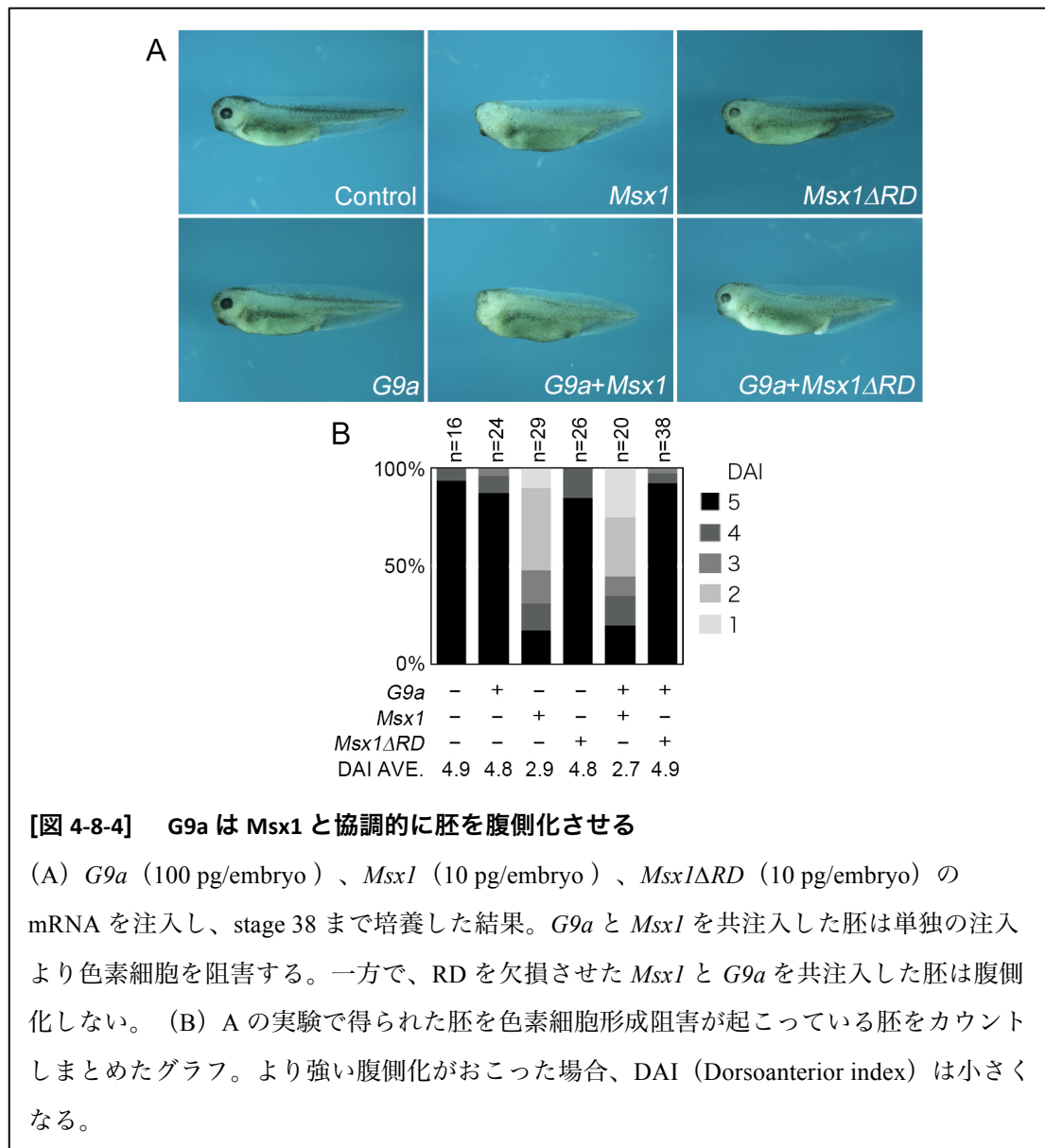


PRDM12 は上述した通り、1 ng の *PRDM12* mRNA を注入した場合、神経堤に由来する色素細胞を阻害するが、100 pg の *PRDM12* の mRNA の注入では色素細胞の形成阻害は起こりにくかった (図 4-3-1A, B; 4-8-3A, B)。同様に、*G9a* 単独の過剰発現胚においても、色素細胞の形成阻害は起こらなかった (図 4-8-3A, B)。これらの結果に対して、*PRDM12* と *G9a* を共注入すると多くの胚において、色素細胞の形成阻害が起こることが明らかとなった (図 4-8-3A, B)。



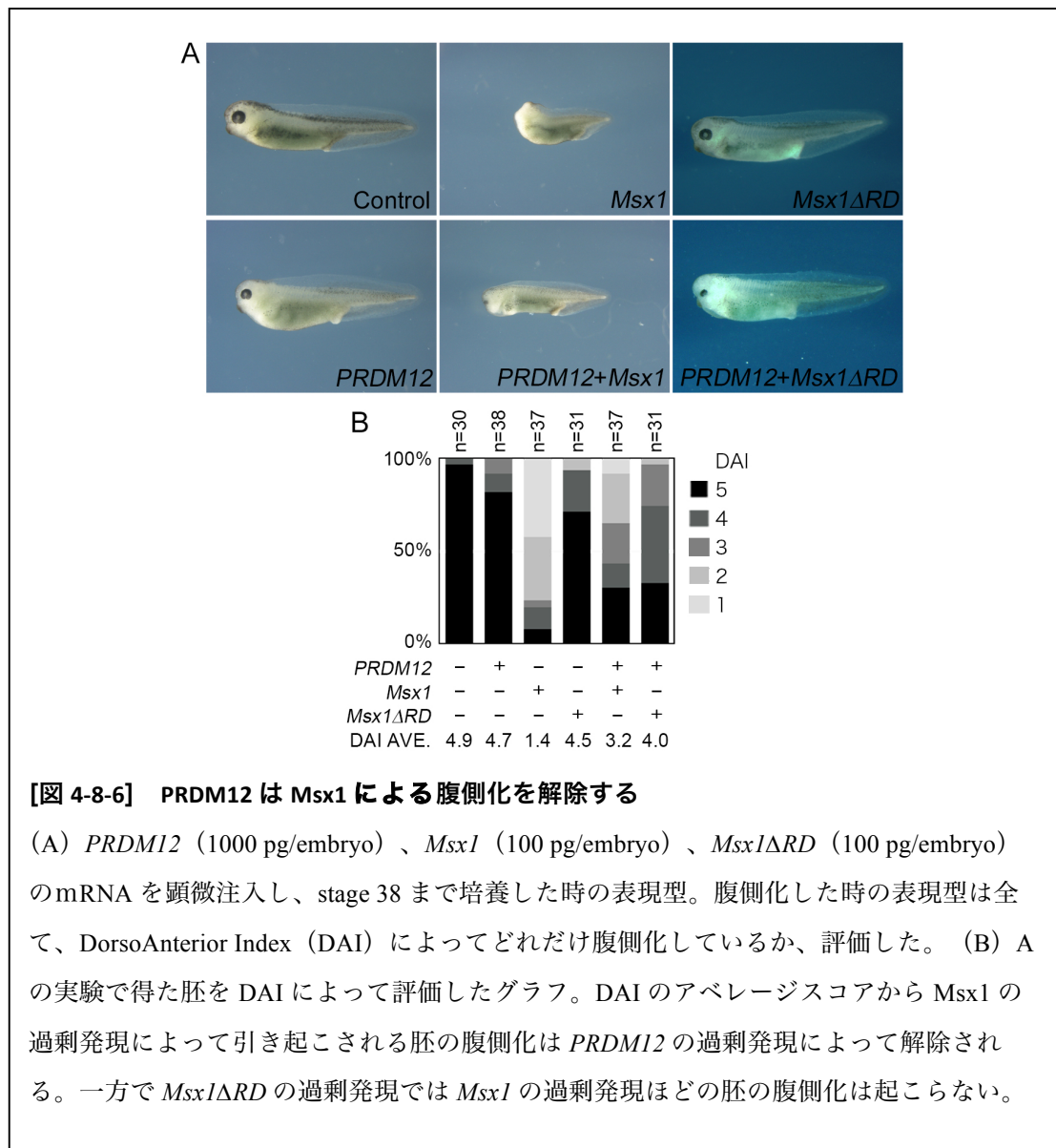
また、上述した先行研究は、G9a と PRDM12 は PRDM12 の ZNF ドメインを介して結合する事を報告している (Yang and Shinkai, 2013)。そこで、G9a と PRDM12 Δ ZNF の mRNA を共注入した場合においても、同様に色素細胞形成阻害が観察されるか評価した。PRDM12 Δ ZNF を単独で過剰発現させた場合、多くの胚で色素細胞の形成阻害が観察されなかった (図 4-8-3A, B)。同様に、G9a と PRDM12 Δ ZNF を共注入した場合においても色素細胞の形成阻害は観察されなかった (図 4-8-3A, B)。これらの結果は G9a と PRDM12 が色素細胞形成阻害を行う場合、PRDM12 の ZNF ドメインが必要である事を示唆する。

また、G9a はパートナーを選択することで複雑な機能を獲得する (reviewed in Shankar et al., 2013)。例えば、別の先行研究は、筋培養細胞において、G9a は Msx1 の Repression ドメイン (RD) を介して Msx1 と結合し、MyoD や Six1 などの遺伝子領域におけるヒストン H3K9 のメチル化を促進する事で、それらの遺伝子発現を抑制する事を報告している (Wang and Abate-Shen, 2012)。初期胚において、Msx1 の過剰発現は予定プラコード遺伝子の発現を抑制する (Monsoro-Burq et al., 2005)。そのため、Msx1 も PRDM12 と同様に G9a と協調的に Six1 などの予定プラコード遺伝子の転写制御に関わる可能性が高い。そこで、G9a と Msx1 が協調的に作用するか調べるため、これら 2 つの遺伝子の共注入を行った。Msx1 単独の過剰発現胚では、腹側化した胚が得られた (図 4-8-4A, B)。それに対して Msx1 と G9a、同時の過剰発現胚ではより強い腹側化した胚が得られ、Dorsoanterior index (DAI; 背腹側化した胚を観察する指標) は Msx1 単独で注入した胚より G9a と Msx1 を共注入した胚の方が高い (図 4-8-4A, B)。これらの結果は Msx1 と G9a が生体内で協調的に働く事を示唆している。また、G9a と Msx1 が協調的に機能するためには Msx1 の RD が必要とされている。そのため、RD を欠損させた Msx1 と G9a を共発現させた場合、胚の腹側化が観察されるか評価した。その結果、Msx1 Δ RD を過剰発現させた胚と Msx1 Δ RD と G9a を共注入した胚では、胚の腹側化が観察できなかった (図 4-8-4A, B)。これらの結果は Msx1 の過剰発現による胚の腹側化は Msx1 の RD に依存し、Msx1 と G9a は協調的に機能する事を示唆する。



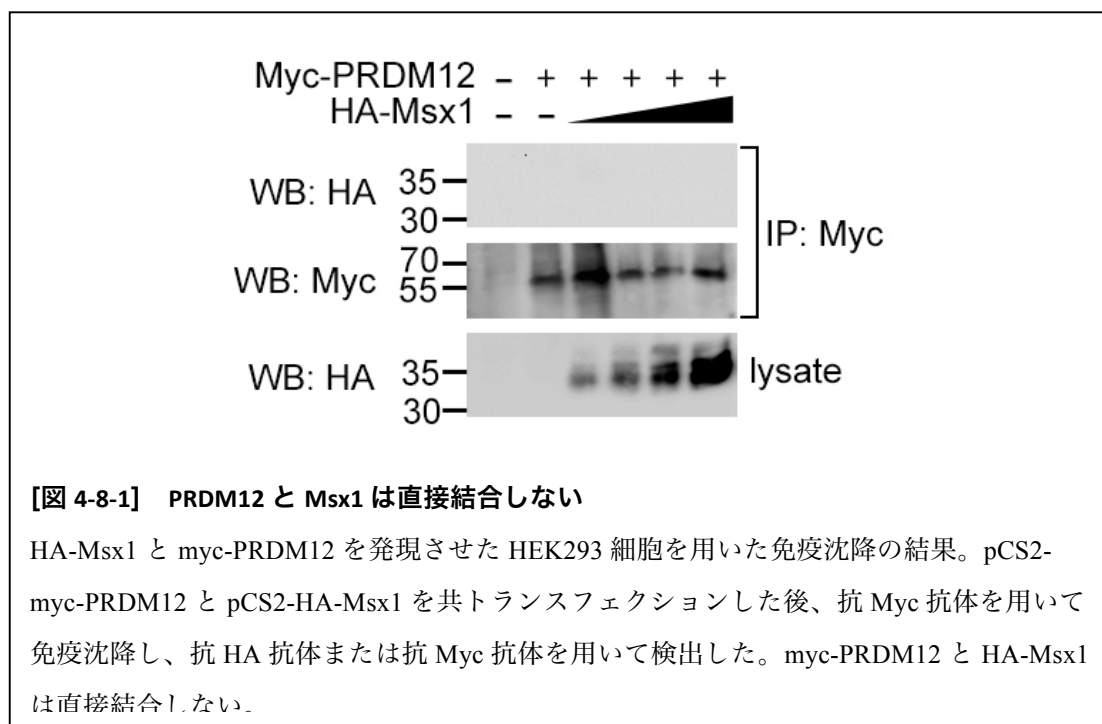
mRNA を共注入した結果から *G9a* は *PRDM12* または *Msx1* と結合し、協調的に機能する可能性が示唆された。先行研究では *G9a* のどのドメインが *PRDM12* あるいは *Msx1* と結合するかは明らかになっていないが、仮に *G9a* が共通のドメインを介して 2 つのタンパク質と結合すると仮定すれば、*Msx1* の過剰発現による胚の腹側化は *PRDM12* の過剰発現によって解除できるかもしれない。そこで、*PRDM12* と *Msx1* の共注入によって、*Msx1* の過剰発現で引き起こされる腹側化が抑制されるか評価する事にした。*PRDM12* の過剰発現胚では、色素細胞の形成阻害が生じるが強い腹側化した胚は観察されなかった (図 4-8-6A, B)。一方で、上述した結果と同様に *Msx1* の過剰発現胚では強い腹側化

が観察された (図 4-8-6A, B)。*Msx1* 単独と *Msx1* と *PRDM12* を同時に過剰発現した場合を比較すると、*PRDM12* の過剰発現によって *Msx1* 依存的な胚の腹側化が解除された (図 4-8-6A, B)。また、G9a と結合する RD を欠損させた *Msx1* と *PRDM12* の過剰発現胚では、RD を欠損した *Msx1* による腹側化がおこらないため、解除がかからなかった (図 4-8-6A, B)。これらの結果は、*PRDM12* と *Msx1* が共通した作用点を持つことと、それぞれの競合阻害因子として機能することを示している。



Msx1 による腹側化は *PRDM12* の過剰発現によって解除される事が明らかとなったが、*Msx1* と *PRDM12* が直接結合し、相互抑制した事で解除がおこったかもしれない。

Msx1 と *PRDM12* が直接結合し、相互抑制したか検証するため、HEK293T 細胞を用いた免疫沈降法によって *Msx1* と *PRDM12* が結合するか調査した。細胞抽出液 (lysate) では HA タグをつけた *Msx1* の濃度依存的な発現が確認された (図 4-8-1)。それに対して、免疫沈降した細胞液では myc タグを結合させた *PRDM12* の発現が観察できたが、HA タグをつけた *Msx1* は確認できなかった (図 4-8-1)。この結果は *PRDM12* と *Msx1* が直接的に結合しない事を示唆している。*Msx1* と *PRDM12* の共注入と免疫沈降の結果から、*Msx1* と *PRDM12* は互いに直接結合せず、間接的に相互作用する事が明らかとなった。



5. 考察

本研究結果は大別して、PRDM12 と Kdm4a が神経堤遺伝子のプロモーター領域のヒストン修飾を調節することで予定プラコードと神経堤のパターンに寄与する点と PRDM12 と Msx1 が間接的に相互作用する点についてそれぞれ示してきた。ここでは、PRDM12 と Kdm4a に関連する項目として、「PRDM12 の発現領域と上流因子」、「PRDM12 ノックダウン胚と Kdm4a 過剰発現胚の差異」、「神経堤遺伝子の発現抑制が予定三叉神経プラコード遺伝子の発現抑制を起こす理由」、「ヒストン H3K9 のメチル化が広範囲で起こる理由」をあげ、PRDM12 と Msx1 に関わる項目として、「G9a の選択性が予定プラコードと神経堤におけるパターン制御をする可能性」について記述していく。そして最後に、予定プラコードと神経堤の境界形成機構に関わる項目として、「予定プラコードと神経堤へ分化するためのコンピテンス」、「ヒストン修飾に依存しない予定プラコードと神経堤のパターン形成機構」と「PRDM12 が他因子に結合する可能性」について取り上げ、具体的に考察する。

5-1. PRDM12 の発現領域と上流因子

本研究成果は PRDM12 が予定プラコード領域に発現し、神経堤遺伝子の発現を抑制する働きを持つ事を示した。PRDM12 MO によるノックダウン胚の表現型からも、予定プラコードにおける PRDM12 の発現は正常なプラコード細胞の分化に必須と言えるだろう。しかしながら、BMP や Wnt シグナルを調節した胚における PRDM12 の発現パターンは予定プラコード遺伝子 *Six1* よりも神経板遺伝子 *Pax3* の発現パターンと酷似している。また、直接か間接かわからないものの *Pax3* の過剰発現が PRDM12 の発現を誘導できることから、PRDM12 は予定プラコード領域に発現しながらも、予定プラコード遺伝子によって誘導されない風変わりな遺伝子である可能性が高い。加えて、厳密に言えば *Pax3* と PRDM12 の発現領域は全て一致しているわけではなく、予定プラコード内における発

現領域は *Pax3* よりも *PRDM12* の方が広範囲にわたる。そのため、*PRDM12* の予定プラコード側方における発現は *Pax3* だけでなく、別の転写因子による調節を必要するかもしれない。*PRDM12* の発現を調節するタンパク質を特定する事は難しいが、*PRDM12* が神経堤細胞誘導条件で発現する性質を持っていることから、神経板境界遺伝子だけでなく、神経堤遺伝子によって調節を受けている可能性もあるだろう。そのため、神経堤様細胞の誘導条件下で各遺伝子に対する MO を使った遺伝子スクリーニングによって *PRDM12* の上流に当たる転写因子を特定する事が可能かもしれない。生体内で *PRDM12* が発現する条件は何か、今後とも研究する必要がある。

5-2. *PRDM12* のノックダウン胚と *Kdm4a* 過剰発現胚の差異

PRDM12 MO によるノックダウン胚と *Kdm4a* mRNA の過剰発現胚では、共に神経堤遺伝子の発現領域の前方方向への拡大が観察された。しかし、ノックダウン胚と過剰発現胚における神経堤遺伝子の発現領域は異なる傾向を示し、ノックダウン胚における神経堤遺伝子の発現領域の方がより前方領域まで拡大する傾向が観察された。つまり、*PRDM12* をノックダウンした胚の方がより広い領域で神経堤遺伝子を発現させる。何故 *PRDM12* のノックダウン胚における神経堤遺伝子の発現がより広く拡大するか、その原因として、*PRDM12* と *Kdm4a* の各神経堤遺伝子プロモーターへの結合様式が異なることが考えられる。先行研究から、*Kdm4a* は Tudor または PHD ドメインがメチル化したヒストンへの結合を介して、特定のプロモーター領域へ結合することが知られている (Hillringhaus et al., 2011)。つまり、*Kdm4a* はトリメチル化したヒストン H3K4 がなければプロモーターへ直接、結合することができない。そのため、トリメチル化したヒストン H3K4 の存在が *Kdm4a* によるヒストン H3K9 の脱メチル化に必須条件となる。一方、*PRDM12* は ZNF ドメインを介して直接ゲノム領域に結合し、ヒストン H3K9 のメチル化を促進する。つまり、*PRDM12* はプロモーター領域におけるヒストンの状態に依存しないで、ヒストン H3K9 のメチル化を促進することができるだろう。これらの事実から、

Kdm4a の過剰発現による表現型が PRDM12 MO によるノックダウン胚の表現型より弱いのは、また別のヒストン脱メチル化酵素によって神経堤遺伝子のプロモーター上のメチル化したヒストン H3K4 が脱メチル化されたことに起因する現象であると推測できる。現在、予定プラコード領域におけるヒストン H3K4 に対する脱メチル化の存在は確認されていないが、予定プラコード、神経堤における遺伝子発現調節機構では PRDM12 や *Kdm4a* だけでなく、別のヒストン修飾因子がさらに関連しているかもしれない。

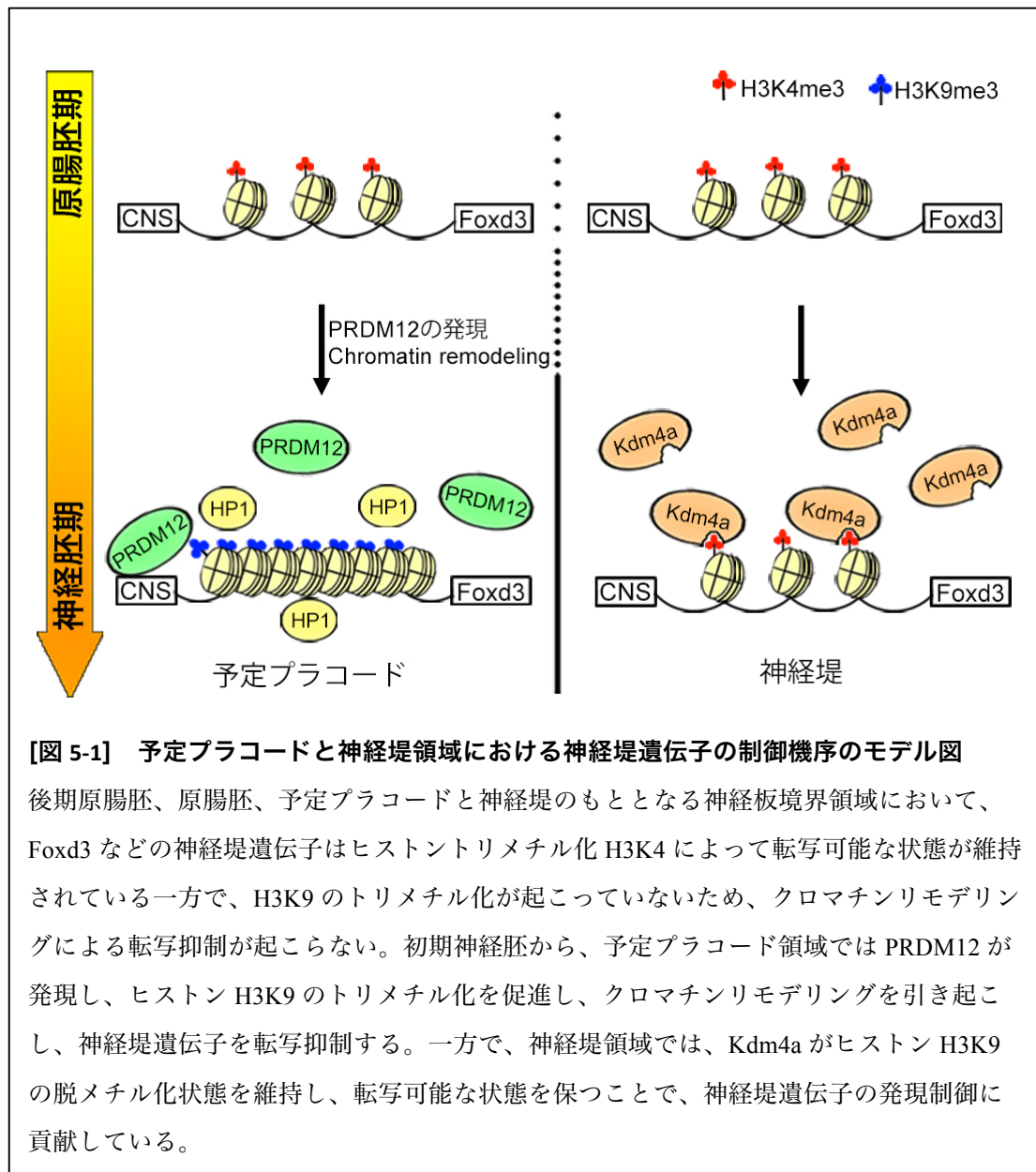
5-3. 神経堤遺伝子の発現制御によって予定三叉神経プラコード遺伝子の発現抑制が起こる理由

本研究は PRDM12 MO によるノックダウンまたは *Kdm4a* の過剰発現のいずれの場合も、予定三叉神経プラコード遺伝子の発現を阻害かつ神経堤遺伝子のプロモーター領域におけるヒストン H3K9 のメチル化を抑制することを示した。しかし、PRDM12 と *Kdm4a* がともに予定三叉神経プラコード遺伝子に対する転写調節を行っているかは示されていない。そのため、PRDM12 ノックダウン胚や *Kdm4a* の過剰発現胚において、予定三叉神経プラコード遺伝子が何故抑制されたのか議論すべきである。本研究から PRDM12 の過剰発現によって三叉神経プラコードの発現を誘導できないこと、先行研究から *Kdm4a* の MO によって予定プラコード遺伝子の発現が上昇しないことがそれぞれ示されている (Strobl-Mazzulla et al., 2010)。これらの結果からも、PRDM12 MO や *Kdm4a* mRNA は神経堤遺伝子の発現を促すことで、三叉神経プラコードの発現を間接的に抑制したと考えられる。別の先行研究は神経堤遺伝子 *Foxd3* の過剰発現が予定三叉神経プラコードを含む後方プラコード遺伝子の発現を抑制することを報告している (Brugmann et al., 2004)。また、PRDM12 MO によるノックダウン胚もしくは *Kdm4a* 過剰発現胚では、神経堤遺伝子の発現領域の前方方向への拡大がみられた。加えて、PRDM12 MO による PRDM12 の抑制は *Foxd3* や *Slug* の発現量をわずかながら上昇させた。これらの事から、PRDM12 のノックダウンもしくは *Kdm4a* の異所的な発現によって

誘導された *Foxd3* が予定三叉神経プラコード領域まで発現し、予定三叉神経プラコード遺伝子の発現を抑制したと考えられる。

5-4. ヒストン H3K9 のメチル化が広範囲で起こる理由

本研究によって、PRDM12 が *Foxd3* を始めとする神経堤遺伝子のプロモーター上のヒストン H3K9 のトリメチル化を促進することで、転写抑制を行うことが明らかとなった。しかし、PRDM12 は *Foxd3* プロモーター上の CNS のみに結合する。そのため、ヒストンメチル化修飾する範囲が限られている一方で、ヒストン H3K9 のトリメチル化が広範囲で起こる理由については明らかとなっていない。近年の研究結果は Heterochromatin protein 1 (HP1) がヒストン H3K9 のトリメチル化標識を読みとり、ヒストンメチル化酵素 Suv39h1 と協調的に広範囲でヒストン H3K9 のメチル化を促進して、周辺領域を強くサイレンシングすることが報告されている (Bannister et al., 2001; Jacobs et al., 2002; Lachner et al., 2001)。しかしながら、ツメガエル初期胚における HP1 や Suv39h1 の発現領域は明らかとなっていないが、仮にそれらのタンパク質が各領域に存在したとしたら、予定プラコード領域において PRDM12 が神経堤遺伝子のプロモーター上のヒストン H3K9 をメチル化し、それをきっかけに、HP1 や Suv39h1 が広範囲でヒストン H3K9 をメチル化し、ヘテロクロマチン状態に変化させているのかもしれない。その結果、遺伝子の転写抑制が起こり予定プラコードでは神経堤遺伝子の発現が観察されなかったのかもしれない (図 4-1)。一方で、神経堤領域では Kdm4a が発現し、ヒストン H3K4 のメチル化を目印に神経堤遺伝子のプロモーター上に局在し、ヒストン H3K9 の脱メチル化を促進する。Kdm4a の脱メチル化によって、神経堤遺伝子が転写可能な状態を維持していたのかもしれない。この仮説が正しいのか、議論するためには未だ明らかとなっていない初期発生における HP1 や Suv39h1 の発現や機能について明らかにする必要があるだろう。



5-5. G9a の選択性が予定プラコードと神経堤におけるパターン制御をする可能性

本研究では初期発生における知見が少ない G9a についても取り扱い、予定プラコードと神経堤の発生と G9a の関連性について検討してきた。ゼブラフィッシュの先行研究は、G9a をノックダウンした胚では末梢神経系および中枢神経系遺伝子の発現抑制が起こる事を示している (Rai et al., 2010)。これに対して、ツメガエル胚では G9a のノックダウンを行わなかったため、その初期発生における機能や役割については議論できなかった

ものの、G9a の発現が神経板、予定プラコードや神経堤を含む広い領域で確認された事から、初期神経発生において重要な役割を持つ事が期待される。また、G9a は様々な因子と結合し、遺伝子調節をする特徴を持ち (Reviewed in Shankar et al., 2013)、本研究では G9a と PRDM12、または G9a と Msx1 が協調的に働き、それぞれの生命現象をコントロールしている事を示唆する結果が得られた。この結果は G9a が各領域で最適なパートナーを選択する事で、その領域における分化を促進している可能性を示唆した。上述した研究結果から、PRDM12 は神経堤遺伝子のプロモーターにおけるヒストン H3K9 のメチル化を介して、神経堤遺伝子の発現を負に制御する。これに対して、先行研究から、Msx1 は *Six1* や *MyoD* の転写調節領域に結合し、G9a と協調的にヒストン H3K9 のメチル化を介して、それらの遺伝子の発現を負に制御する (Wang and Abate-Shen, 2012)。本研究結果と先行研究をふまえると、G9a が PRDM12 または Msx1、どちらに結合するか選択することによって神経堤遺伝子もしくは *Six1* をはじめとする予定プラコード遺伝子を抑制する事が考えられる。今後は、G9a がどのドメインを介して PRDM12 や Msx1 と結合するのか、各ドメインを欠損させたコンストラクトを使って検証し、PRDM12 と Msx1 による G9a の取り合いが実際に生体内でおこっているか検証する必要があるだろう。

また、Msx1 の過剰発現によって予定プラコード遺伝子の抑制だけでなく、胚が腹側化したのは Msx1 が転写抑制する標的遺伝子に *MyoD* が含まれている事に起因すると考えられる (Bendall et al., 1999)。胚の全体構造を形成するためには原腸陥入を必要とする。この原腸陥入が正しく行われるためには *MyoD* の発現を必要とし、Msx1 による *MyoD* の発現抑制は原腸陥入を阻害する事が知られている (Bendall et al., 1999)。そのため、Msx1 をより強く異所的に発現させた胚では原腸陥入を阻害した表現型が観察された (data not shown)。これらの結果から Msx1 の過剰発現による胚の腹側化は *MyoD* の発現抑制が主な原因と考えられる。

5-6. 予定プラコードと神経堤へ分化するためのコンピテンス

一般的に予定プラコードは非神経に由来する組織、神経堤は神経に由来する組織と考えられている (Reviewed in Schlosser, 2006; Steventon et al., 2014)。ヒト ES 細胞やマウス ES 細胞においてプラコード細胞を模倣する場合、中程度の BMP シグナルを受容するように BMP リガンドの濃度を調節し、非神経細胞を誘導した後、FGF リガンドを加え分化させ、プラコード様細胞を誘導する (Dincer et al., 2013; Koelher et al., 2013)。この時、FGF リガンドを加えずに培養した場合、発生運命が表皮へ向かうことからプラコードは非神経細胞に由来する組織と考えられている (Dincer et al., 2013; Koehler et al., 2013)。一方、神経堤は *Sox2* や *Sox3* など神経板形成に重要な役割を持つ遺伝子を抑制する *Dnmt3a* や神経堤遺伝子を活性化する *C-myc* のような遺伝子によって分化が促される (Hu et al., 2013; Bellmeyer et al., 2003)。また、*Dnmt3a* や *C-myc* の発現を抑制した場合、神経堤は形成されず、代わりに神経板として分化が進むことが報告されている (Hu et al., 2013; Bellmeyer et al., 2003)。現在、非神経と神経のどちらに分化の方向を位置づけるか、それぞれのコンピテンスを決定する転写因子の存在が報告され、非神経のコンピテンスは *Dlx3* と *Gata2* に、神経領域のコンピテンスは *Sox3* に依存して決定され则认为されている (Pieper et al., 2013)。しかし、コンピテンスを調節する因子は同定されたものの、これらのコンピテンスがどのようにして決定されているかについては未だ明らかになっていない。そのため、非神経あるいは神経領域におけるヒストン修飾を伴う転写制御がこのコンピテンスを決定している可能性もあるだろう。*Dlx3* や *Gata2*、*Sox3* とエピジェネティックな制御因子が協調的に働き、非神経細胞と神経細胞における核内の修飾状況を変化させることで、リガンドや隣り合う細胞同士の相互作用をシャットダウンしているかもしれない。上記の転写因子と相互作用し、初期発生に関わるヒストン修飾を制御する因子などが同定されれば、非神経や神経におけるコンピテンスを決定する要因も明らかになるかもしれない。

5-7. PRDM12 が他因子に結合する可能性

今後の研究として、G9a に限らず他のヒストン修飾因子や転写因子と PRDM12 が相互作用する事が分かれば興味深い。例えば、PRDM ファミリーの一員としてあげられる PRDM2 は様々な遺伝子に対してヒストン H3K9 のメチル化を介して転写抑制的に振る舞う一方で、アセチル化酵素として機能する p300 と結合し、転写活性化因子として機能することが知られている (Carling et al., 2004; Kim et al., 2003)。PRDM2 と同ファミリーに属している PRDM12 も他のヒストン修飾酵素と協調的に働くことで予定プラコード遺伝子の発現を制御している可能性が考えられる。先行研究から上述した p300 はツメガエル初期胚において母性因子として存在し、前方神経を中心とした広い領域で発現することが報告されている (Fujii et al., 1998)。つまり、p300 は予定プラコード領域においても発現する (Fujii et al., 1998)。仮に、p300 と PRDM12 が協調的に遺伝子の転写制御を調節するとすれば、初期胚における予定プラコードのパターン形成に重要な役割を持つ可能性はあるだろう。

5-8. 最後に

PRDM12 は P19 細胞において細胞周期を制御することで細胞増殖を抑制する働きを持つことや白血病において腫瘍抑制因子として機能する可能性が示唆されている (Yang and Shinkai, 2013; Reid and Nacheva, 2004)。一方で、Kdm4a が細胞増殖に関連する様々な遺伝子を調節することや、胸部腫瘍形成に関わる事が報告されている (Berry et al., 2012; Kim et al., 2012)。PRDM12 と Kdm4a の相補的な関係性が他の生物学的事象に貢献している可能性もあるかもしれない。今後は初期発生に限らず、PRDM12 と Kdm4a の関係性について研究が進む事を期待する。

また、ツメガエルに限らず多くの場合、初期胚は常に閉鎖空間内で発生し、BMP などのリガンドは分解するプロテアーゼが存在しない限り空間内に蓄積していく。空間内に

リガンドが蓄積するため、対応する分子シグナルが伝達されやすくなる一方で、発生ステージが進むにつれて細胞が分化しにくくなる現象が確認されている。例えば、中胚葉誘導物質である Activin を胞胚から切り出したアニマルキャップに作用させると濃度依存的に中胚葉が誘導されるが、後期原腸胚から切り出したアニマルキャップに作用させた場合には、中胚葉は誘導されない事が報告されている (Sasai et al., 2008)。このような、分子シグナルに対する応答性を決定する 1 つの要因として、ヒストンやゲノム DNA に対する修飾による核内の状態変化があげられる。本研究で取り上げた PRDM12 や Kdm4a はヒストン修飾を介して遺伝子の転写調節を行い、転写因子だけでなく分子シグナルに対する応答性を変化させ、より確実な細胞の運命決定を実現させている可能性が高い。また、PRDM12、Kdm4a、あるいは G9a に限らず、様々なエピジェネティックな修飾因子の機能が明らかになる中、多くの修飾因子の初期発生における役割は未解明な点が多い。初期発生においてヒストン修飾因子や DNA 修飾因子がどのように働くのか明らかにする研究が進み、初期胚における細胞分化に対する知見がよりいっそう多くなることを期待し、考察を終わりたいと思う。

6. 実験方法

6-1. DNA コンストラクション

本研究において、使用したプラスミドは主に cDNA をテンプレートとして用いた PCR から得た DNA フラグメントを各種ベクターに挿入して作成した。作成時に必要としたプライマーの配列情報など各プラスミドの詳細情報は表 6-1, 6-2, 6-3 に記す。ここでは cDNA から得たプラスミド、譲渡して頂いたプラスミド、または保管されていたプラスミド以外のプラスミドの作成法を以下に記す。pCS2-myc-PRDM12F117A とドメイン欠損型 PRDM12 コンストラクト (pCS2-myc-PRDM12 Δ 111-119、pCS2-myc-PRDM12 Δ PR、および pCS2-myc-PRDM12 Δ ZNF) は long-PCR によって変異や欠損を加えた後、セルフライゲーションによって作成した。pBluescript-SK-Six1 は Six1 ORF の全長を含む pBluescript-SK-Six1 (full) から EcoRI によって Six1 の C 末端をコードする領域を切断した後、セルフライゲーションによって作成した。pFoxd3-2000 はゲノム DNA をテンプレートとした PCR によって増幅した CNS を含む Foxd3 プロモーター領域フラグメントを SmaI で切断した pGL3 (Promega) に挿入した。pFoxd3-1647、pFoxd3-1612、pFoxd3-1577、そして pFoxd3-1000 は pFoxd3-2000 をテンプレートとした PCR から増幅した各フラグメントを SmaI で切断した pGL3 に挿入して作成し、pFoxd3-1504 と pFoxd3-1195 は EcoRV と PstI で切断した後、T4 DNA polymerase (TAKARA) によって平滑末端を形成した後、Might mix (TAKARA) によるライゲーションによって作成した。

表 6-1 mRNA 合成時に使用したプラスミド

プラスミド名	骨組みとなったプラスミド	プライマー配列	切断に使った制限酵素
pCS2p-Noggin	pCS2p	ATGGATCATTCCCAGTGCCTTG	Asp718
		TCAGCATGAGCATTGCACTC	
pCS2-BMP4	道上研究室にストックされていたプラスミド		Asp718
pCS2-Chordin	道上研究室にストックされていたプラスミド		Asp718
pCS2-Dkk1	道上研究室にストックされていたプラスミド		NotI
pCS2-Pax3	pCS2	GGAACTGAGAATGACCAGCTT	NotI
		AACCACTCCTTTATGCAATATCTGG	
pCS2-Zic1	pCS2	ACCATGCTGCTGGACGCCGAG	Asp718
		GTGTTTAAACGTACCATTTCG	
pCS2-Wnt8	道上研究室にストックされていたプラスミド		Asp718
pCS2-PRDM12	pCS2	TTAATGATGGGCTCGGTGCTGC	Asp718
		ATCGAATTTACAGCACCATGGTTG	
pCS2-myc-PRDM12	pCS2-myc	TTAATGATGGGCTCGGTGCTGC	Asp718
		ATCGAATTTACAGCACCATGGTTG	
pCS2-myc-PRDM12F117A	pCS2-myc-PRDM12	GCCACTGGCAGAGTCATTTCCCAG	Asp718
		AGGACCCATCTCTGTGCCAG	
pCS2-myc-PRDM12Δ111-119	pCS2-myc-PRDM12	AGAGTCATTTCCCAGAGCATGTGG	Asp718
		ATGCGCCTCTGGAAAGG	
pCS2-myc-PRDM12ΔPR	pCS2-myc-PRDM12	AATCCCTGAGTAGCTTC	Asp718
		TTCAGAGGGCAGCACCAAG	
pCS2-myc-PRDM12ΔZNF	pCS2-myc-PRDM12	CAGAAAAGCGCCAGGCACC	Asp718
		GCGGCCTGCTAGCGACGGCCCTGTGGAGTCC	

プラスミド名	骨組みとなった プラスミド	プライマー配列	切断に使った 制限酵素
pCS2-myc-PRDM12D31Y	Senderek研究室から譲渡		Asp718
pCS2-myc-PRDM12W160C	Senderek研究室から譲渡		Asp718
pCS2-myc-PRDM12R168C	Senderek研究室から譲渡		Asp718
pCS2-myc-PRDM12E172D	Senderek研究室から譲渡		Asp718
pCS2-VP16-PRDM12	pCS2-VP16	GTGACAATTCCTGAGTAG	NotI
		ATCGAATTTACAGCACCATGGTTG	
pCS2-EnR-PRDM12	pCS2-EnR	AATTCCTGAGTAGCTTC	NotI
		ATCGAATTTACAGCACCATGGTTG	
pCS2-myc-misPRDM12	pCS2-myc-PRDM12	GAAGTGTATTACCGGCTGAAGCGTTGGTGC CCATCATGAGCTCCAAGTCCTTTCAGAAATGA GCTT	Asp718
pCS2p-Kdm4a	pCS2p	CTTCAAGATGGCTGGAGAGAATG	NotI
		CTTCTATTTTACTCCATGATGGCATGG	
pCS2p-G9a	pCS2p	GCGACCGAGGAGACATGGAG	Asp718
		TCACACAGTTTGTGGTGTGATGC	
pCS2-Msx1	pCS2	GCTTTGCTTATGGCTTCTTACCAG	Asp718
		TTAGGACAGATGGTACATGCTG	

表 6-2 プローブ合成時に使用したプラスミド

プラスミド名	骨組みとなったプラスミド	プライマー配列	切断に使った制限酵素	転写酵素
pBluescript-SK-PRDM12	pBluescript-SK	TTAATGATGGGCTCGGTGCTGC ATCGAATTTACAGCACCATGGTTG	XbaI	T7
pBluescript-SK-Six1	pBluescript-SK-Six1 (full)から作成		HindIII	T3
pBluescript-SK-Pax3	pBluescript-SK	GGAAGTGAATGACCAGCTT AACCACTCCTTTATGCAATATCTGG	HindIII	T3
pCS2p-Islet1	pCS2	ATGGGAGATATGGGAGAC TCATGCCTCTATAGGGCTG	EcoRI	T7
pGEM-Pax6	道上研究室にストックされていたプラスミド		Sall	T7
pGEM-Six3	道上研究室にストックされていたプラスミド		HindIII	T3
pCS2p-Foxd3	pCS2p	CGTAACTGGAATGACCCTGTC GCCCCAGAGATTATTGCGC	EcoRI	T7
pBluescript-SK-TrkB	pBluescript-SK	ATGCGCCTCTGAAAGG GATCTCTTAGCCAAGGATATCAAG	EcoRI	T7
pBluescript-SK-Slug	道上研究室にストックされていたプラスミド		SpeI	T7
pCS2p-Sox9	pCS2p	CGCATGAATCTCTGGATC GATGCACACGGGAACTTC	XbaI	SP6
pGEM-Sox2	道上研究室にストックされていたプラスミド		XbaI	SP6
pBluescript-SK-EBF3	道上研究室にストックされていたプラスミド		BamHI	T7
pBluescript-SK-Ath3	道上研究室にストックされていたプラスミド		HindIII	T3

プラスミド名	骨組みとなったプラスミド	プライマー配列	切断に使った制限酵素	転写酵素
pBluescript-SK-Pax8	道上研究室にストックされていたプラスミド		HindIII	T3
pCS2p-Kdm4a	表1と同様		BamHI	T7
pCS2p-G9a	表1と同様		EcoRI	T7

表 6-3 顕微注入に使用したプラスミド

プラスミド名	骨組みとなったプラスミド	プライマー配列	備考
pCS2-Wnt3a	道上研究室にストックされていたプラスミド		発現ベクター
pGL3-control	Promega		レポーターベクター
pGL-TK	Promega		レポーターベクター
pFoxd3-2000-luc	pGL3	AGCTGGGCACTTGTGATTGTGCGATTAATAG	レポーターベクター
		TCCAGTTACGCTCCACAGCGATG	
pFoxd3-1647-luc	pGL3	AACAACAGATTAGCACAATACATCTC	レポーターベクター
		TCCAGTTACGCTCCACAGCGATG	
pFoxd3-1612-luc	pGL3	GGAAACGTTTCTTTTCATGCTAAG	レポーターベクター
		TCCAGTTACGCTCCACAGCGATG	
pFoxd3-1577-luc	pGL3	ATGGTATGAGTCAATTGCTTTCAC	レポーターベクター
		TCCAGTTACGCTCCACAGCGATG	
pFoxd3-1504-luc	pFoxd3-2000から作成		レポーターベクター
pFoxd3-1195-luc	pFoxd3-2000から作成		レポーターベクター
pFoxd3-1000-luc	pGL3	CAACAGCCTGTA AACAGGGAAAAATAACTG	レポーターベクター
		TCCAGTTACGCTCCACAGCGATG	

6-2. 胚の取扱い

本論文で記述するツメガエルの発生ステージは一般的に用いられているツメガエル発生ステージに従った (Nieuwkoop and Faber, 1956)。アフリカツメガエルの胚は全て人工授精によって採取し、顕微注入のためゼリー層を pH 7.8 に調整した 4.6% のシステイン酸水溶液を用いて除去した。顕微注入する mRNA は NotI または Asp718 を用いて直鎖状にした各プラスミドをテンプレートとして、mMESSAGE mMSHINE SP6 transcription kit (Invitrogen) で in vitro 転写して合成した。mRNA 合成時、使用したプラスミドおよび顕微注入したプラスミドは表 6-1 と表 6-3 に記述する。アンチセンスモルフォリノオリゴは Gene Tool 社から得た。control MO の配列は 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'、PRDM12 MO の配列は 5'-GCAGCACCGAGCCCATCATTAATTC-3'を用いた。各 MO は nuclease-free water (Gibco) を用いて適切な濃度に希釈した後、60 度、15 分間の熱処理を加えた後、使用した。本論文に記載する実験において特記事項がなければ、mRNA または DNA は 2 細胞期の動物極側領域 2 割球に、MO は 4 細胞期の動物極側側 2 割球に顕微注入している。

6-3. Whole-mount in situ hybridization、Double in situ hybridization、lacZ 染色

各 mRNA に対するプローブは各種プラスミドをそれぞれの制限酵素によって直鎖状にしたテンプレートを用いて、DIG labeling mix (Roche) または Fluorescence labeling mix (Roche) と T7 または T3 RNA polymerase (Roche) を使って合成した。各プラスミドと処理に用いた制限酵素は表 3 に記載する。WISH 法と DISH 法は Harland (1991) に記載されているプロトコールを基本として行った。WISH 法および DISH 法で用いた発色基質はそれぞれ NBT/BCIP (Roche)、NBT (Roche) と BCIP (Roche) を用いた。WISH 法を行う前に、LacZ mRNA を顕微注入した胚は MEMFA で 30 分、室温で固定した後、Red-gal (SAFC Biosciences) によって染色を行った。

6-4. ゲノム抽出

ツメガエルのゲノム DNA は SDS による変成後、フェノール・クロロホルムとイソプロパノールを用いて精製した。タンパク質の除去は 3 つの Stage 38 の胚を Homogenization buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 7.4) に溶かした後、Proteinase K (Wako) を加え、55 度、一晩静置して行った。その後、溶解液中の核酸はフェノール、フェノール・クロロホルムを使って段階的に不要なタンパク質を除去した後、イソプロパノールを使った塩析によって沈殿させた。精製した核酸に含む RNA は RNase A (Invitrogen) を用いて分解し、ゲノム DNA は再度フェノール・クロロホルムによって不純物を除去した後、イソプロパノールを用いた塩析によって沈殿させ得た。

6-5. Total RNA の単離、RT-PCR 法、および RT-qPCR 法

Total RNA は 3 つの胚、もしくは 10 個のアニマルキャップを Isogen II (NIPPON Genetics) を用いて単離した。抽出した Total RNA からランダムプライマーと SuperScript III を用いて cDNA を合成した。qPCR は KAPA SYBR Fast qPCR Kit と StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて $\Delta\Delta C_t$ 法および絶対定量法で行った。 $\Delta\Delta C_t$ 法において、各増幅配列の標準化は ODC を使用した。絶対定量法による測定は pCS2-myc-PRDM12、pCS2p-G9a を用いてスタンダードカーブを引き、各 Ct から絶対量を算出して行った。RT-PCR 法と RT-qPCR 法で使用した温度条件とプライマーの配列は表 6-4 に記す。

表 6-4 RT-PCR と RT-qPCR に用いたプライマーの配列

	標的遺伝子名	プライマー配列	反応温度
RT-PCR	Chordin	GTTGTACATTTGGTGGGAA	60
		ACTCAGATAAGAGCGATCA	
	Sox8	CTCAATGCTGAACATGAGTTC	60
		CACTGCATCTCGAATAACAAG	
	Sox9	CGCATGAATCTCTTGGATC	60
		GATGCACACGGGGAECTTC	
	Sox10	ACCATGAGTGATGACCAAAGC	60
		ACACCTGTGAGACTGCTTC	
	MyoD	AGGTCCAACCTGCTCCGACGGCATGAA	60
		AGGAGAGAATCCAGTTGATGGAAACA	
	Twist	ACAGCAATGCCACTACAG	60
		AGATGAGAGGTTTGATCAGG	
	EF1 α	CAGATTGGTGCTGGATATGC	55
		ACTGCCTTGATGACTCCTAG	
	Pax3	TTGAGCCTTCCACAGCTGTATC	55
		CTTTATGCAATATCTGGCTTCAG	
	Snail	AAGCACAATGGACTCCTT	55
		CCAATAGTGATACACACC	
	Ms-actin	GCTGACAGAATGCAGAAG	55
		TTGCTTGAGGAGTGTGT	
Kdm4a	GTTCGCTGGACAGATGGTTTG	55	
	CTTCTATTTTACTCCATGATGGCATGG		
Twist	ATGATGCAGGAAGAGTCCAG	60	
	CAAAGGACTGGGGGCTAC		
Six1	CCCGTGTATGTGTTTGCCTG	60	
	CTTGCTCCTGAGTGAAGCCA		

	標的遺伝子名	プライマー配列	反応温度
RT-PCR and -qPCR	PRDM12	TCCATTCCTGGTGAGGGAC	55
		CCTTGCACACTTGATGTACGTCATC	
	Ath3	TGGACCTCAGGCCATGTTC	60
		GATGCTGAGTGGAGGTGTTA	
	Foxd3	CGTAACTGGAATGACCCTGTC	60
		CCTTACCCTCTGCCTCAG	
	Slug	TCCCGCACTGAAAATGCCACGATC	60
		CCGTCCTAAAGATGAAGGGTATCCTG	
	Sox2	CTGCGTCCAACAACCAGAATAAG	60
		CCTCGTCGATGAAGGGTCTTTTC	
Msx1	AGAAAGCCCAGAACCCCTTTAC	60	
	TTAGGACAGATGGTACATGCTG		
G9a	CACCAAGATCTGCGCTTTCCTC	60	
	TCACACAGTTTGTGGTGTGATGC		
ODC	GCCATTGTGAAGACTCTCTCCATTC	60	
	TTCGGGTGATTCCTTGCCAC		
ChIP-qPCR	Foxd3-CNS	AACAACAGATTAGCACAATACATCTC	60
		ACACAATTGGAGTGAAAGCAATTG	
	Foxd3 -1kbp	TTGCAGTGAGGATAAAACAG	60
		GACACCACAGTCTATTCTTC	
	Foxd3 -0.5kbp	TGTAGCGGCGATGTAAAGAG	60
		GAGGAAATGGGAGCTGTC	
	Foxd3 0kbp	CGGGCCAGTATATCTCTAAGTG	60
		TTGCTGCGAGTGCCTTC	
	Foxd3 +0.5kbp	CGTAACTGGAATGACCCTGTC	60
		CCTTACCCTCTGCCTCAG	
slug -1.5 kbp	CACTGTGCTGTAAAGGTGCTG	60	
	ACCTGCATTGGGATACAAGC		

	標的遺伝子名	プライマー配列	反応温度
ChIP-qPCR	Slug -0.5 kbp	TCTCTGGGAAGGGAAATCTG	60
		ACAAACACGACTTGGGTGAC	
	Slug +0.5 kbp	TCCCGCACTGAAAATGCCACGATC	60
		CCGTCCTAAAGATGAAGGGTATCCTG	
	Sox8 -1.5 kbp	CACTGTGCTGTAAAGGTGCTG	60
		ACCTGCATTGGGATACAAGC	
	Sox8 -1.0 kbp	TGCATCTTGCCTAACTGCTG	60
		GTCGGATGCCTTTTAGCAAG	
	Sox8 -0.5 kbp	CTTTATCCCCGAGCATTCTG	60
		GCGGGAATATGTAGTGTTC	
	Sox9 -0.5 kbp	CGTCATTCAACAAGGAGTTTC	55
		ATTCACGCATTTATGTCGTG	
	Sox10 -0.5 kbp	GCAGCGGAAGGATTTTAGAG	60
		AGGCGAAGCTTTTCTCAAAC	
	Twist -0.5 kbp	TCTGCGCATTTTCTGTGC	60
		TCCCTTGGTACACATCATGG	
	Six1 -0.5 kbp	AGAGAAAGGCTTGTGTGTGG	55
		GCCATTGTCCATTTAGGTG	

6-6. ウェスタンブロッティング法

タンパク質を含む細胞溶液はアニマルキャップまたは全胚をプロテアーゼインヒビター (Roche) を含む RIPA buffer (1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7.4) を用いて溶かし作成した。その後、NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific) と BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology) を用いて細胞溶液を等濃度に調整後、細胞溶液は 2x SDS-PAGE loading buffer (125 mM Tris-HCl, 20% glycerol, 4% SDS, 100 mM DTT, pH 7.4) を加えロードするサンプルとして使用した。ロードしたサンプルは 10%または 15%の SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動し、分離した。ウェスタンブロッティングはウェット式で転写を行った後、抗 histone H3 抗体 (Millipore, 06-755) 、抗 histone H3K4me3 抗体 (Abcam, ab8580) 、抗 histone H3K9me3

抗体 (Millipore, 07-449)、抗 histone H3K27me3 抗体 (Abcam; ab6002)、抗 myc 抗体 (Sigma-Aldrich, M4439-100UL および SantaCruz, sc-789)、抗 HA 抗体 (SantaCruz; sc-805)、そして抗 α -tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich; T9026-100UL) を用いて検出した。

6-7. ルシフェラーゼレポーター解析

ルシフェラーゼレポーター解析は Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて行った。本解析に用いたレポーターコンストラクトは内在性の状態を模倣するため、全て Asp718 で切断した pGL3-control または各 pFoxd3-luc ベクターを用いた。また、全てのベクターの発現量を標準化は *Renilla luciferase plasmid* (pGL-TK) を共注入し行った。各レポーターベクターおよび mRNA を顕微注入した胚は stage 18 まで培養した後、Passive Lysis Buffer (Promega) を用いて溶かし、luciferase および *Renilla luciferase* の光量は Luminescencer-JNR (ATTO) を用いて測定した。顕微注入に使用したプラスミドは表 6-3 に記載する。

6-8. ChIP-qPCR 法

ChIP アッセイに用いるサンプルは 100 個体の非注入胚もしくは各 mRNA や MO を顕微注入した 100 個体の胚からアニマルキャップまたは各領域の外植片から得たものを使用した。ChIP アッセイのサンプルは各外植片を 1%ホルムアミド (37%の原液ホルムアミドを 37 倍希釈した) を含む 0.7x PBS (1x PBS (137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4) を 0.7 倍に希釈したもの) で 30 分間、固定した後、DNA サイズを 400 から 600 bp 程度になるように超音波破碎して準備した。ChIP アッセイはサンプルとモック抗体 (DakoCytomation, X0936) または標的抗体 (anti-myc, anti-H3K4me3, anti-H3K9me3) と Protein A Sepharose Fast Flow (GE healthcare) を反応させを行った。ChIP アッセイによって得た DNA サンプルは Protein K で不要なタンパク質を除去

した後、80度で一晩、リバースクロスリンクを行った。リバースクロスリンクしたサンプルは QIAquick purification cleanup kit (Qiagen) を用いて精製した。qPCR は前述した方法で行い、ゲノムの発現量は ODC フラグメントを用いて平均化した。ChIP-qPCR で用いたプライマーの配列は表 6-4 に記す。

6-9. ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは DIG ラベルによる非ラジオイムノアッセイ法を用いて行った。結合予測されている DNA 配列を含む二本鎖 DNA は DIG labeling PCR mix を用いて標識した。2細胞期に各 mRNA を注入した胚から得たアニマルキャップはプロテアーゼインヒビターを含む 1x PBS を用いて溶解した。溶解液は標識した二本鎖 DNA と反応させた後、4.5%の TBE アクリルアミドゲルによって分離した。ウェスタンブロットはウェット式の転写装置で Hybond+メンブレンに転写し、ラベルした DNA はトランスイルミネーターで5分間、UVを照射することでメンブレンに結合させた。DIG ラベルした DNA は HRP 結合型抗 DIG 抗体 (DakoCytomation、D5101) を用いて検出した。

6-10. 培養細胞の取り扱い

HEK293T 細胞はストレプトマイシン-ペニシリン (Sigma) と最終濃度 10%になるように FBS (CCB) を加えた D-MEM (Wako) を用いて、37度、5% CO₂ の条件下で培養した。遺伝子導入は 0.323 g/L の polyethylenimine (コスモバイオ) を用いて行い、遺伝子導入した培養細胞は 48 時間後に回収した。遺伝子導入に使用したプラスミドは表 6-5 に記す。

表 6-5 遺伝子導入に使用したプラスミド

遺伝子導入	備考
pCS2-myc-PRDM12	発現ベクター
pCS2-HA-Msx1	発現ベクター

6-11. 免疫沈降法

免疫沈降法を行う前日、担体と抗体の複合体はプロテアーゼインヒビターを含む 1x TBS (140 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) 内で Protein G Sepharose (GE Healthcare) と抗 myc 抗体を混合し、回転させながら 4 度、一晩反応させ作成した。遺伝子導入した HEK293T 細胞はプロテアーゼインヒビターを含む lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40, 2 mM EDTA, pH 8.0) で懸濁した後、懸濁したサンプルは担体と抗体の複合体と合流し、回転させながら 2 度、1 時間、反応させた。反応させた複合体は 1x TBS で 5 回洗った後、1x SDS-PAGE buffer を加え、95 度、3 分間熱処理し、ウェスタンブロットのサンプルとして使用した。

7. 謝辞

本研究の実施にあたり道上達男先生には指導教員として充実した研究環境と本博士論文執筆時に多大なる助言をいただきました。心より深謝致します。東京女子医科大学特任助教須藤則広先生から技術的な助言を、東京都臨床医学総合研究所の種子島幸祐先生から本研究に対する助言を、ドイツの Friedrich-Baur-Institute、Ludwig-Maximilians 大学の Senderek 先生から共同研究者として各コンストラクトと的確なアドバイスを頂きました。また、本研究をサポートしてくださいました技術員の水野恵子様、原颯子様、奈良岡佑南様、道上研究室の皆様に感謝の意を込めて、謝辞とさせていただきます。

8. 引用文献

書籍

Wilt F. H. and Hake S. C. (2004) ウィルト発生生物学、東京化学同人

原著論文

Ahrens, K., and Schlosser, G. 2005. Tissues and signals involved in the induction of placodal Six1 expression in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 288, 40-59

Aihara, Y., Hayashi, Y., Hirata, M., Ariki, N., Shibata, S., Nagoshi, N., Nakanishi, M., Ohnuma, K., Warashina, M., Michiue, T., Uchiyama, H., Okano, H., Asashima, M., and Furue, M. K. 2010. Induction of neural crest cells from mouse embryonic stem cells in a serum-free monolayer culture. *IJDB* 54, 1287-1294

Aoki, Y., Saint-germain, N., Gyda, M., Magner-fink, E., Lee, Y. h., Credidio, C., Saint-jeannet, J. 2003. Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 259, 19-33

Bailery, A.P., Bhattacharyya, S., Bronner-Fraser, M., Streit, A. 2006. Lens specification is the ground state of all sensory placodes, from which FGF promotes olfactory identity. *Dev. Cell* 11, 505-517

Baker, C.V., Bronner-Fraser, M. 2001. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev. Biol.* 232, 1-61.

Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., Kouzarides, T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410, 120-124.

Bellmeyer, A., Krase, J., Lindgren, J., LaBonne, C. 2003. The protooncogene c-Myc is an essential regulator of neural crest formation in *Xenopus*. *Dev. Cell* 4, 827-839

Bendall, A.J., Ding, J., Hu, G., Shen, M.M., Abate-Shen, C. 1999. Msx1 antagonizes the myogenic activity of Pax3 in migrating limb muscle precursors. *Development* 126, 4965-4976

- Berry, W.L., Shin, S., Lightfoot, S.A., Janknecht, R. 2012. Oncogenic features of the JMJD2A histone demethylase in breast cancer. *Int. J Oncol.* 41, 1701–1706.
- Bronner-Fraser, M. and Fraser, S.E. 1988. Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. *Nature* 335, 161-164
- Brugmann, S.A., Pandur, P.D., Kenyon, K.L., Pignoni, F., Moody, S.A. 2004. Six1 promotes a placodal fate within the lateral neurogenic ectoderm by functioning as both a transcriptional activator and repressor. *Development* 131, 5871–5881.
- Carling, T., Kim, K.C., Yang, X.H., Gu, J., Zhang, X.K., Huang, S. 2004. A histone methyltransferase is required for maximal response to female sex hormones. *Mol. Cell Biol.* 24, 7032-7042.
- Carmona-Fontaine, C., Acuña, G., Ellwanger, K., Niehrs, C., Mayor, R. 2007. Neural crests are actively precluded from the anterior neural fold by a novel inhibitory mechanism dependent on Dickkopf1 secreted by the prechordal mesoderm. *Dev. Biol.* 309, 208-221
- Collins, R.E., Tachibana, M., Tamaru, H., Smith, K.M., Jia, D., Zhang, X., Selker, E.U., Shinkai, Y., Cheng, X. 2009. In Vitro and in Vivo analyses of a Phe/Tyr switch controlling product specificity of histone lysine methyltransferases. *J. Biol. Chem.* 280, 5563–5570.
- de Souza, F.S., Gawantka, V., Gómez, A.P., Delius, H., Ang, S.L., Niehrs, C. 1999. The zinc finger gene Xblimp1 controls anterior endomesodermal cell fate in Spemann's organizer. *EMBO J.* 18, 6062-6072.
- Ding Dincer, Z., Piao, J., Niu, L., Ganat, Y., Kriks, S., Zimmer, B., Shi, S.H., Tabar, V., Studer, L. 2013. Specification of functional cranial placode derivatives from human pluripotent stem cells. *Cell Rep.* 5, 1387–1402.
- Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., 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
- Fainsod, A., Steinbeisser, H., De Robertis, E. M. 1994. On the function of BMP-4 in patterning the marginal zone of the *Xenopus* embryo. *EMBO J.* 13, 5015-5025

- Fujii G1, Tsuchiya R, Itoh Y, Tashiro K, Hirohashi S. 2006. FoxD3 regulation of Nodal in the Spemann organizer is essential for Xenopus dorsal mesoderm development. *Development* 133, 4827-4838
- Grenier, J., Teillet, M.A., Grifone, R., Kelly, R.G., Duprez, D. 2009. Relationship between neural crest cells and cranial mesoderm during head muscle development. *PloS one* 4, e4381.
- Grunz, H. and Tacke, L. 1989. Neural differentiation of *Xenopus laevis* ectoderm takes place after disaggregation and delayed reaggregation without inducer. *Cell Differ. Dev.* 28, 211-217
- Hans, S., Liu, D., Westerfield, M., 2004. Pax8 and Pax2a function synergistically in otic specification, downstream of the Foxi1 and Dlx3b transcription factors. *Development* 131, 5091–5102.
- Harland, R.M. 1991. In situ hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. *Methods Cell Biol.* 36, 685-695
- Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., Saitou, M. 2011. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell* 146, 519-532
- Hillringhaus, L., Yue, W. W., Rose, N. R., Ng, S. S., Gileadi, C., Loenarz, C., Bello, S. H., Bray, J. E., Schofield, C. J., Oppermann, U. Structural and evolutionary basis for the dual substrate selectivity of human KDM4 histone demethylase family. *JBC*, 286, 41616-41625
- Hirabayashi, Y., Gotoh, Y. 2010. Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nature reviews. Neuroscience* 11, 377-388
- Hu, N., Strobl-Mazzulla, P., Sauka-Spengler, T., Bronner, M. 2012. DNA methyltransferase3A as a molecular switch mediating the neural tube-to-neural crest fate transition. *Genes Dev.* 26 2380-2385
- Hohenauer, T. and Moore, A. W. 2012. The Prdm family: expanding roles in stem cells and development. *Development* 139, 2267-2282
- Lee, H. X., Ambrosio, A. L., Reversade, B., De Robertis, E. M. 2006. Embryonic Dorsal-Ventral Signaling : Secreted Frizzled-Related Proteins as Inhibitors of Tolloid Proteinases. *Cell* 124, 147-159

Hu, N., Strobl-Mazzulla, P., Sauka-Spengler, T., Bronner, M. E. 2012. DNA methyltransferase3A as a molecular switch mediating the neural tube-to-neural crest fate transition. *Genes and Dev.* 26, 2380-2385

Huang, Y., Fang, J., Bedford, M.T., Zhang, Y., Xu, R.M. 2006. Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science* 312, 748–51.

Inomata, H., Shibata, T., Haraguchi, T., Sasai, Y. 2013. Scaling of dorsal-ventral patterning by embryo size-dependent degradation of Spemann's organizer signals. *Cell* 153, 1296-1311

Jacobs, S.A., Khorasanizadeh, S. 2002. Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* 295, 2080–2083.

Kaji, T., Artinger, K.B., 2004. *dlx3b* and *dlx4b* function in the development of Rohon–Beard sensory neurons and trigeminal placode in the zebrafish neurula. *Dev. Biol.* 276, 523–540.

Kim, T.D., Shin, S., Berry, W.L., Oh, S., Janknecht, R. 2012. The JMJD2A demethylase regulates apoptosis and proliferation in colon cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 113, 1368–1376.

Kim, K.C., Geng, L., Huang, S. 2003. Inactivation of histone methyltransferase by mutations in human cancers. *Cancer Res.* 63, 7619-7623.

Kinameri, E., Inoue, T., Aruga, J., Imayoshi, I., Kageyama, R., Shimogori, T., Moore, A.W. 2008. Prdm proto-oncogene transcription factor family expression and interaction with the notch-hes pathway in mouse neurogenesis. *PloS one* 3, e3859.

Kinameri, E., Inoue, T., Aruga, J., Imayoshi, I., Kageyama, R., Shimogori, T., Moore, A. W. 2008. Prdm proto-oncogene transcription factor family expression and interaction with the Notch-Hes pathway in mouse neurogenesis. *PloS one* 3, e3859

Koehler, K. R., Mikosz, A. M., Molosh, A. I., Patel, D., Hashino, E. 2013. Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature* 500, 217-221

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., Jenuwein, T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116–120.

Marom, K., Fainsod, A., Steinbeisser, H. 1999. Patterning of the mesoderm involves several threshold responses to BMP-4 and Xwnt-8. *Mech. Dev.* 87, 33-44

- Matsuo-takasaki, M., Matsumura, M., Sasai, Y. 2005. An essential role of *Xenopus Foxi1a* for ventral specification of the cephalic ectoderm during gastrulation. *Development* 132, 3885–3894.
- Meulemans, D. and Bronner-Fraser, M. 2004. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev. Cell* 7, 291-299
- Milet, C., Maczkowiak, F., Roche, D.D., Monsoro-Burq, A.H. 2013. Pax3 and Zic1 drive induction and differentiation of multipotent, migratory, and functional neural crest in *Xenopus* embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 5528-5533.
- Milner, C.M., Campbell, R.D. 1993. The G9a gene in the human major histocompatibility complex encodes a novel protein containing ankyrin-like repeats. *Biochem. J.* 290, 811–818.
- Minoux, M., Rijli, F.M. 2010. Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development* 137, 2605–21.
- Monsoro-Burq, A.H., Wang, E., Harland, R. 2005. Msx1 and Pax3 cooperate to mediate FGF8 and WNT signals during *Xenopus* neural crest induction. *Devel. Cell* 8, 167–178.
- Nieuwkoop, P.D., Faber, J. 1967. Normal table of *Xenopus* embryos. North-Holland, Amsterdam
- Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S. C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., Saitou, M., and Surani, M. A. 2005. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436, 207-213
- Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T., Saitou, M., 2009. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell* 137, 571-584
- Piccolo, S., Agius, E., Lu, B., Goodman, S., Dale, L., De Robertis, E. M. 1997. Cleavage of Chordin by Xolloid Metalloprotease Suggests a Role for Proteolytic Processing in the Regulation of Spemann Organizer Activity. *Cell* 91, 407-416
- Pieper, M., Ahrens, K., Rink, E., Peter, A., Schlosser, G. 2012. Differential distribution of competence for panplacodal and neural crest induction to non-neural and neural ectoderm. *Development* 139, 1175–1187.

Powell, D. R., Hernandez-Lagunas, L., LaMonica, K., Artinger, K. B. 2013. Prdm1a directly activates foxd3 and tfap2a during zebrafish neural crest specification. *Development* 140, 3445-3455

Rai, K., Nadauld, L. D., Chidester, S., Manos, E. J., James, S. R., Karpf, A. R., Cairns, B. R., Jones, D. A. 2006. Zebra fish Dnmt1 and Suv39h1 regulate organ-specific terminal differentiation during development. *Mol. Cel. Biol.*, 26, 7077-7085

Rai, K., Jafri, I.F., Chidester, S., James, S.R., Karpf, A.R., Cairns, B.R., Jones, D.A. 2010. Dnmt3 and G9a cooperate for tissue-specific development in zebrafish. *J. Biol. Chem.* 285, 4110–4121.

Rai K., Sarkar S, Broadbent TJ, Voas M, Grossmann KF, Nadauld LD, Dehghanizadeh S, Hagos FT, Li Y, Toth RK, Chidester S, Bahr TM, Johnson WE, Sklow B, Burt R, Cairns BR, Jones DA. 2010. DNA demethylase activity maintains intestinal cells in an undifferentiated state following loss of APC. *Cell* 17, 930-942

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593--599 (2000).

16.

Reichert, S., Randall, R.A., Hill, C.S. 2013. A BMP regulatory network controls ectodermal cell fate decisions at the neural plate border. *Development* 140, 4435–4444.

Reid, A.G., Nacheva, E.P. 2004. A potential role for PRDM12 in the pathogenesis of chronic myeloid leukaemia with derivative chromosome 9 deletion. *Leukemia* 18, 178–180.

Saint-Jeannet, J.P., Moody, S.A. 2014. Establishing the pre-placodal region and breaking it into placodes with distinct identities. *Dev. Biol.* 389, 13–27.

Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., Geissert, D., Gont, L.K., De Robertis, E.M. 1994. Xenopus Chordin: A novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 79, 779–790.

Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H. and De Robertis, E.M. 1995. Regulation of neural induction by the chd and BMP-4 antagonistic patterning signals in Xenopus. *Nature* 376, 333-336

Sasai, N., Yakura, R., Kamiya, D., Nakazawa, Y., Sasai, Y. 2008. Ectodermal factor restricts mesoderm differentiation by inhibiting p53. *Cell* 133, 878-890.

- Sato, S.M. and Sargent, T.D. 1989. Development of neural inducing capacity in dissociated *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* 134, 263-266
- Sato, T., Sasai, N., Sasai, Y. 2005. Neural crest determination by co-activation of Pax3 and Zic1 genes in *Xenopus* ectoderm. *Development* 132, 2355–2363.
- Schlosser, G. 2010. Making sense development of vertebrate cranial placodes. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 283, 129-234.
- Schlosser G. 2010. Making sense development of vertebrate cranial placodes. 129-234
- Shankar, S. R., Bahirvani, A. G., Rao, V. K., Bharathy, N., Ow, J. R., Taneja, R. 2013. G9a, a multipotent regulator of gene expression. *Epigenetics* 8, 16-22
- Spemann H. and Mangold. H. 1924. Über induction von embryonalanlagen durch implantation artfremder organisatoren. *Roux'Arch. F. Entw. Mech.* 100, 599-638
- Steiner AB1, Engleka MJ, Lu Q, Piwarzyk EC, Yaklichkin S, Lefebvre JL, Walters JW, Pineda-Salgado L, Labosky PA, Kessler DS.
- Steventon, B., Mayor, R., Streit, A. 2014. Neural crest and placode interaction during the development of the cranial sensory system. *Dev. Biol.* 389, 28-38.
- Strobl-Mazzulla, P.H., Sauka-Spengler, T., Bronner-Fraser, M. 2010. Histone demethylase Jmjd2A regulates neural crest specification. *Dev. Cell* 19, 460–468.
- Sun, X. J., Xu, P. F., Zhou, T., Hu, M., Fu, C. T., Zhang, Y., Jin, Y.,
- Suga, H., Kadoshima, T., Minaguchi, M., Ohgushi, M., Soen, M., Nakano, T., Takata, N., Wataya, T., Muguruma, K., Miyoshi, H., Yonemura, S., Oiso, Y., Sasai, Y. 2011. Self-formation of functional adenohypophysis in three-dimensional culture. *Nature* 480, 57-62
- Sun, X.J., Xu, P.F., Zhou, T., Hu, M., Fu, C.T., Zhang, Y., Jin, Y., Chen, Y., Chen, S.J., Huang, Q.H., et al. 2008. Genome-wide survey and developmental expression mapping of zebrafish SET domain-containing genes. *PloS one* 3, e1499.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T. & Shinkai, Y. Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific

- selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J. Biol. Chem.* 276, 25309–25317 (2001).
- Tanibe, M., Michiue, T., Yukita, A., Danno, H., Ikuzawa, M., Ishiura, S., Asashima, M. 2008. Retinoic acid metabolizing factor xCyp26c is specifically expressed in neuroectoderm and regulates anterior neural patterning in *Xenopus laevis*. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 893-901.
- Theveneau, E., Mayor, R. 2012. Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev. Biol.* 366, 34–54.
- Tribulo, C., Aybar, M.J., Nguyen, V.H., Mullins, M.C., Mayor, R. 2003. Regulation of *Msx* genes by a *Bmp* gradient is essential for neural crest specification. *Development* 130, 6441–6452.
- Villanueva, S., Glavic, A., Ruiz, P., Mayor, R. 2002. Posteriorization by FGF, Wnt, and retinoic acid is required for neural crest induction. *Dev. Biol.* 241, 289-301
- Wang, J. and Abate-Shen, C. 2012. The *MSX1* homeoprotein recruits G9a methyltransferase to repressed target genes in myoblast cells. *PLoS one* 7, e37647
- Woda, J.M., Pastagia, J., Mercola, M., Artinger, K.B., 2003. *Dlx* proteins position the neural plate border and determine adjacent cell fates. *Development* 130, 331–342.
- Yamaji, M., Ueda, J., Hayashi, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Nakato, R., Yamada, Y., Shirahige, K., Saitou, M. 2013. *PRDM14* ensures naive pluripotency through dual regulation of signaling and epigenetic pathways in mouse embryonic stem cells. *Cell* 12, 368-382
- Yang, C.M., Shinkai, Y. 2013. *Prdm12* is induced by retinoic acid and exhibits anti-proliferative properties through the cell cycle modulation of P19 embryonic carcinoma cells. *Cell Struct. Funct.* 38, 195–204.
- Zhang, H., Hu, G., Wang, H., Sciavolino, P., Iler, N., Shen, M.M., Abate-shen, C. 1997. Heterodimerization of *Msx* and *Dlx* homeoproteins results in functional antagonism. *Mol. Cell Biol.* 17, 2920-2932.