

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 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

氏名 松川晋也

#### 背景

脊椎動物の外胚葉はBMPシグナルの勾配に応じて、非神経、神経板境界、神経領域に大別される。その後、非神経と神経の中間領域にあたる神経板境界はFGFやWntリガンドを受容することや各転写因子による遺伝子発現の調節により、予定プラコードと神経堤領域へ分化する。本研究は分子シグナルや転写因子だけでなく、ヒストン修飾による転写調節を介した遺伝子発現の調節が予定プラコードと神経堤の分化に重要である事を示す。特に、ヒストンメチル化転移酵素として機能するPRDM12とヒストン脱メチル化酵素Kdm4aのパターニングにおける役割とメチル基転移活性を持つヒストンメチル化転移酵素G9aを中心とした遺伝子制御メカニズムについてその可能性を議論していきたい。

#### 結果

まず、Whole-mount in situ hybridization法により、PRDM12の発現領域を調査した。その結果、PRDM12が予定プラコード側方領域に発現する事が明らかとなった。初期発生において、PRDM12はどんな役割を持つのだろうか。PRDM12の過剰発現を行った結果、PRDM12は神経堤形成遺伝子の発現を抑制する働きを持ち、ヒストンメチル化転移酵素としてクロマチン

リモデリングに関連するH3K9のトリメチル化を促進する機能を持つ。つまり、PRDM12はヒストンH3K9のトリメチル化を促進する事によって遺伝子発現を負に制御する役割を持つことが明らかとなった。では、PRDM12がどの領域のヒストンH3に対してメチル化を促進するか、PRDM12のジンクフィンガードメインが脊椎動物種間で高度に保存されている点から、PRDM12の結合配列候補として種間で保存性の高いゲノム領域、Foxd3プロモーターのCNS (conserved non-coding sequence) を選出した。ルシフェラーゼ解析およびChIP-qPCR解析から、PRDM12がFoxd3プロモーターのCNSへ結合し、周辺領域のヒストンH3K9に対してメチル化修飾を行うことを見出した。また、神経堤においてヒストン脱メチル化酵素Kdm4aが発現する。ニワトリ胚における先行研究から、Kdm4aは複数の神経堤遺伝子のプロモーター領域において、ヒストンH3K9の脱メチル化を促進し、神経堤遺伝子の発現維持に関与している。Kdm4aが予定プラコードと神経堤領域における遺伝子発現を調節しているか検証するため、Kdm4aの過剰発現を行った。Kdm4aの過剰発現胚では予定プラコード形成遺伝子の発現抑制が観察された。また、この表現型はPRDM12の過剰発現によってレスキューする事ができる。つまり、PRDM12とKdm4aは共に神経堤遺伝子のプロモーター領域を標的としてヒストン修飾を調節し、遺伝子発現を制御する可能性が示唆された。また、PRDM12によって促進されたFoxd3プロモーターにおけるヒストンH3K9のトリメチル化はKdm4aの過剰発現によって脱メチル化された。これらの結果から、PRDM12が予定プラコードで発現し、ヒストンH3K9のメチル化を介して転写抑制を行う一方で、Kdm4aが神経堤で発現し、ヒストンH3K9の脱メチル化を介して転写可能な状態を維持している事がわかった。

## 考察

研究結果から Foxd3 プロモーターにおける PRDM12 依存的なヒストン H3K9 のトリメチル化の促進が観察されたが、PRDM12 の結合配列周辺だけでなく、広範囲に渡ったヒストン H3K9 のメチル化が認められた。これは Heterochromatin protein 1 によるクロマチンリモデリングの促進によって広範囲にわたってヒストン H3K9 のトリメチル化の占有が認められたのかもしれない。また、Kdm4a の過剰発現胚で予定プラコード遺伝子の発現抑制が観察された。近年の報告は、Foxd3 の過剰発現によって予定プラコード遺伝子の発現抑制が起こることを示している。予定プラコードにおける Kdm4a の過剰発現によって Foxd3 プロモーター上でヒストン H3K9 の脱メチル化が起こり、Foxd3 が異所的に発現し、予定プラコード遺伝子を抑制したのかもしれない。また、PRDM12 や Kdm4a によるヒストン H3K9 のメチル化・脱メチル化による神経堤遺伝子の発現調節だけでなく、ヒストンメチル化転移酵素 G9a がパートナーとなる転写因子を選択することで、様々な領域で遺伝子発現を調節していることが考えられる。G9a が PRDM12 と結合し、神経堤遺伝子の発現を抑制するのに対して、Msx1 にパートナーを変えることで予定プラコード遺伝子の発現抑制を行うかもしれない。今後の研究は G9a にスポットを当て、PRDM12、Msx1 との関係性について深く研究を行えば、予定プラコードと神経堤におけるパターン形成機構の一端が明らかになるだろう。