

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 松川晋也

本研究において論文提出者は、脊椎動物初期胚の神経境界領域に誘導される予定プラコードの領域がいかにかに決定されるか、特にヒストン修飾を介したエピジェネティック制御に焦点を当て、その分子機構を解明している。

脊椎動物の外胚葉では転写因子や分子シグナルの変化に対応して予定プラコードと神経堤が形成されることは明らかになっている一方で、2つの組織の分化過程におけるヒストン修飾に依存する転写制御に関する研究は未解明な点が多い。本研究では予定プラコードと神経堤の分化過程に必要なヒストン修飾因子 PRDM12 と Kdm4a について詳細な解析を行い、2つのタンパク質がヒストン修飾を介した転写制御によって予定プラコードと神経堤の分化に貢献する事を示している。加えて、予定プラコードと神経堤におけるヒストン修飾が PRDM12 だけでなく、ヒストンメチル化酵素 G9a や転写因子 Msx1 によって制御されている可能性を示している。

まず申請者は、初期発生における機能が未知な PRDM12 について評価を行った。ツメガエル胚における PRDM12 の発現解析により、PRDM12 は神経胚において予定プラコード領域に局在しており、PRDM12 mRNA の過剰発現の結果から PRDM12 は神経堤遺伝子の発現を抑制し、ヒストン H3K9 のトリメチル化を促進する機能を持つことを明らかにした。次に、PRDM12 が持つ、ヒストンメチル化に関わる PR ドメインと DNA 結合ドメインである Zn フィンガードドメイン (ZNF) に変異を加えた PRDM12 を検討し、PR ドメインはヒストン H3K9 のメチル化修飾に、ZNF ドメインは DNA 結合にそれぞれ必要であることを示している。また、PRDM12 が神経堤遺伝子 *Foxd3* プロモーターの上流領域に結合することをルシフェラーゼ解析、ChIP-qPCR 法、ゲルシフト解析を用いて示し、続いて ChIP-qPCR 法によって PRDM12 依存的に *Foxd3* を始めとする神経堤遺伝子プロモーター上のヒストン H3K9 がトリメチル化されることを申請者は明らかにしている。PRDM12 のノックダウン実験の結果からは、PRDM12 阻害により予定プラコード遺伝子の発現抑制が生じた一方で、予定プラコード方向へ神経堤遺伝子の発現領域の拡大が示されている。この結果は内在性 PRDM12 の阻害により、本来プラコードになるべき細胞が神経堤となることを示唆している。PRDM12 阻害胚の予定プラコード細胞では、神経堤遺伝子プロモーター上のヒストン H3K9 がトリメチル化されないことを ChIP-qPCR 解析によって示している。これらの結果

は、PRDM12 が予定プラコード領域に発現し、神経堤遺伝子プロモーター上のヒストン H3K9 のトリメチル化を介して神経堤遺伝子の発現抑制を行う事が明らかにしている。

後半では、PRDM12 と、神経堤で発現するヒストン脱メチル化酵素 Kdm4a の関係について、議論を加えている。Kdm4a mRNA の過剰発現の結果、Kdm4a 注入量に依存して予定プラコード遺伝子の発現抑制と神経堤遺伝子発現の拡大、すなわち PRDM12 の抑制効果と類似する表現型が観察された。また、PRDM12 と Kdm4a の共発現により、PRDM12 に依存する神経堤遺伝子の発現抑制が解除された。更に、PRDM12 依存的なヒストン H3K9 のトリメチル化が Kdm4a の共発現によって脱メチルされる事が ChIP-qPCR の結果により示されており、以上をまとめると、予定プラコード細胞では PRDM12 が発現し、ヒストン H3K9 のメチル化を介して神経堤遺伝子の発現を抑制するのに対して、神経堤細胞では Kdm4a が発現し、ヒストン H3K9 の脱メチル化を介して神経堤遺伝子の発現を維持する事が明らかになった。同時に、PRDM12 がヒストンメチル化酵素 G9a と協調的に機能する可能性を示している。G9a が PRDM12 と結合するのみならず、転写因子 Msx1 と結合する事でヒストン修飾する領域を選択し、予定プラコードと神経堤における分化パターン形成に貢献することを示唆している。

以上のように、本博士論文の研究結果から、予定プラコードと神経堤領域においてヒストン H3K9 のメチル化、脱メチル化に依存する遺伝子発現の調節機構が2つの組織の分化パターンを調節し、予定プラコードと神経堤の境界の決定に貢献していることを示していた。この研究内容は、これまで必ずしも明らかにされてこなかった初期胚の神経領域規定にヒストン修飾というエピジェネティック制御が必要とされていることを直接証明したものであり、重要性・新規性が極めて高いと考えられる。また、実験量も多く、論理の積み重ねも適切であり、博士論文として質の高いものである。よって、本審査における審査委員の総意をもって、本研究は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいと認定する。