

博士論文

ヒストン脱メチル化酵素 Fbxl11 による

神経分化制御機構の解明

(Epigenetic regulation of neural stem cell fate
by histone demethylase Fbxl11)

川上 絵理

略語一覽

bFGF	basic Fibroblast Growth Factors
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	base pair
cDNA	complementary DNA
cKO	conditional Knockout
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ES	Embryonic Stem
Fbxl11	F-box and leucine rich repeat protein 11
FBS	Fetal Bovine Serum
HE	Hematoxylin-Eosin
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEF	Mouse Embryonic Fibroblasts
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	PBS containing 0.05% Tween20
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyde
RNA	Ribonucleic Acid
TBST	Tris-buffered saline containing 0.1% Tween20

目次

1. 序論

- 1.1 ヒストンのメチル化修飾
- 1.2. 神経発生におけるヒストンメチル化の役割
- 1.3. ヒストン H3K36 脱メチル化酵素 Fbxl10 / Fbxl11

2. 実験手法

3. 結果

- 3.1. Fbxl11 遺伝子改変マウスの作製
- 3.2. 初期発生における Fbxl11 の機能解析
 - 3.2.1. 胚発生における Fbxl11 の発現動態
 - 3.2.2. Fbxl11 欠損マウスの表現型
 - 3.2.3. Fbxl11 欠損胚における細胞増殖および細胞死
 - 3.2.4. Fbxl11 による細胞周期調節因子の発現調節
 - 3.2.5. Fbxl11 欠損によるヒストン修飾への影響
- 3.3. 神経発生における Fbxl11 の機能解析
 - 3.3.1. 神経発生過程における Fbxl11 の発現動態
 - 3.3.2. 神経特異的 Fbxl11 欠損マウスの表現型
 - 3.3.3. Fbxl11 欠損による特異的神経細胞層における神経細胞死
 - 3.3.4. 胎生期の神経幹細胞維持における Fbxl11 の役割
 - 3.3.5. 神経幹細胞における Fbxl11 下流遺伝子の網羅的探索

4. 考察

- 4.1. Fbxl10 と Fbxl11 の機能比較
- 4.2. 初期発生におけるヒストン H3K36 脱メチル化酵素の役割
- 4.3. Fbxl11 による細胞周期調節因子の制御
- 4.4. Fbxl11 とポリコーム群タンパク質との相関
- 4.5. Fbxl11 欠損による神経変性

参考文献

謝辞

1. 序論

1.1. ヒストンのメチル化修飾

ヒストンはメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO 化といった翻訳後修飾を受け、これらのヒストン修飾は遺伝子発現制御に影響することが知られている。特にヒストン H3 のメチル化修飾は、他の翻訳後修飾と比較して、標的となる特異的リジン残基数やヒストン修飾酵素が複数存在し、多様性に富み、動的である。例えば、ヒストン H3K4 (H3 Lys 4)、H3K36 のメチル化は近傍遺伝子の発現亢進に、対して H3K9、H3K27 のメチル化は遺伝子発現抑制に働いている (表 1-1; Shi and Whetstine, 2007; Pattaroni and Jacob, 2013)。これらのヒストンメチル化状態を正常に保つことは、発生や分化の過程のみならず、DNA 損傷やストレスに対する遺伝子発現調節を介した生体の恒常性維持に必須であり、ヒストンメチル化機構の破綻は発生異常、がん、神経変性疾患などの病態を示すことが報告されている (Martin and Zhang, 2005)。ヒストンメチル化はヒストンメチル化酵素群により触媒されるが、これらのヒストンメチル化酵素欠損マウスの多くは胎生致死を呈することが明らかとなっている (Tachibana et al., 2002; Dodge et al., 2004; O' Carroll et al., 2001)。

ヒストンメチル化修飾はそのメチル化酵素群により不可逆的に制御されるという説が長く支持されてきた。しかし、近年ヒストン脱メチル化酵素群が同定された (Shi et al, 2004) ことにより、ヒストンメチル基は可逆的に制御されることが明らかとなり、メチル化制御の分子機能に広がりを与えることとなった (Shi, 2007) (表 1-1, 図 1-1)。哺乳類では多くのヒストン脱メチル化酵素が同定されており、異なる脱メチル化反応機構を有する LSD (Lysine specific demethylase) ファミリーと JmjC (JumonjiC) ファミリーに大別される。LSD ファミリーは Flavin Adenine Dinucleotide 依存 amine oxidase 反応により脱メチル化を行い、LSD1 と LSD2 により構成される。一方で、JmjC ファミリーは Fe(II) および α -ketoglutarate 依存ヒドロキシ化反応を介し、これまでに 30 以上の JmjC ドメイン依存ヒストン脱メチル化酵素が同定されている (表 1-2)。LSD1 および LSD2 の遺伝子欠損マウスは既に作製され、LSD1 遺伝子欠損マウスは着床前後において胎生

致死を呈することが明らかにされているが、JmJc ファミリー遺伝子欠損マウスはまだ一部しか作製されておらず、JmJc ファミリーヒストン脱メチル化酵素の生理的機能および分子機構についての報告は少ない(Klose and Zhang, 2007; Shi, 2007; Kooistra and Helin, 2012; Mosammamaparast and Shi, 2010; Pedersen and Helin, 2010)

1.2. 神経発生におけるヒストンメチル化の役割

中枢神経系においてもヒストンメチル化は非常に大きな役割を果たしている。哺乳類の中枢神経系は神経細胞とグリア細胞とで構成されており、発生過程の決まった時期に神経幹細胞より秩序正しく分化する。この時期特異的な神経幹細胞の分化および増殖は basic helix-loop-helix (bHLH) 転写因子や POU 転写因子による転写調節と DNA メチル化やヒストンメチル化修飾といったエピジェネティック制御機構により厳密にコントロールされている(Juliandi et al., 2010)。

これまでにヒストン H3K27 のメチル化に働くポリコーム群タンパク質(PcG)が神経幹細胞の分化運命決定に寄与することが報告されている。PcG 構成因子である Ring1B(Ring finger protein2)および Ezh2(Enhancer of zeste homolog2)は神経分化を正に制御する bHLH 因子 Ngn1(Neurogenin1)の発現抑制を介して神経幹細胞から神経細胞とグリア細胞に分化する時期を調節しており (Hirabayashi et al., 2009; Pereira et al., 2010)、また PcG 構成因子 Bmi1(polycomb complex protein BMI-1)は細胞周期調節因子である p16^{Ink4a} や p19^{ARF} の発現抑制を介して神経幹細胞の増殖や生存を支持する (Molofsky et al., 2003; Molofsky et al., 2005)。一方で、ヒストン H3K27 の脱メチル化酵素 Jmjd3 は、神経細胞に陽性である Dlx5、Gad1/2、Dcx の発現誘導を介して神経幹細胞から神経細胞の分化を正に制御することが報告されている (Jepsen et al., 2007; Burgold et al., 2008; Estaras et al., 2012)。

このように、近年神経発生や神経幹細胞の分化に関して、ヒストンメチル化修飾酵素の様々な役割が報告されている(表 1-3; Pattaroni and Jacob, 2013)。しかしながら、ヒストンメチル化酵素と比較してヒストン脱メチル化酵素の生体における機能についての知見は少なく、特にヒストン H3K36 メチル化修飾の神経発生における生理的役割や神経幹細胞の分化制御に関する報告はない。H3K36 メチル化の生物学的役割を解明することは重要であり、神経幹細胞のエピジェネティック状態の一端を明らかとするだけで

はなく、エピジェネティクスを標的とした疾患治療や再生医療への新しいアプローチの確立に繋がることを期待される。

1.3. ヒストン H3K36 脱メチル化酵素 Fbxl10/ Fbxl11

Fbxl11 (F-box and leucine-rich repeat protein 11, 別名 Kdm2a, Jhdmla) は jmjC ドメインを有するヒストン脱メチル化酵素として初めて同定された遺伝子である (Tsukada et al., 2006)。Fbxl11 には非常に構造のよく似たパラログ遺伝子 Fbxl10 が存在し (Pfau et al., 2008)、共にモノメチル化・ジメチル化 H3K36 に対して特異的に脱メチル化を行う。Fbxl11 と Fbxl10 はヒストン脱メチル化活性を持つ jmjC ドメインの他、Zinc finger ドメイン、PHD ドメイン、F-box ドメイン、Leucine Rich Repeat といった機能ドメインを共通に持ち、配列相同性も非常に高い (図 1-2)。

いくつかの報告により、Fbxl11 と Fbxl10 が標的遺伝子領域における H3K36 脱メチル化活性を介して細胞増殖、アポトーシス、細胞分化、細胞老化、がん化といった生理的現象に重要であることが明らかになっている。Fbxl11 は細胞周期調節因子 p15^{Ink4b}、p27^{Kip1} の発現を抑制することで間葉系幹細胞の増殖と分化を制御することが報告されている (Dong et al., 2013; Du et al., 2013; Gao et al., 2013)。一方で Fbxl10 はマウス線維芽細胞 (MEF) において p19^{ARF}、p15^{Ink4b}、p16^{Ink4a} の発現を抑制することにより細胞増殖や老化を制御することが示されている (Fukuda et al., 2011; He et al., 2008; Kottakis et al., 2011; Pfau et al., 2008; Tzatsos et al., 2009; Tzatsos et al., 2011)。さらに Fbxl11 と Fbxl10 はリボソーム RNA の転写を抑制することにより細胞生存を正に制御している (Frescas et al., 2007; Tanaka et al., 2010)。また、Fbxl11 と Fbxl10 はいずれも癌や腫瘍形成に関与することが報告されており、Fbxl11 は肺がんの腫瘍形成に、Fbxl10 はヒト膵臓がんを高発現することが知られている (Dhar et al., 2014; Tzatsos et al., 2013)。このように、Fbxl11 と Fbxl10 はよく似た機能を示し、多様な細胞コンテキストにおいて共通の遺伝子を標的にする。しかしながら、*in vivo* における生理的機能についてはほとんど明らかになっていない。

当研究室では、Fbxl10 が ES 細胞や神経幹細胞に高発現していることに着目し、初期発生での生理的機能を調べるために、Fbxl10 欠損マウスを作製した。Fbxl10 欠損マウスでは細胞周期調節因子 p19^{ARF} の発現上昇が見られ、細胞増殖とアポトーシスの亢進を

示すことにより、神経管閉鎖不全による外脳症を呈して生後 0 日 (P0) に死亡することを見出した。この結果より、Fbx110 が初期神経発生過程における細胞増殖に重要であることを示した (図 1-3; Fukuda et al., 2011)。一方で、Fbx110 欠損マウスの外脳症の発症率は 20% と低く、Fbx110 のパラログである Fbx111 が神経発生において機能を代償する可能性が示唆された。しかしながら、Fbx111 の個体での生理的機能および神経発生過程での神経幹細胞分化制御における役割についての報告は未だない。

本研究では初期発生および神経発生における Fbx111 の生理的機能を調べるために、Fbx111 レポーターマウス、Fbx111 欠損マウス、および神経特異的 Fbx111 欠損マウスを作製して解析を行った。その結果、Fbx111 欠損マウスは胎生中期において致死となり、p21^{Cip} の発現上昇が見られたことから、初期発生において Fbx111 は細胞周期調節因子の発現調節を介して細胞増殖を制御することが示された (Kawakami et al., 2014)。さらに、神経特異的 Fbx111 欠損マウスでは生後に神経細胞が細胞死を呈し、胎生期神経幹細胞も細胞死および分化亢進を呈したことから、Fbx111 は神経細胞の生存維持や神経幹細胞の未分化維持に必須であり、神経発生において重要な役割を持つことが示された。

機能	ヒストン/リジン残基	ヒストンメチル化酵素	ヒストン脱メチル化酵素
転写活性化	H3K4 me1	SETD1A/B (SET1A/B, KMT2F)	LSD1/2 (KDM1A/B)
		ASH1L (KMT2H)	KDM5B (JARID1B, PLU)
		MLL1 (KMT2A, TRX1, HRX, ALL1)	NO66 (MAPJD)
	H3K4 me2	MLL2 (MLL4, KMT2B, KMT2D, ALR)	
		MLL3 (KMT2C)	
		SETD7 (SET7/9, KMT7)	
		SETD1A/B (SET1A/B, KMT2F)	LSD1/2 (KDM1A/B)
		MLL1 (KMT2A, TRX1, HRX, ALL1)	KDM5A (RBP2, RBBP2)
	H3K4 me3	MLL2 (MLL4, KMT2B, KMT2D, ALR)	KDM5B/D
MLL3 (KMT2C)		KDM5C (JARID1C, SMCX)	
SMYD3		NO66 (MAPJD)	
SETD1A/B (SET1A/B, KMT2F)		KDM2B	
ASH1L (KMT2H)		KDM5A (RBP2, RBBP2)	
転写不活性化	H3K9 me1	MLL1 (KMT2A, TRX1, HRX, ALL1)	KDM5B/D
		MLL2 (MLL4, KMT2B, KMT2D, ALR)	KDM5C (JARID1C, SMCX)
		MLL3 (KMT2C)	NO66 (MAPJD)
	H3K9 me2	SMYD3	
		PRDM7 (MEISETZ)	
		SETDB1 (ESET, KMT1E)	KDM3A/B (JMJD1A/B, JHDM2A/B)
		G9a (EHMT2, KMT1C)	PHF8
		GLP (EHMT1, KMT1D)	KDM7 (JHDM1D)
	H3K9 me3	PRDM2 (KMT8)	KDM3A/B (JMJD1A/B, JHDM2A/B)
		SUB39H1/2 (KMT1A/B)	PHF8
		SETDB1 (ESET, KMT1E)	KDM7 (JHDM1D)
		G9a (EHMT2, KMT1C)	LSD1 (KDM1A)
転写不活性化	H3K27 me1	GLP (EHMT1, KMT1D)	KDM3A/B (JMJD1A/B, JHDM2A/B)
		PRDM2 (KMT8)	PHF8
		SUB39H1/2 (KMT1A/B)	KDM7 (JHDM1D)
転写不活性化	H3K27 me2	PRDM2 (KMT8)	KDM3A/B (JMJD1A/B, JHDM2A/B)
		SETDB1 (ESET, KMT1E)	PHF8
		G9a (EHMT2, KMT1C)	KDM7 (JHDM1D)
転写不活性化	H3K27 me3	PRDM2 (KMT8)	LSD1 (KDM1A)
		SETDB1 (ESET, KMT1E)	KDM3A/B (JMJD1A/B, JHDM2A/B)
		PRDM2 (KMT8)	KDM4A-D (JMJD2A-D, JHDM3A-D)
転写活性化	H3K36 me1	PRDM2 (KMT8)	KDM7 (JHDM1D)
		EZH1/2	KDM6A/B (UTX, JMJD3)
		SETD2 (KMT3A)	KDM7 (JHDM1D)
	H3K36 me2	NSD1-3	KDM6A/B (UTX, JMJD3)
		SETD2 (KMT3A)	KDM2A/B (JHDM1A/B, FBXL10/11)
		ASH1L	KDM2A/B (JHDM1A/B, FBXL10/11)
	H3K36 me3	NSD1-3	NO66 (MAPJD)
		SMYD2	NO66 (MAPJD)
		SETD2 (KMT3A)	KDM4A-C (JMJD2A-C, JHDM3A-C)
転写活性化	H3K79 me1	ASH1L	KDM4A-C (JMJD2A-C, JHDM3A-C)
		SETD2 (KMT3A)	NO66 (MAPJD)
		ASH1L	KDM4A-C (JMJD2A-C, JHDM3A-C)
転写活性化	H3K79 me2	DOT1L (KMT4)	
		DOT1L (KMT4)	
		DOT1L (KMT4)	

表1-1 ヒストンメチル化酵素とヒストン脱メチル化酵素
Shi and Whetstone, 2007, Review; Pattaroni and Jacob, 2014, Reviewより転載、改変

Phylogenetic tree	Protein domains	Name	Synonyms	Specificity	
		KDM1A KDM1B	AOF2/BHC110/LSD1 AOF1/LSD2	H3K4me2/me1 H3K9me2/me1 H3K4me2/me1	
		JMJD7 HIF1AN HSPBAP1 JMJD5 JMJD4 JMJD6 JMJD8 KDM2B KDM2A JHDM1D PHF8 PHF2 HR KDM3B KDM3A JMJD1C KDM6B KDM6A UTY KDM4A KDM4C KDM4B KDM4D KDM5B KDM5C KDM5D KDM5A JARID2 MINA NO66	PSR/PTDSR KIAA1718 JHDM1E JHDM2A/JMJD1A/TSGA JMJD3 UTX JHDM3A/JMJD2A JHDM3C/JMJD2C/GASC1 JHDM3B/JMJD2B JHDM3D/JMJD2D JARID1B/PLU1 JARID1C/SMCX JARID1D/SMCY JARID1A/RBP2	H3R2 H4R3 H3K36me2/me1 H3K4me3 H3K36me2/me1 H3K9me2/me1 H3K27me2/me1 H3K9me2/me1 H3K27me3/me2 H3K9me3/me2 H3K36me3/me2 H3K4me3/me2 H3K4me3/me2 H3K36me3/me2	
	Key: 				

TRENDS in Cell Biology

表1-2 ヒストン脱メチル化酵素の模式図

ヒトのヒストン脱メチル化酵素はそのヒストン脱メチル化反応機構により2ファミリー(LSDファミリーとJmjCファミリー)に大別される。

Pedersen and Helin, 2010, review より抜粋。

Cell type	Target residue	Enzyme	Modification	Observation	Suggested role
Neurons	H3K27	KDM6B (JMJD3)	Demethylation	Neuronal genes induced when JMJD3 is overexpressed in neural stem cells	Promotes differentiation of neural stem cells into neurons
		EZH2	Methylation	Upregulation of genes involved in neurogenesis in Ezh2-null mouse cortex	Maintenance of appropriate balance between neural stem cell self-renewal and differentiation into neurons
	H3K4	EZH1	Methylation	High expression in post-mitotic neurons	Induces postnatal neurogenesis in the SVZ via transcriptional activation of Dlx2
		MLL1	Methylation	Neurogenesis impaired in the absence of MLL1 in mouse subventricular zone (SVZ)	
		KDM5C (SMCX)	Demethylation	KDM5C and REST are released from RE1 binding sites upon differentiation into neurons	
	H3K9	SETDB1	methylation	Early neurogenesis severely impaired and increased astrogensis in the absence of SETDB1	Represses astrocytic genes to prevent precocious differentiation in astrocytes and to allow differentiation of early-born neurons
		SUV39H1	Methylation	Downregulation of SUV39H1 induced by BDNF enhances CREB-related genes	Neurite outgrowth promoted by downregulation of SUV39H1 and subsequent decrease of H3K9 methylation
	H3K9/ H4K20	PHF8	Demethylation	Activation of genes involved in cytoskeleton dynamics	Neurite outgrowth
		H4R3	PRMT8	Methylation	
Oligodendrocytes	H3K27	EZH2	Methylation	EZH2 remains highly expressed in oligodendrocytic lineage where it represses astrocytic and neuronal lineages specific genes	Cell fate choice towards oligodendrocytic lineage upon induction of neural stem cell differentiation and maintenance of oligodendrocyte lineage identity
	H3K9	not described	Methylation	Increase of H3K9me3 and HP1 α levels in mature oligodendrocytes	Maintenance of oligodendrocytes myelination
Schwann cells	H3K27	EZH2	Methylation	Decrease of myelin gene expression and process extension in Schwann cells upon downregulation of EZH2	Promotes Schwann cell maturation by repressing p57kip2, what downregulates inhibitors of myelination such as Hes5
Astrocytes	H3K4	SETD7 (SET7/9)	Methylation	Increased H3K4 methylation on the GFAP promoter	Mediates FGF2-dependent astrocyte differentiation via the transcriptional activation of GFAP
	H3K9	Not described	Demethylation	Decreased H3K9 methylation on the GFAP promoter	Mediates FGF2-dependent astrocyte differentiation via the de-repression of GFAP gene

表1-3 神経発生におけるヒストンメチル化酵素・脱メチル化酵素の役割
Pattaroni and Jacob, 2013, reviewより抜粋、改変。

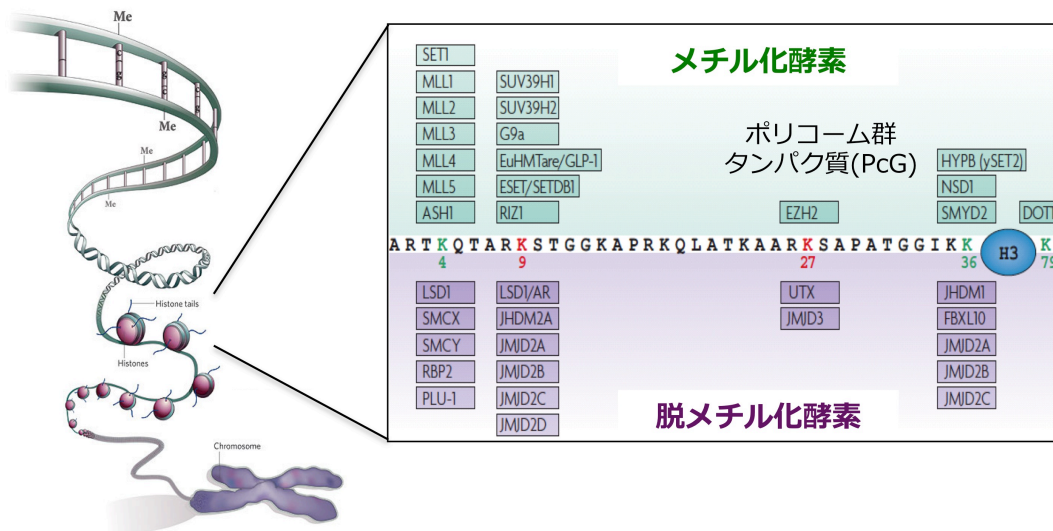


図1-1 ヒストンメチル化修飾酵素

Shi, 2007, reviewより抜粋、改変。

ヒストンH3の特異的リジン残基に対するヒストンメチル化酵素およびヒストン脱メチル化酵素。メチル化されるリジン残基はヒストンH3でのリジンK4,9,27,36,79が存在する。

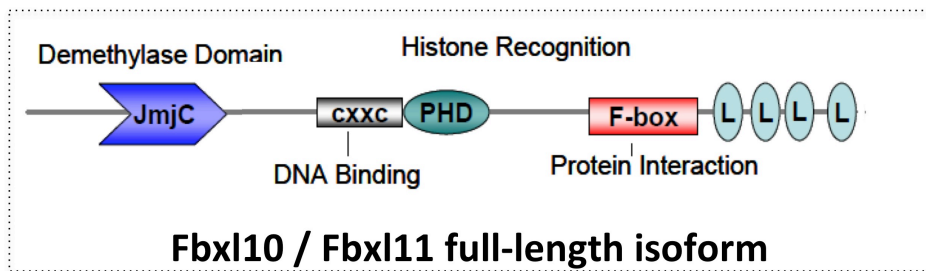
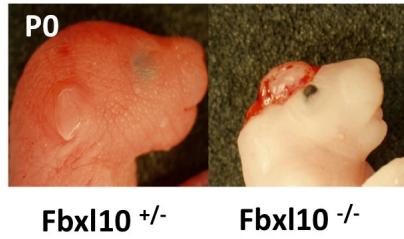


図1-2 Fbx10およびFbx11のドメイン構造

(A)



(B)

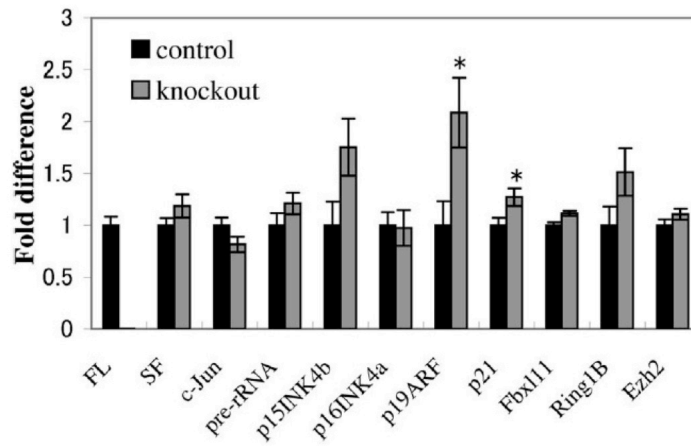


図1-3 Fbx10欠損マウスの表現型

Fukuda et al., 2011より抜粋。

(A)Fbx10欠損マウスは神経管閉鎖不全による外脳症を呈する。

(B)Fbx10欠損マウスにおいてp19^{ARF}とp21^{Cip1}の発現は亢進する。

2. 実験手法

2.1. ES 細胞の培養

C57BL/6N 由来の ES 細胞である JM8. A3 細胞 (Pettitt et al., 2009) は 0.1%ゼラチン上にて、leukemia inhibitory factor (LIF) および $1 \mu\text{M}$ PD0325901 (Axon), $3 \mu\text{M}$ CHIR99021 (Biovision) (Ying et al., 2008; Silva and Smith, 2008) を添加した M15G 培地 (KNOCKOUT DMEM [Life Technologies], 100nM 2-メルカプトエタノール, $1 \times$ GlutaMax [Life Technologies], 15% Fetal Bovine Serum (FBS)) で 37°C 、5% CO_2 の条件下で培養した。

2.2. Fbx111 遺伝子改変マウスの作製

Fbx111 ターゲティングベクター (Clone : PG00184_Z_8_C04) は KOMP (Knockout Mouse Project) より購入した。25 μg の Fbx111 ターゲティングベクターを AsiS1 で線状化して、電気穿孔法 (230V, 500 μF) により 1×10^7 の JM8. A3 細胞に導入し、ネオマイシン耐性のマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) 上に播種した。24 時間後に G418 (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Nakarai) を添加し、7 日間の選別後、クローン化した ES 細胞からゲノム DNA を GenLysis Buffer (20mM Tris-HCl [pH8.0], 1mM EDTA, 5mM NaCl, 1.0% SDS, 0.5% Igepal, 0.5% Tween-20, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A, 1mg/ml Proteinase K) により抽出し、PCR 法によるスクリーニングにより相同組換え体を同定した。PCR によるスクリーニングには抽出したゲノム DNA を鋳型として、以下のプライマーを用いて、Fbx111 ターゲティングにおける相同組換え体 (*Fbx111*^{+/neo} ES 細胞) を同定した。

[5'arm]	F	5'-CATAATAGCGGTAAGTACTAGATGGACAGTTAG-3'
	R	5'-GGACTAACAGAAGAACCCGTTGTG-3'
[3'arm]	F	5'-GAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTAC-3'
	R	5'-GATTAGGTTGCTATATTCATCTCCTCAAG-3'

Fbx111^{+/*neo*} ES 細胞をインジェクションした C57BL/6J マウスの胚盤胞を、偽妊娠 MCH マウスの子宮に移植し、キメラマウスを作製した。誕生した雄のキメラマウスと、雌の C57BL/6J マウスとを交配し、生殖系列に相同組換えが伝播した *Fbx111*^{+/*neo*} マウスを得た。*Fbx111*^{+/*lacZ*} レポーターマウス、*Fbx111*^{+/*flox*} マウス、*Fbx111*^{+/-}マウスを得るために、*Fbx111*^{+/*neo*} マウスと CAG-Cre マウス (Sakai and Miyazaki, 1997) および CAG-Flpe マウス (Kanki et al., 2006) を交配した。*Fbx111*^{+/*flox*} マウスの自家交配により *Fbx111*^{*flox/flox*} を取得し、*Fbx111*^{*flox/flox*} と *Emx1*-Cre マウスとの交配により、神経特異的 *Fbx111* 欠損マウス、すなわち *Emx1*-Cre;*Fbx111*^{*flox/flox*} (*Fbx111* cK0) マウスを作製した。本研究における全ての動物実験は、東京大学動物実験実施マニュアルおよび大分大学動物実験規則集に基づいて行われた。

2.3. 胎子の採取

Fbx111 レポーターマウスを作製するために、雄の *Fbx111*^{+/*lacZ*} マウスと雌の C57BL/6J マウスを交配させ、*Fbx111* 欠損マウスの作製には *Fbx111*^{+/*neo*} マウス同士、あるいは *Fbx111*^{+/-} マウス同士を交配させた。また、*Fbx111* cK0 マウスの作製には *Emx1*-Cre;*Fbx111*^{+/*flox*} マウスと *Fbx111*^{*flox/flox*} マウスを交配させた。プラグチェックにより臍栓を確認した日の正午を受精後 0.5 日 (E0.5) とし、E8.5~E18.5 の胎子を採取した。胎子の遺伝子型は卵黄囊あるいは尻尾に 50mM NaOH を加えて 95°C 10 分間加熱処理後、pH8.0 の 1M Tris を加えることによりゲノム DNA を抽出し、それを鋳型として PCR を行うことにより判定した。PCR には以下のプライマーを用いた。lacZ アリル: lacZF/ lacZR、neo アリル: Forward③/Reverse④、flox アリル: Forward①/Reverse②、null アリル: Forward1①/Reverse④のプライマーセットで検出した (図 3-1A)。

Forward ①	5'-CATCTTCAGCCCTGATCTTTGT-3'
Reverse ②	5'-CACAACCTGGAGCTGTACGA-3'
Forward ③	5'- CACAACCTGGAGCTGTACGA-3'
Reverse ④	5'-ACATTTGAGAAGCACTGTACCA-3'
lacZ F	5'- CACACCTCCCCCTGAACCTGAAAC-3'
lacZ R	5'-GTCTGAGCTCGCCATCAGT-3'

2.4. X-gal 染色

採取した E7.5~E16.5 の胎仔を X-gal 固定液 (1%PFA, 0.2%Glutaraldehyde, 2mM MgCl₂, 0.02%NP-40) で固定した後、洗浄バッファー (2mM MgCl₂, 0.02% NP40, 0.01% Sodium deoxycholate) で洗浄し、染色バッファー (5mM K₃Fe (CN)₆, 5mM K₃Fe (CN)₆•3H₂O, 2mM MgCl₂, 0.02%NP40, 0.01% Sodium deoxycholate, 1mg/mL X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)) で染色した。Xgal により染色された胎仔および胎仔脳は ScaleA2 (4M Urea, 0.1%TritonX-100, 10%グリセロール) を用いて透明化处理を行い (Hama et al., 2011)、光学顕微鏡で観察した。

2.5. 神経幹細胞の培養(ニューロスフェア培養)

E14.5 胚の脳皮質を顕微鏡下で無菌的に切り出し、20ng/mL bFGF (R&D) および 2 μg/mL Heparin (Sigma) を添加した Neural Culture Medium (DMEM / F12, 1 x GlutaMax, N2 supplement, B27 supplement [Life Technologies]) に懸濁し、培養することによりニューロスフェアを形成させ、脳皮質由来神経幹細胞の純化培養を行った。培養は 37°C、5%CO₂、20%O₂、あるいはマルチガスインキュベーターを用いて 37°C、5%CO₂、5%O₂ の 2 つの異なる酸素濃度条件下で行った。神経幹細胞の増殖能は 5×10³ 個の脳皮質細胞を 6well plate に播種し、培養 7 日目に形成された 50 μm 以上のニューロスフェアの数をカウントすることにより評価した。

2.6. Cell titer Glo を用いた細胞生存能評価

神経幹細胞の生存率は Cell Titer-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を用いて評価した。1×10⁴ の脳皮質細胞を 96well 上に播き、7 日間培養した。生細胞の指標として ATP 存在下でルシフェリン発光を呈する Cell Titer-Glo reagent を培養した細胞に混合し、ルミノメーターで発光を測定した。

2.7. 神経分化培養

神経系細胞への分化培養にはニューロスフェア培養 4 日目の神経幹細胞を用いた。5×10³ の神経幹細胞を 15 μg/mL の Poly-ornithine (Sigma) および 1 μg/mL の Fibronectine (Sigma) でコーティングした 8well チャンバーおよび 6well plate に播

種し単層培養を行った。神経細胞への分化には Neural Culture Medium で 4 日間接着培養を行い、グリア細胞へは Neural Culture Medium に①20ng/mL Bmp4、LIF を添加して 4 日間、あるいは②1%FBS を添加して 8 日間接着培養を行うことにより分化誘導した。

2.8. 免疫細胞化学染色

8well チャンバースライドで分化培養した神経系細胞は PBS (NaCl, KCl, Na₂HP0₄ · 12H₂O, KH₂PO₄) で洗浄後、4%PFA-PBS で 15 分間室温にて固定した。再度 PBS で洗浄し、0.1% Triton-PBS で 15 分間室温にて透過処理を行った。次に、TNB blocking reagent (0.5% blocking reagent [Perkin Elmer], 0.1M Tris-HCl pH7.5, 0.15M NaCl) で室温 1 時間ブロッキング処理を行い、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体を反応させて一晩 4°C でインキュベートした。一次抗体と反応させたチャンバースライドを PBST (0.05% Tween20-PBS) で洗浄後、Alexa Fluor 標識二次抗体 (Life technologies) を室温で 1 時間反応させ、Perma Fluor (Thermo) で封入した後、蛍光顕微鏡 BZ-9000 (Keyence) 下でシグナルを検出した。使用した一次抗体は rabbit 抗 Fbx111 抗体 (1:100, Abcam)、mouse 抗 Tuj1 抗体 (1:1000; Covance)、rabbit 抗 Tuj1 抗体 (1:1000; Covance)、mouse 抗 Nestin 抗体 (1:500; B&D)、mouse 抗 GFAP 抗体 (1:500; Sigma) である。二次抗体は Alexa Fluor 488 標識 Donkey-anti-mouse IgG 抗体 (Invitrogen)、Alexa Fluor 555 標識 Donkey-anti-rabbit IgG 抗体 (Invitrogen) を 1:500 の希釈濃度で使用した。

2.9. 組織学的解析

組織学的解析は標準的なプロトコールに基づいて行った。

E10.5 胚、E14.5 前脳および E17.5 前脳は一晩 4°C にて 4%PFA を用いて固定した後、30%スクロースで一晩 4°C にて置換処理を行い、Tissue-Tek O.C.T compound (Sakura Finetek) に包埋した。クライオスタットを用いて包埋した凍結ブロックから 8~10 μm の切片を作製した。作製した切片は PBS 洗浄により O.C.T compound を除去した後、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色および免疫組織化学染色に供した。

生後 0 日 (P0) および P10 の前脳は、ジエチルエーテルにより麻酔したマウスを還流固定した後に取り出し、一晩 4°C にて 4%PFA で浸漬固定した。エタノールにより段階的に脱水し、キシレンに透徹した後、パラフィンに包埋した。マイクロトームを用いて包埋し

たパラフィンブロックから 8~10 μ m の切片を作製した。作製した切片はキシレンでパラフィンを除去した後、段階的にエタノール濃度を下げることにより親水化し、HE 染色および免疫組織化学染色に供した。

2.10. Hematoxylin-Eosin (HE) 染色

2.9. 組織学的解析で処理した切片を使用した。

切片を PBS で洗浄した後、ヘマトキシリンで核染色を行い、流水で洗浄した。その後エオシンで細胞質染色を行い、流水で洗浄後、エタノール、キシレン処理を行い透徹した。スライドは乾燥させた後に Perma Fluor (Thermo) で封入した。

2.11. 免疫組織化学染色

2.9. 組織学的解析で処理した切片を使用した。

切片を PBS で洗浄した後、10mM Sodium Citrate で 105°C 15 分間オートクレーブ処理することにより抗原賦活化を行った。室温まで冷却した後、PBS で洗浄し、0.1% TritonX100-PBS で 15 分間室温にて透過処理を行った。次に、TNB blocking reagent で室温 1 時間ブロッキング処理をした後、ブロッキング溶液にて希釈した一次抗体を反応させて一晩 4°C でインキュベートした。一次抗体液を PBST で洗浄後、Alexa Fluor 標識二次抗体 (Life Technologies) を室温で 1 時間反応させ、Perma Fluor (Thermo) で封入した後、蛍光顕微鏡 BZ9000 (Keyence) 下でシグナルを検出した。使用した抗体は、mouse 抗 Nestin 抗体 (1:250; B&D)、rabbit 抗 Tuj1 抗体 (1:500; Covance)、mouse 抗 N-Cadherin 抗体 (1:250; B&D)、rabbit 抗 Cleaved-Caspase3 抗体 (1:250; Cell Signaling)、mouse 抗 Phospho-Histone3 抗体 (1:250; Cell Signaling)、rat 抗 CTIP2 抗体 (1:250; Abcam)、rabbit 抗 Cux1 抗体 (1:250; Santa Cruz)、goat 抗 Foxp2 抗体 (1:250; Santa Cruz)、rabbit 抗 Tbr1 抗体 (1:500; Abcam)、rabbit 抗 Tbr2 抗体 (1:500; Abcam)、mouse 抗 Glutamine Synthetase 抗体 (1:250; B&D)、mouse 抗 GFAP 抗体 (1:250; Sigma)、rabbit 抗 GFAP 抗体 (1:250; DAKO)、rabbit 抗 Iba1 抗体 (1:250; Wako) である。二次抗体は Alexa Fluor 488 標識 Donkey-anti-mouse IgG 抗体、Alexa Fluor 555 標識 Donkey-anti-rabbit IgG 抗体、Alexa Fluor 647 標識 Donkey-anti-goat IgG 抗体、Alexa Fluor 488 標識 Donkey-anti-rat IgG 抗体 (Invitrogen) をそれぞれ 1:500 の倍率で使用した。核の染色

は DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 1 μ g/ml で行った。

2.12. ウェスタンブロッティング

E8.5~E12.5 の胎仔全組織、E14.5 大脳皮質、E14.5 大脳皮質由来培養 4 日目のニューロスフェアを回収した後、2×サンプルバッファー(125mM Tris-HCl pH6.8, 10% 2-メルカプトエタノール, 4%SDS, 20%グリセリン, 0.01% ブロモフェノールブルー) に懸濁し、95°Cで5分間熱変性させることによりタンパク試料を調製した。試料は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、セミドライトランスファーあるいはウェットトランスファーにより PVDF(PolyVinylidene DiFluoride)膜に転写した。転写した PVDF 膜に 5%スキムミルク-TBST (Tris buffered saline containing 0.1% Tween20; 25mM Tris, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.1% Tween20) あるいはブロックエース (DS ファーマバイオメディカル) をを加えて、60 分間室温ブロッキング処理を行い、ブロッキング剤で希釈した一次抗体で一晩 4°Cにて抗体反応を行った。PVDF 膜を TBST で洗浄した後、ブロック剤で希釈した HRP 標識 Donkey-anti-mouse IgG 抗体あるいは HRP 標識 Donkey-anti-rabbit IgG 抗体 (GE ヘルスケア) で室温 60 分の抗体反応を行った。PVDF 膜を Chemilumi One L (Nakarai) または、Immunostar zeta (Wako) に反応させて生じた化学発光シグナルを CCD カメラ LAS4000mini (GE ヘルスケア) により検出した。使用した一次抗体は rabbit 抗 Fbxl11 抗体 (1:1000; Abcam)、rabbit 抗 p53 抗体 (1:1000; Leica)、rabbit 抗 H3K36me1 抗体 (1:1000; Abcam)、rabbit 抗 H3K36me2 抗体 (1:1000; Abcam)、rabbit 抗 H3K36me3 抗体 (1:1000; Abcam)、rabbit 抗 H3K4me 抗体 (1:1000; Abcam)、rabbit 抗 H2AK119ub 抗体 (1:1000; Millipore)、Mouse 抗 Ring1B 抗体 (1:1000; MBL)、rabbit 抗 Ezh2 抗体 (1:1000; Cell Signaling)、rabbit 抗 Cleaved-Caspase3 抗体 (1:1000; Cell Signaling)、Mouse 抗 Gapdh 抗体 (1:10,000; Millipore)、rabbit 抗 H3 抗体 (1:10,000; Abcam)、抗 Actin 抗体 (1:10,000; Sigma) である。内在性の pan-p53 を検出するための陽性コントロールは 1 μ M Adriamycin で 6 時間処理した野生型の MEF を使用した。

2.13. リアルタイム PCR 解析

E8.5 および E10.5 の胚組織、神経系細胞の total RNA は Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel) を用いて抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA

Remover (TOYOBO)を用いて 100-500ng の total RNA から cDNA (complementary DNA) を逆転写反応により合成し、 THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (TOYOBO)を用いてリアルタイム PCR 反応を行い、Light Cycler 480 System (Roche) または Light Cycler 96 System (Roche) を用いて解析した。サンプル間の遺伝子発現量の差は $\Delta \Delta Ct$ 法を用いて評価した。解析に使用したプライマーは表 2 に示す。

2.14. 統計学的解析

結果は平均値±標準誤差 (SE) で示し、統計解析処理法として Student t-test を行った。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

2.15. DNA マイクロアレイ解析

DNA マイクロアレイの試料には、E14.5 の大脳皮質由来の神経幹細胞をコントロールマウスおよび Fbx111 cKO マウスより採取し、5% O_2 、あるいは 20% O_2 条件下で 4 日間培養したニューロスフェアを用いた。total RNA の抽出には Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel) を用いて、その品質はアガロースゲル電気泳動による 28s/18s リボソーム RNA のシグナルの確認および、NanoDrop 2000c (Thermo) を用いた A_{260}/A_{230} 値のチェックにより評価した。

50ng あるいは 100ng の total RNA から、Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent)、RNA Spike-In Kit (Agilent) により Cy3 ラベル化 cRNA (complementary RNA) を合成した。Gene Expression Hybridization Kit (Agilent) により cRNA を断片化処理し、オリゴ DNA マイクロアレイチップ (8×60K) 上で 65°C の条件で 17 時間ハイブリダイゼーションを行った。マイクロアレイチップを洗浄後、Agilent 社の G2565BA スキャナーを用いて蛍光シグナルの読み取りを行った。Feature Extraction ソフトウェアによりシグナルの数値化を行い、2 倍以上の発現変動のあった遺伝子を抽出した。2 倍以上の発現変動のあった遺伝子に対して Gene Spring GX ソフトウェアや DAVID により Gene Ontology 解析、ベン図解析を行うことにより、生物学的意義について検討した。

gene	F/R	Sequence	gene	F/R	Sequence
Fbxl11	F	5'-GCCAAGGCACTTGAAAGAAA-3'	GFAP	F	5'-ACCAGCTTACGGCCAACAG-3'
	R	5'-AGCAGCCTCGAACACTCATT-3'		R	5'-CCAGCGATTCAACCTTTCTCT-3'
Fbxl10	F	5'-GTTTCACTGACTTCCACATTGACTTT-3'	Hes1	F	5'-AAACGAAAATGCCAGCTGAT-3'
	R	5'-GCAGGGTTGGAGGGATCAG-3'		R	5'-GTCTTTGGTTTGTCCGGTGT-3'
Ezh2	F	5'-ACTGCTGGCACCCTCTGATG-3'	Hes5	F	5'-AGAAAAACCGACTGCGGAAGCC-3'
	R	5'-TCCTGAGAAATAATCTCCCCACAG-3'		R	5'-CGCTGGAAGTGGTAAAGCAGCTT-3'
Ring1B	F	5'-AGACTTCAGGCAATGCCACT-3'	Ngn2	F	5'-GACATTCCCGACACACAC-3'
	R	5'-GGAGCCATTTAAAACGGTGA-3'		R	5'-CCCAGCAGCATCAGTACCTC-3'
p15 Ink4b	F	5'-AGATCCCAACGCCCTGAAC-3'	Gad1	F	5'-CACAACTCAGCGGCATAGA-3'
	R	5'-TCGTGCACAGGTCTGGTAAG-3'		R	5'-CTGGAAGAGGTAGCCTGCAC-3'
p16 Ink4a	F	5'-GTACCCCGATTTCAGGTGATG-3'	Gad2	F	5'-AGAGAGGGCCAACTCTGTGA-3'
	R	5'-AGGACCCCACTACCTTCTCC-3'		R	5'-CTCTGCATCAGTCCCTCCTC-3'
p18 Ink4c	F	5'-CGTCAACGCTCAAAATGGAT-3'	Lhx6	F	5'-TCGTTGAGGAGAAGGTGCTT-3'
	R	5'-TGACAGCAAAACCGTTCCA-3'		R	5'-CTTGGGCTGACTGTCCTGTT-3'
p19 Ink4d	F	5'-GCAGGTCATGATGTTTGGAA-3'	Dlx2	F	5'-CGGACAAGGAAGACCTTGAG-3'
	R	5'-TAGTACCGGAGGCATCTTGG-3'		R	5'-GGAGTAGATGGTGCCTGGTT-3'
p19 Arf	F	5'-GCTCTGGCTTTCGTGAACATG-3'	P2rx7	F	5'-GGCACTGGAGAAAATTTGA-3'
	R	5'-TCGAATCTGCACCGTAGTTGAG-3'		R	5'-TGAGCAAGTCAATGCACACA-3'
p21 Cip1	F	5'-TTGCACTCTGGTGTCTGAGC-3'	Nr4a2	F	5'-GACCGGCTCTATGGAGATCA-3'
	R	5'-TCTGCGCTTGAGTGATAGA-3'		R	5'-CTGGGTTGGACCTGTATGCT-3'
p27 Kip1	F	5'-GGGTCTCAGGCAAACTCTGA-3'	Lrdd	F	5'-CACCGTGTGAATCTCATTGC-3'
	R	5'-TCTGTTGGCCCTTTTGTGTTT-3'		R	5'-CAGGGTGGCATCTACCTTGT-3'
p57 Kip2	F	5'-GGAGCAGGACGAGAATCAAG-3'	Dcxr	F	5'-TGAATGCAGTAAACCCACACA-3'
	R	5'-GTTCTCCTGCGCAGTTTCTCT-3'		R	5'-TTCTCCACCTCAGCGAACTT-3'
p53	F	5'-CTCTCCCCGCAAAAGAAAAA-3'	Ecel1	F	5'-ATGACCCAGACTTCCCACAG-3'
	R	5'-CGGAACATCTCGAAGCGTTTA-3'		R	5'-CAGTGCAACAGGTTTCTGA-3'
Nestin	F	5'-AGCCATTGTGGTCTACGGAAG-3'	Arid5a	F	5'-ATGATGAACTTGCGGGTAGC-3'
	R	5'-TCCACACACCCCACTGGTT-3'		R	5'-ATATGGGAGGACCAGCCTCT-3'
Tuj1	F	5'-CGCCTGCCTTTTCGTCTC-3'	Gapdh	F	5'-ATGAATACGGCTACAGCAACAGG-3'
	R	5'-ATCTGGTTGCCGCACTGG-3'		R	5'-CTCTTGCTCAGTGTCTTGTCTG-3'

表2 定量的RT-PCRに使用したプライマー配列情報

3. 結果

3.1. Fbx111 遺伝子改変マウスの作製

本研究では初期発生および神経発生における Fbx111 の生理的役割を調べるために、Fbx111 遺伝子改変マウス (Fbx111 レポーターマウス、全身性 Fbx111 欠損マウス、神経特異的 Fbx111 欠損マウス) を作製し、解析を行った。Fbx111 ターゲッティングストラテジーは図 3-1A に示した。KOMP (NIH Knockout Mouse Project) から購入した Fbx111 ターゲッティングベクターは、FRT 配列で挟まれた lacZ-neo カセットと、その下流に loxP 配列で挟まれた標的エクソン (exon7~9) を有し、標的エクソンは Fbx111 のヒストン脱メチル化酵素活性を持つ Jumonji ドメインをコードしていた (Tsukada et al., 2006)。FRT 配列は Flpe 組換え酵素存在下、loxP 配列は Cre 組換え酵素存在下で部位特異的組換えを起こす配列である。lacZ カセットは Fbx111 の発現局在解析のために、neo カセットはネオマイシン耐性 ES 細胞の選択のために用いられた。この Fbx111 ターゲッティングベクターを C57BL/6N マウス由来の JM8. A3 ES 細胞にエレクトロポレーション法により遺伝子導入し、G418 でネオマイシン耐性遺伝子に対する薬剤選択を行った後、ES 細胞コロニーに対して PCR によるスクリーニングを行った。その結果、5550bp の 5' 側相同組換え領域と 8209bp の 3' 側の相同組換え領域を確認し、21.5% (4/19 クローン) の効率で相同組換え体 (*Fbx111*^{+/neo} ES 細胞) を得た (図 3-1B)。次に *Fbx111*^{+/neo} ES 細胞をインジェクションした C57BL/6J 由来の胚盤胞を、MCH 系統の偽妊娠マウス (日本クレア) の子宮内に移植することでキメラマウスを取得し、キメラマウスと C57BL/6J 野生型マウスとの交配により、生殖系列に伝播された *Fbx111*^{+/neo} マウスを得た。

この *Fbx111*^{+/neo} マウスと、CAG プロモーター下で全身性に Cre 相同組換え酵素を発現する CAG-Cre マウス (Sakai and Miyazaki, 1997)、および CAG プロモーター下で全身性に Flpe 相同組換え酵素を発現する CAG-Flpe マウス (Kanki et al., 2006) とを交配し、*Fbx111*^{+/lacZ} マウス、*Fbx111*^{+/Fllox} マウス、更に *Fbx111*^{+/-} マウスを得た。Fbx111 変異マウスの遺伝子型を決定するために、マウスの後肢からゲノム DNA を抽出し PCR 解析を行った。PCR により、*Fbx111*^{+/neo} マウスでは 550bp の野生型アレルと 625bp の Fbx111 neo アレル、*Fbx111*^{+/lacZ} マウスでは 244bp の Fbx111 lacZ アレルを検出した。同様に、

Fbx111^{+/*lox*} マウスでは 602bp の野生型アリルと 791bp の *Fbx111 flox* アリル、*Fbx111*^{+/-} マウスでは 3.2kbp の野生型アリルと 554bp の *Fbx111 null* アリルの PCR 産物を確認し、各マウスの遺伝子型を決定した (図 3-1C)。

3.2. 初期発生における *Fbx111* の機能解析

3.2.1. 胚発生における *Fbx111* の発現動態

Fbx111 の初期発生過程における機能を調べるために、lacZ レポーターマウスを用いて、胎生期における *Fbx111* の時空間的発現様式のプロファイリングを行った。*Fbx111*^{+/*lacZ*} 雄マウスに野生型の雌マウスを交配し、胎生 7.5 日 (E7.5)、E8.5、E10.5、E12.5、E14.5 での *Fbx111*^{+/*lacZ*} マウスの X-gal 染色を行った。*Fbx111* の遺伝子座にノックインされた lacZ レポーター遺伝子は、E7.5 から E14.5 にかけて全身性に広範囲に発現していた。特に、E14.5 においては前脳にその発現局在が観察された (図 3-2A)。

次に、発生過程における *Fbx111* の定量的発現解析を行うため、E8.5~E12.5 の野生型胚より RNA およびタンパク質を抽出し、リアルタイム PCR およびウエスタンブロット解析を行った。*Fbx111* mRNA およびタンパク質の発現レベルは、E8.5 と比較して、妊娠中期である E11.5 にかけて発現が上昇していた (図 3-2B, 3-2D)。一方で、*Fbx110* は *Fbx111* よりも早期の E8.5~E10.5 で高い発現を示した (図 3-2C)。これまでに、我々はノザンブロット解析により *Fbx111* が発生過程の胚組織および成体組織においてユビキタスに発現していることを明らかとしており (Fukuda et al., 2011)、今回の結果はそれを支持するものであった。*Fbx111* の発現動態の解析より、*Fbx111* が胎生中期において恒常的に発現することが示された。また、神経分化時期である E14.5 において中枢神経系での偏局在がみられたことから、初期発生のみならず中枢神経系においても機能することが示唆された (図 3-8)。

3.2.2. *Fbx111* 欠損マウスの表現型

初期発生における *Fbx111* の生理的機能を解析するために、*Fbx111* 欠損マウスを作製した。まず *Fbx111* 欠損マウスが正常に出生可能か調べるため、*Fbx111* のターゲッティングによって最初に作出される *Fbx111*^{neo/neo} マウスを用いて解析した。*Fbx111 neo* アリルにおいて、*Fbx111* 遺伝子座に挿入された lacZ カセットはスプライシング受容配列

(Splicing Acceptor Site)と終止コドン、polyA 配列を持つことから、Fbx111 の発現は理論上消失すると予想された。そこで *Fbx111*^{+/neo} マウス同士を交配し、*Fbx111*^{neo/neo} マウスを作製したところ、*Fbx111*^{neo/neo} の遺伝子型を持つ個体は得られなかった。このことから、Fbx111 の発現欠損は胎生致死を示すことが示唆されたため、*Fbx111*^{neo/neo} 胚に対して胎生解析を行った。その結果 *Fbx111*^{neo/neo} 胚は、E10.5 においてはメンデルの法則に従って取得できたものの、E12.5 では死亡した胚が観察され、E14.5 では胚が消失していた(表 3-1)。すなわち、Fbx111 欠損は E10.5 から E12.5 の期間に胎生致死を呈することが示された。次に、*Fbx111*^{+/neo} マウスと CAG-Cre マウスとの交配により、Fbx111 の機能ドメインを完全に欠失させた Fbx111 欠損(*Fbx111*^{-/-})マウスを作出し、胎生解析を行ったところ、*Fbx111*^{neo/neo} 胚と同様に *Fbx111*^{-/-}胚もまた E10.5 以降で生存胚を取得することが出来なかった(表 3-2)。E10.5 全胚組織を用いてウェスタンブロット解析を行い、*Fbx111*^{neo/neo}胚および *Fbx111*^{-/-}胚での Fbx111 の遺伝子の発現欠損についてタンパク質レベルで確認した(図 3-3A)。

次に、E8.5 から E10.5 における *Fbx111*^{-/-}胚の形態的解析を行った(図 3-3B)。E8.5 から E10.5 の *Fbx111*^{-/-}胚はメンデルの法則通りに得られ(表 3-2)、実体顕微鏡下で心臓の拍動も観察された。E8.5 では *Fbx111*^{-/-}胚とコントロール(*Fbx111*^{+/+}および *Fbx111*^{+/-})胚のサイズに大きな違いは観察されなかったものの、E9.5 および E10.5 において *Fbx111*^{-/-}胚は発生に障害が見られた(図 3-3B)。コントロール胚では E8.5 から E9.5 にかけて見られる胚の尾方が 180 度反転する現象(Embryonic turning)が *Fbx111*^{-/-}胚では遅れて E10.5 で観察された(図 3-3B)。さらに、正常胚では E9.5 に神経管の背側閉鎖(neural tube closure)が完了するが、*Fbx111*^{-/-}胚は E10.5 においても神経管閉鎖不全を呈していた(Data not shown)。すなわち、*Fbx111*^{-/-}胚の胎仔サイズの減少や Embryonic turning の遅延、神経管閉鎖不全といった表現型を示し、Fbx111 欠損マウスは E8.5 ~ E10.5 の発生過程において成長遅延を呈し、胎生致死を示すことが明らかとなった。

3.2.3. Fbx111 欠損胚における細胞増殖および細胞死

Fbx111 欠損マウスにおける成長遅延の詳細な表現型を明らかにするために、組織化学的解析を行った。胎生期から生後期にかけて *Fbx111*^{+/+}マウスの形態的特徴は *Fbx111*^{+/+}マウスと同様であった(Data not shown)ため、以下の解析には *Fbx111*^{+/+}マウスを

Fbx111^{-/-}マウスと比較するためのコントロールとして使用した。

まず、E10.5 胚に対する HE 染色を行い、E10.5 で顕在する中枢神経系と心臓に対する組織解析を行った。E8.5 から E10.5 の発生中期のマウス脳では神経管から後脳、中脳、前脳(終脳)と後方より神経分化が進行することが知られている。E10.5 の *Fbx111*^{-/-}胚においては神経上皮構造は正常であり、後脳部において神経上皮細胞層の厚さには変化はみられなかったものの、前脳において神経上皮細胞層が減少していた(図 3-4A, 3-4B)。一方、心臓のもととなる管状の原始心筒は E9.5 において心ループを形成し、左右の心室を形成する(Laugwitz et al., 2008)。E10.5 の *Fbx111*^{-/-}胚では心臓組織は小さく、心ループの形成が不完全であり、管状の心組織が観察された(図 3-4C, 3-4D)。これらの結果から、*Fbx111*^{-/-}胚では中枢神経系や心臓における表現型が示され、発生中期の器官形成に遅延が生じることが示唆された。我々は、*Fbx111* のパラログである *Fbx110* の遺伝子欠損マウスが外脳症を発症し、神経前駆細胞の細胞増殖異常や分化異常といった表現型を生じることが報告している(Fukuda et al., 2011)。そこで、*Fbx110* と同様に神経発生における *Fbx111* の機能を予想して、E10.5 の *Fbx111*^{+/-}および *Fbx111*^{-/-}胚の水平断面に対して、神経幹細胞マーカーNestin、神経細胞マーカーTuj1、神経系の未分化細胞に発現する細胞接着マーカーN-cadherin の免疫染色を行った。その結果、Nestin と N-cadherin の発現動態には違いは見られなかった。一方で Tuj1 は *Fbx111*^{-/-}胚の後脳領域においてはコントロール胚と同様の発現が認められたが、前脳部の発現が消失していた(図 3-4E)。E10.5 の *Fbx111*^{-/-}胚では前脳部における神経分化マーカーの発現が消失していたことから、特に前脳部での神経発生に障害が生じていることが確認された。次に、心臓や中枢神経系における発生遅延には、細胞増殖および細胞死が関与することが予想されたため、E10.5 の頭部組織に対する細胞周期 M 期マーカーである Phospho-Histone 3 (PH3)、アポトーシスマーカーCleaved-Caspase 3 (CC3)の検出を行った。その結果、*Fbx111*^{-/-}胚では増殖性の神経上皮細胞が存在する側脳室において PH3 陽性の M 期細胞が減少し、一方で、神経上皮細胞層だけでなく、神経堤細胞および間充織細胞でも CC3 陽性のアポトーシスを起こした細胞が有意に増加していた(図 3-5)。さらに、胸部や尾部の組織においてもアポトーシス陽性細胞が顕著に観察された(Data not shown)。以上の結果から、全身性の細胞増殖能低下と細胞死亢進が *Fbx111* 欠損マウスの成長遅延の一因であることが示唆された。

3.2.4. Fbxl11 による細胞周期調節因子の発現調節

最近の報告から、Fbxl11 はヒストン脱メチル化を介して p15^{Ink4b} と p27^{Kip1} の発現を調節することにより、間葉系幹細胞の細胞増殖を調節することが示されている (Gao et al., 2013)。また、我々は E8.5 胚において Fbxl10 が p19^{ARF} および p21^{Cip1} の遺伝子発現を抑制することにより、細胞増殖に寄与することを見出している (Fukuda et al., 2011)。Fbxl11 もまた *in vivo* において細胞周期の調節に寄与するのかを決定するために、E8.5 胚における細胞周期調節因子 (p15^{Ink4b}、p16^{Ink4a}、p19^{ARF}、p18^{Ink4c}、p19^{Ink4d}、p21^{Cip1}、p27^{Kip1}、p57^{Kip2}) の発現をリアルタイム PCR により解析した。その結果 E8.5 の *Fbxl11*^{-/-} 胚において p21^{Cip1} の発現が有意に上昇しており、一方で p19^{ARF}、p18^{Ink4c}、p19^{Ink4d}、p27^{Kip1}、p57^{Kip2} の発現には有意な変化は見られなかった (図 3-6A)。また、p15^{Ink4b}、p16^{Ink4a} は E8.5 胚では検出限界以下だった (Data not shown)。

がん抑制因子として知られる p53 は細胞増殖やアポトーシス両方に重要な役割をもち、また、p21^{Cip1} の転写を活性化することが知られている (Wood and Shilatifard, 2006)。そこで、リアルタイム PCR およびウエスタンブロット解析により、コントロール胚と *Fbxl11*^{-/-} 胚での p53 の転写レベルとタンパクレベルの発現を解析した。その結果、*Fbxl11*^{-/-} 胚では、コントロール胚と比較して p53 の転写レベルには変化が見られなかった (図 3-6A)。アドリマイシン処理を施した MEF を陽性コントロールとして、コントロール胚と *Fbxl11*^{-/-} 胚での p53 タンパク質の発現を解析したところ、p53 のタンパクレベルでの発現亢進は検出されなかった (図 3-6B)。従って、Fbxl11 は p53 の発現誘導を介さずに、p21^{Cip1} の発現を制御していることが示された。

3.2.5. Fbxl11 欠損によるヒストン修飾への影響

ヒストン H3K36 と H3K4 メチル化は標的遺伝子の発現亢進に関与する (Noma et al., 2001; Wagner and Carpenter, 2012) が、Fbxl11 は近傍遺伝子の発現抑制を導くメチル化 H3K36 およびメチル化 H3K4 の脱メチル化を触媒することが知られている (Bartke et al., 2010; Tsukada et al., 2006)。そこで Fbxl11 が関与するヒストン修飾レベルについてウエスタンブロット解析を行った。その結果、予想に反して、E10.5 胚の全組織をライセートとして用いた結果では、コントロールと *Fbxl11*^{-/-} 胚の間でヒストン H3K36me1、H3K36me2、H3K36me3、H3K4me3 の発現レベルには変化は見られなかった (図

3-7A)。

近年、Fbx111 のホモログである Fbx110 が、マウス ES 細胞においてポリコーム群タンパク質 (Polycomb group protein: PcG) と相互作用することにより遺伝子発現制御することが報告された (Farcas et al., 2012; Kottakis et al., 2011; Tzatsos et al., 2011; Wu et al., 2013)。PcG はヒストン修飾 (H3K27me3、H2AK119ub) による遺伝子サイレンシングを介して幹細胞分化、がん化、老化を含む生体の恒常性維持に関与する。最近の報告では、マウス ES 細胞での Fbx110 ノックダウンは PcG 構成因子である Ezh2 や Ring1B の発現を変化させることなくヒストン H2A のユビキチン化を減少させ、Fbx110 がヒストンユビキチン化の触媒作用を介して PcG の下流遺伝子発現制御に関与することが明らかとされている (Farcas et al., 2012; Wu et al., 2013)。そこで、E10.5 のコントロールおよび *Fbx111*^{-/-} 胚を用いてヒストン H2A ユビキチン化レベル、PcG 主要構成因子 Ring1B および Ezh2 の mRNA レベル、タンパクレベルでの発現定量解析を行った。その結果、E10.5 の *Fbx111*^{-/-} 胚において H2A ユビキチン化レベルの低下が認められた (図 3-7A)。また、Ring1B の mRNA 発現およびタンパク質発現量は変化しなかった (図 3-7B, 3-7C)。ES 細胞における Fbx110 と同様に、Fbx111 は Ring1B の発現に影響することなく、H2A ユビキチン化を制御する可能性が示唆された。しかし一方で、*Fbx111*^{-/-} 胚において Ezh2 の mRNA 発現量に変化はなかったが、タンパク質発現量が有意に低下していた (図 3-7B, 3-7C)。MEF での Fbx110 のノックダウン実験により、Fbx110 がマイクロ RNA の発現調節を介して Ezh2 の発現を正に制御しており、PcG の標的遺伝子の発現を Fbx110 がコントロールしうることが報告されている (Tzatsos et al., 2011)。Fbx111 欠損マウスにおける Ezh2 タンパク発現量の低下から、MEF での Fbx110 と同様に、Fbx111 もまたマイクロ RNA を介した Ezh2 の翻訳調節に関与する可能性も考えられた。

これらの結果より、初期発生において Fbx111 は PcG の主要構成因子である Ezh2 の発現および PcG が介する H2A のユビキチン化レベルを正に制御することから、PcG による遺伝子発現制御に関与する可能性が示された。

3.3 神経発生における Fbx111 の機能解析

3.3.1. 神経発生過程における Fbx111 の発現動態

Fbx111 レポーターマウスによる解析より、神経分化時期である E14.5 において Fbx111 の発現が中枢神経系に強く局在する (図 3-2A) ことから、発生期の神経系において Fbx111 が機能することが期待された。そこでまず、中枢神経系での局在部位を詳細に解析するために、E12.5、E14.5、E16.5 における野生型マウスおよび *Fbx111^{+lacZ}* マウスの胎仔脳を取り出し X-gal 染色を行った。その結果、Fbx111 は神経分化時期である E14.5 以降の前脳に強く発現していることが示された (図 3-8)。

脳の大脳皮質は多様な神経細胞とグリア細胞で構成されており、それらは発生期に神経幹細胞より秩序正しく分化する。まず大脳皮質における Fbx111 の発現時期と細胞種を特定する目的で、E14.5 の野生型マウスの大脳皮質より神経幹細胞を採取し、神経細胞およびグリア細胞へ分化誘導した後、それぞれの細胞を回収した (図 3-9A)。①神経幹細胞は bFGF 存在下でのニューロスフェア培養 (Reynolds and Weiss, 1992; Kawaguchi et al., 2001; Shimazaki et al., 2001) により、②神経細胞は培養 4 日目のニューロスフェアをさらに 4 日間 bFGF 非存在下で接着培養することにより取得した。③グリア細胞は培養 4 日目のニューロスフェアをさらに 8 日間 1%FBS 存在下で接着培養することにより取得した。それぞれの培養条件 (①, ②, ③) で取得した細胞に対して神経幹細胞マーカー Nestin、神経細胞マーカー Tuj1、グリア細胞マーカー GFAP、および Fbx111 の発現をリアルタイム PCR により検出した。その結果、Fbx111 は神経幹細胞 (①)、グリア細胞 (③) 培養条件と比較して神経分化条件 (②) で培養した細胞集団に高発現であった (図 3-9B)。さらに、神経分化培養条件 (②) で培養した細胞に対して神経細胞マーカー Tuj1 抗体と Fbx111 抗体による免疫染色を行ったところ、Tuj1 陽性細胞と Fbx111 強陽性細胞が共局在していた (図 3-9C)。以上より、Fbx111 は神経幹細胞から神経細胞に分化する過程において発現が増加し、分化した神経細胞において強く発現することが示された。

3.3.2. 神経特異的 Fbx111 欠損マウスの表現型

神経幹細胞から神経細胞へ分化する時期にかけて Fbx111 の発現が増加したことから、神経分化制御に対する Fbx111 の機能が強く支持された。しかしながら、作製した全身

性の *Fbx111* 欠損マウスでは E10.5 前後の胎生中期に成長遅延を伴い致死を呈した(表 3-1, 3-2, 図 3-3B)ため、初期の神経分化時期における *Fbx111* の機能解析を行うことが困難であった。そこで、神経発生における *Fbx111* の生理的機能を調べるために、*Emx1*-Cre マウス(Iwasato et al., 2004; Gorski et al., 2002)との交配により、神経特異的 *Fbx111* 欠損(*Fbx111* cKO)マウスを作製することとした。*Emx1*-Cre マウスは E10.5 から *Emx1* の発現部位である大脳皮質領域で Cre-loxP 組換えを開始し、E12.5 には大脳皮質を構成する全ての細胞で組換えが完了することが報告されている。

まず *Fbx111*^{+/*neo*} マウスに全身性に Flpe 酵素を発現する CAG-Flpe マウスとの交配により *Fbx111*^{+/*flox*} マウスを取得した。*Fbx111*^{+/*flox*} マウスと *Emx1*-Cre マウスを交配することにより、ヘテロ変異マウスである *Emx1*-Cre; *Fbx111*^{+/*flox*} マウスを作製した。得られた *Emx1*-Cre; *Fbx111*^{+/*flox*} マウスは雌雄共に外見上正常であり、交配可能であった。さらに *Emx1*-Cre; *Fbx111*^{+/*flox*} マウスと *Fbx111*^{*flox/flox*} マウスとの交配で *Fbx111* cKO (*Emx1*-Cre; *Fbx111*^{*flox/flox*}) マウスを作製した。*Fbx111* cKO マウスは生後 10 日 (P10)においてはメンデルの法則通りに取得することが出来た(表 3-3)。

Emx1-Cre により組み換わる部位の詳細な同定を試みるべく、Stop カセットの両端に loxP 配列を持ち、その下流に GFP カセットが挿入された Rosa-loxP-STOP-loxP-GFP マウスを *Emx1*-Cre マウスと交配することにより組換え部位が GFP で追跡できるようにした。*Emx1*-Cre;loxP-GFP マウスの E14.5 の前脳大脳皮質に GFP の発現が確認された(図 3-10A)ことから、E14.5 の大脳皮質では *Fbx111* が欠損することが十分に予想された。実際には、*Fbx111* cKO マウスの E14.5 大脳皮質よりタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット解析により *Fbx111* がタンパク質レベルで欠損していることを確認した(図 3-10B)。

最初に *Fbx111* の発現が増加する胎生期の神経分化時期(E14.5 および E17.5)の大脳皮質に対して組織学的解析を行った。まず HE 染色により E17.5 のコントロールと *Fbx111* cKO マウスの大脳皮質を比較した所、*Fbx111* cKO マウスの大脳皮質層の厚さに有意な変化は認められなかった(図 3-10C)。さらに、神経幹細胞マーカー Nestin、神経細胞マーカー Tbr1、および神経前駆細胞マーカー Tbr2 の発現を免疫染色により調べたところ、E14.5、E17.5 の大脳皮質において Nestin、Tbr1、Tbr2 の発現動態にも異常は認められず(図 3-10D)、E17.5 の *Fbx111* cKO マウス大脳皮質において Tbr1 陽性神経細胞層が占

める割合にも変化は見られなかった(図 3-10D 下)。そのため胎生期脳では Fbx111 欠損による神経幹細胞や神経細胞における顕著な異常は生じていないことが示された。

胎生期大脳皮質では Fbx111 欠損による顕著な表現型は確認できなかったが、Fbx111 cKO マウスは生後にかけて前脳の低形成といった表現型を呈していた。Fbx111 cKO マウスは P10 から P15 にかけて全個体が死亡し(図 3-11A)、また P5 から P10 にかけては顕著な体重減少(図 3-11B)および個体サイズの減少(図 3-11C)が認められた。Fbx111 cKO マウスは P3 までは外見上正常であったが、P5 から前後肢や頭部の形態異常が認められ(data not shown)、P10 では大脳皮質の縮小、前後肢の形態異常、脾臓の肥大といった異常を生じた(図 3-11D~3-11F)。Emx1-Cre マウスでは前脳特異的に相同組換えを行うにも関わらず、生後の Fbx111 cKO マウスでは前脳以外の表現型も確認された。これは、生後 0 日(P10)の Emx1-Cre;loxP-STOP-loxP-GFP マウスにおいて前脳大脳皮質のみならず前後肢や顔面にも一部 GFP が発現しており(図 3-11G)、Emx1 が出生前後において大脳皮質以外の組織でも発現したことから、前脳以外の組織で Fbx111 が欠損した前後肢や頭部表面に形態異常が認められたと考えられる。

3.3.3. Fbx111 欠損による特異的神経細胞層における神経細胞死

Fbx111 cKO マウスの生後における大脳皮質の縮小の原因を探るため、生後脳の冠状切片を作製し、組織学的解析を行うこととした。まず HE 染色により P10 のコントロールと Fbx111 cKO マウスの大脳皮質を比較した所、Fbx111 cKO マウスの大脳皮質層が有意に減少していた(図 3-12A)。次に免疫組織化学染色により分化神経細胞マーカーである Tbr1 の発現を調べたところ、P10 の Fbx111 cKO マウスでは Tbr1 が有意に発現低下しており、Tbr1 陽性の幼若な神経細胞が減少していることが明らかとなった(図 3-12B)。このことから神経細胞の分化能および生存能の低下により大脳皮質が薄くなっていることが予測された。大脳皮質は発生時期の異なる複数の神経細胞層で構成されており、下層の神経細胞層は E14.5 から分化する早生まれの神経細胞であり、上層に向かうに従って胎生後期から生後に分化する遅生まれの神経細胞で構成される(図 3-13A)。そこで層特異的な神経細胞マーカーで免疫組織化学染色を行ったところ、Fbx111 cKO マウスでは VI 層神経細胞マーカー Foxp2 の発現には変化が見られなかったが、II-IV 層神経細胞マーカーである Cux1、V 層神経細胞マーカー Ctip2 の発現低下(図 3-13B)および、Cux1

陽性の神経細胞層の有意な減少が認められた(図 3-13C)。Fbx111 cK0 マウスでは Cux1、Ctip2 陽性神経細胞すなわち、遅生まれの神経細胞が特異的に減少することが示された。

Fbx111 cK0 マウスにおける層特異的な神経細胞層の減少には細胞死の関与も予想されたため、アポトーシスマーカーCC3 の発現を免疫染色により検出した。コントロールマウスでは大脳皮質ではほとんど CC3 の発現は確認されないのに対して、Fbx111 cK0 マウスでは前脳の縮小が観察された P10 大脳皮質において CC3 陽性細胞の増加が認められた。その上、前脳縮小が観察されない P0 の大脳皮質においても CC3 の発現上昇が確認された(図 3-14A)。次に、成熟神経細胞マーカーNeuN と CC3 との共染色を行うと、神経細胞の核に局在する NeuN と CC3 は共局在しており、大脳皮質においてより上層の神経細胞において CC3 が多く局在することが示された(図 3-14B)。さらに、層特異的な神経細胞マーカーCtip2、Foxp2 が CC3 と共局在するかを免疫染色により調べた。その結果 Fbx111 cK0 マウスでは CC3 は Foxp2 とは共局在しないが、Ctip2 とは共局在していることが示された(図 3-14C)。これらの結果より、Fbx111 cK0 マウスでは胎生後期および生後に分化する遅生まれの神経細胞が細胞死を引き起こしており、Fbx111 は生後に産生される神経細胞の生存に重要であることが示された。

次に、神経細胞を支持するグリア細胞の挙動について調べるために、未成熟アストロサイトマーカーGS(Glutamine Synthetase)、アストロサイトマーカーGFAP、ミクログリアマーカーIba1 の発現を免疫染色により評価した。GS の発現動態には大きな変化はなかったが、驚くべきことに、GFAP 陽性細胞と Iba1 陽性細胞の顕著な増加が認められた(図 3-15A, 3-15B)。コントロール脳では、大脳皮質の Apical side に存在する脳室帯(Ventricular Zone; VZ)および Basal side に GFAP の発現局在が観察されるが、Fbx111 cK0 マウスでは GFAP は大脳皮質全体に異所的に発現し、GFAP 陽性細胞数が明らかに増加していた(図 3-15A)。また Iba1 はコントロール脳ではほとんど発現が見られないが、Fbx111 cK0 脳では GFAP と同様に、大脳皮質全体にわたって Iba1 の発現が観察された(図 3-15B)。ミクログリアやアストロサイトは正常時に神経細胞を保護する役割を持つが、脳虚血を含む中枢神経系の病態において神経細胞死が生じた際、それぞれ活性型となり炎症性サイトカインやフリーラジカルなどを遊離し、神経細胞死が促進するように働きかけ、最終的にはミクログリアにより損傷した神経細胞は貪食され除去されることが知られている。以上の知見からも、Fbx111 cK0 マウスにおける神経細胞死を感知してグ

リア細胞が異所的に増殖したことが示唆された。この大脳皮質におけるグリア細胞の異常集積は2次的な表現型であることが予想されるが、生後脳にて Fbx111 欠損による神経変性・神経細胞死が生じたことを示す重要な証拠となった。

3.3.4. 胎生期の神経幹細胞維持における Fbx111 の役割

Fbx111 欠損による生後の神経変性・神経細胞死の原因を探るため、神経細胞の起源である胎生期の神経幹細胞の性状を詳細に評価した。

胎生期の神経幹細胞は組織学的解析で異常が認められなかった(図 3-10C, 3-10D)ため、*in vitro* で胎生期神経幹細胞を採取し、神経幹細胞の増殖能、分化能、および遺伝子発現異常を定量的に解析することとした。まずコントロールマウスおよび Fbx111 cKO マウスの E14.5 大脳皮質由来の神経幹細胞を培養し、神経幹細胞の増殖能、自己複製能を評価するためにニューロスフェアアッセイを行った。その結果、培養4日目で Fbx111 cKO マウス由来のニューロスフェアは低形成となり、培養7日目では完全に細胞が消失した(図 3-16A)。神経幹細胞の増殖能を評価するため、直径 50 μ m 以上のニューロスフェア数を計測したところ、培養7日目において Fbx111 cKO マウスのニューロスフェア形成数は有意に減少した。また、生細胞由来の ATP 量を定量して神経幹細胞の生存率を解析(Cell titer Glo [Promega])した結果、Fbx111 cKO マウスでは有意に ATP を標識した発光シグナルが低下していた(図 3-16B)。一方で、Fbx111 欠損神経幹細胞ではアポトーシスマーカー CC3 の発現が有意に上昇していた(図 3-16C)。すなわち、E14.5 における Fbx111 cKO マウス大脳皮質神経幹細胞の *in vivo* での挙動には異常が生じなかったのに対して、予想に反して *in vitro* では Fbx111 の欠損により神経幹細胞の細胞死の亢進および増殖能の著しい低下が認められた。*in vitro* での Fbx111 欠損による神経幹細胞の細胞死の原因を探るため、培養4日目の神経幹細胞(ニューロスフェア)に対して遺伝子発現解析を行った。Fbx111 欠損神経幹細胞では、神経幹細胞に陽性である Nestin、Hes1、Hes5 の発現は低下し、神経細胞に陽性である Tuj1、Ngn2 の発現が上昇していた(図 3-16D)。このことから Fbx111 欠損神経幹細胞は異常な分化促進、および細胞死を引き起こしたことが示唆された。

次に、Fbx111 欠損神経幹細胞の分化能を評価するため、神経分化培養を行った。神経幹細胞をニューロスフェアで4日間培養した後、bFGF 存在下(図 3-17A)、bFGF 非存

在下(図 3-17B)、Bmp4・LIF 存在下(図 3-17C)で 4 日間接着培養を行った。それぞれの培養条件では Nestin、Tuj1 陽性(図 3-17A)、Tuj1 陽性(図 3-17B)、GFAP 陽性(図 3-17C)細胞へと分化する。Fbx111 cK0 マウスでは Nestin 陽性細胞の維持能および GFAP 陽性細胞への分化能が障害されていた(図 3-17A, 3-17C)。一方で、Tuj1 陽性細胞が増加していたものの、正常な神経突起を形成することが出来なかった(図 3-17B)。従って、Fbx111 欠損神経幹細胞は神経細胞・グリア細胞への正常な分化能を失うことが示された。以上より、*in vitro*においては Fbx111 欠損により胎生期神経幹細胞の増殖能、分化能のいずれも障害されるという結果が得られた。

in vivo の組織学的解析では、Fbx111 cK0 マウス大脳皮質において胎生期の神経幹細胞の動態は正常だったのに対して、*in vitro* のニューロスフェアアッセイでは Fbx111 欠損神経幹細胞が細胞死を呈し、分化能を欠失するという一見相反する結果が得られた。この矛盾に対して、*in vivo*の胎仔脳は低酸素に保たれていることから、「*in vitro*での培養条件は *in vivo*と比較して高酸素環境であり、酸素濃度の違いにより Fbx111 cK0 神経幹細胞の細胞死が引き起こされる」という仮説を立てた。この仮説の証明のため、低酸素下(5% O₂)にて神経幹細胞を培養した結果、Fbx111 欠損神経幹細胞のニューロスフェア形成能が回復した(図 3-18A)。また、20%酸素培養下では Fbx111 cK0 マウスにおいて神経幹細胞マーカーNestin の発現低下と神経細胞マーカーTuj1 の発現上昇が認められたが、5%酸素培養下においては Nestin と Tuj1 の発現変化は見られなくなった(図 3-18B)。このことから、生理的な酸素条件下(5% O₂)で神経幹細胞を培養すると *in vivo*での組織学的解析と同様に、神経幹細胞の生存および未分化状態を維持できることが明らかとなった。胎生期の低酸素条件(*in vivo*)では Fbx111 cK0 マウスにおいても神経幹細胞を正常に保つことが可能であるが、生後の通常酸素条件(*in vitro*)では Fbx111 欠損による神経幹細胞の生存能および未分化状態が損なわれることが示された。このように、低酸素培養により Fbx111 欠損神経幹細胞の増殖能および分化状態は回復したものの(図 3-18B)、細胞周期調節因子 p15^{Ink4b}, p19^{ARF}, p21^{Cip1}, p53 の発現上昇および p57^{Kip2} 発現低下が示された(図 3-18C)。低酸素環境下において細胞周期調節因子の遺伝子発現異常は回復することが出来ないものの、Fbx111 欠損による神経幹細胞の増殖・生存の欠失といった重篤な表現型はレスキューできることが分かった。

すなわち、Fbx111 は神経幹細胞の増殖・生存を制御するが、その制御には酸素環境

が重要であることが示され、酸化ストレスや低酸素応答といったシグナルに Fbx111 が関与する可能性が示された。

3.3.5. 神経幹細胞における Fbx111 下流遺伝子の網羅的探索

Fbx111 による神経分化機構を明らかにする目的で、神経幹細胞における Fbx111 の標的遺伝子およびシグナル経路を網羅的に探索するため、5%および 20%の酸素条件で 4 日間培養した Fbx111 cKO (Emx1-Cre; *Fbx111*^{flox/flox}) マウスとコントロール (Emx1-Cre; *Fbx111*^{+ /flox}) マウス由来神経幹細胞に対して、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。20%酸素環境下では神経幹細胞の生存率や分化状態が大きく変動しているため、5%酸素環境で培養した神経幹細胞を Fbx111 の標的遺伝子を抽出するのに適切な細胞集団として使用した。

20%酸素条件下で培養した神経幹細胞において、コントロールと比較して Fbx111 cKO マウスで 2 倍以上発現が変動した遺伝子は 4013 個であった (図 3-19A, [1] het (20%) vs cKO (20%))。一方で、5%酸素培養ではコントロールと比較して Fbx111 cKO 神経幹細胞で 2 倍以上の発現変動した遺伝子は 1290 個であった (図 3-19A, [2] het (5%) vs cKO (5%))。20%酸素培養では 5%酸素培養と比較して約 3 倍の遺伝子数の変動が示されたことから、分化状態や生存状態の変化のために、2 次的に変動する遺伝子も多く抽出されたと考えられる。5%酸素培養における Fbx111 下流遺伝子に対して、酸素条件による遺伝子発現変動を検討するために、5%酸素培養のコントロール細胞と 20%酸素培養のコントロール細胞のみを比較したところ、530 遺伝子が 2 倍以上発現変動していた (図 3-19A, [3] het (5%) vs het (20%))。酸素条件に依らない Fbx111 の下流遺伝子を探索するために、5%酸素条件下にてコントロールと Fbx111 cKO マウス間で 2 倍以上発現変動した遺伝子群 ([2] het (5%) vs cKO (5%)) から、5%および 20%酸素培養のコントロール間で発現変動した遺伝子群 ([3] het (5%) vs het (20%)) を排除し、Fbx111 の標的候補遺伝子とした (図 3-19A, 3-19B 斜線部)。図 3-19B の斜線部で示された 1149 遺伝子の内、2 倍以上発現上昇した遺伝子は 399 遺伝子、2 倍以上発現低下した遺伝子は 750 遺伝子だった (図 3-19C)。ヒストン H3K36 メチル化は標的遺伝子の発現亢進に関与することが知られているため、ヒストン H3K36 の脱メチル化酵素である Fbx11 の欠損下において発現が亢進している遺伝子群に着目した。2 倍以上発現上昇した遺伝子リストを調べると、神経発生、

アポトーシス、酸化ストレスに関連する遺伝子がいくつも存在した(図3-19C)。さらに、Fbx111の標的候補遺伝子に対して Gene Ontology (GO)解析を DAVIDにより行い、アノテーションを行ったところ、同様に神経発生、アポトーシス、酸化ストレスや低酸素応答に関与する GO term が有意に変化することが示された(表 3-4)。実際に real-time PCRより、Fbx111が抑制をかける標的候補遺伝子として抽出した遺伝子(Gad1, Gad2, Lhx6, Dlx2, P2rx7, Nr4a2, Lrdd, Dcxr, Ecell, Arid5a)の発現解析を行ったところ、Fbx111欠損神経幹細胞において有意な発現亢進が認められた(図 3-20)。

本解析より、Fbx111を欠損した神経幹細胞では神経発生、アポトーシス、酸化ストレスおよび低酸素応答に関連する遺伝子異常が蓄積しており、その遺伝子異常が神経細胞死をいう表現型を招く一因となることが示唆された。以上の結果よりヒストン脱メチル化酵素 Fbx111は胎生期の神経幹細胞の恒常性を保つのに必要な遺伝子の発現制御に関与することが初めて明らかとなった。

Stage	+/+	+/neo	neo/neo	Total (n)
E10.5	5	32	9	46
E12.5	9	14	1 (Resorbed)	24
E14.5	10	9	0	19
Postnatal	18	21	0	39
				128

表3-1 *Fbxl1*^{+/neo}マウスの交配による新生仔および胎仔の遺伝子型解析

Stage	+/+	+/-	-/-	Total (n)
E8.5	5	28	4	37
E9.5	3	12	2	17
E10.5	21	57	25	103
Postnatal	13	11	0	24
				181

表3-2 *Fbxl11*^{+/-}マウスの交配による新生仔および胎仔の遺伝子型解析

Genotype	Emx1-Cre; Fbxl11 ^{lox/lox} (Fbxl11 cKO)	Emx1-Cre; Fbxl11 ^{+/lox} (het; Cont)	Fbxl11 ^{lox/lox}	Fbxl11 ^{+/lox}	Total (n)
Postnatal (P10)	32	39	27	45	143

表3-3 *Emx1-Cre;Fbxl11^{+/lox}*と*Fbxl11^{lox/lox}*マウスの交配による新生仔の遺伝子型解析

Term	P-Value
homophilic cell adhesion	1.70E-04
cell-cell adhesion	1.90E-04
cell adhesion	2.20E-04
biological adhesion	2.30E-04
multicellular organismal response to stress	3.70E-04
positive regulation of programmed cell death	1.20E-03
regulation of apoptosis	1.20E-03
positive regulation of cell death	1.20E-03
regulation of programmed cell death	1.40E-03
regulation of cell death	1.40E-03
DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in induction of apoptosis	1.50E-03
induction of apoptosis by intracellular signals	2.80E-03
synaptic transmission	3.30E-03
positive regulation of apoptosis	3.40E-03
DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator	3.80E-03
response to hypoxia	4.50E-03
response to oxygen levels	4.80E-03
transmission of nerve impulse	5.20E-03
glutamine family amino acid metabolic process	5.90E-03
DNA damage response, signal transduction resulting in induction of apoptosis	6.60E-03
induction of programmed cell death	7.60E-03
induction of apoptosis	7.60E-03
cell-cell signaling	1.10E-02
oxygen transport	1.40E-02
death	1.50E-02
DNA damage response, signal transduction	1.60E-02
cell cycle arrest	1.60E-02
neuron differentiation	7.70E-02
neuron projection development	7.80E-02
regulation of neuron differentiation	9.50E-02

表 3-4 DAVIDによる神経幹細胞におけるFbxl11標的候補遺伝子のGene Ontology解析

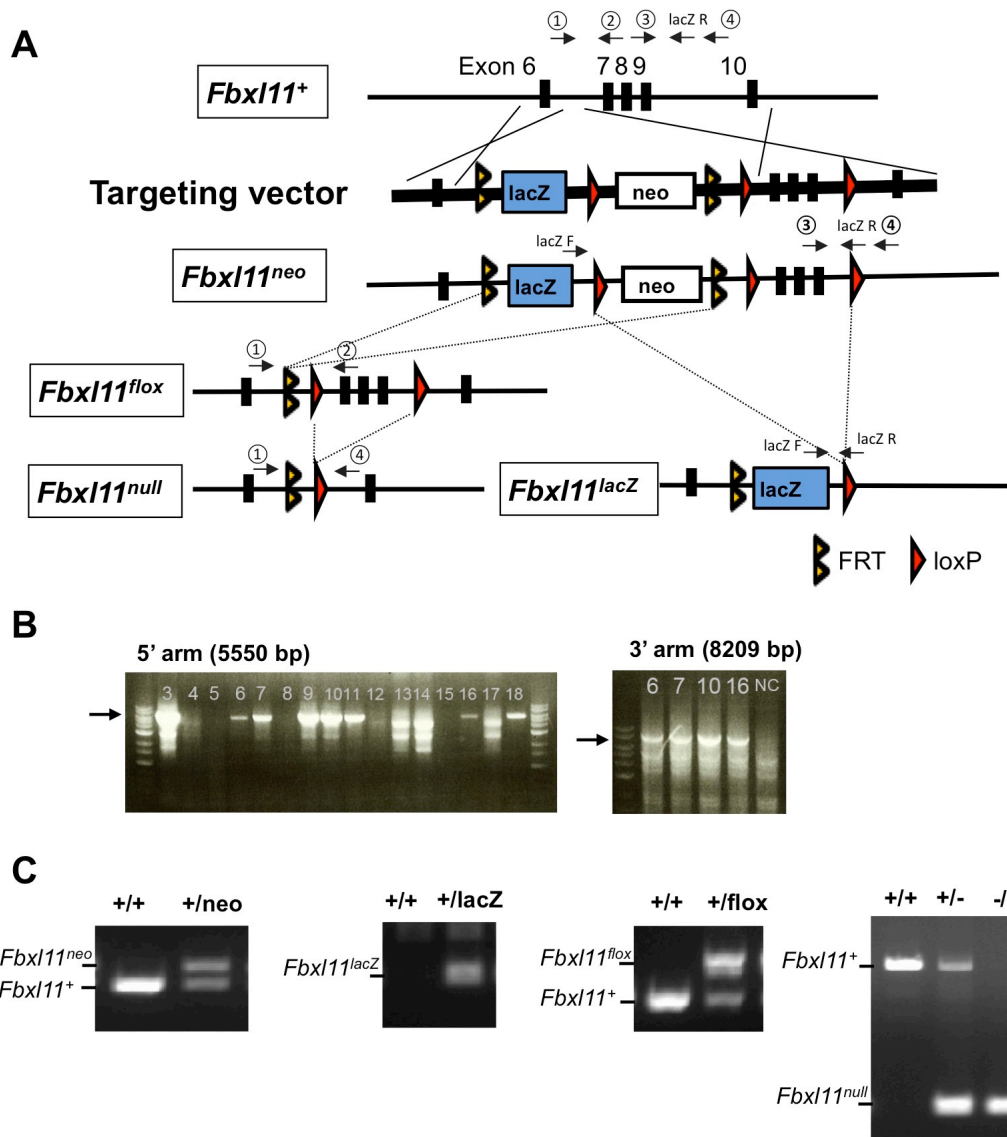
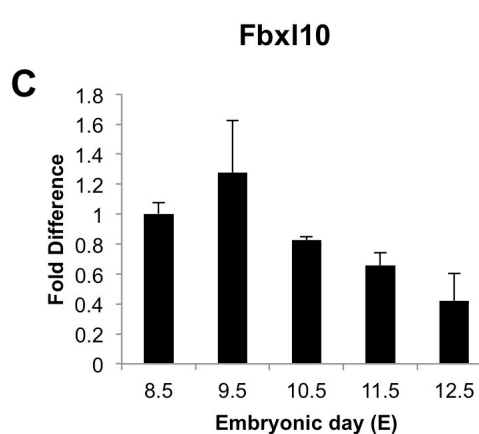
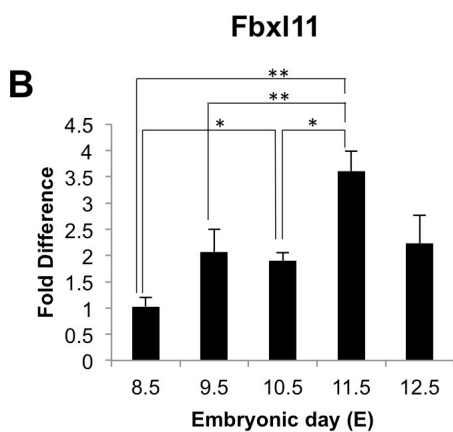
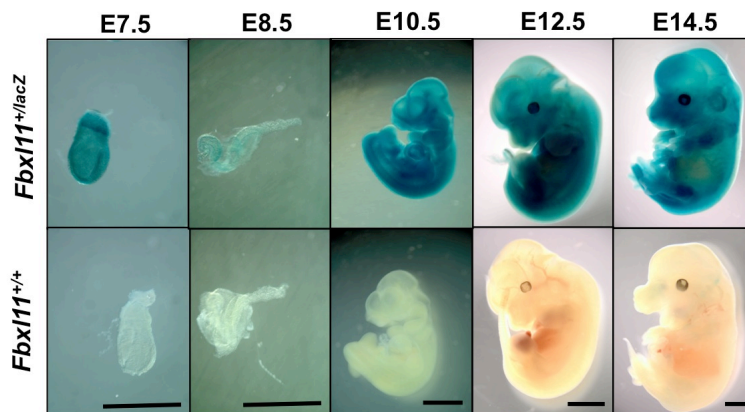


図3-1 相同組換えによるFbxl11遺伝子のターゲティング

(A)上からマウスFbxl11野生型(*Fbxl11*⁺)遺伝子座、Fbxl11コンディショナルターゲティングベクター、相同組換えにより変異が導入された*Fbxl11*^{neo}遺伝子座、Cre酵素およびFlpe酵素により部位特異的組換えを起こした*Fbxl11*^{lox}遺伝子座、*Fbxl11*^{null}遺伝子座、および*Fbxl11*^{lacZ}遺伝子座(赤矢頭：loxP配列、黄矢頭：FRT配列、黒四角：エクソン、白四角：ネオマイシン耐性遺伝子)。(B)PCRによる相同組換え体(*Fbxl11*^{+/neo})ES細胞の遺伝子型解析。番号はES細胞のクローン番号を示した。陰性コントロールとして野生型ES細胞を使用した。(C)PCRによるFbxl11遺伝子改変マウスの遺伝子型解析。左から*Fbxl11*^{neo}遺伝子座、*Fbxl11*^{lacZ}遺伝子座、*Fbxl11*^{lox}遺伝子座、*Fbxl11*^{null}遺伝子座を検出するプライマーでゲノムDNA断片を増幅した。

A



D

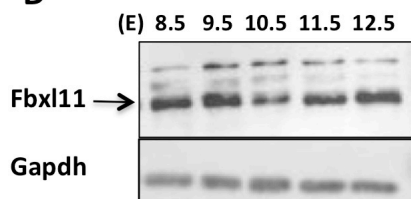


図3-2 初期発生におけるFbxl11の発現解析
 (A)胎生7.5日(E7.5)、E8.5、E10.5、E12.5、E14.5の野生型および*Fbxl11*^{+/-lacZ} マウス胎仔に対するX-gal染色。Bar=2mm。E8.5、E9.5、E10.5、E11.5、E12.5の野生型マウス全胚における(B)(C)リアルタイムPCR法によるFbxl11およびFbxl10のmRNA発現解析、および (D)ウェスタンブロットング解析によるFbxl11のタンパク質発現解析。(B)(C)(D)内部標準にはGapdhを使用した。(B)(C)グラフは3回の独立実験(n=3)をもとに平均値±標準誤差で表示し、統計解析処理法としてStudent t-testを行った。
 **p<0.01, *p<0.05。

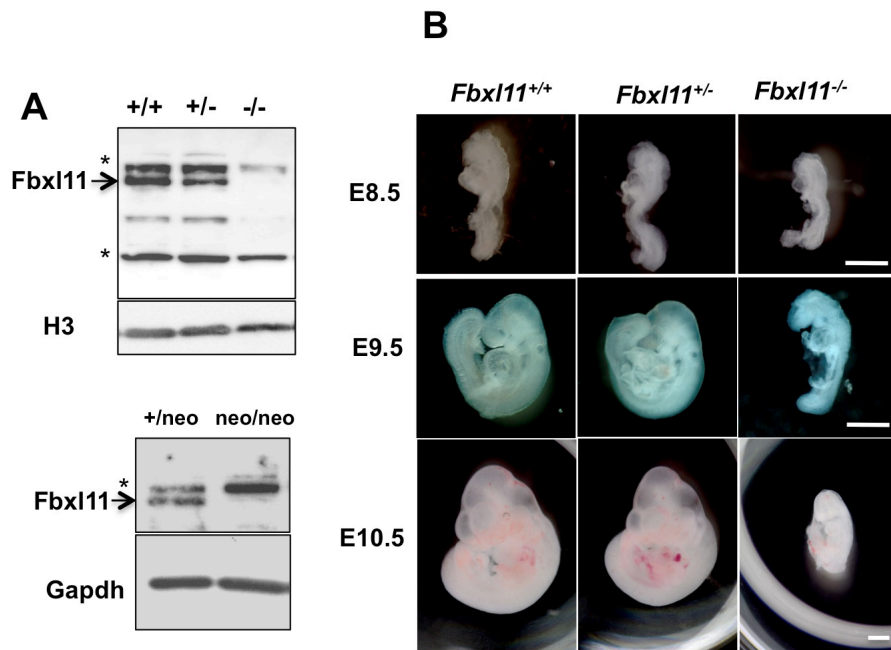


図3-3 *Fbxl11*欠損マウスの表現型

(A)ウエスタンブロッティング解析によるE10.5の野生型(*Fbxl11*^{+/+}マウス)、*Fbxl11*^{+/-}マウス、*Fbxl11*^{-/-}マウス、および*Fbxl11*^{+/-neo}マウス、*Fbxl11*^{neo/neo}マウスの全胚での*Fbxl11*の発現解析。矢印：*Fbxl11*シグナル(132kDa)、*印：非特異シグナル。(B)E8.5、E9.5、E10.5における野生型(*Fbxl11*^{+/+}マウス)、*Fbxl11*^{+/-}マウス、*Fbxl11*^{-/-}マウスの明視野像。Bar=1mm。

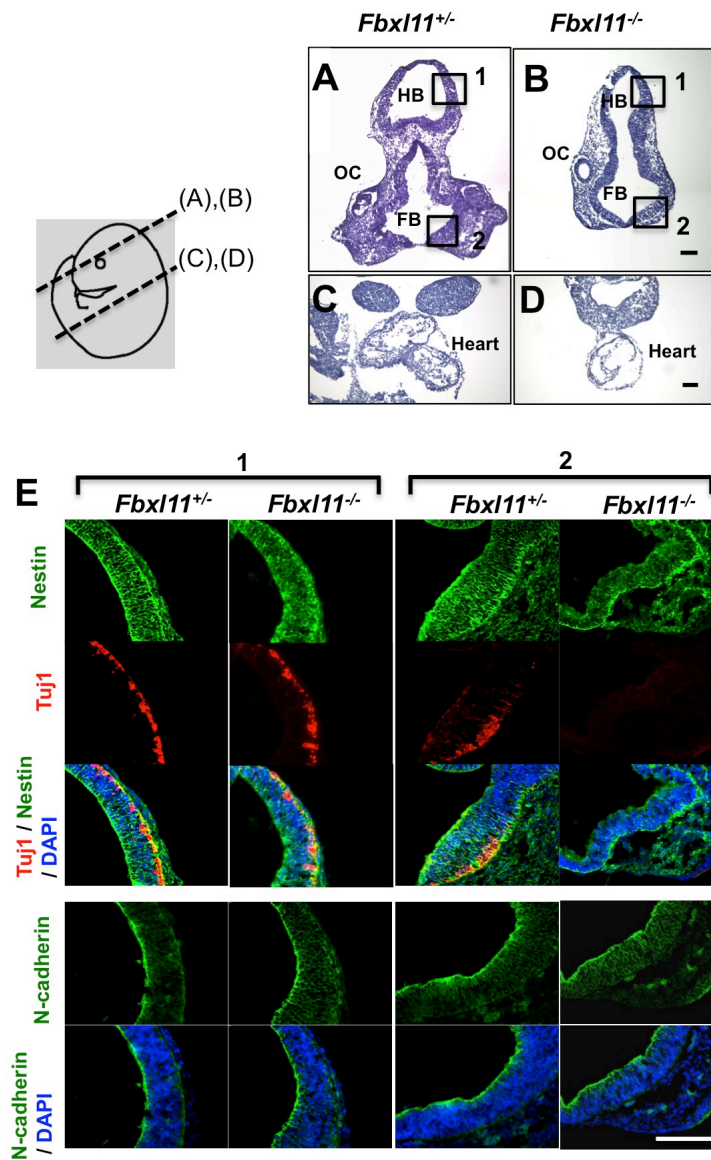


図3-4 *Fbxl11*欠損マウスにおける形態的特徴と神経分化
 E10.5のコントロール胚(*Fbxl11*^{+/-})と*Fbxl11*欠損胚(*Fbxl11*^{-/-})の水平断面切片に対する(A-D)HE染色、および(E)αNestin抗体、αTuj1抗体、αN-Cadherin抗体を用いた免疫組織化学染色。DAPIは核染色に使用した。FB; Forebrain前脳、HB; Hindbrain後脳、OC; Optic cup 眼杯。Bar=100μm。

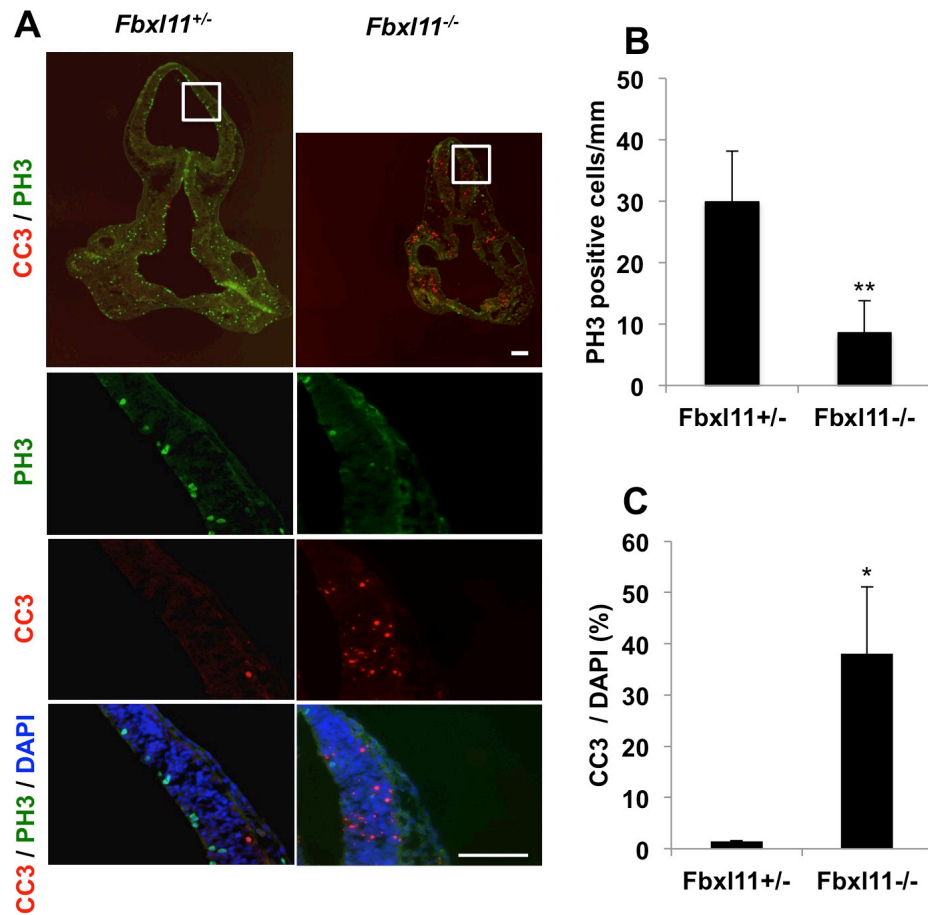


図3-5 *Fbx11*欠損マウスにおける細胞死

(A)E10.5のコントロール胚(*Fbx11*^{+/-})と*Fbx11*欠損胚(*Fbx11*^{-/-})の水平断面に対する α リン酸化ヒストン(PH3)抗体、 α 活性型カスパーゼ3(CC3)抗体を用いた免疫組織化学染色。DAPIは核染色に用いた。Bar=100 μ m。(B)(C)切片上のPH3陽性M期細胞数およびCC3陽性アポトーシス細胞数の計測。グラフは3回の独立実験(n=3)をもとに平均値 \pm 標準誤差で表示、Student t-testによる統計解析処理を行った。
*p<0.05; **p<0.01。

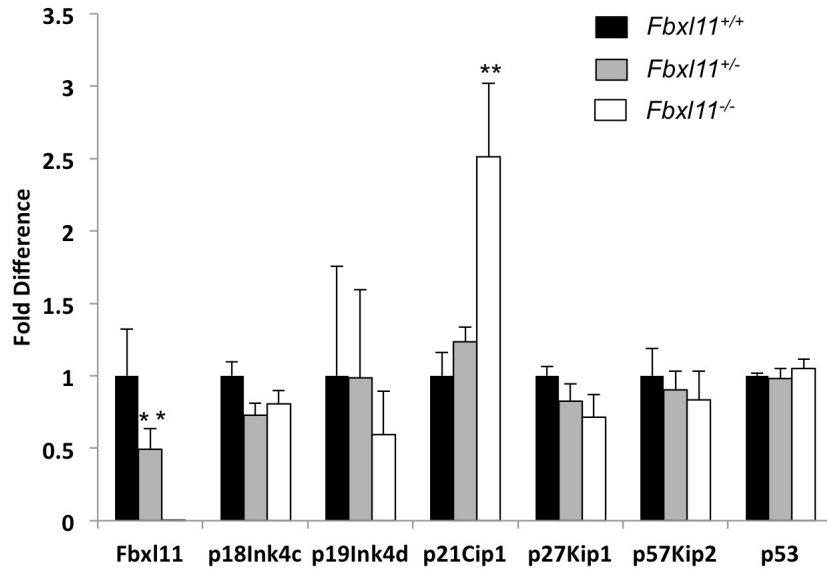
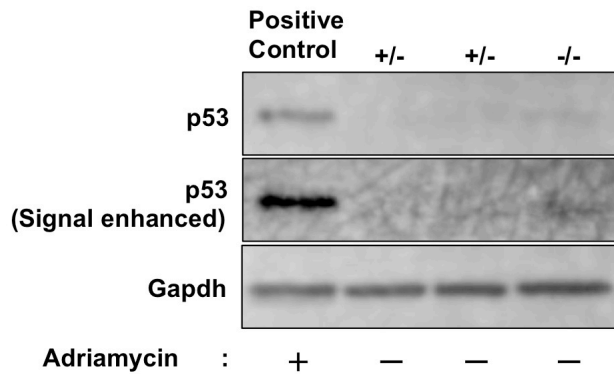
A**B**

図3-6 *Fbxl11*は細胞周期調節因子の発現を調節する

(A)リアルタイムPCRによるE8.5のコントロール胚(*Fbxl11*^{+/+} or *Fbxl11*^{+/-})と*Fbxl11*欠損胚(*Fbxl11*^{-/-})におけるCDK阻害因子の発現解析。それぞれの遺伝子の発現量は*Gapdh*を内部標準として規格化した。グラフは3回の独立実験(n=3)をもとに平均値±標準誤差で表示し、統計解析処理法としてStudent t-testにより有意差検定を行った。**p<0.01。(B)ウエスタンブロット解析によるE10.5のコントロール胚(*Fbxl11*^{+/+})と*Fbxl11*欠損胚(*Fbxl11*^{-/-})におけるp53の発現解析。p53の陽性コントロールとしてアドリアマイシンを処理したMEFを使用した。内部標準として*Gapdh*を使用した。

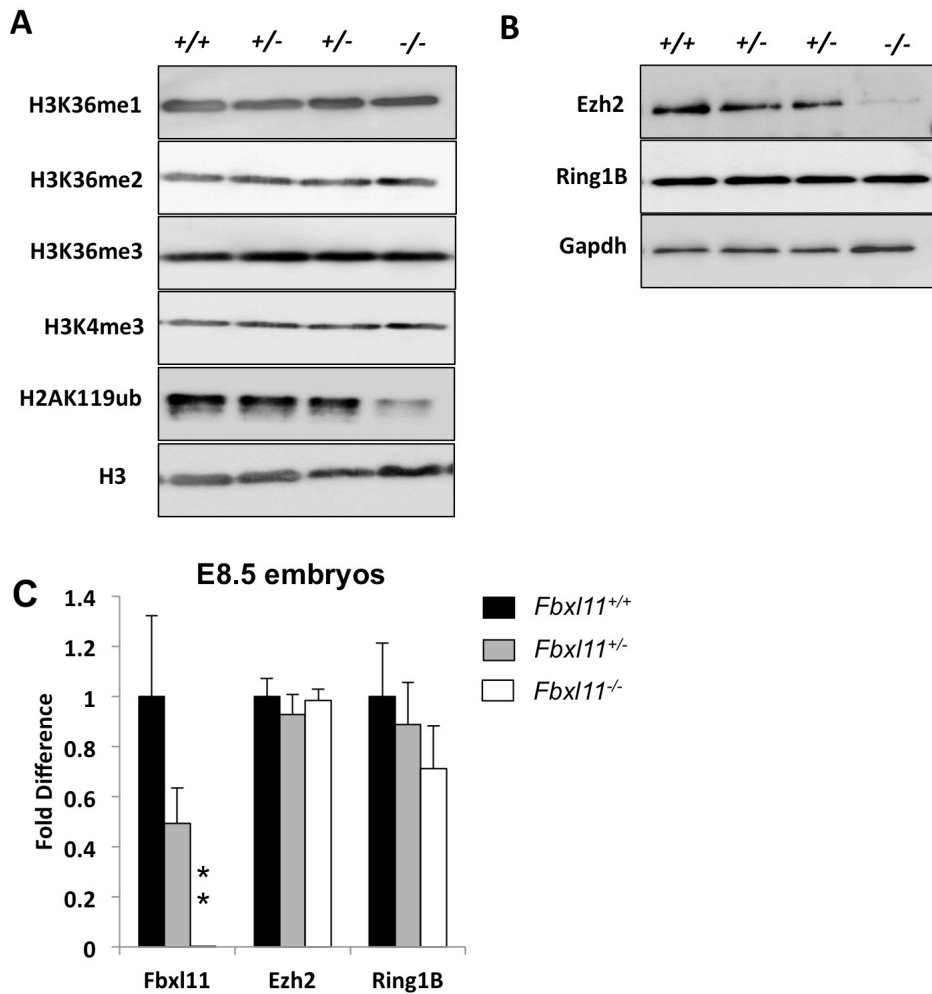


図3-7 *Fbx11*欠損マウスにおけるヒストン修飾レベルとポリコーン群タンパク質発現の変化
ウエスタンブロッティング解析によるE10.5のコントロール胚(*Fbx11*^{+/+} or *Fbx11*^{+/-})と
*Fbx11*欠損胚(*Fbx11*^{-/-})における(A)抗モノメチル化ヒストンH3K36(α H3K36me1)抗体、
 α H3K36me2抗体、 α H3K36me3抗体、 α H3K4me3抗体、 α H2AK119ub抗体を用いたヒ
ストン修飾レベル解析、および(B) α Ezh2抗体、 α Ring1B抗体を用いたポリコーン群タンパク
質の発現解析。内部標準としてヒストンH3、Gapdhを使用した。(C)リアルタイムPCR解析に
よるE8.5のコントロール胚(*Fbx11*^{+/+} or *Fbx11*^{+/-})と*Fbx11*欠損胚(*Fbx11*^{-/-})における
Fbx11、*Ezh2*、*Ring1B*のmRNA発現解析。遺伝子発現はGapdhを内部標準として規格化し
た。グラフは3回の独立実験(n=3)をもとに平均値 \pm 標準誤差で表示し、統計解析処理法として
Student t-testにより有意差を示した。**p<0.01。

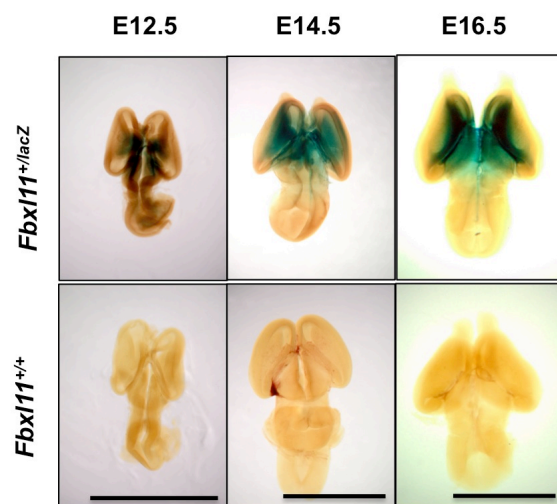


図3-8 中枢神経系における*Fbx111*の発現解析
 E12.5、E14.5、E16.5の野生型および*Fbx111^{+/-lacZ}*マウス胎仔脳に対するX-gal染色。Bar=1mm

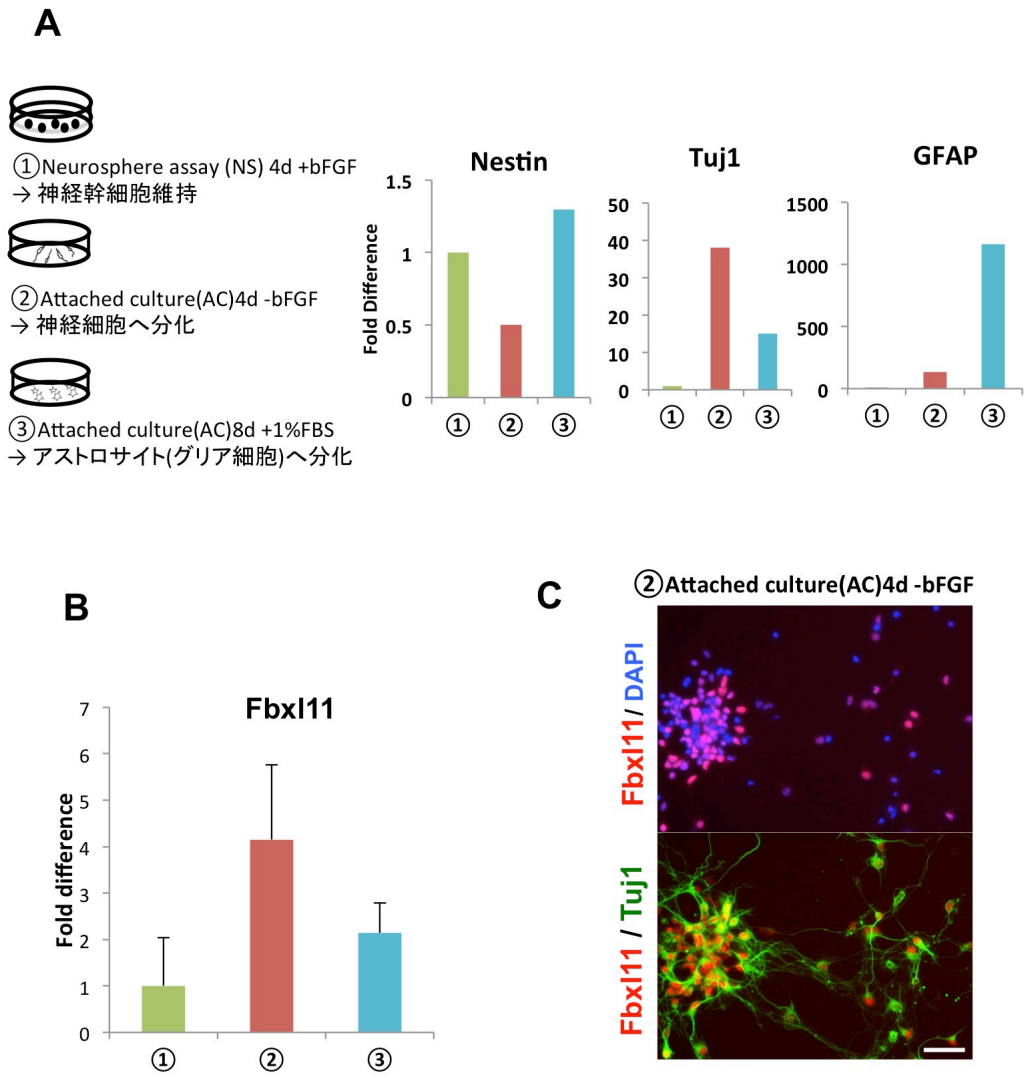


図3-9 神経分化過程におけるFbxl11の発現解析
 (A)神経幹細胞培養条件(ニューロスフェア培養4日)、神経細胞分化培養条件(bFGF非存在下での接着培養4日)、グリア細胞分化培養条件(1%FBS存在下での接着培養8日)でそれぞれ培養した細胞集団に対する、リアルタイムPCRによる神経幹細胞マーカーNestin、神経細胞マーカーTuj1、アストロサイトマーカーGFAP、および(B)Fbxl11の発現解析。それぞれの遺伝子発現はGapdhを内部標準として規格化した。(C)免疫細胞化学染色による神経細胞分化培養4日目の細胞におけるTuj1、Fbxl11の発現局在。Bar=100 μ m。

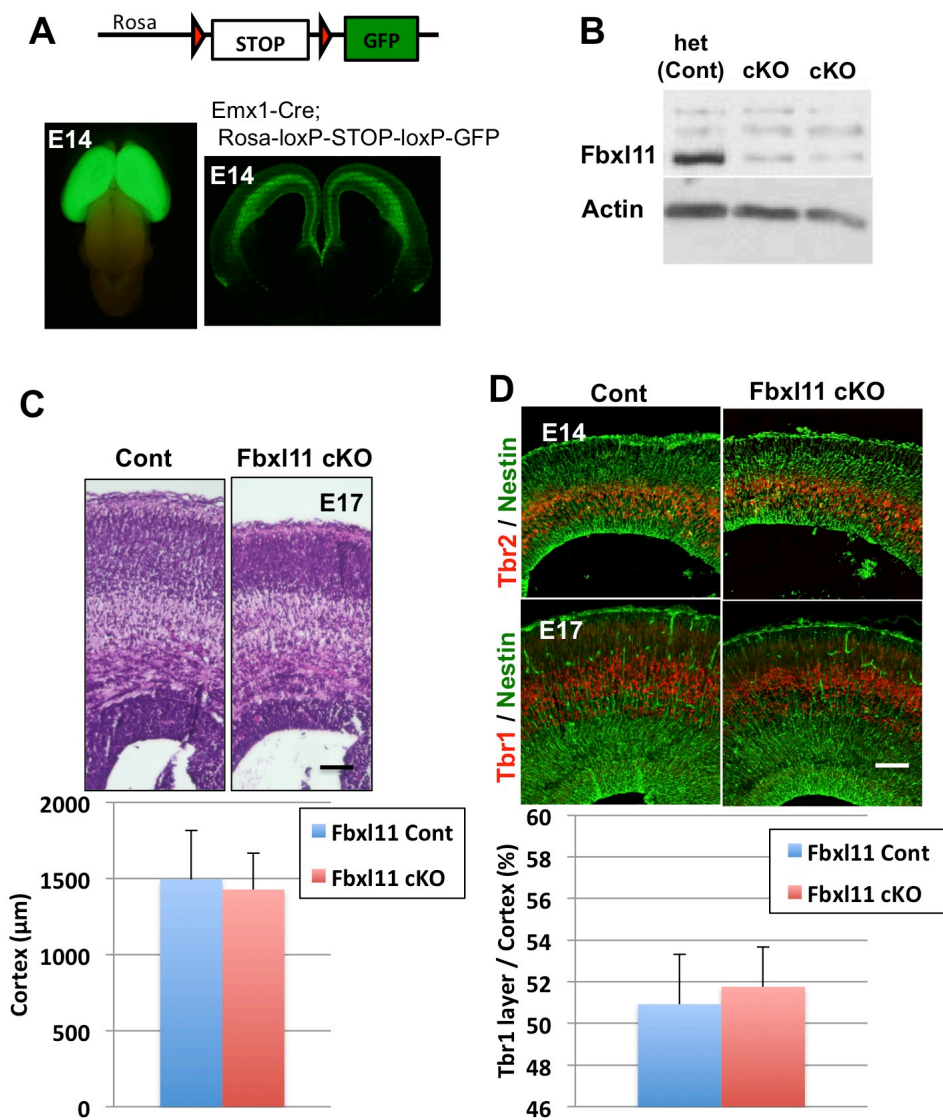


図3-10 Fbxl11 cKOマウスの胎生期大脳皮質における表現型

(A)Emx1-Cre;Rosa-loxP-STOP-loxP-GFPマウスのE14.5脳におけるGFPの発現局在。(B)ウエスタンブロット解析によるE14.5のコントロール(het)およびFbxl11cKOマウス大脳皮質におけるFbxl11タンパク質の発現。内部標準にはActinを使用した。(C)E17.5のコントロールおよびFbxl11 cKOマウス大脳皮質に対するHE染色、大脳皮質の厚さ(μm)。(D)E14.5およびE17.5のコントロールおよびFbxl11 cKOマウス大脳皮質に対する免疫組織化学染色による大脳皮質神経細胞マーカーTbr1、神経前駆細胞マーカーTbr2、神経幹細胞マーカーNestinの発現解析。Bar=100μm。E17.5の大脳皮質層に対するTbr1陽性神経細胞層の割合(%)。グラフは3回の独立実験(n=3)をもとに平均値±標準誤差で表示し、統計解析処理法としてStudent t-testを行った。

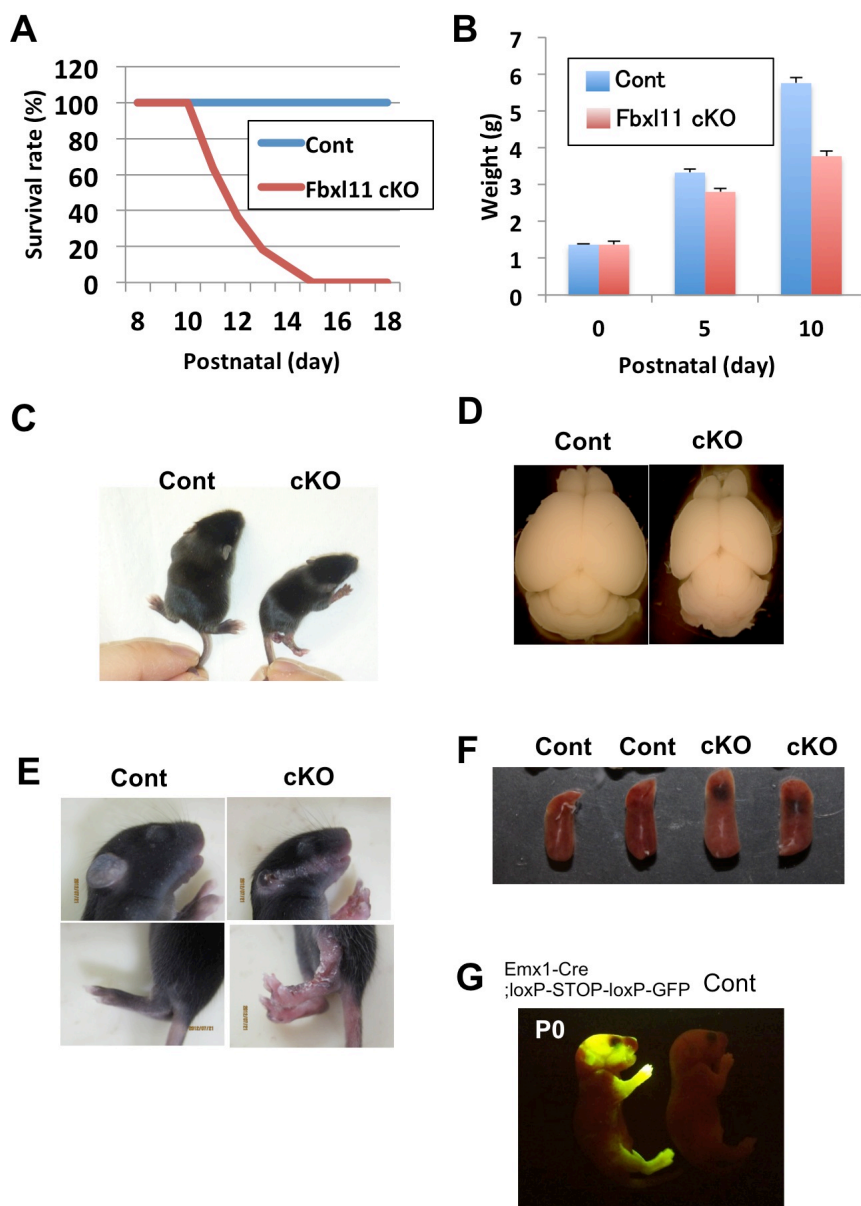


図3-11 Fbxl11cKOマウスの生後における表現型

(A)P8からP18にかけての新生仔の生存率。(B)生後0日(P0)、P5、P10における新生仔の体重推移。グラフは各発生時期において3個体以上の独立実験をもとに平均値±標準誤差で表示した。

P10におけるFbxl11hetマウスおよびFbxl11cKOマウスの(C)全体像、(D)脳、(E)頭部、前後肢部、(F)脾臓の明視野像。(G)Emx1-Cre;loxP-STOP-loxP-GFPマウスのP0におけるGFPの発現局在。

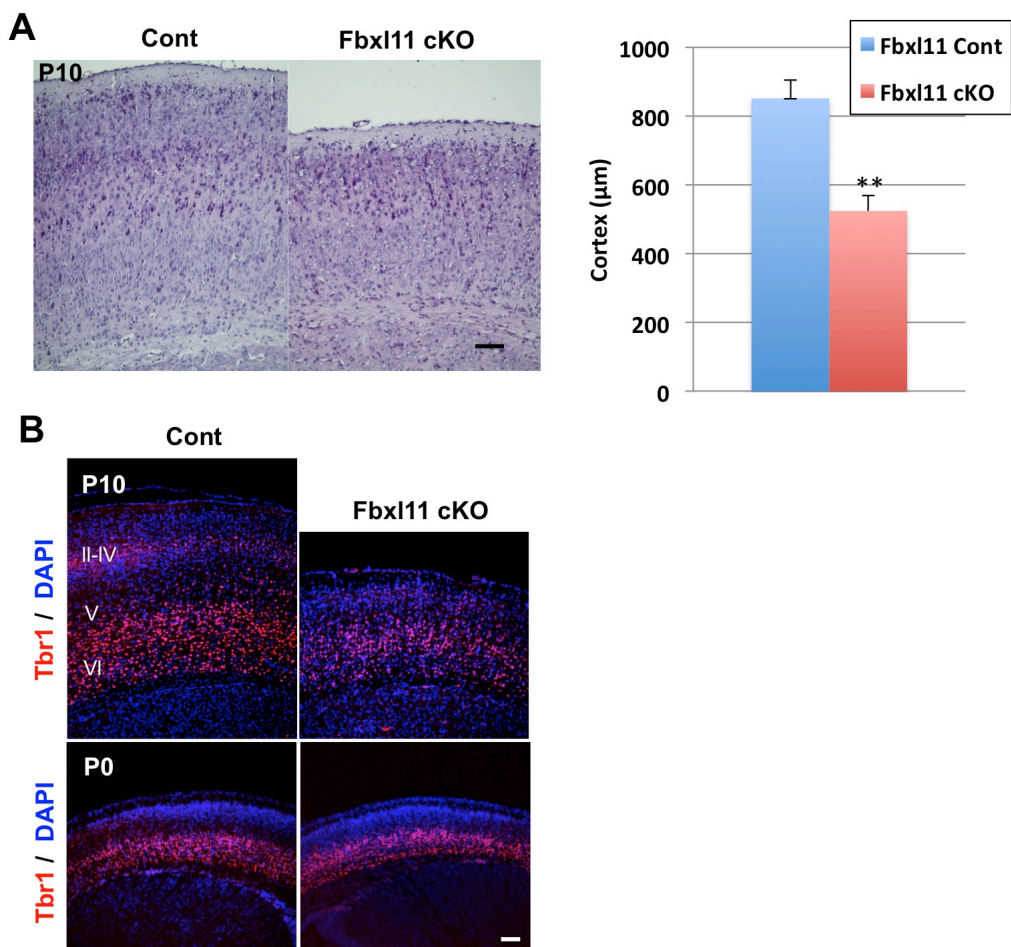


図3-12 Fbx11欠損による特異的神経細胞層の減少

P10のコントロールおよびFbx11cKOマウス大脳皮質に対する(A)HE染色、大脳皮質層の厚さ(μm)。グラフは3回の独立実験(n=3)をもとに平均値±標準誤差(SE)で示され、Student t-testにより有意差検定を行った。**p<0.01。(B)P0あるいはP10のコントロールおよびFbx11cKOMマウス大脳皮質に対する免疫組織化学染色による大脳皮質神経細胞マーカーTbr1の発現。

A

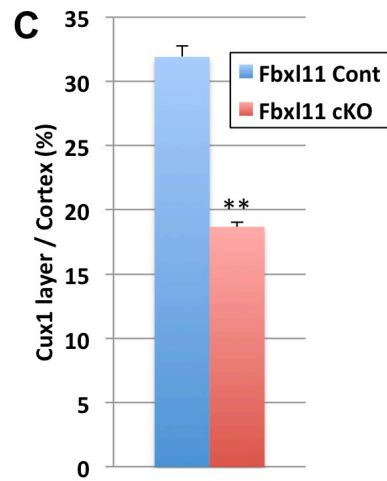
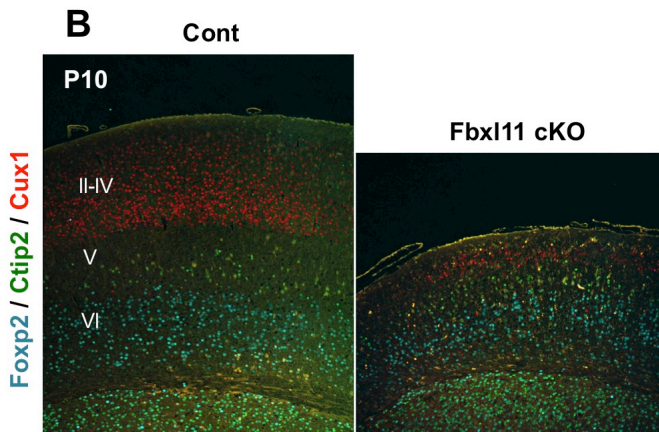
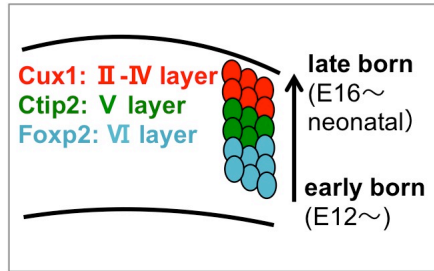


図3-13 Fbx11欠損による特異的神経細胞層の減少

(A) 大脳皮質を構成する神経細胞層の模式図。P10のコントロールおよびFbx11 cKOマウス大脳皮質に対する(B)免疫組織化学染色による大脳皮質層特異的神経細胞マーカーCux1、CTIP2、Foxp2の発現、(C)Cux1陽性神経細胞層の割合(%)。グラフは3回の独立実験(n=3)をもとに平均値±標準誤差(SE)で示され、Student t-testにより有意差検定を行った。**p<0.01。

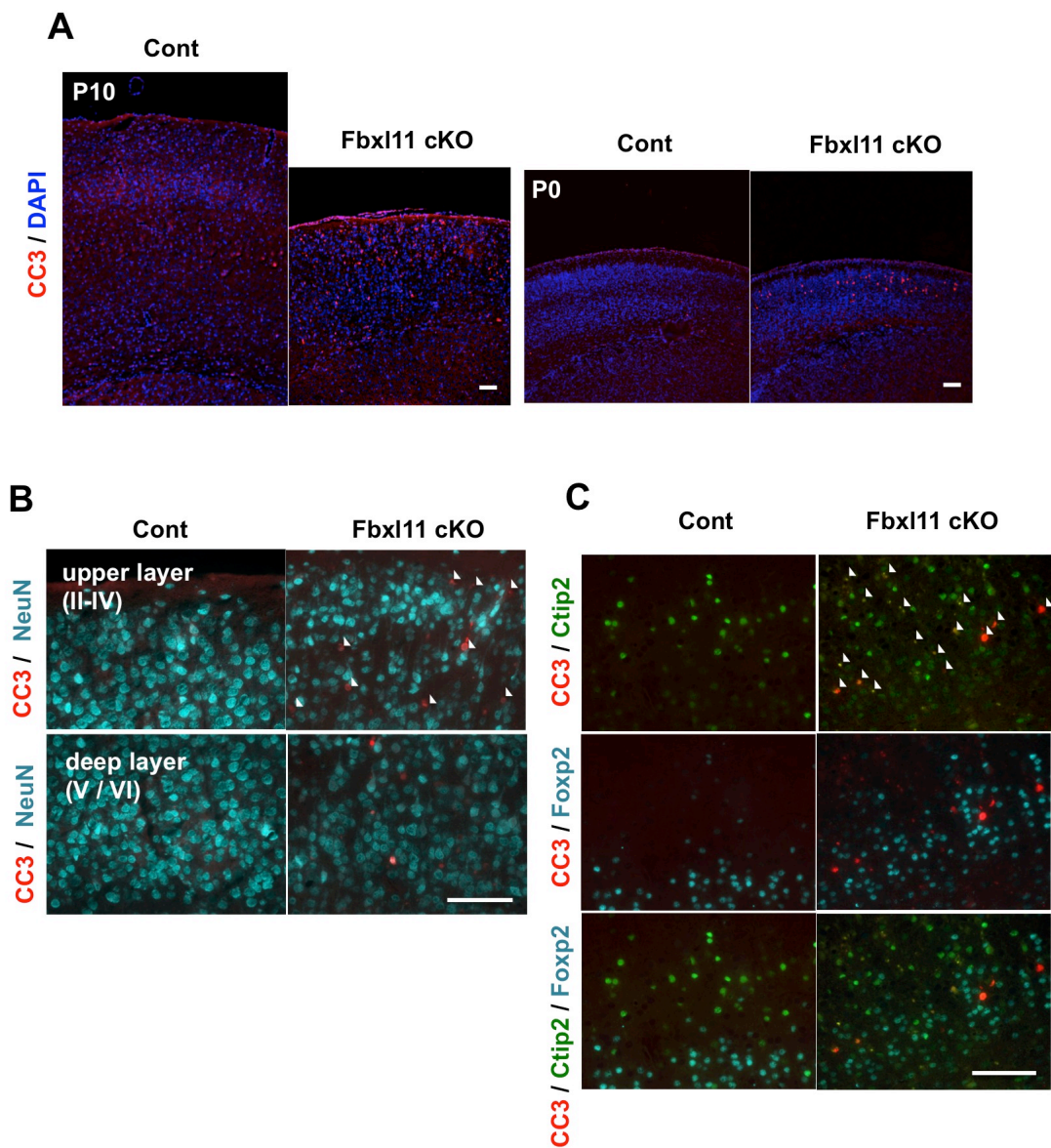


図3-14 Fbxl11欠損は生後の神経細胞死を引き起こす
 (A)P0あるいはP10のコントロールおよびFbxl11cKOマウス大脳皮質に対するアポトーシスマーカー-CC3の免疫組織化学染色。P10のコントロールおよびFbxl11 cKOマウス大脳皮質における (B) アポトーシスマーカー-CC3と成熟分化した神経細胞マーカー-NeuNの発現局在、および(C)CC3と層特異的の神経細胞マーカー-Ctip2、Foxp2の発現局在。Bar=100 μ m。

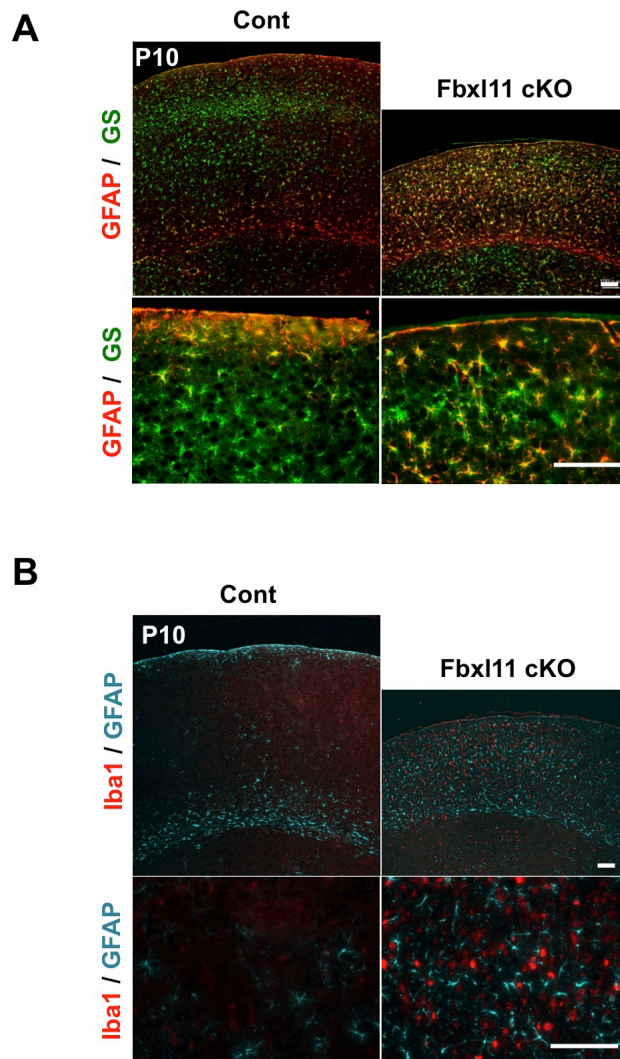


図3-15 Fbx11 cKO大脳皮質ではグリア細胞が過剰増殖する
P10のコントロールおよびFbx11 cKOマウス大脳皮質に対する免疫組織化学染色による(A)未成熟アストロサイトマーカーGSおよびアストロサイトマーカーGFAPの発現、(B)GFAPおよびミクログリアマーカーIba1の発現。Bar=100 μ m。

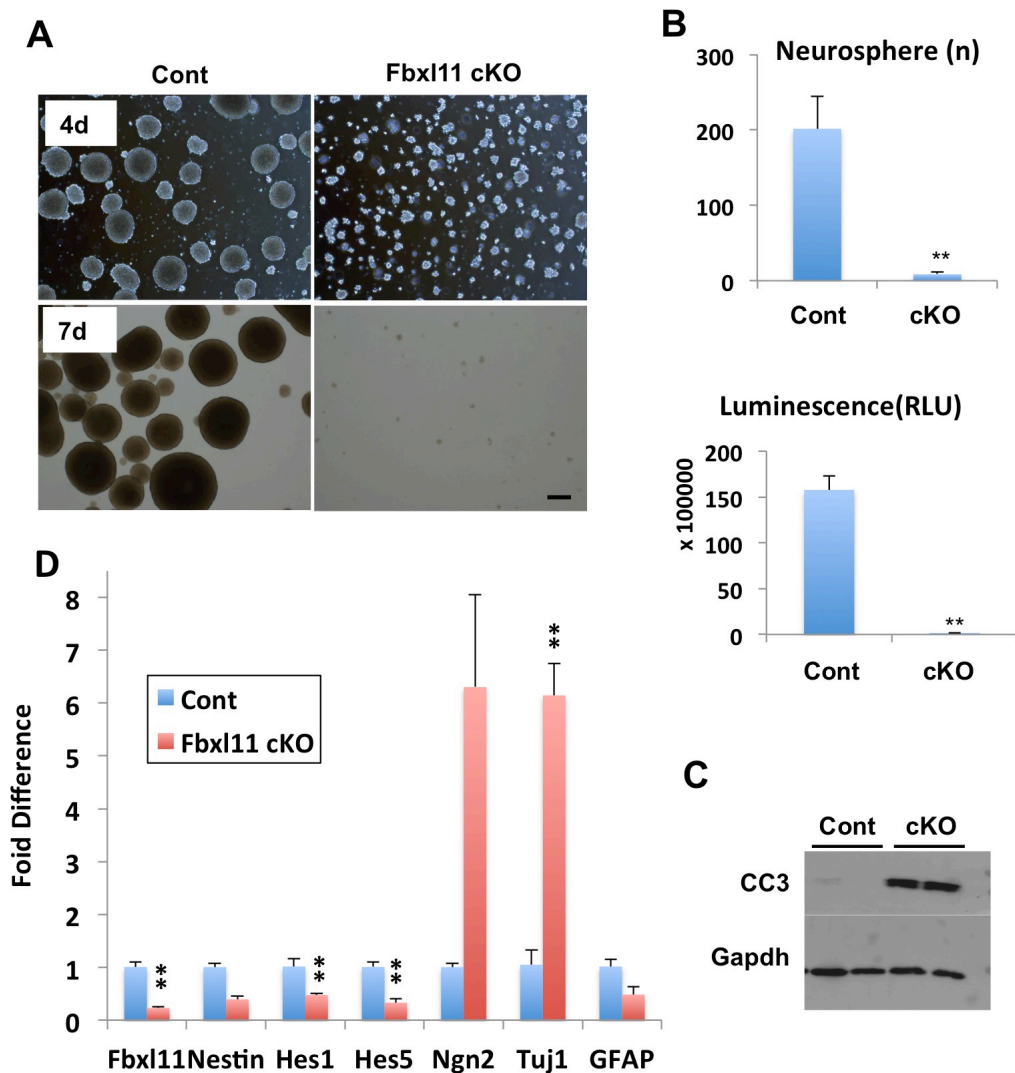
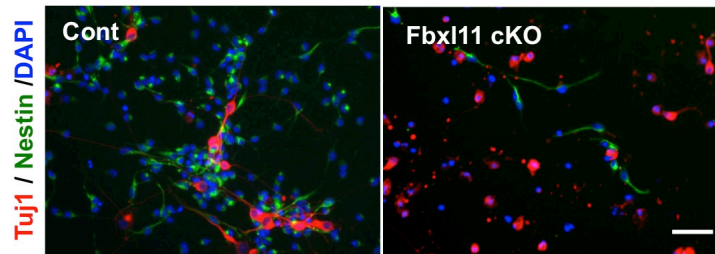
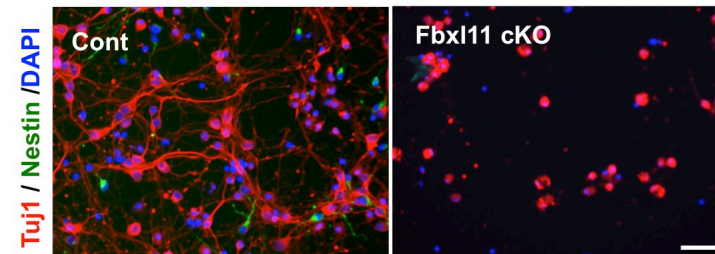


図3-16 Fbxl11 cKOマウス大脳皮質由来神経幹細胞は細胞死を引き起こす
 E14.5胎仔大脳皮質由来の神経幹細胞の純化培養(ニューロスフェアアッセイ)。(A)E14.5のコントロールおよびFbxl11cKOマウス大脳皮質より採取した培養4日目および培養7日目のニューロスフェア明視野像。Bar=100 μ m。培養7日目の(B上)ニューロスフェア数のカウントおよび(B下)Cell titer Gloによる生細胞数の定量評価。(C)ウエスタンブロッティング解析によるコントロールおよびFbxl11cKO由来の培養4日目ニューロスフェアにおけるアポトーシスマーカーCC3の発現。内部標準にはGapdhを使用した。(D)リアルタイムPCRによるコントロールおよびFbxl11cKO由来の培養4日目ニューロスフェアにおけるFbxl11、Nestin、Tuj1、GFAP、Hes1、Hes5、Ngn2の発現。遺伝子発現はGpadhを内部標準として規格化した。グラフは3回の独立実験(n=3)をもとに平均値 \pm 標準誤差で表示し、統計解析処理法としてStudent t-testを行った。
 **p<0.01。

A Attached culture 4d +bFGF (Nestin+ / Tuj1+)



B Attached culture 4d -bFGF (Tuj1+)



C Attached culture 4d +Bmp4 +Lif (GFAP+)

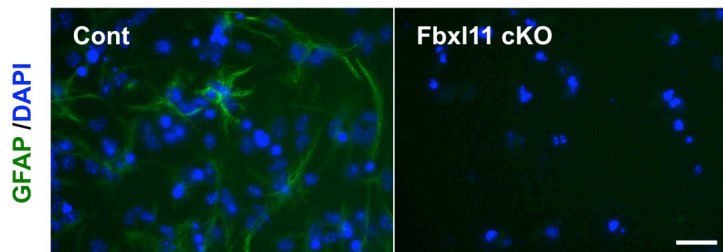


図3-17 Fbx11cKOマウス大脳皮質由来神経幹細胞の神経分化異常
神経幹細胞の純化培養、神経細胞およびグリア細胞への分化培養のために、E14.5胎仔脳由来のニューロスフェアを4日間培養し、(A)bFGF存在下、(B)bFGF非存在下、(C)Bmp4・LIF存在下で4日間接着培養を行った。各培養条件の細胞に対する、免疫細胞化学染色による(A)神経幹細胞マーカーNestin、(B)神経細胞マーカーTuj1、(C)アストロサイトマーカーGFAPの発現。Bar=100 μ m。

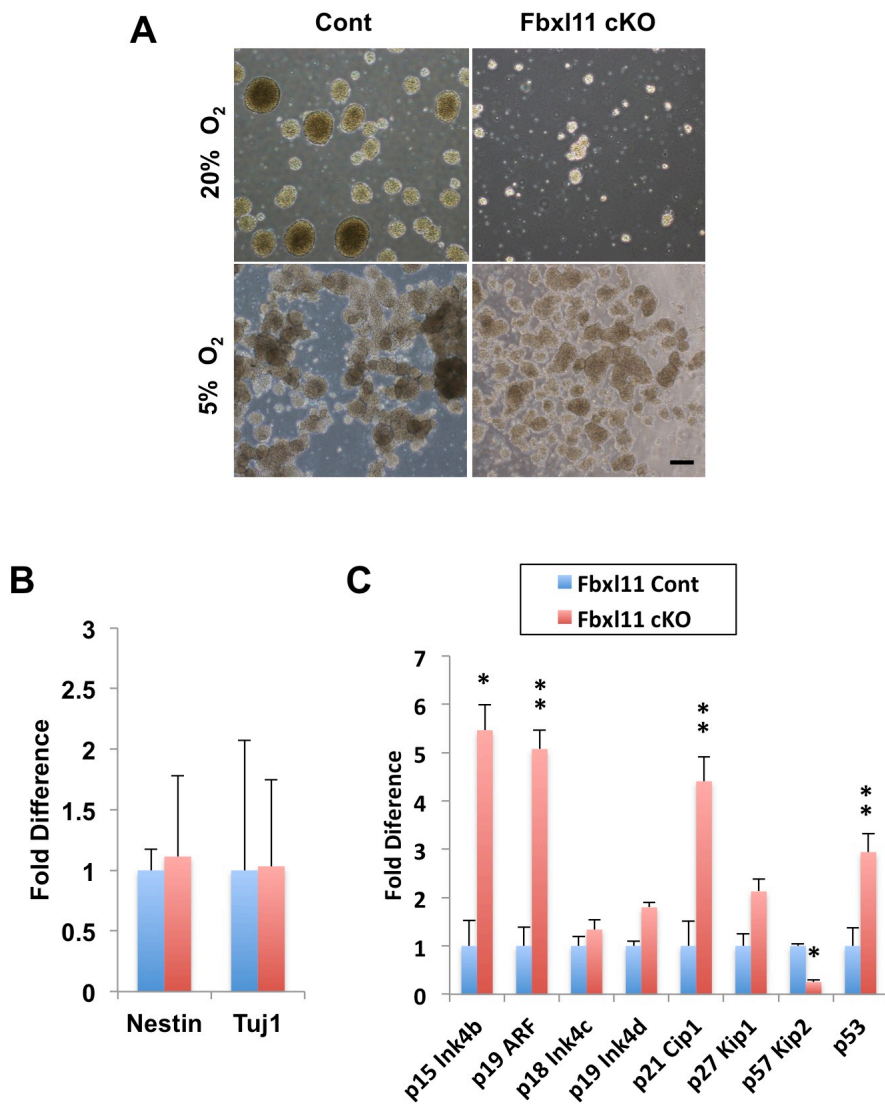


図3-18 低酸素条件下におけるFbx11欠損神経幹細胞の生存率の回復
 (A)E14.5のコントロールおよびFbx11 cKOマウス大脳皮質より採取し、酸素条件20%および5%で7日間培養したニューロスフェア明視野像。Bar=100 μ m。(B)5%酸素環境で4日間培養したニューロスフェアにおけるリアルタイムPCRによる神経分化マーカー(Nestin、Tuj1)、細胞周期マーカー(p15^{Ink4b}、p19^{ARF}、p18^{Ink4c}、p19^{Ink4d}、p21^{Cip1}、p27^{Kip1}、p57^{Kip2}、p53)の発現解析。遺伝子発現はGapdhを内部標準として規格化した。グラフは3回の独立実験(n=3)をもとに平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計学解析としてStudent t-testにより有意差検定を行った。
 *p<0.05,**p<0.01

A

	2 fold down	2 fold up	all
[1] het (20%) vs cKO (20%)	2072	1941	4013
[2] het (5%) vs cKO (5%)	850	440	1290
[3] het (5%) vs het (20%)	227	303	530

B

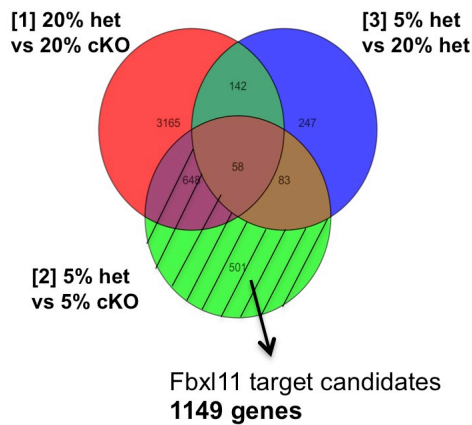
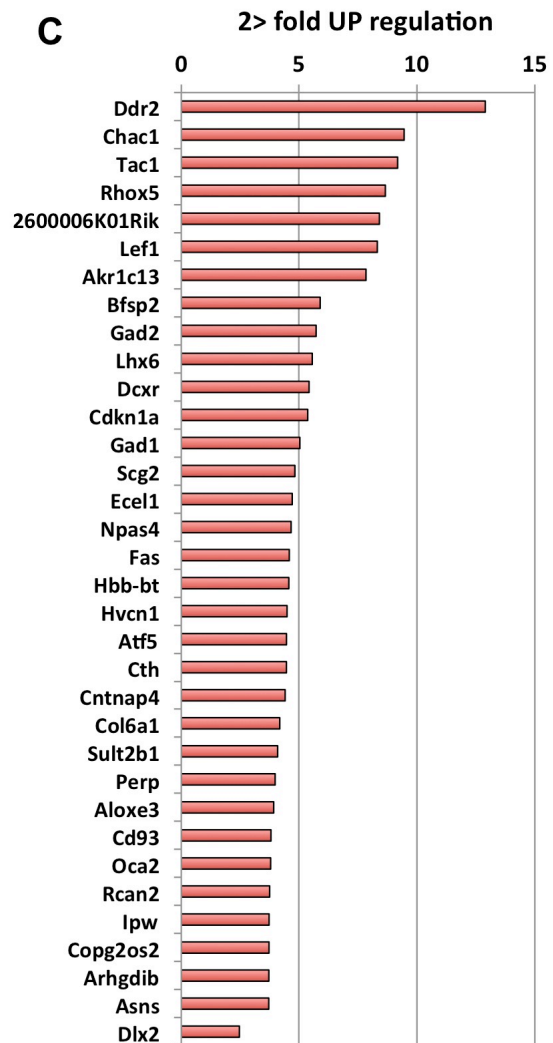


図3-19 マイクロアレイによるFbxl11欠損神経幹細胞の網羅的遺伝子発現解析
 [1]20%酸素条件下で4日間培養したコントロールとFbxl11 cKOマウスの神経幹細胞、
 [2]5%酸素条件下で4日間培養したコントロールとFbxl11 cKOマウスの神経幹細胞、
 [3]5%酸素条件と20%酸素条件下で4日間培養したコントロールの神経幹細胞で比較した。(A)Fbxl11欠損、および酸素条件により発現が2倍以上変動した遺伝子数のリスト。(B)ベン図解析により、酸素条件で変動する遺伝子を取り除いた遺伝子セットを標的候補遺伝子とした(斜線部)。(C)斜線部に示したFbxl11標的候補遺伝子群のうち2倍以上発現上昇した遺伝子リスト。

C



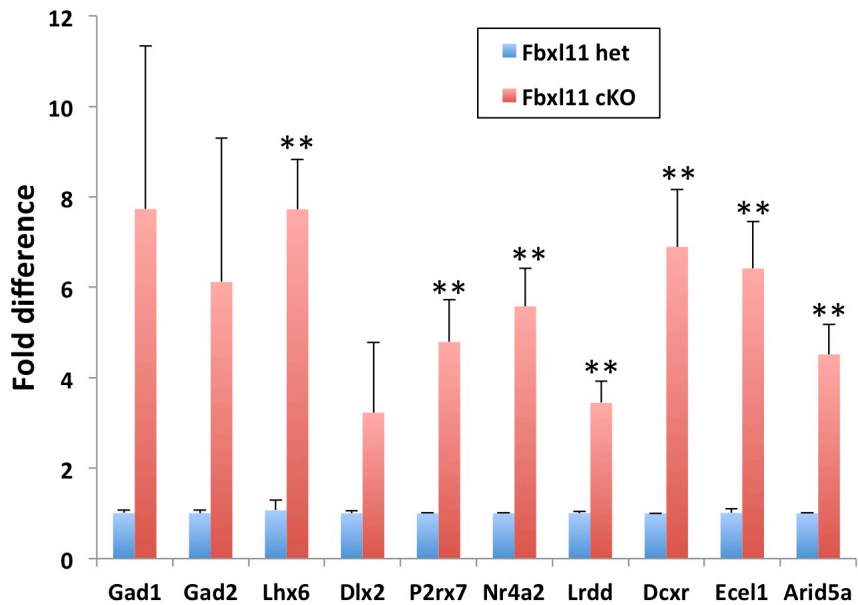


図3-20 神経幹細胞におけるFbx111の標的遺伝子発現解析
 マイクロアレイ解析によって抽出されたFbx111標的候補遺伝子(Gad1、Gad2、Lhx6、Dlx2、P2rx7、Nr4a2、Lrdd、Dcxr、Ecel1、Arid5a)のリアルタイムPCRによるの発現解析。それぞれの遺伝子発現はGapdhを内部標準として規格化した。マイクロアレイ解析と同様に、5%酸素環境で4日間培養したニューロスフェアからcDNAを精製し実験に供した。グラフは4回の独立実験(n=4)をもとに平均値±標準誤差で表示した。有意差はStudent t-testにより検定を行った。**p<0.01。

4. 考察

本研究ではまず初期発生での Fbx111 の生理的機能を調べるために、Fbx111 遺伝子改変マウスを作製した。Fbx111 レポーターマウスを用いた発現解析より、Fbx111 が胚発生期を通じて広く発現し、中枢神経系にも局在が示されたことから、初期発生および神経分化期において Fbx111 が機能を持つ可能性が示唆された。また、Fbx111 欠損マウスは成長遅延を示し、胎生中期 (E10.5) で致死を呈した。遺伝子発現解析より Fbx111 欠損マウスでは p21^{Cip1} の発現が有意に上昇しており、Fbx111 は細胞周期調節因子 p21^{Cip1} の発現抑制を介して細胞増殖に寄与することが示唆された。さらに、Fbx111 の欠損はポリコーム群タンパク質 (PcG) の遺伝子発現制御のヒストンマークである H2A のユビキチン化レベルの低下を引き起こしていた。Fbx111 が初期発生において Fbx110 と同様に細胞増殖を制御し、胚発生期に必須の因子であることを明らかとした。

さらに、神経特異的 Fbx111 (Fbx111 cKO) 欠損マウスは脳皮質の低形成を呈して生後 10~15 日にかけて全個体が死亡した。また Fbx111 欠損脳では上層の神経細胞死が観察され、その神経変性に伴い、活性型アストロサイトおよび活性型ミクログリアが集積していた。これらの結果から、Fbx111 は生後の神経細胞の生存維持や神経幹細胞の自己複製能に必須であり、神経発生において重要な役割を持つことを示した。

4.1. Fbx110 と Fbx111 の機能比較

近年では 30 以上の JmjC ファミリーヒストン脱メチル化酵素が同定されている。これまでに、ヒストン脱メチル化酵素の生理的役割の解明のために、いくつかの遺伝子欠損マウスが作製されてきたが、JmjC ファミリー脱メチル化酵素遺伝子欠損マウスの表現型は軽微なものから胎生致死といった重篤なものまで様々に存在する。例えば、Utx (Kdm6a) および Jarid2 の欠損は胎生致死を引き起こす (Baker et al., 1997; Cox et al., 2010; Lee et al., 2012) が、Kdm4d (Jmjd2d / Jhdm3d)、Kdm3a (Jmjd1a / Jhdm2a) の欠損マウスは生存可能であり、顕著な表現型は観察されない。 (Inagaki et al., 2009; Iwamori et al., 2011; Okada et al., 2007)

Fbx110(Kdm2b)は JmjC ドメインにおいて Fbx111 と 80%の相同性を有するパラログ遺伝子であり、Fbx110 と Fbx111 は共通してヒストン H3K36 のモノメチル基、ジメチル基を特異的に取り除く。Fbx110 欠損マウスでは神経管閉鎖不全に由来する外脳症を呈し、生後に早死し、また Fbx110 欠損胚および Fbx110 欠損 MEF では、細胞周期阻害因子である p19^{ARF} の発現が亢進していた。これらの結果から、Fbx110 は初期発生における細胞の増殖やアポトーシスの制御に寄与することが明らかとなっている (Fukuda et al., 2011)。Fbx110 と Fbx111 の配列相同性から、初期発生において Fbx110 と Fbx111 は同様の表現型を示すことを予想したが、予想に反し、Fbx111 欠損マウスの表現型は E8.5 ~E10.5 と Fbx110 欠損マウスと比較して早期に現れ、胎生中期に致死となる重篤な症状を示した (図 3-3B, 表 3-1, 3-2)。Fbx110 は脳や精巣といった特定の組織に発現が偏ることが報告されている (Fukuda et al., 2011)。しかし、本研究での Fbx111 レポーターマウスの解析により、Fbx111 は全身に広く発現しており、胎生中期以降に大脳皮質や前後肢に強く発現することが明らかとなった (図 3-2A)。このような初期発生における Fbx110 および Fbx111 の発現動態の違いが、Fbx110 および Fbx111 遺伝子欠損マウスの異なる表現型を示した要因と推測される。

一方で、一部の Fbx111 欠損マウスは Fbx110 欠損マウスと同様に、神経管閉鎖不全や神経堤細胞におけるアポトーシスを示し (data not shown)、さらに、Fbx111 欠損胚においては神経分化マーカーの発現減少が観察された (図 3-4E)。従って Fbx110 と Fbx111 は神経発生において一部機能が重複する可能性が考えられた。しかしながら、Fbx111 欠損胚の胎生致死により、Fbx111 欠損による神経分化の影響を追跡することが出来なかったため、次に神経特異的 Fbx111 欠損 (Fbx111 cKO) マウスを作製した。大脳皮質特異的に Fbx111 を欠損した Fbx111 cKO マウスは、生後 10 日 (P10) ~P15 において全ての個体が死亡した。Fbx111 cKO マウスは P10 において大脳皮質が有意に縮小しており、II ~ V 層の神経細胞層特異的な神経細胞死が観察された (図 3-12, 3-13, 3-14)。

このように Fbx111 cKO マウスは生後において神経変性様の表現型を示し、その表現型が生じる時期と症状は限局しており、Fbx110 欠損マウスの外脳症の表現型とは一致しなかった。このことは、Fbx110 欠損マウスは E9.5 の時期から神経管閉鎖不全が起こるのに対して、Fbx111 cKO マウスは E10.5 以降で大脳皮質の神経幹細胞において Fbx111 が欠損するために、表現型の相違が生じたことが予想された。Fbx111 cKO マウスの解

析だけではFbxl10とFbxl11との機能相関について解釈することが難しかった。今後は、神経特異的 Fbxl10/Fbxl11 欠損マウスが、中枢神経系の初期発生における Fbxl11 と Fbxl10 の機能相関性、相違性を解析する有用なツールとなるだろう。

4.2. 初期発生におけるヒストン H3K36 脱メチル化酵素の役割

Fbxl11 欠損マウスの表現型はパラログ遺伝子の Fbxl10 よりも、JmjC ファミリーの一つである Jmjd5 の遺伝子欠損マウスの表現型と類似するものであった。Fbxl11 と同様に、Jmjd5 はジメチル化 H3K36 の脱メチル化を行う遺伝子である (Hsia et al., 2010)。Jmjd5 欠損マウスは E10.5 で胎生致死を呈し、細胞周期調節因子である p21^{Cip1} の発現上昇が見られることが報告されている (Ishimura et al., 2012; Oh et al., 2012)。共通するヒストン H3K36 のメチル基 (H3K36me2) を取り除く Fbxl11 と Jmjd5 の欠損は、p21^{Cip1} の発現異常を呈し、成長遅延による胎生致死という同様の表現型を誘導した。ヒストン H3K36 の生物学的な役割は全てが証明されてはいないが、H3K36 メチル化は転写が活性化された遺伝子領域に分配されており、転写調節や DNA 複製、相同組換え、DNA 二重鎖切断といった機構に関与することが示唆されている (Wagner and Carpenter, 2012)。我々の知見と最近の報告から、ヒストン H3K36 の脱メチル化による細胞周期の調節がマウスの初期発生に必須であることが示された。

しかしながら、Fbxl11 欠損マウスにおける全ゲノム上のヒストン H3K36 のメチル化レベルでは変化が見られなかったことから (図 3-7)、初期発生において Fbxl11 は主要な H3K36 脱メチル化酵素ではない可能性、あるいは、ヒストン修飾は標的遺伝子の領域に特異的であるために、胎仔より採取した全タンパク質に対するウエスタンブロッティング解析では検出することが出来なかったことが示唆される。標的遺伝子領域におけるヒストン修飾の変化を検出するにはクロマチン免疫沈降法 (ChIP) による解析が尤も適している。一般的には、初期発生における機能解析には E13.5 胎仔由来の MEF を使用するが、Fbxl11 欠損マウスの胎生致死の時期は E10.5~E12.5 と早く (表 3-1, 3-2)、胎仔より MEF を樹立することが困難であった。Fbxl11 に対する shRNA (short hairpin RNA) による遺伝子ノックダウン、Fbxl11 欠損 ES 細胞や Fbxl11 cKO マウス由来初代培養細胞などを用いて、ChIP 解析を行うことで、Fbxl11 による各遺伝子発現調節機構が明らかになるだろう。

4.3. Fbxl11 による細胞周期調節因子の制御

我々は Fbxl11 欠損胚において p21^{Cip1} の発現が上昇していることを見出した(図 3-6)。p21^{Cip1} は DNA 損傷下において p53 の下流で転写調節を受ける遺伝子であり、p21^{Cip1} の発現は細胞周期の停止とアポトーシスを引き起こすことから、細胞の恒常性維持に重要であることが知られている (Takimoto and El-Deiry, 2001)。最近では、いくつかのエピジェネティック因子が p53 の非依存下で p21^{Cip1} の転写をコントロールするという報告がなされている (Gartel and Radhakrishnan, 2005; Wood and Shilatifard, 2006)。ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1 や脱メチル化酵素 Jmjd5 の遺伝子欠損マウスでは p21 の発現亢進と成長遅延を伴う胎生致死という表現型が見られる (Lagger et al., 2002; Ishimura et al., 2012; Oh et al., 2012)。我々は Fbxl11 欠損胚とコントロール胚との間に p53 の mRNA 発現レベルに変化がなく、p53 のタンパク質発現は両群共に検出感度以下であることを確認している(図 3-6)。最近の知見では、Ishimura らは Jmjd5 が p53 の発現調節を介さずに、ヒストン H3K36 の脱メチル化により p21^{Cip1} の発現を抑制することを Jmjd5 欠損 MEF を用いた実験によって示した一方で、Oh らのグループは Jmjd5 欠損胚(E10.5)を用いた実験で p53 とその下流遺伝子である p21^{Cip1}、Noxa および Puma の転写がいずれも亢進することを示している。これらの対立する研究結果は細胞のコンテキストの違いや発生時期の違いによるものと考えられる。従って Fbxl11 においても、遺伝子座におけるヒストン脱メチル化修飾により①p21^{Cip1} の発現を直接調節している可能性と、②p53 の発現調節を介して間接的に p21^{Cip1} の発現調節を行っている可能性が示唆された。このことは p53 および p21 の遺伝子座における ChIP 解析によって明らかにする必要があるが、Fbxl11 欠損マウスで p53 の発現亢進が認められなかったことから、p53 の発現調節に関わらず、p21^{Cip1} の発現は亢進されており、細胞増殖低下や細胞死亢進といった原因により胎生致死を呈したと解釈している。

さらに Fbxl11 cKO マウスを用いて神経幹細胞における Fbxl11 の機能解析を行ったところ、Fbxl11 欠損胚と同様に、Fbxl11 cKO マウス由来神経幹細胞においても細胞周期調節因子 p21^{Cip1} とアポトーシスマーカー CC3 の発現亢進が観察され、細胞死が誘導されていた。興味深いことに、Fbxl11 欠損神経幹細胞においては p53 の mRNA レベルも亢進していたことから(図 3-19C)、神経幹細胞においては Fbxl11 が p53-p21 経路に影響することにより、神経幹細胞の生存を制御することが示された。胚組織と神経幹細胞では

細胞コンテキストの違いにより、p53 の発現に相違が認められたが、初期発生および神経発生において Fbx111 が p21 の発現抑制を介して、細胞の生存能を制御することが明らかとなった。

4.4. Fbx111 とポリコーム群タンパク質との相関

ヒストンメチル化修飾を触媒するポリコーム群タンパク質 (Polycomb Group proteins) PcGs は Polycomb Repressive Complexes (PRC)1 および PRC2 と呼ばれる二つのタンパク複合体により構成され、そのヒストン修飾 (H3K27 トリメチル化、H2AK119 ユビキチン化) により標的遺伝子の発現を抑制して幹細胞の自己複製能維持や分化制御を行うことが知られている (Bernstein et al., 2006; Mikkelsen et al., 2007; Boyer et al., 2006)。2013 年に、Fbx110 が PRC1 の新規構成因子としても働き、PRC1 の標的遺伝子領域へのリクルートに関与することが報告された (Cooper et al., 2014; Wu et al., 2013)。これまで PRC2 により付加されるヒストン H3K27me3 マークを認識して PRC1 がリクルートされると考えられてきた (canonical PRC1) が、Fbx110 は PRC2 非存在下において、非メチル化 CpG 領域に結合して PRC1 を標的遺伝子領域にリクルートする。さらに、新しく同定された Fbx110-PRC1 (novel PRC1) は PRC2 をリクルートし、H3K27 トリメチル化を標的遺伝子領域に付与することも示された (Blackledge et al., 2014; Cooper et al., 2014)。このように最近では Fbx110 の詳細な機能解析により、novel PRC1 の機能が見出されるまでに至っている。また Fbx111 も、Fbx110 と同様にゲノム上の多くの CpG アイランド (非メチル化 DNA 領域) に結合することから、Fbx111 と PRC1 との結合や機能相関が予測されたため、Fbx111 欠損胚を用いて、PcG のヒストン修飾マーカーである H2A ユビキチン化レベル、PcG 構成因子である Ezh2 および Ring1B の発現を検出した。その結果、Fbx111 欠損胚において H2A ユビキチン化レベルは特異的に低下し (図 3-7)、更に Fbx111 欠損によりヒストン H3K27 メチル化酵素である Ezh2 の mRNA およびタンパク質発現が減少していた (図 3-7)。マウス ES 細胞での Fbx110 欠損では、ヒストンユビキチン化レベルは低下するものの、PcG 構成因子 (Ring1B, Ezh2) の発現レベルに影響しないとの報告がある (Farcas et al., 2012; Wu et al., 2013)。また一方では、MEF で Fbx110 がマイクロ RNA の発現調節を介して Ezh2 の転写調節を行っているという報告もなされている (Tzatsos et al., 2011)。先述 (考察 4-3 参照) のようにヒストン修

飾による発現調節はセルコンテキストに依存しており、Fbx110 は ES 細胞では Ezh2 の発現調節には関与しないが、MEF ではマイクロ RNA を介して間接的に Ezh2 の発現調節を行っている。我々の結果では、Fbx111 の欠損がヒストンユビキチン化レベルの低下を引き起こしたことから、発生中期の胚において Fbx111 が PcG の機能の一部関与することが示唆された。さらに Fbx111 と PcG が直接相互作用するかは ES 細胞や神経幹細胞を用いた免疫沈降法によって詳細に検討してゆく必要があるだろう。

4.5. Fbx111 欠損による神経変性

Fbx111 cKO マウス脳は P10 において大脳皮質層が減少し、神経細胞の減少およびアストロサイトの増加といった表現型が観察された(図 3-12, 3-13, 3-14, 3-15)。これまでに PcG の主要構成因子である Ezh2 および Ring1B が神経幹細胞からの神経細胞とアストロサイトへの分化運命決定をコントロールすることが証明されている(Hirabayashi et al., 2009)。ヒストン脱メチル化酵素である Fbx111 も Ring1B と同様に、神経幹細胞からグリア細胞への分化運命に寄与することが予想された。解析の結果、Fbx111 cKO マウスではアストロサイトだけではなく、ミクログリアの過増殖も観察された(図 3-15B)。グリア細胞は神経細胞の支持・保護を行う役割を持つと同時に、神経損傷などの病態脳において、活性化されたミクログリアとアストロサイトが、死細胞の貪食、サイトカインの分泌等を行い炎症を増強することも報告されている(Liu et al., 2011)。神経損傷に応答したグリア細胞は活性型アストロサイト、活性型ミクログリアと呼ばれるアメーバ状の形態を示すことが細胞生物学的に明らかとなっているが、Fbx111 cKO マウス大脳皮質においても、アメーバ状のミクログリアが観察された(図 3-15B)。また、ミクログリアは中胚葉起源であり、血液脳関門が形成される前の胎生期において脳実質中に移行することから、脳の神経幹細胞から分化する細胞系列ではないことが報告されている(Chan et al., 2007)。Fbx111 欠損神経幹細胞を *in vitro* にてアストロサイトへ分化培養したところ、アストロサイトへの分化誘導はされず(図 3-17)、これらの結果および知見から、Fbx111 cKO マウスにおけるアストロサイトおよびミクログリアの過増殖は、神経幹細胞からの分化亢進ではなく、脳虚血時の神経変性症状と非常に似た表現型(神経細胞死およびグリア細胞の集積、脳の縮小)であることから、Fbx111 の欠損によりまず重篤な神経変性が生じた結果、神経細胞死を呈し、それに応答して二次的

にグリア細胞が異所的な集積をすることが示唆された。また Fbx111 の発現は分化した神経細胞に強く発現していた(図 3-9)ことから、Fbx111 は生後の神経細胞の生存に寄与することが支持された。また、大脳皮質特異的な遺伝子欠損にも関わらず、P10~P15 で個体死亡するほどの神経変性の表現型を示したことから、Fbx111 による異常は神経変性疾患といった病態にも関与することが強く示唆された。

Fbx111cKO マウスにおいて、生後の神経細胞は神経変性様の症状を示したが、胎生期の神経幹細胞および神経細胞の動態は正常であった。生後に見られる Fbx111 欠損による神経変性の原因を探るため、形態的な異常が表れてない胎生期の神経幹細胞を用いて Fbx111 の遺伝子発現調節機構を解明することにした。しかし、予想に反し、*in vitro* で培養した胎仔脳由来の Fbx111 cKO 神経幹細胞は分化異常、細胞死という *in vivo* とは異なる重篤な表現型を示した(図 3-16, 3-17)。そこで胎生期と生後の環境の違いとして酸素濃度の変化に着目し、Fbx111 欠損神経幹細胞を低酸素条件下で培養したところ、一部ニューロスフェア形成能が回復することが見出された(図 3-18)。

・低酸素応答

胎仔脳は成体脳と比較して生理的に低酸素条件下(2%~5%O₂)に保持されており、*in vitro* において神経幹細胞および神経細胞を低酸素条件下で培養することでその自己複製能が増大されることが知られている(Zhang et al., 2011)。低酸素環境下における分子機構の一つに酸素誘導因子(Hypoxia-inducible factors: HIF)による遺伝子発現調節機構があり、癌の病巣部などの低酸素環境において HIF はエネルギー代謝、細胞生存、血管新生などに関与する 180 以上の下流遺伝子の発現を亢進する。中枢神経系においても、低酸素下において HIF と協調して Notch signaling が活性化することにより神経幹細胞の増殖が維持されることが報告されている(Gustafsson et al., 2005)。さらに、ChIP-chip 解析により、HIF の直接的な下流遺伝子として JmjC ドメインを有するヒストン脱メチル化酵素が同定されており、その中には Fbx110 および Fbx111 も含まれていた。すなわち低酸素下において HIF の下流でヒストン脱メチル化酵素の発現および酵素活性が上方調節されることにより、クロマチン修飾状態がゲノムワイドに変化し、HIF 下流因子の遺伝子発現調節に関与することが明らかとなっている(Yang et al., 2009; Xia

et al., 2009)。これらの先行研究により、Fbx111 欠損神経幹細胞が 5% O₂ の低酸素環境下で増殖能が回復したことにに関して、Fbx111 以外のヒストン脱メチル化酵素の活性化により幹細胞の生存能が回復したことも考えられる。

・酸化ストレス

好氣的エネルギー代謝により生じる活性酸素種 (Reactive Oxidative Stress: ROS) は DNA 損傷などの酸化ストレス応答を引き起こし、その蓄積はパーキンソン病などの神経変性疾患やアルツハイマー病といった老化関連疾患に密接に関与することが報告されている (Ross and Poirier, 2004; Selkoe, 2004)。酸化ストレスに応答して細胞周期を調節する (Ataxia Telangiectasia Mutated) ATM 遺伝子欠損マウスを用いた解析により、活性酸素下において p38-MAPK が活性化し、p21^{Cip1} や p27^{Kip1} といった細胞周期調節因子の発現を亢進させることにより神経幹細胞の増殖能が欠失することが示されている (Kim and Wong, 2009; Kim et al., 2011)。この報告から活性酸素が神経幹細胞の自己複製を負に制御することが明らかとなっており、Fbx111 cKO 神経幹細胞が生後に生じる酸化ストレスに曝露されたことが、細胞死を引き起こした要因であることが示唆される。

また、正常の発生過程においても酸化ストレスが細胞の増殖に与える影響についても報告されており、新生仔の心筋細胞において、出生という酸素環境の変化によって生じた ROS による DNA 損傷が心筋細胞の細胞周期停止を引き起こすことが最近証明された (Puente et al., 2014)。Fbx111 cKO マウスも胎生期においては正常に分化、生存していた神経細胞が生後において急速に神経細胞死を引き起こしていた (図 3-10, 3-12, 3-13, 3-14)。脳も好氣的エネルギー代謝に強く依存していることから、心筋細胞と同様に、神経細胞もまた、出生に伴う酸素環境の変化によって神経細胞死が引き起こされることが考えられる。Fbx111 cKO マウスの表現型より、Fbx111 は通常、生後の神経細胞の酸化ストレス応答に対して保護する役割を担っていることが示唆された。

我々の研究結果とこれまでの知見より、胎生期の神経幹細胞では Fbx111 の欠損による遺伝子発現異常が蓄積し、出生というイベントにより生じた酸化ストレスがトリガーとなり、生後において神経変性といった表現型が露見したものと考えられる (図 4)。本

研究では生理的環境下において Fbx111 が神経幹細胞や神経細胞の生存、分化に必須な因子であり、ヒストン修飾を介して酸化ストレス、神経分化、細胞周期といった複数のシグナルに関わる遺伝子の発現調節を担っていることを証明した。

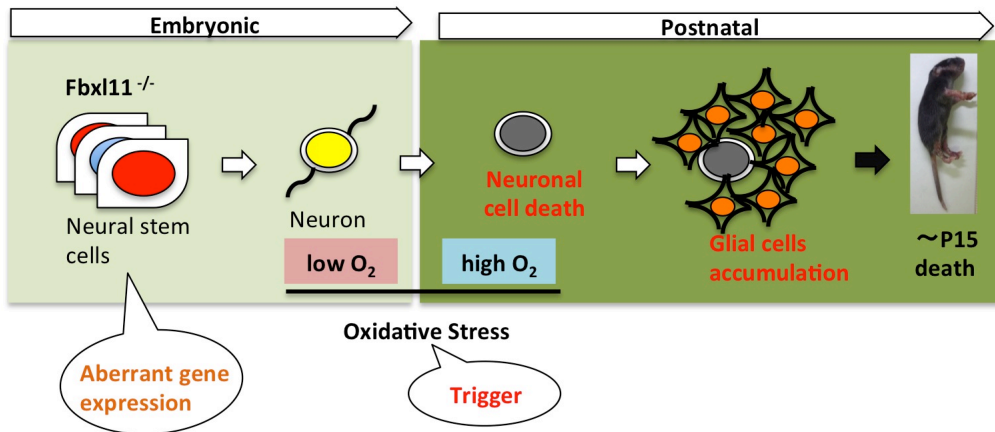


図4 神経発生におけるFbx11の生理的役割
 Fbx11欠損による神経幹細胞での遺伝子異常の蓄積、生後の酸化ストレスの影響が発端となり、生後の大脳皮質での神経細胞死、早死を引き起こすことが示唆された。

参考文献

Baker RK, Haendel MA, Swanson BJ, Shambaugh JC, Micales BK, Lyons GE. (1997). In vitro preselection of gene- trapped embryonic stem cell clones for characterizing novel developmentally regulated genes in the mouse. *Dev. Biol.* 185(2): 201–214.

Bartke T, Vermeulen M, Xhemalce B, Robson SC, Mann M, Kouzarides T. (2010). Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell.* 143(3): 470-484.

Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell.* 125(2): 315-326.

Blackledge NP, Farcas AM, Kondo T, King HW, McGouran JF, Hanssen LL. (2014). Variant PRC1 complex- dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell.* 157(6), 1445–1459.

Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* 441(7091): 349-353.

Burgold T, Spreafico F, De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Natoli G, Testa G. (2008). The histone H3 lysine 27-specific demethylase Jmjd3 is required for neural commitment. *PLoS One.* 3(8): e3034.

Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. (2007). The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev.* 53(2): 344-354.

Cooper S, Dienstbier M, Hassan R, Schermelleh L, Sharif J, Blackledge NP. (2014). Targeting polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. *Cell Rep.* 7(5): 1456-1470.

Cox BJ, Vollmer M, Tamplin O, Lu M, Biechele S, Gertsenstein M. (2010). Phenotypic annotation of the mouse X chromosome. *Genome Res.* 20(8): 1154–1164.

Dhar SS, Alam H, Li N, Wagner KW, Chung J, Ahn YW. (2014). Transcriptional repression of histone deacetylase 3 by the histone demethylase KDM2A is coupled to tumorigenicity of lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* 289(11): 7483–7496.

Dodge JE, Kang YK, Beppu H, Lei H and Li E. (2004). Histone H3-K9 methyltransferase ESET is essential for early development. *Mol Cell Biol.* 24(6): 2478-2486.

Dong R, Yao R, Du J, Wang S, Fan Z. (2013). Depletion of histone demethylase KDM2A enhanced the adipogenic and chondrogenic differentiation potentials of stem cells from apical papilla. *Exp. Cell Res.* 319(18): 2874–2882.

Du J, Ma Y, Ma P, Wang S, Fan Z. (2013). Demethylation of epiregulin gene by histone demethylase FBXL11 and BCL6 corepressor inhibits osteo/dentinogenic differentiation. *Stem Cells.* 31(1): 126–136.

Estarás C, Akizu N, García A, Beltrán S, de la Cruz X, Martínez-Balbás MA. (2012). Genome-wide analysis reveals that Smad3 and JMJD3 HDM co-activate the neural developmental program. *Development.* 139(15): 2681-2691.

Farcas AM, Blackledge NP, Sudbery I, Long HK, McGouran JF, Rose NR. (2012). KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. *Elife.* 1: e00205.

Frescas D, Guardavaccaro D, Bassermann F, Koyama-Nasu R, Pagano M. (2007). JHDM1B/FBXL10 is a nucleolar protein that represses transcription of ribosomal RNA genes. *Nature*. 450(7167): 309–313.

Fukuda T, Tokunaga A, Sakamoto R, Yoshida N. (2011). Fbxl10/ Kdm2b deficiency accelerates neural progenitor cell death and leads to exencephaly. *Mol. Cell. Neurosci*. 46(3): 614–624.

Gao R, Dong R, Du J, Ma P, Wang S, Fan Z. (2013). Depletion of histone demethylase KDM2A inhibited cell proliferation of stem cells from apical papilla by de-repression of p15INK4B and p27Kip1. *Mol. Cell. Biochem*. 379(1–2): 115–122.

Gartel AL, Radhakrishnan SK. (2005). Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res*. 65(10): 3980–3985.

Gorski JA, Talley T, Qiu M, Puelles L, Rubenstein JL, Jones KR. (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J Neurosci*. 22(15): 6309-6314.

Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M. (2005). Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*. 9(5): 617-628.

Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, Noda H. (2011). Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neurosci*. 14(11): 1481–1488.

He J, Kallin EM, Tsukada Y, Zhang Y. (2008). The H3K36 demethylase Jhdm1b/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15(Ink4b). *Nat. Struct. Mol. Biol*. 15(11): 1169–1175.

Hirabayashi Y, Suzuki N, Tsuboi M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Koseki H, Vidal M, Gotoh Y. (2009). Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. *Neuron*. 63(5): 600-613.

Hsia DA, Tepper CG, Pochampalli MR, Hsia EY, Izumiya C, Huerta SB. (2010). KDM8, a H3K36me2 histone demethylase that acts in the cyclin A1 coding region to regulate cancer cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107(21): 9671-9676.

Inagaki T, Tachibana M, Magoori K, Kudo H, Tanaka T, Okamura M. (2009). Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHDM2a-deficient mice. *Genes Cells*. 14(8): 991-1001.

Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Kondoh G, Hara T, Suzuki T. (2012). Jmjd5, an H3K36me2 histone demethylase, modulates embryonic cell proliferation through the regulation of Cdkn1a expression. *Development*. 139(4): 749-759.

Iwamori N, Zhao M, Meistrich ML, Matzuk MM. (2011). The testis-enriched histone demethylase, KDM4D, regulates methylation of histone H3 lysine 9 during spermatogenesis in the mouse but is dispensable for fertility. *Biol. Reprod.* 84(6): 1225-1234.

Iwasato T, Nomura R, Ando R, Ikeda T, Tanaka M, Itohara S. (2004). Dorsal telencephalon-specific expression of Cre recombinase in PAC transgenic mice. *Genesis*. 38(3): 130-138.

Jepsen K, Solum D, Zhou T, McEvelly RJ, Kim HJ, Glass CK, Hermanson O, Rosenfeld MG. (2007). SMRT-mediated repression of an H3K27 demethylase in progression from neural stem cell to neuron. *Nature*. 450(7168): 415-419.

Juliandi B, Abematsu M, Nakashima K. (2010). Epigenetic regulation in neural stem cell differentiation. *Dev Growth Differ.* 52(6): 493-504.

Kanki H, Suzuki H, Itohara S. (2006). High-efficiency CAG-FLPe deleter mice in C57BL/6J background. *Exp. Anim.* 55(2): 137– 141.

Kawaguchi A, Miyata T, Sawamoto K, Takashita N, Murayama A, Akamatsu W, Ogawa M, Okabe M, Tano Y, Goldman SA, Okano H. (2001). Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of the self-renewal and multipotency of CNS stem cells. *Mol Cell Neurosci.* 17(2): 259-273.

Kawakami E, Tokunaga A, Ozawa M, Sakamoto R, Yoshida N. (2015). The histone demethylase Fbxl11/Kdm2a plays an essential role in embryonic development by repressing cell-cycle regulators. *Mech Dev.* 135: 31-42.

Kim J, Wong PK. (2009). Loss of ATM impairs proliferation of neural stem cells through oxidative stress-mediated p38 MAPK signaling. *Stem Cells.* 27(8): 1987-1998.

Kim J, Hwangbo J, Wong PK. (2011). p38 MAPK-Mediated Bmi-1 down-regulation and defective proliferation in ATM-deficient neural stem cells can be restored by Akt activation. *PLoS One.* 6(1): e16615.

Klose RJ, Zhang Y. (2007). Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(4): 307–318.

Kooistra SM, Helin K. (2012). Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13(5): 297–311.

Kottakis F, Polytarchou C, Foltopoulou P, Sanidas I, Kampranis SC, Tsiachlis PN. (2011). FGF-2 regulates cell proliferation, migration, and angiogenesis through an NDY1/ KDM2B-miR-101-EZH2 pathway. *Mol. Cell.* 43(2): 285–298.

Lagger G, O'Carroll D, Rembold M, Khier H, Tischler J, Weitzer G. (2002). Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J.* 21(11): 2672–2681.

Laugwitz KL, Moretti A, Caron L, Nakano A, Chien KR. (2008). Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? *Development*. 135(2):193-205.

Lee S, Lee JW, Lee SK. (2012). UTX, a histone H3-lysine 27 demethylase, acts as a critical switch to activate the cardiac developmental program. *Dev. Cell*. 22(1): 25-37.

Liu W, Tang Y, Feng J. (2011). Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life Sci*. 89(5-6): 141-146.

Martin C, Zhang Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(11): 838-849.

Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. 448(7153): 553-560.

Molofsky AV, Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ. (2003). Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature*. 425(6961): 962-967.

Molofsky AV, He S, Bydon M, Morrison SJ, Pardal R. (2005). Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev*. 19(12): 1432-1437.

Mosammamaparast N, Shi Y. (2010). Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu. Rev. Biochem*. 79: 155-179.

Noma K, Allis CD, Grewal SI. (2001). Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science*. 293 (5532): 1150–1155.

O'Carroll D, Erhardt S, Pagani M, Barton S.C, Surani MA. and Jenuwein T. (2001). The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol. Cell Biol.* 21: 4330-4336.

Oh S, Janknecht R. (2012). Histone demethylase JMJD5 is essential for embryonic development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420(1): 61–65.

Okada Y, Scott G, Ray MK, Mishina Y, Zhang Y. (2007). Histone demethylase JHDM2A is critical for *Tnp1* and *Prm1* transcription and spermatogenesis. *Nature*. 450(7166): 119–123.

Pattaroni C, Jacob C. (2013). Histone methylation in the nervous system: functions and dysfunctions. *Mol Neurobiol.* 47(2): 740-756.

Pedersen MT, Helin K. (2010). Histone demethylases in development and disease. *Trends Cell Biol.* 20(11): 662–671.

Pereira JD, Sansom SN, Smith J, Dobenecker MW, Tarakhovskiy A, Livesey FJ. (2010). *Ezh2*, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(36): 15957-15962.

Pettitt SJ, Liang Q, Rairdan XY, Moran JL, Prosser HM, Beier DR, Lloyd KC, Bradley A, Skarnes WC. (2009). Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nat Methods.* 6(7): 493-495.

Pfau R, Tzatsos A, Kampranis SC, Serebrennikova OB, Bear SE, Tsihchlis PN. (2008). Members of a family of JmjC domain- containing oncoproteins immortalize embryonic fibroblasts via a JmjC domain-dependent process. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105(6): 1907–1912.

Puente BN, Kimura W, Muralidhar SA, Moon J, Amatruda JF, Phelps KL, Grinsfelder D, Rothermel BA, Chen R, Garcia JA, Santos CX, Thet S, Mori E, Kinter MT, Rindler PM, Zacchigna S, Mukherjee S, Chen DJ, Mahmoud AI, Giacca M, Rabinovitch PS, Aroumougame A, Shah AM, Szweda LI, Sadek HA. (2014). The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell*. 157(3): 565-579.

Reynolds BA, Weiss S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 255(5052): 1707-1710.

Ross CA, Poirier MA. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*. 10 Suppl: S10-17.

Sakai K, Miyazaki J. (1997). A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237(2): 318–324.

Selkoe DJ. (2004). Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol*. 6(11): 1054-1061.

Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 119(7): 941-953.

Shi Y. (2007). Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat. Rev. Genet*. 8(11): 829–833.

Shi Y, Whetstine JR. (2007). Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell*. 25(1): 1-14.

Shimazaki T, Shingo T, Weiss S. (2001). The ciliary neurotrophic factor/ leukemia inhibitory factor/gp130 receptor complex operates in the maintenance of mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci.* 21(19): 7642-7653.

Silva J, Smith A. (2008). Capturing pluripotency. *Cell.* 132(4): 532-536.

Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, Shinkai Y. (2002). G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev.* 16(14): 1779-1791.

Takimoto R, El-Deiry WS. (2001). DNA replication blockade impairs p53-transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(3): 781–783.

Tanaka Y, Okamoto K, Take K, Umata T, Yamagiwa N, Suto Y. (2010). JmjC enzyme KDM2A is a regulator of rRNA transcription in response to starvation. *EMBO J.* 29(9): 1510–1522.

Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature.* 439(7078): 811–816.

Tzatsos A, Pfau R, Kampnis SC, Tsihchlis PN. (2009). Ndy1/ KDM2B immortalizes mouse embryonic fibroblasts by repressing the Ink4a/Arf locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106(8): 2641–2646.

Tzatsos A, Paskaleva P, Lympieri S, Contino G, Stoykova S, Chen Z. (2011). Lysine-specific demethylase 2B (KDM2B)- let-7-enhancer of zester homolog 2 (EZH2) pathway regulates cell cycle progression and senescence in primary cells. *J. Biol. Chem.* 286(38): 33061–33069.

Tzatsos A, Paskaleva P, Ferrari F, Deshpande V, Stoykova S, Contino G. (2013). KDM2B promotes pancreatic cancer via polycomb-dependent and -independent transcriptional programs. *J. Clin. Invest.* 123(2): 727–739.

Wagner EJ, Carpenter PB. (2012). Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13(2): 115–126.

Wood A, Shilatifard A. (2006). Transcriptional blackjack with p21. *Genes Dev.* 20(6): 643–647.

Wu X, Johansen JV, Helin K. (2013). Fbxl10/Kdm2b recruits polycomb repressive complex 1 to CpG islands and regulates H2A ubiquitylation. *Mol. Cell.* 49(6): 1134–1146.

Xia X, Lemieux ME, Li W, Carroll JS, Brown M, Liu XS, Kung AL. (2009). Integrative analysis of HIF binding and transactivation reveals its role in maintaining histone methylation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(11): 4260-4265.

Yang J, Ledaki I, Turley H, Gatter KC, Montero JC, Li JL, Harris AL. (2009). Role of hypoxia-inducible factors in epigenetic regulation via histone demethylases. *Ann N Y Acad Sci.* 1177: 185-197.

Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature.* 453(7194): 519-523.

Zhang K, Zhu L, Fan M. (2011). Oxygen, a Key Factor Regulating Cell Behavior during Neurogenesis and Cerebral Diseases. *Front Mol Neurosci.* 379(1-2): 115-122.

謝辞

本研究を行う機会を与えて下さった東京大学医科学研究所システム疾患モデル研究センター発生工学研究分野、指導教官である吉田進昭教授に深く御礼申し上げます。また、本研究の立案・遂行にあたり、実験技術の指導から実験データの解釈まで熱心に指導を頂いた徳永暁憲助教をはじめ、貴重なアドバイスを頂いた発生工学研究分野の皆様にも深く感謝致します。DNA マイクロアレイの解析、データの解釈について多くのご支援とご指導を頂きました大分大学医学部 分子病理学講座の守山正胤教授、塚本善之助教授にも深く感謝致します。

井上純一郎教授(東京大学医科学研究所 分子発癌分野)、宮島篤教授(東京大学分子生物学研究所 発生・再生研究分野)、佐藤均准教授(東京大学医科学研究所 病態医療科学分野)、渡邊すみ子特任教授(東京大学医科学研究所 再生基礎医科学国際研究拠点)におかれましては、本論文作製にあたり、審査委員として貴重なアドバイスを頂きました。深く御礼申し上げます。

本研究で使用しました多くのマウスたちに深く感謝するとともに、哀悼の意を捧げます。