

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 18 年度博士課程 進学  
氏名 横山 敦  
指導教員名 加藤 茂明

論文題目 神経分化を制御するヒストン修飾因子複合体群の生化学的解析

### 第一章 序論

多細胞生物の正常な発生と臓器形成には、遺伝子発現の時期・組織特異的な制御が伴う。この遺伝子発現制御は、DNA 結合性転写因子がリクルートする転写共役因子群によるクロマチン構造調節を介して行われている。

クロマチン構造調節は、ヒストンの翻訳後修飾と、ヌクレオソームの再構築とに大別され、それぞれ特異的な転写共役因子群によって担われている。ヒストンの修飾とは、ヒストンの主に N 末端側がアセチル化やメチル化といった種々の修飾を受けたり除去されたりすることである。それぞれの修飾は、染色体活性化との関係性が証明されつつある。他方、ヌクレオソームの再構築は、ATP 依存性クロマチンリモデリング因子により調節されている。

これらクロマチン構造調節の中でも、ヒストンのメチル化修飾はクロマチン構造調節のトリガーであると考えられておりその重要性が注目されている。また、ヒストンの脱メチル化については全く不明であったが、LSD1 をはじめとするヒストン脱メチル化酵素の同定から、ヒストンメチル化修飾も動的に変動し得る事が明らかとなった。しかしながら、これらヒストン脱メチル化酵素は複数種存在することから、各々の酵素の生物学的な意義に関しては未だ不明な点が多い。

転写共役因子群は、核内で複合体を形成することで協調的に機能し、選択的なクロマチン構造調節を行うと考えられている。即ち、転写共役因子は、複合体を形成することで基質特異性や酵素活性、さらには複合体安定化等の多様な制御機構を獲得しているといえる

1)。しかしながら、個々の複合体の制御機構や、生物学的意義は殆ど不明であり、複合体レベルでの生化学的な解析が待たれる。

この、クロマチン構造調節が関与する生命現象の一例として細胞分化が挙げられる。この過程では、染色体上の大部分の領域でクロマチン構造の再構築が行われる事が観察されてきたが、その制御を司る転写共役因子複合体に関しては未解明のままである。ヒストン修飾の関与の必須性と考え合わせると、細胞分化において、クロマチン構造調節のトリガーであるヒストンメチル化修飾の関与が予想されるが、その詳細な実態も不明である。

本研究では、神経細胞の分化系をモデルに、神経分化制御を担う転写共役因子複合体を生化学的手法で単離・同定しその機能を解析することを目的とした。そこで、まず神経系に特異的に発現する核内受容体 TLX (NR2E1) に着目し、その転写共役因子複合体の精製・同定を行うことを試みた。続いて、同複合体の機能と神経分化の関係について神経前駆細胞株 Neuro2a の分化系を用いて生化学的な観点から解析した。

## 第二章 オーファン核内受容体TLXの新規転写共役因子の同定と転写抑制機構の解明

TLX は構成的転写抑制能を持ち神経幹細胞の未分化維持に寄与することが知られるオーファン核内受容体である。TLX はその標的遺伝子の転写を抑制することで神経幹細胞の未分化性を維持していると考えられたが、TLX の機能を説明し得る転写共役因子の報告は存在しない。また、予備実験において、TLX は一般的な核内受容体の転写共役抑制因子である NCoR/SMRT 非依存的な転写抑制因子であったことから、新規転写共役抑制因子の存在が予想された。

そこで、TLX の転写抑制機構を解明する目的で相互作用因子の生化学的同定を試みた。その結果、網膜芽腫細胞株 Y79 より、ヒストン脱メチル化酵素 LSD1、転写抑制因子 CoREST、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1/2 等の複合体構成因子群を同定した。LSD1 は転写活性化に関与するヒストン H3K4、もしくは転写抑制に関与する H3K9 のメチル基を脱メチル化する酵素であり、転写活性化型と転写抑制型それぞれの複合体の存在が示唆されているが、K4/K9 の脱メチル化の基質特異性を規定する分子機構や、神経分化への関与も不明であったためこの因子に着目した。

そこで、LSD1 が TLX の転写抑制能に与える影響について解析した。LSD1 は TLX に直接結合し複合体を形成していた。更に、レポーターアッセイにおいて LSD1 はヒストン脱メチル化活性を介して TLX の転写抑制能を促進したことから、TLX の転写共役抑制因子であることが明らかとなった。また、ChIP アッセイの結果、TLX は LSD1-CoREST-HDAC1/2 複合体を PTEN プロモーター上にリクルートし、ヒストンの脱アセチル化、H3K4 の脱メチル化により標的遺伝子の転写抑制を維持していることが判明した。更に両者の RNAi により細胞増殖能が抑制されることも観察された。

以上の結果から、LSD1 複合体は TLX の転写共役抑制因子複合体として機能し、PTEN

をはじめとする TLX 標的遺伝子の転写抑制を維持し細胞増殖を正に制御していることが示唆された<sup>2)</sup>。このことから、TLX による神経幹細胞未分化維持の一端は、LSD1 複合体を介した細胞の増殖維持であることが推察された。

### 第三章 ヒストン脱メチル化酵素LSD1 複合体の神経分化における機能

TLX は神経分化刺激によりその発現が消失する一方、LSD1 は分化過程を通じて発現が認められた。しかしながら、LSD1 の神経分化における役割は不明であった。そこで、Neuro2a 細胞においてロックダウン実験をしてみたところ、神経分化が抑制された。このことから、分化誘導時においては、LSD1 は未分化維持ではなく分化促進に働いていると考えられ、神経分化の際に LSD1 が転写抑制型から活性化型へ変換していることを予想した。

そこで、この詳細な分子機構を解析するために、Neuro2a 細胞より LSD1 複合体の精製を試みた。FLAG-LSD1 を安定的に発現する Neuro2a 細胞より多段階精製で得た LSD1 複合体を LC-MS/MS、および MALDI-TOF/MS に供した。その結果、NZF2 (Neural Zinc Finger transcription Factor 2)を含む新規 LSD1 複合体構成因子を含む全構成因子の同定に成功した。

NZF2 は、脳組織特異的に発現する DNA 結合性の未知因子であり、Neuro2a 細胞で NZF2 をロックダウンすると神経分化の抑制が認められ、やはり分化に必須の因子であることが示唆された。また、NZF2 は分化刺激依存的な神経分化の鍵因子である Mash1 遺伝子の転写誘導に必要であることが判明した。このことから、分化刺激依存的に LSD1 は、NZF2 上で転写抑制型から転写活性化型に変換されていると考えられた。

さらに、分化の際の LSD1 複合体の構成因子を詳細に調べると、分化刺激依存性に構成因子の一つに SUMO 化修飾の変化が認められ、LSD1 複合体構成因子変化への関与が予想された。

### 第四章 クロマチンテンプレートを用いた *in vitro* 転写系の構築

LSD1 が転写抑制状態から転写活性化に転ずることを直接示すには、*in vitro* で精製複合体を用いた転写活性、転写抑制を評価する実験系が必要であると考えられた。そこで、クロマチンテンプレートを用いた *in vitro* 転写系の構築を試みた。

まず、強力なアクティベーター型転写因子である Gal4-VP16 を使った *in vitro* 転写系の構築を目指した。HeLa 細胞由来ヒストンとショウジョウバエ胚 S190 画分によりクロマチンテンプレートを *in vitro* において再構築した。このクロマチンテンプレートと HeLa 核抽出液を混合してもアデノウィルスプロモーター由来転写産物は検出されなかったことから、完全に抑制的なクロマチンが形成されていると判断した。この条件下において、Gal4-VP16 を加え、バキュロウィルス由来ヒストンアセチル化酵素 p300 を加えると、p300 の量依存性に転写産物が検出された。従って、完全なクロマチンテンプレートを用いた *in vitro* 転写系が確立され、これは LSD1 複合体の転写活性を評価可能な実験系であると考え

られた。現在この系を使って更なる解析を進めているところである。

## 第五章 総合討論

本研究では、オーファン核内受容体 TLX 相互作用因子の生化学的同定系を確立し、視神経由来細胞から TLX 転写共役抑制因子複合体として、ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 複合体を同定した。これまで、核内受容体のリガンド依存的な転写活性化への関与が知られていた LSD1 が、ある種のオーファン核内受容体にはリガンド非依存的な転写抑制因子として機能することを初めて明らかにすることができた。この事は、複合体構成因子群の組み合わせにより LSD1 の転写共役活性が制御されることを示唆するものであった。

また、これまで TLX による神経幹細胞の未分化維持機構の詳細はまったく不明であった。本研究から、TLX は、LSD1 複合体を介して PTEN をはじめとする標的遺伝子の転写を抑制することで、幹細胞性の一つの特徴である細胞増殖を維持していることが示唆された。また、生理的意義の不明であった LSD1 複合体の神経幹細胞での機能が推察された。

次に、Neuro2a 細胞を用いた分化実験で LSD1 が分化促進に必要であることから、この因子は細胞系譜によって相反する分化の方向性—未分化維持と分化促進—を規定していると考えられた。このことは、LSD1 がヒストン H3K4 と H3K9 という転写に対して相反するエピジェネティックマークを脱メチル化の基質にし得ることに関連していることを予想させた。そこで、LSD1 の活性制御を司る分子機構を解析する目的で、神経細胞特異的な LSD1 複合体を精製・同定した。さらに、同定された新規 LSD1 相互作用因子の一つ NZF2 が、神経分化の鍵因子 Mash1 の転写誘導に必要であり、LSD1 による転写活性化に伴う神経分化促進に関与することを示唆した。また、神経細胞の分化に伴った LSD1 複合体構成因子の変化を見出した。このことから、LSD1 の基質特異性の変化と神経細胞分化との関連が強く示唆された。

本研究では、神経細胞の未分化維持や分化過程におけるクロマチン構造調節に関わる転写共役因子複合体として、ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 を同定した。また、LSD1 複合体の神経細胞の分化刺激依存性の複合体構成因子の変換を見出した。

以上、本研究では、神経分化という生命現象の分子機構の一端を複合体レベルで明らかにした。

### (参考文献)

- 1) Takezawa S, Yokoyama A, Okada M, Fujiki R, Iriyama A, Yanagi Y, Ito H, Takada I, Kishimoto M, Miyajima A, Takeyama K, Umesono K, Kitagawa H, Kato S. *EMBO J*, 26, 764-74(2007)
- 2) Yokoyama A, Takezawa S, Schüle R, Kitagawa H, Kato S. *Mol Cell Biol*, 28, 3995-4003(2008)