

論文内容の要旨

論文題目 神経管形成におけるヒストン脱メチル化酵素
Fbxl10/Kdm2b の機能解析

(Fbxl10/Kdm2b Deficiency Accelerates Neural Progenitor Cell Death
and Leads to Exencephaly)

氏名

福田 剛

【目的】

本研究では生体での働きが不明であるヒストン脱メチル化酵素 Fbxl10/Kdm2b が、中枢神経系に与える影響および、その分子メカニズムの解明を目指す。

【背景】

脊椎動物の中枢神経系（脳、脊髄）の発生は、胎生期に神経管と呼ばれる管構造原基が形成される事に始まる。神経管は神経上皮細胞で構成される神経ヒダの両端が立ち上がり、近接、融合することによって形成される。この形成過程は多くの遺伝子が関与する複雑なプロセスから成り、それぞれの遺伝子が及ぼす詳細なメカニズムについては未だ不明な点が残されている。神経管形成の異常は外脳症/無脳症や二分脊椎といった重篤な先天性疾患を引き起こす。そのため神経管形成に関わる遺伝子の同定やメカニズム解析は生物学のみならず医学的にも重要な課題といえる。

DNA のメチル化やヒストン修飾に代表されるエピジェネティックな遺伝子発現制御は、個体発生や細胞の分化において非常に重要な役割を担っている。例えば胎生期のニューロン新生からグリア新生への切り替わりには、時期特異的なヒストンメチル化状態の変化が重要な要因となっていることが報告されている。またがんや神経変性疾患などで、しばしばこれらの制御異常が確認されており、エピジェネティックな変異は様々な疾患に対しても大きく関与していると考えられている。ヒストンのリジン残基メチル化は近年までその熱力学的安定性から不可逆的な修飾と考えられてきた。しかし 2004 年にその定説を覆すヒストンリジン脱メチル化酵素 (KDM) の存在が証明された。以後、JmjC ドメインを持つタンパクが次々とリジン脱メチル化活性を有することが示され、新たなヒストン修飾酵素群の個体発生や疾患に対する役割に注目が寄せられる一方で、これらの生理的機能はほとんど明らかにされていない。

Fbxl10/Kdm2b は 2006 年にヒストン 3 リジン 36 (H3K36) に対する脱メチル化酵素であること

が示された JmjC ドメイン含有タンパクである。これまで Fbx110 は、細胞の増殖やアポトーシス、老化、腫瘍形成に関与することが示唆されてきたが、研究グループまたは用いる細胞種により異なる結果が報告され依然として議論の余地が残されている。さらにその生体での生理的機能は不明である。データベースによると Fbx110 は受精卵や ES 細胞、胎生初期に発現量が高いことが示されており、マウスの初期発生において重要な役割を持っていることが考えられた。そこで本研究では初期発生における Fbx110 の機能を、遺伝子改変マウスを作製することにより解析した。

【結果】

まず、Fbx110 の発生初期における発現様式を確認するため、胎生期のマウスおよび成体マウスの各組織に対しノザンブロット解析を行った。

Fbx110 の発現量は ES 細胞や胎齢 (E)8.5 日胚において高く、胎齢の経過に伴ってその発現量は低下していた (図 1)。また成体組織では胸腺や脳、脾臓で発現が確認できたほか、精巣で顕著に高い発現が見られた。次に胎生期における Fbx110 の発現を空間的に解析するため、E8.5~9.5 胚に対しホールマウント *in situ* hybridization を行い、Fbx110 が E8.5~9.5 胚において頭部の神経上皮細胞特異的に発現することを明らかにした (図 1)。

このことから Fbx110 は胎生期の神経上皮細胞において役割を持っていることが予想された。そこで、Fbx110 の個体レベルでの生理的機能を解析す

るために Fbx110 欠損マウスを作製した。Fbx110 欠損マウスは約 44% の割合で外脳症を呈し、それらの個体は出生直後に死亡した (図 2)。一般的に外脳症は胎生期の神経管閉鎖不全 (NTDs) によって引き起こされる。そこで頭部神経管が閉鎖した直後の E9.5 胚を観察したところ、対照マウスでは正常に神経管が形成されたのに対し、一部の Fbx110 欠損マウスでは神経ヒダが開いたままであった (図 2)。これらのことから Fbx110 は胎生期における神経管形成において重要な役割を果たしていることが示された。

正常な神経管形成には神経ヒダを構成する神経上皮細胞と周囲の間充組織の増殖、アポトーシスおよび分化が絶妙なバランスで調整されることが必須である。一方で Fbx110 は細胞増殖や細胞死を制御することが報告されている。Fbx110 欠損マウスに見られた NTDs の発生機構を調べるため、E9.5 胚の組織切片を作製し Fbx110 欠損胚の増殖、アポトーシスおよび神経分化をそれぞれ、リン酸化ヒストン H3 抗体 (PH3: 分裂期細胞マーカー) による免疫染色、TUNEL 解析およびニューロンマーカー TuJ1 による免疫染色で評価した。その結果、分裂期の細胞数および神経分化に顕著な差は見られなかった。しかし対照胚に

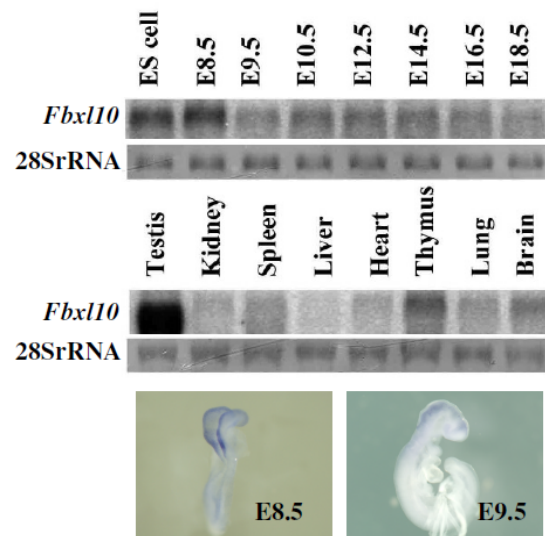


図1

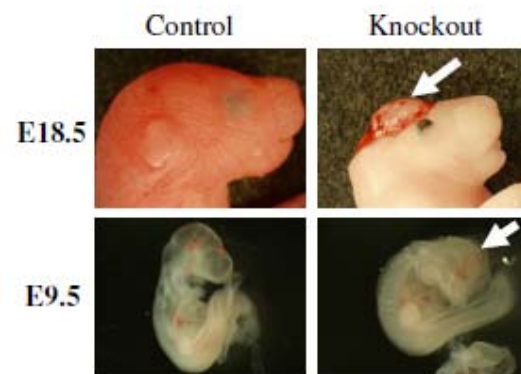


図2

比べ *Fbxl10* 欠損胚では NTDs の有無に関わらず、神経上皮細胞および神経堤細胞由来の間充織細胞においてアポトーシスが有意に亢進していた (図 3)。このことから *Fbxl10* は神経管形成期の神経上皮細胞および神経堤細胞のアポトーシスを負に制御していることが示唆された。

Fbxl10 は H3K36 と H3K4 に対する脱メチル化酵素である。K36 と K4 のメチル化は近傍遺伝子転写の活性化標識であるため、これらの脱メチル化酵素である *Fbxl10* は転写抑制因子であると考えられている。*Fbxl10* の標的遺伝子には *c-jun* や *rRNA*、*p15*、*p16Ink4a*、*p19ARF* などが報告されている。これらの標的遺伝子の中で *c-jun* と *p19ARF* はアポトーシス誘導因子としての機能を持っている。そこで、*Fbxl10* 欠損胚で観察されたアポトーシス亢進はこれらの遺伝子発現量が増加したために引き起こされたことを予想した。この仮定を検証するため、また *Fbxl10* の欠損が標的遺伝子の転写に及ぼす影響を調べるため、対照および *Fbxl10* 欠損 E8.5 胚

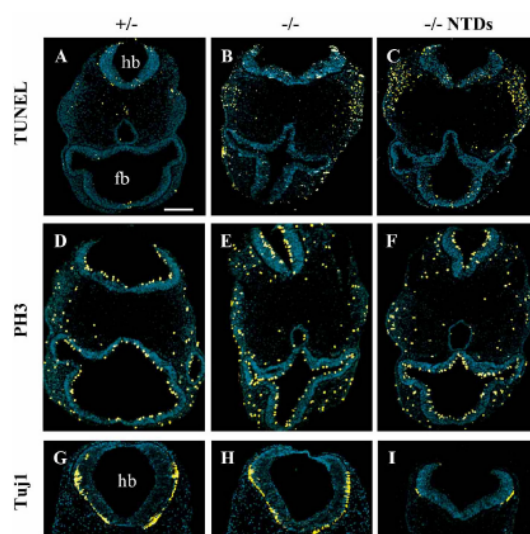


図3

から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を用いてこれら標的遺伝子の発現量を解析した。その結果 *p19ARF* の発現量が *Fbxl10* 欠損胚において亢進する傾向が観察された (図 4)。このことから *Fbxl10* は発生初期において *p19ARF* の発現を抑制していることが示唆された。また同様の現象はマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を用いた実験でも確かめられた。*Fbxl10* を特異的にノックダウンする shRNA を発現させた MEF では *p19ARF* および *p16Ink4a* の発現量が有意に亢進した。また *Fbxl10* 発現ベクターを導入した MEF ではこれらの遺伝子の発現量が低下する傾向が観察できた。以上の結果から、*Fbxl10* は少なくとも *p19ARF* の発現調節を介して胎生期における神経上皮細胞および神経堤細胞のアポトーシスを制御し、正常な神経管形成に貢献していることが明らかとなった。

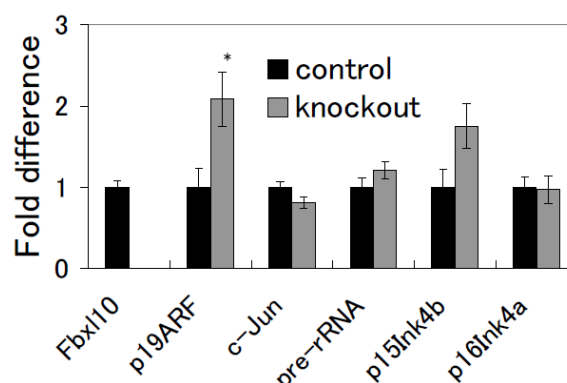


図4

【考察】

本研究によりヒストンリジン脱メチル化酵素 *Fbxl10* は神経管形成が起きる胎生初期胚の頭部神経上皮細胞および神経堤細胞特異的に発現し、正常な神経管形成に必要であることが明らかとなった。また、*Fbxl10* の欠損は神経上皮細胞および神経堤細胞の細胞死を亢進し、その原因の一端は *p19ARF* の発現量亢進にあることを突き止めた。

神経管閉鎖不全 (NTDs) はヒトでは 1000 人に 1 人の割合で発症する大変重篤な疾患である。これまで 200 以上の NTDs を発症するマウスが作製されており、その過程で NTDs は神経上皮細胞の増殖や細胞死、分化パターン、極性パターン、アクチンの異常などにより引き起こされることが分かっている。中でも細胞死の制御は重要な要因であり、神経上皮細胞の細胞死が低下しても

亢進しても NTDs が引き起こされる。したがって Fbx110 欠損胚で見られた NTDs の直接的原因は神経上皮細胞および神経堤細胞のアポトーシス亢進にあると考えられる。先行研究により Fbx110 はゲノムの *Ink4a/Arf* 領域に結合し、近傍の H3K4/K36 を脱メチル化することにより p16Ink4a と p19ARF 遺伝子の転写を抑制することが示されている。p19ARF は p53 をタンパクレベルで安定化することにより p53 依存的な細胞死や細胞周期の停止を制御している。本研究で見られた Fbx110 欠損胚における p19ARF の発現量亢進は同胚で見られたアポトーシスの亢進を引き起こす原因となっている可能性が考えられる。

多くの NTDs 変異マウスの表現型の浸透度が 100%ではないのと同様に、Fbx110 欠損マウスでも全ての個体で NTDs を呈すわけではない。この原因として、Fbx110 のホモログである Fbx111 が一部機能を代償している可能性が考えられる。Fbx111 は Fbx110 同様 H3K36 に対する脱メチル化活性を有する相同性の高い遺伝子である。Fbx111 の発現はユビキタスであり、胎生期の胚や、成体の各種組織にも発現している。両遺伝子の機能的重複性を検証するためには将来的に Fbx110/11 ダブルノックアウトマウスを作製する必要があると考えている。

NTDs を呈す遺伝子欠損マウスは数多く存在するがヒストンのメチル化/脱メチル化を制御する遺伝子においては Fbx110 が初めての報告となる。本研究の発見は神経管形成においてもヒストンのメチル化制御が大きな役割を担っていることを示唆するものである。