

論文の内容の要旨

論文題目 エンハンサー由来の新規 noncoding RNA による neurogenin1 遺伝子の発現制御機構の解析
(A noncoding RNA regulates the neurogenin1 gene locus during mouse neocortical development)

氏 名 小野口 真広

【序論】

哺乳類の脳は多様なニューロンやグリア細胞により構成されており、これらの細胞は共通の幹細胞である神経系前駆細胞から生みだされる。ニューロンが生み出されるタイミングは発生の時期や脳の領域ごとに厳密に制御されており、ニューロン分化の時空間的な制御は精密な脳構造の構築に不可欠である。Neurogenin1 (Neurog1)は bHLH 型の転写因子であり、神経系前駆細胞が特定のニューロンに分化する際に中心的な役割を果たす決定因子として知られている。従って脳を構築するメカニズムを理解する上で、Neurog1 の発現がどのように制御されているのかは重要な問題である。発生の過程における遺伝子発現の時空間的制御においてエンハンサーは中心的な役割を果たす。エンハンサーは様々な転写因子や cofactor などの結合箇所であり、標的遺伝子のプロモーターへ近接し転写活性化を促進する。興味深いことに、近年の網羅的な解析の結果、エンハンサーは特定のヒストン修飾と相関があることや、転写活性化している遺伝子のエンハンサーからはタンパク質をコードしていない noncoding RNA (ncRNA)が転写されるという現象が報告された。これらの報告はエンハンサーによる遺伝子発現制御機構がこれまで考えられてきた以上に複雑であることを示唆している。しかしながら Neurog1 遺伝子座においてエンハンサーがどのように Neurog1 の発現を制御しているのか、あるいはエンハンサーの活性がどのように制御されているのかについてはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では **Neurog1 遺伝子座**をモデルとし、エンハンサーによる遺伝子発現制御機構を解明することを目的とした。

【結果・考察】

1. Neurog1 のエンハンサー領域からは新規の noncoding RNA と考えられる utNgn1 が発現している

Neurog1 のエンハンサー領域には LSE, ANPE, LATE の 3つのエレメントが知られている。この領域の特徴的な配列として、CpG island (CGI) が存在することに着目した (図 1A)。CGI は遺伝子のプロモーター領域にしばしば見られ、RNA の転写との相関が報告されている。そこで、この領域に新規の転写産物が存在する可能性を考え検証を試みた。まずこの領域のヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法により調べたところ、H3K4me3 修飾が高いことがわかった。H3K4me3 修飾は一般に、遺伝子のプロモーター領域のヒストン修飾として知られている。この結果より、エンハンサー付近の CGI は未知の RNA のプロモーター領域である可能性が示唆された。そこで次に、この近傍に実際に転写産物がコードされているのかを RT-PCR 法により調べた。その結果、CGI 付近のエンハンサーエレメントの 1つである LATE 領域から、転写産物の存在を示唆するシグナルが得られた (図 1B)。そこで 5'/3'RACE 解析によりこの RNA の全長を調べたところ、この RNA は CGI から転写される全長およそ 1.4 kb 程度の Poly(A)付加された RNA であることがわかった。さらに、RNA の発現をノザンプロット解析により確認した。以下、この転写産物を utNgn1 (Upstream Transcript for Neurogenin1) と呼ぶ。utNgn1 の配列を解析したところ、最長 49 アミノ酸の ORF が存在する可能性があることがわかった。しかしながら、既知の遺伝子と相同なタンパク質ドメイン等を一切もたないことから、タンパク質をコードしていない ncRNA である可能性が高いと考えられる。さらに utNgn1 の局在を調べた結果、utNgn1 は核に濃縮していることがわかった。この局在は ncRNA の特徴と一致するため、utNgn1 は ncRNA であると推定される。

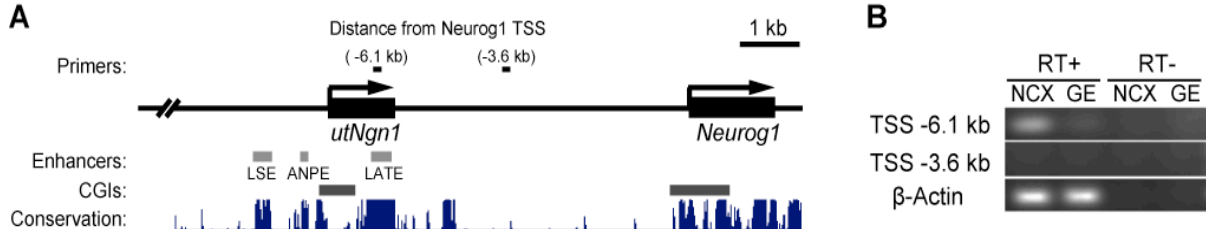


図 1. Neurog1 のエンハンサー領域からは新規 ncRNA, utNgn1 が転写されている

(A) Neurog1 遺伝子座における utNgn1 の転写領域 (B) RT-PCR による utNgn1 の検出結果。使用した PCR primer は (A) に示した。NCX, 大脳新皮質, GE, 大脳基底核原基, TSS, 転写開始点。RT+ 逆転写酵素有り, RT- 逆転写酵素なし

2. utNgn1 と Neurog1 の発現パターンは高い相関を示す

utNgn1 と Neurog1 がどのような関係にあるのかを調べるため、それぞれの発現パターンを定量 RT-PCR 法により検討した。まず、脳の領域ごとの発現を胎生 13.5 日目マウス胎児の各組織を採取し比較した。その結果 utNgn1 の発現は Neurog1 の発現と相関し、大脳新皮質や中脳で発現が高いことがわかった。次に、

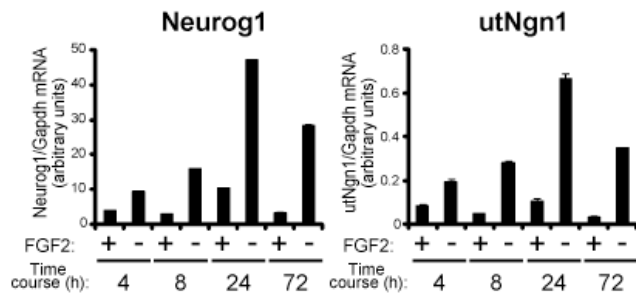


図 2. utNgn1 はニューロン分化時に一過的に発現上昇する

大脳新皮質の神経系前駆細胞がニューロン分化する際の発現パターンを調べた。その結果 *utNgn1* は *Neurog1* 同様に、神経系前駆細胞がニューロン分化する際に一過的に発現が上昇することがわかった (図 2)。さらに *in vivo* での *utNgn1* の発現パターンを胎生 13.5 日目のマウス大脳切片を用いて *in situ hybridization* により検討した。その結果 *utNgn1* は *Neurog1* と同様の発現パターンを示した。また、*utNgn1* の転写が外的シグナルによりどのように制御されているのかを調べるため、神経系前駆細胞のニューロン分化を促進するシグナルである Wnt シグナルと *utNgn1* の発現の関係を調べた。Wnt シグナルのリガンドである *Wnt3a* を神経系前駆細胞に作用させ *utNgn1* の発現を調べたところ、*utNgn1* は *Neurog1* と同様に発現が上昇した。これらの結果より、*utNgn1* と *Neurog1* の発現には強い正の相関があることが示唆された。

3. *utNgn1* は *Neurog1* のエンハンサー活性に重要である

発現の相関から、*utNgn1* は機能を持たない「副産物」として *Neurog1* の発現に伴って転写されているのか、それとも機能をもって *Neurog1* の発現を制御しているのかという疑問が生じる。これを検討するため、*utNgn1* を siRNA によってノック

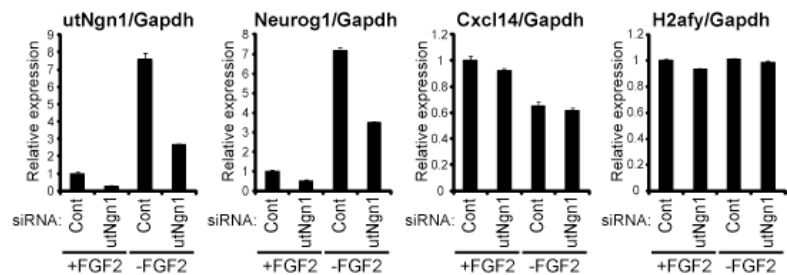


図 3. *utNgn1* のノックダウンは *Neurog1* の発現を減少させる

ダウンし *Neurog1* の発現を定量 RT-PCR 法により検討した。その結果 *Neurog1* の発現は *utNgn1* のノックダウンにより減少することが示唆された (図 3)。このとき、*Neurog1* 遺伝子座近傍にコードされた他の遺伝子の発現レベルは減少しなかった。これらの結果より、*utNgn1* は *Neurog1* の発現を特異的に正に制御していることが示唆された。この結果をさらに検証するため、*utNgn1* 領域が遺伝子の発現を活性化させるのかをレポーターアッセイにより検討した。このアッセイでは、ルシフェラーゼ遺伝子のプロモーター領域に *Neurog1* のプロモーター領域を挿入し、さらに上流に *utNgn1* 領域を挿入したベクターと *utNgn1* 領域を挿入していないコントロールベクターでレポーターの活性を定量し比較した。その結果、*utNgn1* 領域の挿入はレポーターの発現を促進するエンハンサーとしての活性を示すことが示唆された。次に、このエンハンサーとしての活性に *utNgn1* の転写が必要かを調べるため、*utNgn1* の配列中に *utNgn1* の転写が途中で強制的に終結するよう外来の polyA 配列を挿入したコンストラクトを作成し、同様の実験を行った。その結果、polyA 配列を挿入したコンストラクトでは、*utNgn1* 領域の挿入によるレポーターの発現促進が阻害されることが示唆された。これらの結果から、*utNgn1* 領域は *utNgn1* の発現を介してエンハンサーとしての活性を担っている可能性が示唆された。

4. *utNgn1* の発現は発生後期に Polycomb group (PcG) タンパク質により抑制される

神経系前駆細胞は発生の遅い時期ではニューロンを産生せず、これに伴い *Neurog1* の発現は抑制される。先行研究により *Neurog1* プロモーターの発生時期依存的な抑制に PcG タンパク質が必要であることが報告されている。そこで、*utNgn1* が PcG タンパク質によって制御されている可能性を検討した。まず、PcG タンパク質が触媒するヒストン修飾である H3K27me3 レベルを調べた。その結果、H3K27me3 レベルは *Neurog1* のプロモーター領域のみではなく、エンハン

サー領域でも高く、発生時期依存的に上昇することが示唆された。次に、utNgn1 の発現レベルを検討したところ、utNgn1 の発現は Neurog1 と同様、発生時期が進むにつれ減少することがわかった。そこで、utNgn1 の発現の抑制に PcG タンパク質が必要かを、PcG タンパク質複合体の必須の構成因子の一つである Ring1B コンディショナルノックアウトマウスを用いて検討した。その結果、utNgn1 の発現は Neurog1 と同様に、Ring1B のノックアウトにより上昇することが示唆された (図 4)。これらの結果より、発生後期での utNgn1 の抑制には PcG タンパク質が必要であることが示唆された。

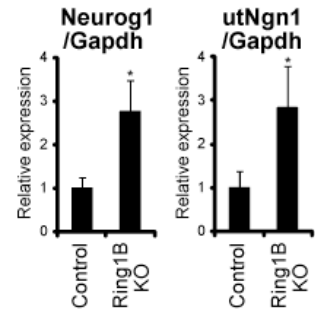


図 4. Ring1B のノックアウトは utNgn1 の発現を上昇させる

【結論】

本研究により、Neurog1 遺伝子座において、エンハンサー領域から新規の ncRNA と考えられる utNgn1 が発現し、Neurog1 の発現を正に制御していることが明らかになった。utNgn1 は Neurog1 のエンハンサー活性に重要であり、その発現は Neurog1 と高い相関を示す。発生前期では utNgn1 の発現は神経系前駆細胞がニューロン分化する際に一過的に上昇し、Wnt シグナルにより促進されることが示唆された。一方で発生後期の神経系前駆細胞では、utNgn1 の発現は PcG タンパク質によって抑制されることが示唆された。これらの結果から、utNgn1 は Neurog1 のエンハンサーの活性として重要な役割を担い、その活性は Wnt シグナルや PcG による時期依存的なエピジェネティックな制御を受けていることが示唆された (図 5)。この結果はエンハンサーによる ncRNA の発現を介した新しい遺伝子発現制御機構が存在し、PcG が ncRNA の発現制御を介してエンハンサーの活性と遺伝子の発現を制御している可能性を示唆している。

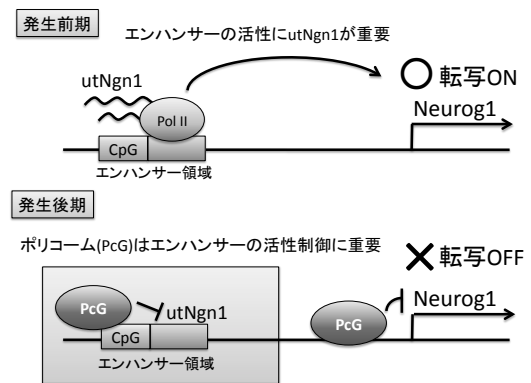


図 5. エンハンサーによる utNgn1 を介した遺伝子発現制御モデル