

博士論文番号：0781011

メチル化 **DNA** 結合タンパク質 **MeCP2** による 神経幹細胞からニューロンへの分化誘導

辻村 啓太

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子神経分化制御学講座

(中島 欽一 教授)

平成22年 1月 25日

序論

神経幹細胞は自己複製能を有するとともに、中枢神経系の主要な細胞種であるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分化能を有する細胞である (Gage, 2000)。近年、従来ニューロン新生がないとされていた哺乳類の成体脳においても神経幹細胞の存在が明らかとなり、生涯を通じて常にニューロン新生が行なわれていると考えられるようになった (Kuhn et al., 1996; Lois and Alvarez-Buylla, 1993)。これらのことから、神経幹細胞の分化制御機構に関する研究は生体内の幹細胞を利用した神経変性疾患や損傷神経の治療という再生医学的観点からも注目を集めている。神経幹細胞を再生医療に利用するためには、神経幹細胞の自己複製能および各細胞系譜への分化運命決定のメカニズムについて分子レベルで理解することが重要とされている。最近になって神経幹細胞の分化特異性は細胞外シグナルおよび細胞内在性プログラムにより厳密に制御されることが明らかにされてきた (Edlund and Jessell, 1999; Hsieh and Gage, 2004)。

細胞外シグナルとして、転写因子を介して核へとそのシグナルが移行されるさまざまなタイプのサイトカインが知られている。シグナル受容体構成因子である gp130 を共用する Interleukin-6 (IL-6) ファミリーのメンバーである Leukemia inhibitory factor (LIF) は Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) シグナル経路を介して神経幹細胞からアストロサイトへの分化を促進する (Bonni et al., 1997; Nakashima et al., 1999a; Rajan and McKay, 1998)。Transforming growth factor β (TGF- β) スーパーファミリーに属する Bone morphogenetic proteins (BMPs) もまた、神経幹細胞からアストロサイトへの分化を促進する (Gomes et al., 2003; Gross et al., 1996; Nakashima et al., 2001)。また、LIF と BMP2 の下流にはそれぞれ STAT3 と smad1 が転写因子として機能している。これらの転写因子は各サイトカイン刺激により活性化され核へと移行し、転写共役因子である p300 を介してアストロサイト特異的遺伝子 glial fibrillary acidic

protein (GFAP)遺伝子の転写を活性化することにより神経幹細胞からアストロサイトへの分化を相乗的に促進することも明らかになっている(Nakashima et al., 1999b)。

細胞内在性プログラムとしては DNA メチル化やヒストン修飾などといったエピジェネティックな修飾機構とそれに伴うクロマチン構造変換による転写制御などが知られている。ジヌクレオチド CpG におけるメチル化は多細胞のゲノムにおいて最もよく調べられているものの一つである(Bird, 2002)。正常な DNA のメチル化パターンの維持は個体の発生にとって重要なことが明らかにされている。DNA がメチル化されると一般的にその遺伝子の転写は抑制されるものと考えられている。その機構としては大きく 2 つのモデルが提唱されている。一つは DNA 上のメチル基による物理的な阻害である。これはメチル基感受性の転写因子が結合できなくなることや、RNA ポリメラーゼの結合および進行が阻害されるというモデルである(Cerny and Quesenberry, 2004; Watt and Molloy, 1988)。もう一つはメチル化領域を認識する転写因子であるメチル化DNA結合タンパク質ファミリー(MBDs)が結合することによる転写抑制機構である(Hendrich and Bird, 1998)。MBDs が DNA 上に結合するとヒストン脱アセチル化酵素(HDACs)がリクルートされ、ヒストンが脱アセチル化されることにより DNA との結合力が強まりクロマチン構造が凝縮状態になる。このようなクロマチン構造変換が生じると転写調節因子などが標的遺伝子に結合できなくなり、その遺伝子の発現は抑制される(Nan et al., 1998)。

胎生中期の神経幹細胞は *glial fibrillary acidic protein (gfap)* などのアストロサイト特異的遺伝子のプロモーター領域が高頻度にメチル化されており、LIF により刺激しても STAT3 が認識配列に結合できないためアストロサイトへは分化せずにニューロンへのみ分化する(Fan et al., 2005; Namihira et al., 2004; Qian et al., 2000; Takizawa et al., 2001)。発生の進行に伴いこれらのプロモーター領域は脱メチル化されるため、胎生後期の神経幹細胞はアストロサイトへの分化能を獲得

する。アストロサイト特異的遺伝子プロモーターがすでに脱メチル化されている胎生後期の神経幹細胞はニューロンも産生することができるが、これらの胎生後期の神経幹細胞から産生されたニューロンは *gfap* を発現させるようなアストロサイト誘導性サイトカインに応答しない(Kohyama et al., 2008; Setoguchi et al., 2006)。このことは、STAT3 結合配列の DNA メチル化以外に細胞分化・可塑性を制御するメカニズムの存在を示唆している。

Methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2)はメチル化された DNA に結合し転写抑制因子として作用するメチル化 DNA 結合タンパク質ファミリー(MBDs)に属する(Klose and Bird, 2006; Meehan et al., 1992)。MeCP2 はメチル化 DNA 結合ドメイン(MBD)を介してメチル化された CpG ジヌクレオチドに結合し、転写抑制ドメイン(TRD)を介して遺伝子発現を抑制する(Jones et al., 1998; Nan et al., 1998)。哺乳類の中樞神経系において MeCP2 を含めたメチル化 DNA 結合タンパク質ファミリーは主にニューロンにおいて高発現している(Jung et al., 2002; Shahbazian et al., 2002)。MeCP2 遺伝子の変異は精神遅滞、運動失調、小頭症、自閉症状を特徴とする進行性の神経発達障害であるレット症候群(RTT)を引き起こす。MeCP2 は神経幹細胞の分化運命決定というよりもニューロンの成熟に関与するということが報告されたが(Kishi and Macklis, 2004)、他の報告では *Xenopus* 胚を用いた研究により MeCP2 は初期の神経発生において分化運命決定に関与するということも示唆されている(Stancheva et al., 2003)。さらに最近の研究により、MeCP2 はニューロン以外のグリア細胞にも発現しており細胞非自律的機構によりニューロンの樹状突起形成に影響を与えること、RNA スプライシングやサイレントクロマチンループ構造を制御することなどが報告され、MeCP2 は非常に多くの機能を有することが示されている(Ballas et al., 2009; Horike et al., 2005; Young et al., 2005)。

当研究室はこれまでに、ニューロンにおいて MeCP2 がアストロサイト特異的遺伝子の高頻度にメチル化された転写開始点近傍に結合することで、ニューロ

ンからアストロサイトへの分化転換を阻害することを報告している(Kohyama et al., 2008; Setoguchi et al., 2006)。本研究において、MeCP2 を胎生後期の神経幹細胞に異所的に発現させるとアストロサイト誘導性サイトカイン存在下においてもアストロサイト分化が抑制されるだけでなくニューロンへの分化が促進されることを見いだした。MEK 阻害剤である U0126 を用いて Ras-extracellular signal-regulated kinase (ERK)経路を阻害したところ、これらの MeCP2 の作用は消失すること、RTT で高頻度にみられる欠失変異体やメチル化 DNA 結合ドメインおよび転写抑制ドメインの 1 アミノ酸置換型ミスセンス変異体は野生型で見られるニューロン分化促進作用が消失していることも明らかにした。また、質量分析により神経幹細胞における MeCP2 結合タンパク質を網羅的に解析し、MeCP2 の新規相互作用因子をいくつか同定した。さらに、MeCP2 は *in vivo* での非神経新生領域や損傷脊髄に移植した神経幹細胞のニューロン分化も促進できることが明らかになった。

材料と方法

神経幹細胞の初代培養

下記に記された実験プロトコールは奈良先端科学技術大学院大学の動物実験ガイドラインに従って行なわれた。神経幹細胞は胎生 14.5 日目マウス胎仔の終脳から調製し、以前に記述されているように培養した(Nakashima et al., 1999b)。終脳を 1ml ピペットチップ(Gilson, Middleton, WI, USA)を使って緩やかなピペッティングにより Hank's balanced salt solution (HBSS)に懸濁した。解離した細胞を poly-L-ornithine (Sigma, St. Louis, MO, USA) と fibronectin (Sigma)でプレコートした培養ディッシュ(Nunc, Naperville, IL, USA)かチャンバースライド(Nunc)上で 10 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; N2/DMEM/F12/bFGF)を含んだ N2-supplemented Dulbecco's modified Eagle's medium with F12 (Gibco, Grand Island, NY, USA)中でそれぞれの実験の前に 4 日間培養した。

阻害剤実験

U0126 (Calbiochem, Darmstadt, Germany)は dimethyl sulfoxide (DMSO)を用いて 10mM に調製し、-20 °C で保存した。保存した阻害剤は使用時に溶かし、培養メディアウムで前もって希釈し 8 μ M になるように加えた。

免疫細胞化学

コートしたチャンバースライドで培養した細胞は phosphate-buffered saline (PBS)を用いて洗浄し、4% paraformaldehyde / PBS を使って固定し下記に示す 1 次抗体の組み合わせを用いて染色した。

chick anti-green fluorescent protein (GFP) (1:1000; Aves Labs, Tigard, OR, USA)、rabbit anti- GFP (1:1000; MBL, Nagoya, Japan)、rabbit anti- β III-tubulin (Tuj1; 1:1000; Covance, Berkeley, CA, USA)、mouse anti-microtubule-associated proteins 2a and 2b (MAP2ab; 1:250; Sigma)、guinea pig anti-GFAP (1:2,500; Advanced Immunochemical, Long Beach, CA, USA)、goat anti-doublecortin (DCX) (1:1000; Santa Cruz

Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、mouse anti-S100 β (1:1000; Sigma)、rabbit anti-aquaporin 4 (AQP4) (1:500; Santa Cruz)、chick anti-myelin basic protein (MBP) (1:200; Aves Labs)、mouse anti-Nestin (1:1000; Chemicon, Temecula, CA, USA)、rabbit anti-cleaved-caspase3 (1:1000; Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、mouse anti-Ki67 (1:1000; BD, Franklin Lakes, NJ, USA)。

2 次抗体は下記のものを使用した。

FITC-conjugated donkey anti-chick IgY (1:500; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)、Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG (1:500; Chemicon)、Cy3-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:500; Jackson ImmunoResearch)、Alexa488-conjugated donkey anti-rabbit (1:500; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)、Cy5-conjugated donkey anti-guinea pig (1:500; Jackson ImmunoResearch)。

核は bisbenzimidazole H33258 fluorochrome trihydrochloride (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を用いて染色した。

免疫組織化学

PBS と 4% paraformaldehyde で経心的に還流したマウスから脳と脊髄を摘出し、4 °C で一晩固定した後、4 °C で 24 時間 20% sucrose / PBS に置換した。脳と脊髄は cryostat (Leica, Tokyo, Japan)を用いて 40 μ m のセクションにした。切片は下記の 1 次抗体の組み合わせを用いて染色した。

rabbit anti-GFP (1:1000)、goat anti-DCX (1:1000)、guinea pig anti-GFAP (1:1000)。

二次抗体は下記のものを使用した。

Cy3-conjugated donkey anti-goat IgG (1:500)、Alexa488-conjugated donkey anti-rabbit (1:500)、Cy5-conjugated donkey anti-guinea pig (1:500)。核は bisbenzimidazole H33258 fluorochrome trihydrochloride を用いて染色した。

免疫沈降法

培養細胞を PBS で 2 回 wash し、lysis バッファーを加え cell scraper で細胞をはがしてチューブに回収した。超音波処理後、15,000rpm で 10 分遠心しその上

清を lysate とした。Lysate 1ml に対し FLAG 抗体(SIGMA)を $5\mu\text{g}$ 加え 4°C でロータリーシェーカーを用いて 3 時間混和した。Protein A ビーズを $20\mu\text{l}$ 加え、さらに 1 時間混和した。 $5,000\text{rpm}$ で 3 分間遠心し上清を取り除き、lysis バッファーを 1ml 加えた。この操作を 5 回繰り返した。FLAG ペプチド(SIGMA)を用いて沈降物を溶出した。

結合タンパク質の同定

溶出した沈降物を SDS-PAGE により分離後、各サンプルレーンを 5 個に切り分け、そのゲルをチューブに回収した。 60% アセトニトリル/ 50mM NH_4HCO_3 を $200\mu\text{l}$ 加え、室温で 10 分振とうした。この操作を 2 回繰り返した。上述の溶液を除き、 10mM DTT / 50mM NH_4HCO_3 を $100\mu\text{l}$ 加え、 56°C で 45 分間インキュベートした。DTT 溶液を除き、 55mM ヨードアセトアミド(IAA) / 50mM NH_4HCO_3 を $100\mu\text{l}$ 加え、室温で 30 分インキュベートした。 60% アセトニトリル/ 50mM NH_4HCO_3 を 200 加え、室温で 10 分間振とうした。これを 2 回繰り返した。 60% アセトニトリル/ 50mM NH_4HCO_3 を除き、室温で 20 分間インキュベートした。Digestion 溶液 $5\sim 10\mu\text{l}$ (1 band)を加え、氷上で 10 分間インキュベートした。 50mM NH_4HCO_3 を $20\mu\text{l}$ 加え、 37°C で一晩インキュベートした。酵素消化液を新しいチューブに回収し、それらを LC/MS 測定に用いた。

組換えレトロウイルスの作製と感染

ラット野生型 *mecp2* と変異体 *mecp2* (R168X, T158M, R306C, E397K) cDNAs は GFP 遺伝子の上流に internal ribosome entry site を含む発現ベクターである pMY (Morita et al., 2000)に挿入された。これらのコンストラクトを Trans-IT 293 (Mirus, Madison, WI, USA) (Morita et al., 2000)を用いて Plat-E パッケージング細胞株に一過的に遺伝子導入した。その次の日、メディウムを N2/DMEM/F12/bFGF に交換し、細胞はウイルスを回収するまでこのメディウムで 1 日培養した。

線条体への細胞移植

成体マウスを ketamine (100mg/kg)と xylazine (10mg/kg)の濃度で腹空内投与し

麻酔をかけた。マウスに定位固定装置(Narishige, Tokyo, Japan)を用いて線条体(ブレグマから後方 0 mm、側方 2 mm、深部 2.9 mm の位置)にコントロールおよび MeCP2 を発現する 10^6 個の神経幹細胞を含んだ 2 μ l の N2-supplemented DMEM/F12 懸濁液を 10 分かけて注入した。

脊髄への細胞移植

成体マウスに上記のように麻酔をかけた。脊髄の胸椎 9 番目と 10 番目の椎弓切除後、硬膜の背側表面を露出させた。マイクロインジェクターを用いて 10^6 個の神経幹細胞を含んだ 2 μ l の N2-supplemented DMEM/F12 懸濁液を 10 分かけて注入した。

脊髄損傷モデルマウスの作製

ICR マウス(雄 14-16 週齢)を用いた。上記と同様に脊髄の胸椎 9 番目と 10 番目の椎弓切除後、硬膜の背側表面を露出させた。その背面部上に、重さ 20g のアクリル棒を降下させ 2 分間圧迫した。7 日後、同様に麻酔をかけ、マイクロインジェクターを用いて 10^6 個の神経幹細胞を含んだ 2 μ l の N2-supplemented DMEM/F12 懸濁液を 10 分かけて注入した。

NS 細胞(均一性神経幹細胞)培養

未分化状態を維持した均一な神経幹細胞(NS 細胞)は以前に報告されている方法と同様に 10 ng/ml の bFGF と epidermal growth factor (EGF) (R&D Systems)を含む培養液(NS-A media (Euroclone, Milan, Italy)) 中で E14.5 の初代培養神経幹細胞を継代培養することで樹立した (Conti et al., 2005; Pollard et al., 2006)。実験には 20 回以上継代したものをを用いた。

Bisulfite Sequence 解析

ゲノム DNA の Sodium bisulfite 処理は以前に報告されている方法と同様に行なった(Clark et al., 1994)。5 μ g のゲノム DNA を *Hind*III と *Eco*RI を用いて切断した。その後、0.3 M NaOH 中で 37 °C で 15 分間インキュベートし、3.1 M sodium bisulfite と 0.5 mM hydroquinone の組成で 55 °C において 16 時間インキュベート

した。サンプルを脱塩カラム(Promega, Madison, WI)を用いて精製し、50 μ l の H₂O で溶出した。3M の NaOH (5.5 μ l)を加え、37 °C で 15 分間インキュベートした。サンプルに 3M 酢酸アンモニウムを加えエタノール沈殿後、H₂O に溶かした。目的の DNA 断片を下記のプライマーセットを用いて PCR 反応により増幅した。STAT3 結合領域を含む *gfap* プロモーター領域； GFms (5'-GGGATTTATTAGGAGGATTTTAGTAAGTAG-3') と GFmAS (5'-TCTACCCATACTTAACTTCTAATATCTAC-3'); *gfap* 遺伝子の exon1 領域； GFmEx1S (5'-GATAGGTAAGTAATTTATGGA-3') と GFmEx1AS (5'-TTCAATCTCTCTACTCACTAACC-3')。PCR 産物は pT7Blue vector (Novagen) へ挿入し、ランダムに最低 10 クローンを選び、シーケンス解析を行なった。

結果

MeCP2 はアストロサイト誘導性サイトカイン存在下においてもニューロン分化を促進する

当研究室ではこれまでに神経幹細胞における MeCP2 の異所的な発現が LIF によって誘導されるアストロサイト分化を阻害することを報告している(Kohyama et al., 2008; Setoguchi et al., 2006)。このような知見から、本研究では MeCP2 が神経幹細胞のニューロン分化にも作用できるのではないかと想定した。実際に MeCP2 が神経幹細胞のニューロン分化を促進できるかどうかを調べるために、コントロールとして GFP のみ、および MeCP2 と GFP を発現するレトロウイルスを胎生 14.5 日目の神経幹細胞に感染させた(図 1A)。まず、アストロサイト誘導性サイトカインの存在しない条件において MeCP2 の作用を調べたところ、ウイルス感染から 4 日後において MeCP2 を発現する神経幹細胞はコントロールに比べてニューロン分化が促進された(図 1B and C)。コントロールと MeCP2 を発現するウイルスを感染した細胞はアストロサイト、オリゴデンドロサイト、未分化細胞それぞれのマーカーである GFAP, MBP, Nestin 陽性細胞の割合は類似した結果であった(図 1B, C および図 2B)。培養期間を 8 日間に延長したところ、コントロールおよび MeCP2 を発現する細胞の Nestin 陽性細胞は 10-20%まで減少した(図 2C)。この長期間の培養においても MeCP2 の発現はコントロールに比べて神経幹細胞のニューロン分化を促進させた (図 2C)。

アストロサイト誘導性サイトカイン存在下においても MeCP2 がニューロン分化を誘導できるのかどうかを調べるため、LIF および BMP2 それぞれの存在下において MeCP2 を発現する神経幹細胞の分化傾向を調べた。以前の報告通り MeCP2 の発現はサイトカインによって誘導される神経幹細胞からアストロサイトへの分化を抑制した。驚いたことに、MeCP2 は LIF が存在しない条件よりも

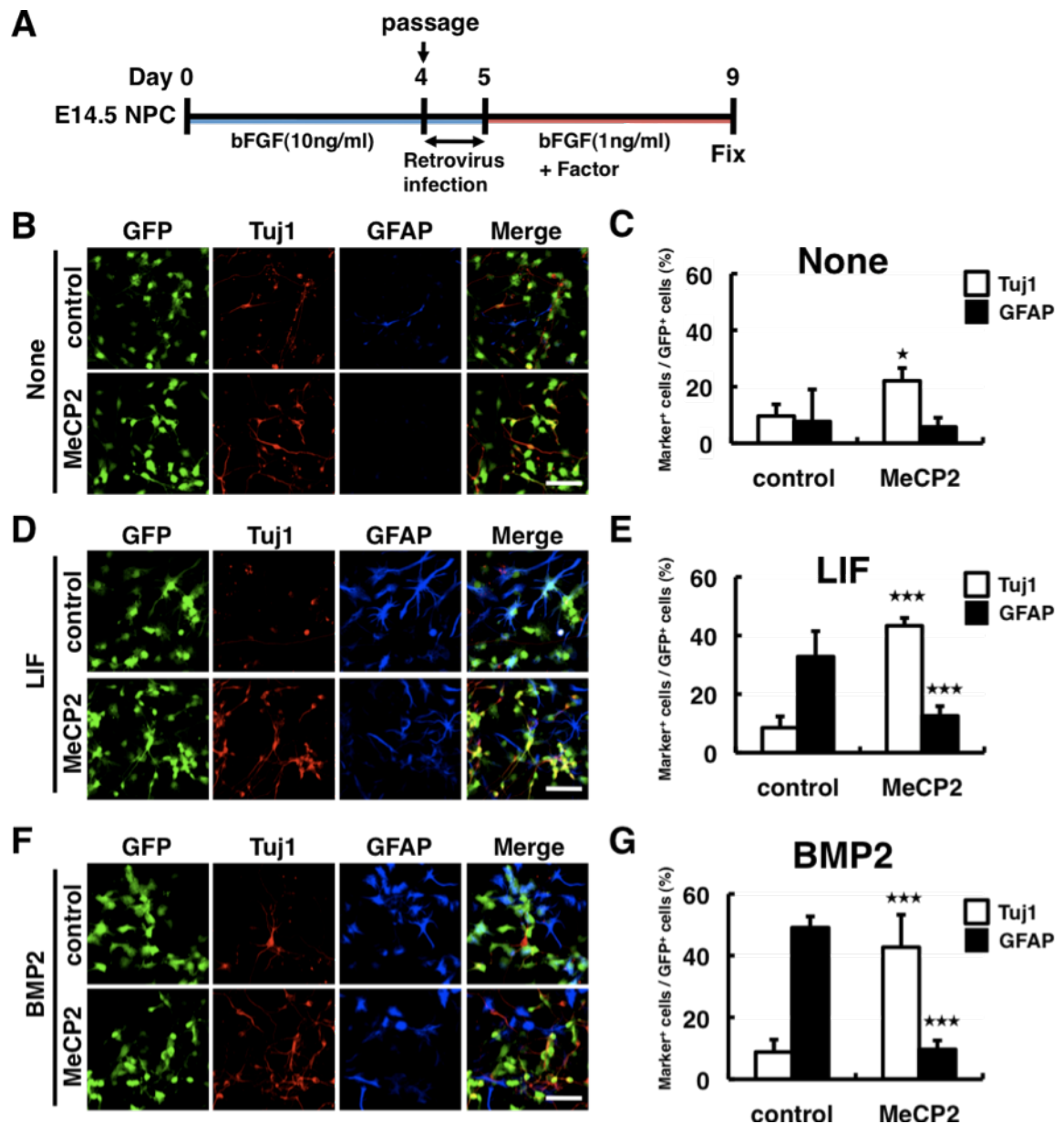


図 1. MeCP2 はアストロサイト誘導性サイトカイン存在下においてもニューロン分化を促進する。(A)細胞培養とウイルス感染の培養過程の模式図。(B, D and F) コントロールとして GFP のみ(上段)、および MeCP2 と GFP(下段)を発現する組換えレトロウイルスを神経幹細胞に感染させ、LIF (50 ng/ml) (D)もしくは BMP2 (50 ng/ml) (F)と bFGF (1 ng/ml)の存在下、および bFGF (1 ng/ml)のみ存在下(B)において 4 日間培養した。細胞は GFP(緑)、 β III-tubulin (Tuj1, 赤)、GFAP (青)に対する抗体を用いて染色した。Scale bar = 50 μ m. (C, E and G) (B), (D) and (F) における GFP 陽性細胞中の Tuj1- および GFAP-陽性細胞の数を定量した (mean $\pm$ S.D.; t-test, * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ compared with the control)。

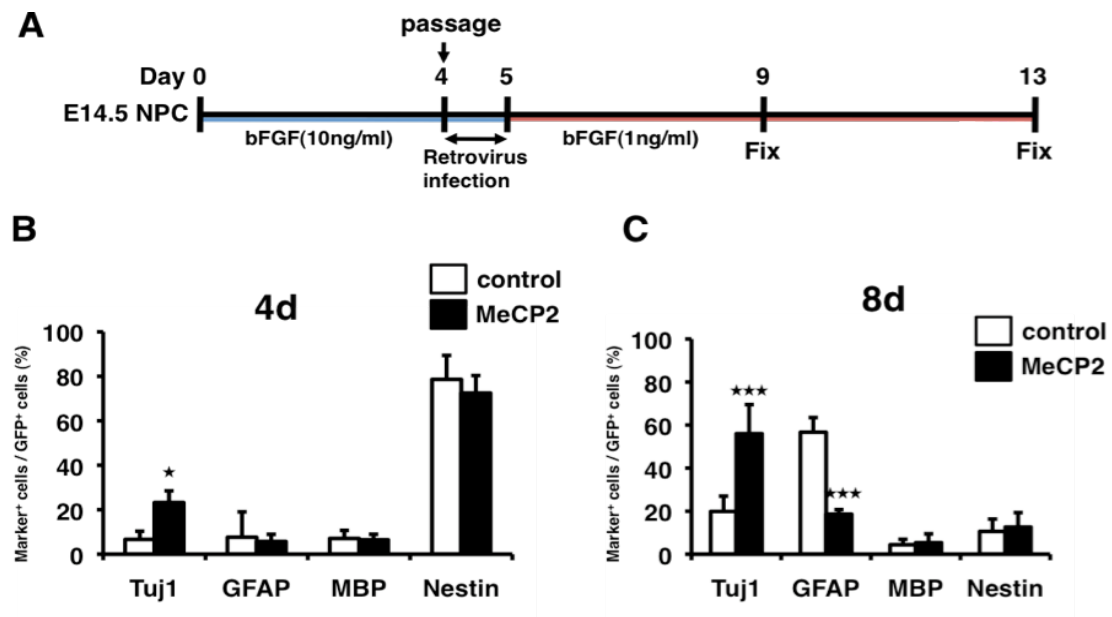


図 2. MeCP2 はより長期間の培養条件においてもニューロン分化を促進する

(A)細胞培養とウイルス感染の培養過程の模式図。(B and C) コントロールとして GFP のみ、および MeCP2 と GFP を発現する組換えレトロウイルスを神経幹細胞に感染させ、bFGF (1 ng/ml)のみ存在下において 4 日間(B)もしくは 8 日間(C)培養した。細胞は GFP、 β III-tubulin (Tuj1)、GFAP、MBP および Nestin に対する抗体を用いて染色した。GFP 陽性細胞中の Tuj1-、GFAP-、MBP-および Nestin-陽性細胞の数を定量した(mean $\pm$ S.D.; t-test, * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ compared with the control)。

効率よくニューロン分化を促進した(図 1D および E)。この MeCP2 の作用は BMP2 存在下においても同様に観察された(図 1F および G)。さらに MeCP2 は LIF および BMP2 存在下において他のニューロンマーカーである MAP2ab の発現も誘導した(図 3A および B)。この結果に加えて、MeCP2 は LIF 条件下において他のアストロサイトマーカーである AQP4 と S100 β の発現も抑制した (図 4)。

次にこの分化誘導が細胞増殖や生存が影響を受けたためではないということ を調べた。細胞増殖と生存効率を調べるために、E14.5 日目の神経幹細胞に GFP のみおよび MeCP2 と GFP を発現するレトロウイルスを感染させ、その 2 日後に増殖マーカーである Ki-67 とアポトーシスマーカーである cleaved-caspase3 に対する抗体を用いて免疫染色を行なった (図 5)。その結果、MeCP2 の発現は細胞増殖およびアポトーシスどちらに対しても影響を与えなかった(図 5B および C)。

初代培養の神経幹細胞は分化系譜にコミットした前駆細胞や多能性をもった前駆細胞などを含んだ不均一な集団であることが知られているので、均一な対称分裂を維持できる条件で培養した神経幹(NS)細胞を用いて同様の実験を行なった(Conti et al., 2005; Pollard et al., 2006)。図 6A に示されているように、この培養系におけるほぼ全ての細胞は未分化神経幹細胞マーカーである Sox2 と Nestin 陽性の細胞集団であり、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの分化マーカーである β -III tubulin、GFAP、MBP は発現していない。この均一な細胞集団においても MeCP2 の作用を調べたところ、初代培養での結果と同様に MeCP2 はニューロン分化を促進させた(図 6B-F)。

これらの結果は、MeCP2 はアストロサイト誘導性サイトカイン存在下においても多分化能を持った神経幹細胞のアストロサイト分化を抑制するだけでなくニューロン分化も促進できることを示している。

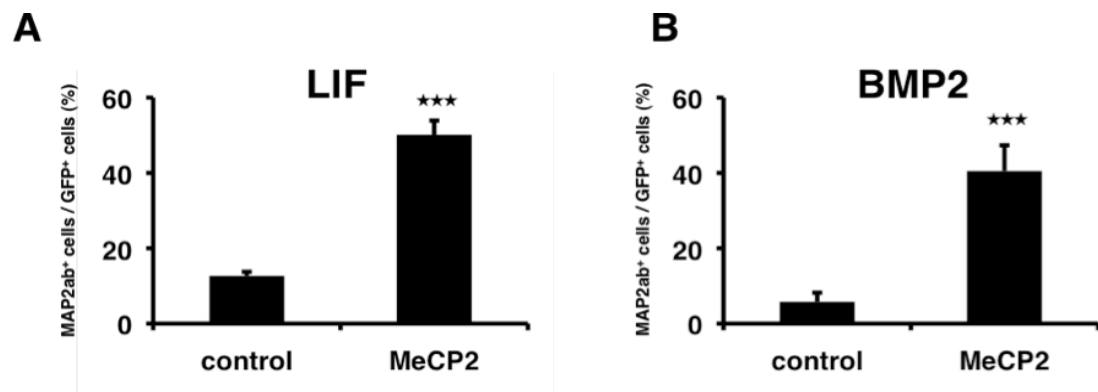


図 3. MeCP2 はアストロサイト誘導性サイトカイン存在下においてもニューロン分化を促進する。(A and B) コントロールとして GFP のみ、および MeCP2 と GFP を発現する組換えレトロウイルスを神経幹細胞に感染させ、LIF (50 ng/ml) (A)もしくは BMP2 (50 ng/ml) (B)と bFGF (1 ng/ml)の存在下において 4 日間培養した。細胞は GFP、MAP2ab に対する抗体を用いて染色した。GFP 陽性細胞中の MAP2ab-陽性細胞の数を定量した(mean $\pm$ S.D.; t-test, *** $P < 0.001$ compared with the control)。

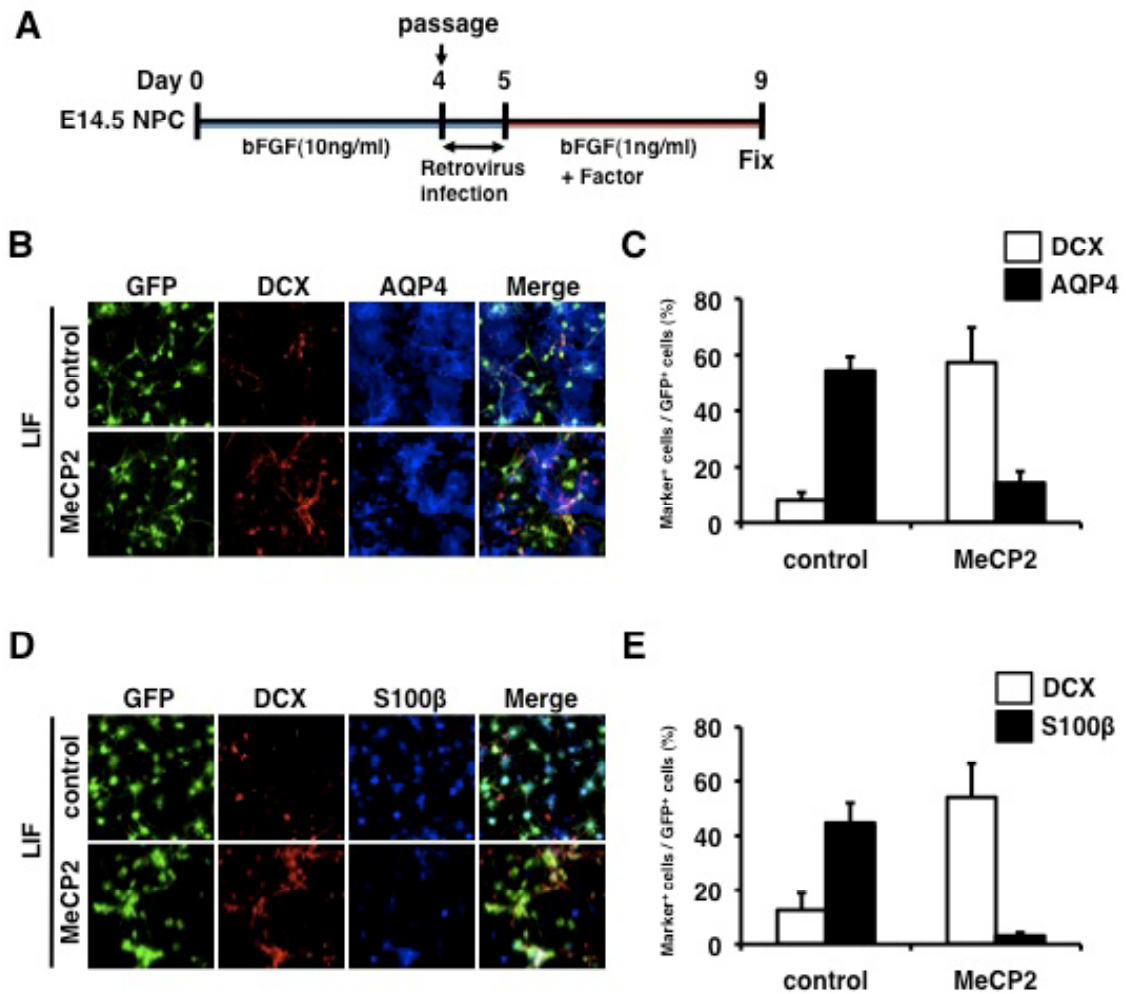


図 4. MeCP2 はアストロサイトマーカーの発現を抑制する。(A) 細胞培養とウイルス感染の培養過程の模式図。(B and D) コントロールとして GFP のみ(上段)、および MeCP2 と GFP(下段)を発現する組換えレトロウイルスを神経幹細胞に感染させ、LIF (50 ng/ml)と bFGF (1 ng/ml)の存在下において 4 日間培養した。細胞は GFP(緑)、DCX(赤)、AQP4(青、B and C)および S100β(青、D and E)に対する抗体を用いて染色した。Scale bar = 50 μ m. (C and E) (B) and (D) における GFP 陽性細胞中のマーカー陽性細胞の数を定量した (mean $\pm$ S.D.; t-test, *** $P < 0.001$ compared with the control)。

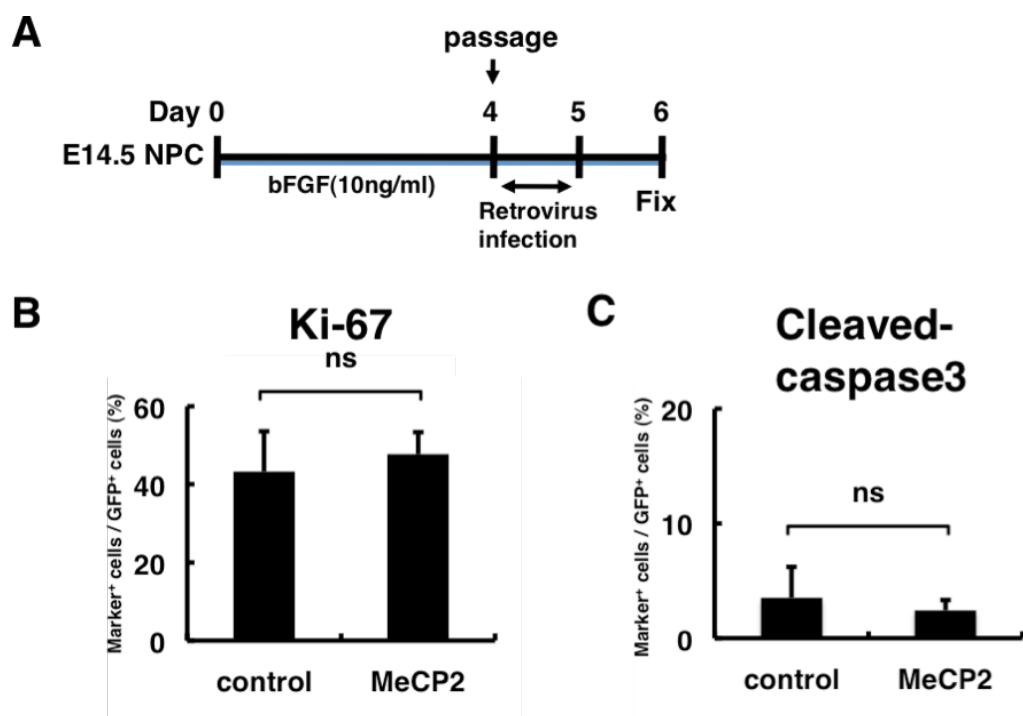


図 5. MeCP2 の発現は神経幹細胞の増殖および生存に影響を与えない。(A) 細胞培養とウイルス感染の培養過程の模式図。(B and C) コントロールとして GFP のみ、および MeCP2 と GFP を発現する組換えレトロウイルスを神経幹細胞に感染させ、bFGF (1 ng/ml) の存在下において 1 日間培養した。細胞は GFP と Ki67 もしくは GFP と cleaved-caspase3 に対する抗体を用いて染色した。GFP 陽性細胞中の Ki-67 もしくは cleaved-caspase3 陽性細胞の数を定量した(mean $\pm$ S.D.; t-test, ns = not significant)。

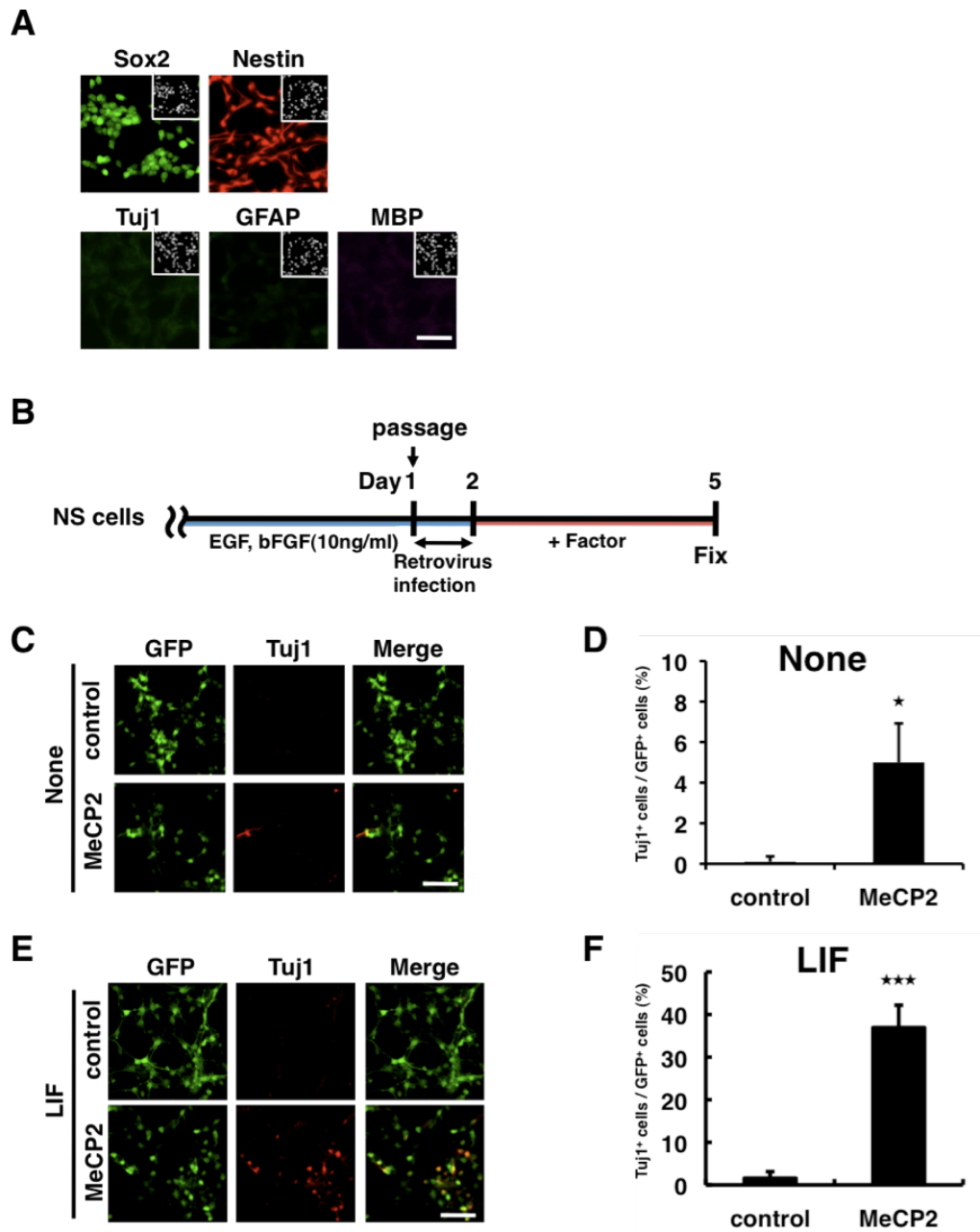


図 6. MeCP2 は均一な神経幹細胞においてもニューロン分化を促進する。(A) 未分化状態で 25 回パッセージした神経幹細胞を Sox2, Nestin, Tuj1, GFAP および MBP に対する抗体を用いて染色した。細胞核については H33258 を用いて染色した(gray, insets)。Scale bar = 50 μ m。(B) 細胞培養とウイルス感染の培養過程の模式図。(C and E) コントロールとして GFP のみ(上段)、および MeCP2 と GFP(下段)を発現する組換えレトロウイルスを神経幹細胞に感染させ、LIF (50 ng/ml) 非存在下(C)もしくは存在下(E)において 4 日間培養した。細胞は GFP(緑)、 β III-tubulin (Tuj1, 赤)に対する抗体を用いて染色した。Scale bar = 50 μ m。(D and F) (C) and (E) における GFP 陽性細胞中の Tuj1 陽性細胞の数を定量した (mean $\pm$ S.D.; t-test, * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ compared with the control)。

MeCP2 の発現は *gfap* プロモーターのメチル化状態に影響を与えない

アストロサイト特異的遺伝子の発現は発生期においてそのプロモーターのメチル化状態により厳密に制御されている(Namihira et al., 2009; Namihira et al., 2004; Takizawa et al., 2001)。そこで MeCP2 の発現が *gfap* プロモーター上のメチル化に影響を与えるかどうかを調べた。しかしながら、MeCP2 を発現した細胞においても *gfap* プロモーター中の低メチル化状態は維持されていた (図 7)。我々は以前に胎生後期の神経幹細胞の *gfap* プロモーターは低メチル化状態にあるが、*gfap* のエクソン 1 は高頻度にメチル化されていること、MeCP2 はその高頻度にメチル化されたエクソン 1 に結合することで *gfap* の発現を抑制することを報告している (Setoguchi, et al., 2006, Kohyama, et al., 2008)。MeCP2 を発現する細胞においても *gfap* エクソン 1 領域は高度のメチル化状態が維持されていた。このことは、MeCP2 はこの領域に結合し、アストロサイト特異的遺伝子の発現を抑制している事を示している。

Ras-ERK 経路の阻害は MeCP2 を介したニューロン分化を消失させる

これまでに Ras-ERK 経路の活性化がニューロン分化に重要であるということが報告されている(Menard et al., 2002; Paquin et al., 2005)。我々の実験系で用いている培養メディアウムは Ras-ERK 経路を活性化する insulin と bFGF を含んでいる (Avruch, 1998; Kouhara et al., 1997)。そのため、MeCP2 のアストロサイト抑制作用とニューロン分化促進作用に Ras-ERK 経路の活性化が必要かどうかを ERK 上流のキナーゼである MEK 阻害剤(U0126)を用いて解析した。神経幹細胞にコントロールおよび MeCP2 を発現するレトロウイルスを感染させ、U0126 存在下、非存在下で bFGF (1 ng/ml) and LIF (50 ng/ml)を加えた条件で神経幹細胞を培養した。U0126 非存在下において MeCP2 を発現する神経幹細胞は Tuj1 陽性ニューロンへと分化したが、U0126 存在下ではこれらの細胞は Tuj1 陽性ニューロンには分化せずに GFAP 陽性アストロサイトへと分化した (図 8A および B)。対照的に、

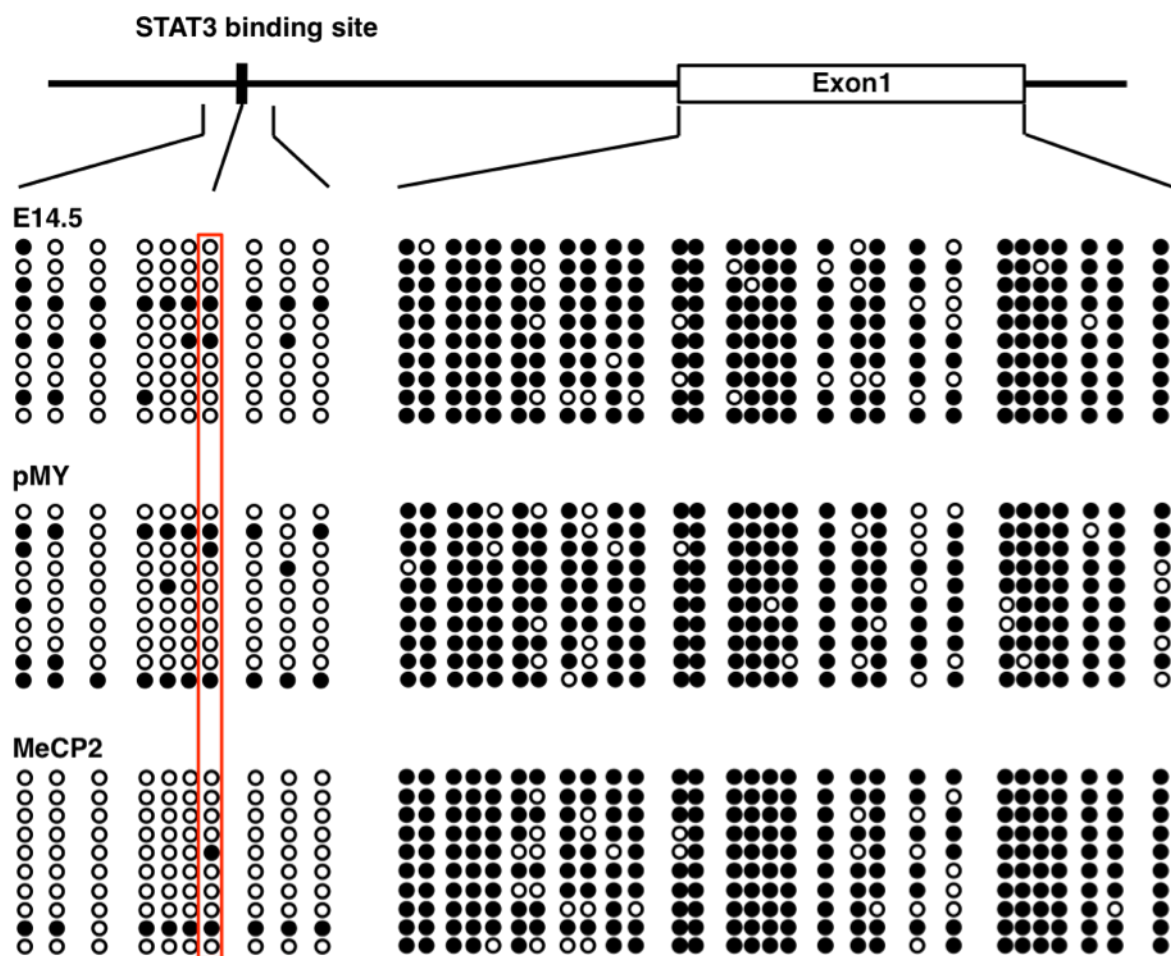


図 7. MeCP2 の発現は *gfap* プロモーターと exon1 のメチル化状態に影響を与えない。コントロールとして GFP のみ(pMY)、および MeCP2 と GFP(MeCP2)を発現する組換えレトロウイルスを神経幹細胞に感染させ、bFGF (1 ng/ml)存在下において 4 日間培養した。*gfap* プロモーター(-1,622 to -1,423)と exon1 領域(+20 to +449)のメチル化状態を bisulfite sequencing 法により解析した。ウイルスを感染していない E14.5 の神経幹細胞についても同様に解析した(E14.5)。白丸と黒丸はそれぞれ脱メチル化およびメチル化 CpG を示す。

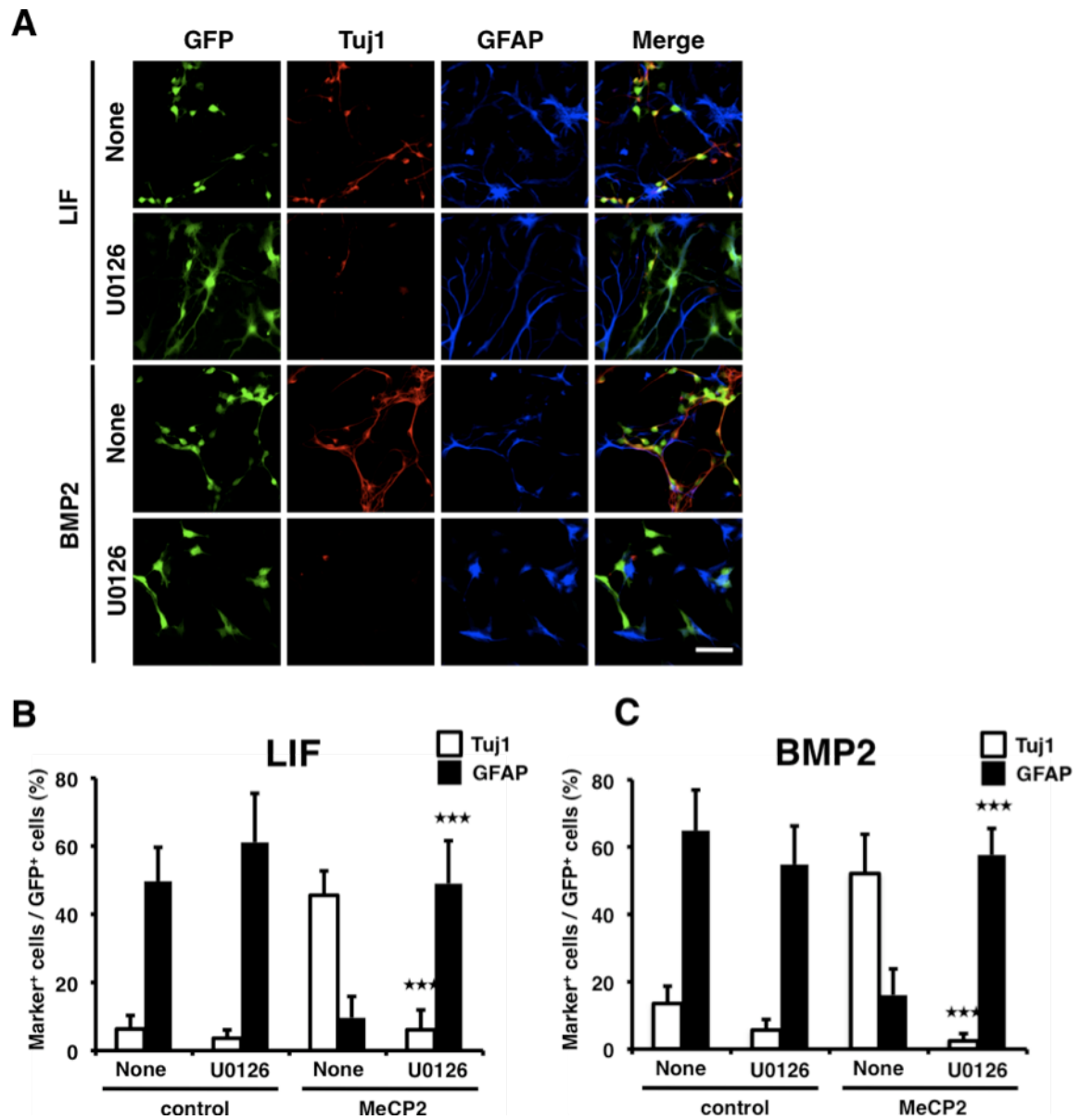


図 8. Ras-ERK 経路の阻害は MeCP2 を介したニューロン分化を消失させる。

(A) 神経幹細胞に GFP のみ、および MeCP2 と GFP を発現する組換えレトロウイルスを感染させ、bFGF (1 ng/ml) と LIF (50 ng/ml)あるいは BMP2 (50 ng/ml)を加えた条件に MEK 阻害剤 U0126 (8 μ M)の非存在(1 列と 3 列目)もしくは存在下(2 列と 4 列目)において 4 日間培養した。細胞は GFP(緑)、 β III-tubulin (Tuj1, 赤)、GFAP (青)に対する抗体を用いて染色した。Scale bar = 50 μ m. (B and C) (A)における GFP 陽性細胞中の Tuj1- および GFAP-陽性細胞の数を定量した。(mean $\pm$ S.D.; t-test, *** $P < 0.001$ compared with the control)。

U1026 処理はコントロールウイルスを感染させた細胞の分化には影響を与えなかった。さらに同様の結果は BMP2 刺激した場合にも得られた (図 8A および C)。これらの結果は Ras-ERK 経路は MeCP2 を介した神経幹細胞の運命決定において重要な役割を果たしていることを示唆している。

RTT 患者にみられる MeCP2 欠失変異体はアストロサイト分化抑制作用およびニューロン分化促進作用を消失している

MeCP2 遺伝子の変異により RTT が引き起こされることが知られている (Amir et al., 1999)。そこで RTT 患者にみられる代表的な変異体が野生型 MeCP2 のアストロサイト分化抑制作用とニューロン分化促進作用をもつかどうか調べるために、古典的 RTT 患者で高頻度にみられ (Amir and Zoghbi, 2000)、転写抑制ドメイン (TRD) を含めた C 末端のポリペプチドを欠いた MeCP2 欠失変異体 (R168X) を用いた (図 9A)。神経幹細胞に全長 MeCP2 および R168X を発現するレトロウイルスを感染させ、LIF 存在下で 4 日間培養した。野生型 MeCP2 とは対照的に、R168X はニューロン分化促進およびアストロサイト分化抑制作用が消失していることが観察された (図 9B および C)。この R168X の野生型 MeCP2 作用の消失は BMP2 存在下においても同様に観察された (図 9D および E)。これらの結果は、MeCP2 の正常な作用には TRD と C 末端領域が必須であることを示している。

RTT 患者にみられる MBD および TRD の MeCP2 ミスセンス変異体はアストロサイト分化抑制作用およびニューロン分化促進作用を消失している

上記の MeCP2 欠失変異体に加え、RTT 患者において多くの 1 アミノ酸置換型のミスセンス変異体が報告されている (Van den Veyver and Zoghbi, 2000)。さらに詳細な作用点を調べるため、メチル化 DNA 結合ドメイン、転写抑制ドメイン、C 末端ドメインからそれぞれ代表的なミスセンス変異体 (T158M, R306C, E397K) を作製し (図 10)、野生型にみられるアストロサイト分化抑制およびニューロン分

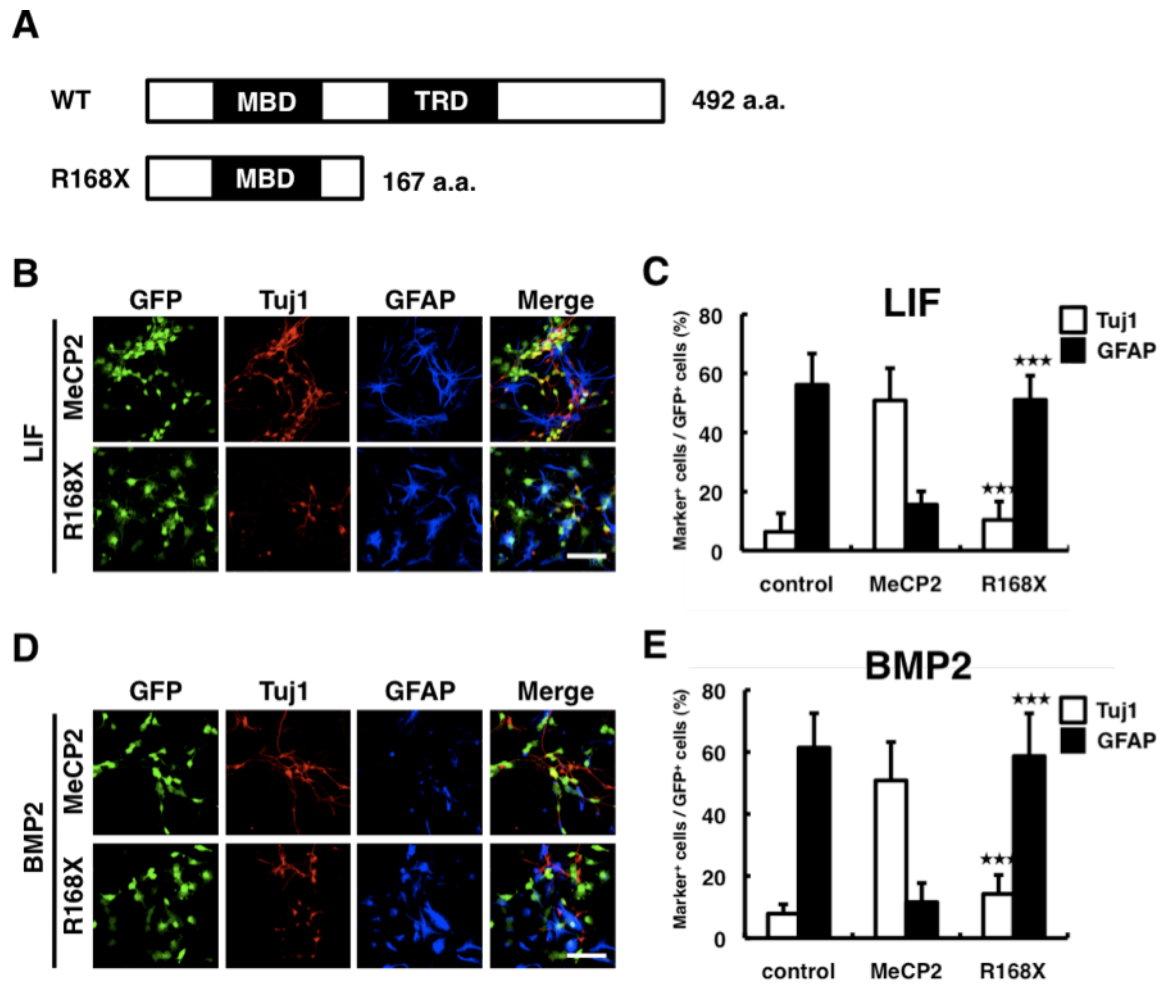


図 9. レット症候群患者にみられる欠失変異体はニューロン分化を促進できない。

(A) 全長(野生型)と変異体(R168X)MeCP2 の模式図。 a.a., アミノ酸。(B and D) 野生型 MeCP2 と GFP、および R168X と GFP を発現する組換えレトロウイルスを神経幹細胞に感染させ、 bFGF (1 ng/ml) と LIF (50 ng/ml) (B)もしくは BMP2 (50 ng/ml) (D)存在下において 4 日間培養した。細胞は GFP(緑)、 β III-tubulin (Tuj1, 赤)、GFAP(青)に対する抗体を用いて染色した。Scale bar = 50 μ m. (C and E) (B) と (D) における GFP 陽性細胞中の Tuj1- および GFAP-陽性細胞の数を定量した(mean $\pm$ S.D.; t-test, *** $P < 0.001$ compared with WT MeCP2)。

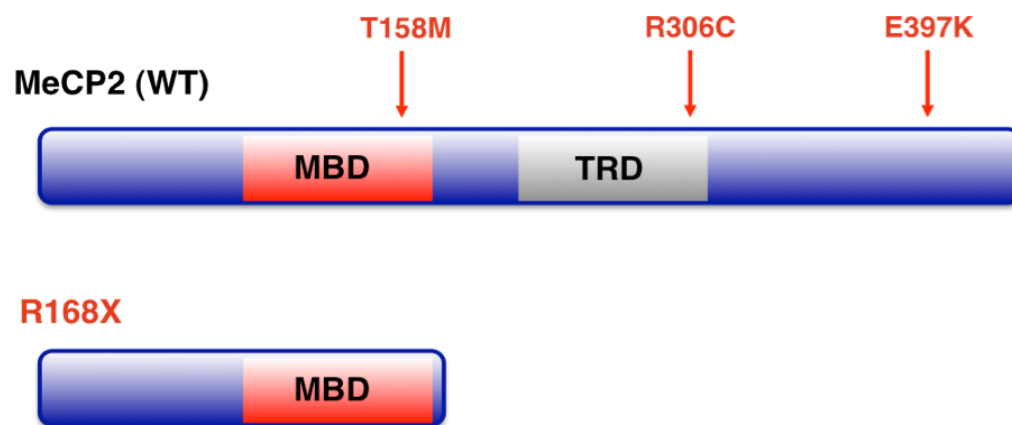


図 10. レット症候群患者にみられるミスセンス変異体

全長(野生型)、ミスセンス変異体(T158M, R306C, E397K)、変異体(R168X)MeCP2 の模式図。a.a., アミノ酸。

Rett 症候群患者においてみられるミスセンス変異体から、メチル化 DNA 結合ドメイン(MBD)、転写抑制ドメイン(TRD)、C 末端ドメインそれぞれにおいて代表的なミスセンス変異体を一つずつ作製した。

化促進作用をもつかどうかを上記 LIF 条件下と同様の方法で調べた。これまでの結果と同じように、コントロールの細胞は LIF 条件下のため、多くの細胞が GFAP 陽性のアストロサイトへの分化し、野生型 MeCP2 を発現する神経幹細胞はアストロサイト分化を抑制しつつニューロンへの分化が促進された。興味深いことに、MBD ドメインのミスセンス変異体である T158M、および TRD ドメインのミスセンス変異体である R306C はコントロールと同様にアストロサイト分化が有意に促進され、野生型 MeCP2 の作用が消失していることが観察された。一方、C 末端ドメインのミスセンス変異体は野生型には劣るが、ニューロン分化を促進させた(図 11A)。さらに、これらの変異体の核内局在をそれぞれの N 末端に融合した FLAG タグに対する抗体を用いて調べた。野生型 MeCP2 はドット状に局在することが確認されたが、MBD ドメインのミスセンス変異体(T158M)は、野生型にみられるドット状の局在が消失していることがわかった(図 11B)。TRD ドメインのミスセンス変異体(R306C)およびC末端ドメインのミスセンス変異体(E397K)は野生型と同様のドット状の局在を示すことが観察された。これらの結果から、MBD ドメインのミスセンス変異体は標的メチル化遺伝子に結合できないため、野生型の作用を発揮できないこと、TRD ドメインのミスセンス変異体は標的メチル化遺伝子に結合できるが、野生型の機能に重要な結合因子と正常な相互作用ができないため、野生型の作用が消失したことが考えられる。

神経幹細胞における MeCP2 結合タンパク質の同定

上述のミスセンス変異体を用いた解析から、MeCP2 の正常な作用に結合タンパク質が重要な役割を果たしていることが考えられた。そこで、MeCP2 によるニューロン分化促進作用メカニズムをより詳細に理解するために、神経幹細胞における MeCP2 結合タンパク質の同定を試みた。コントロールとして GFP のみおよび MeCP2 と GFP を発現する神経幹細胞のタンパク質抽出液を用いて抗 FLAG 抗体により FLAG-MeCP2 を免疫沈降し、MeCP2 結合タンパク質を質量分

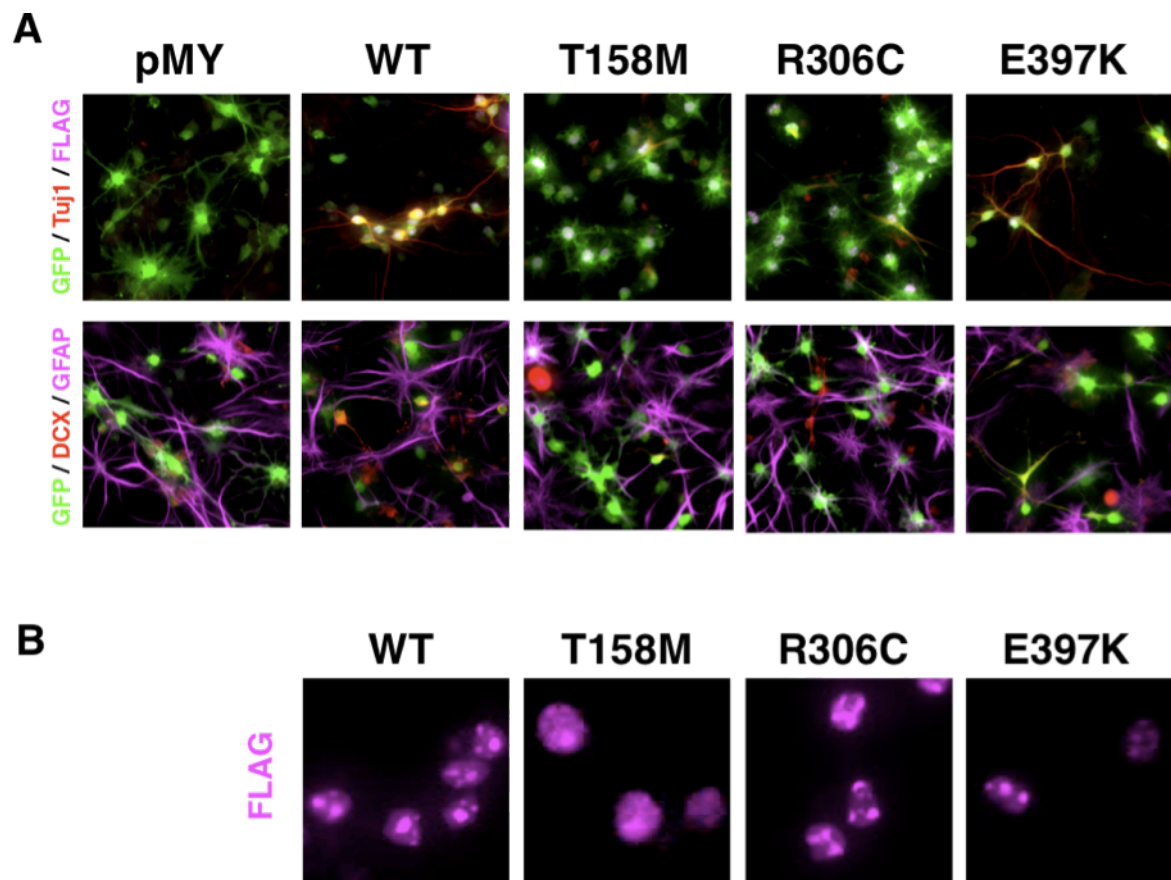


図 11. レット症候群患者にみられる MBD および TRD のミスセンス変異体はニューロン分化を促進できない。

(A) コントロールとして GFP のみ、野生型 MeCP2 と GFP、T158M と GFP、R306C と GFP、および E397K と GFP を発現する組換えレトロウイルスを神経幹細胞に感染させ、bFGF (1 ng/ml) と LIF (50 ng/ml) 存在下において4日間培養した。細胞はGFP(緑)、 β III-tubulin (Tuj1, 赤)、FLAG (紫)(上段)、およびGFP(緑)、DCX(赤)、GFAP (紫)(下段)に対する抗体を用いて染色した。(B) FLAG(紫)に対する抗体を用いて染色を行い、野生型およびミスセンス変異体 MeCP2 の核内における局在を調べた。

析により網羅的に解析した(図 12)。その結果、これまでに MeCP2 と結合することが報告されている Histone deacetylase 2 (HDAC2)、クロマチンリモデリング因子、CaMKII に加え、RNA 結合タンパク質や転写因子など多くの結合タンパク質が同定された(表 1)。

MeCP2 は *in vivo* の非神経新生領域においても神経幹細胞のニューロン分化を促進する

BMP2 および BMP4 は成体脳の非神経新生領域において生理的に発現しており、神経新生を阻害することが報告されている(Gross et al., 1996; Lim et al., 2000)。MeCP2 が *in vitro* の実験で BMP2 存在下においてもニューロン分化を促進できることを考慮し、次に MeCP2 が非神経新生領域として知られる線条体においても神経幹細胞のニューロン分化を促進できるかどうかを調べた。コントロールとして GFP のみ、および GFP と MeCP2 を発現するレトロウイルスを神経幹細胞に感染させ、その神経幹細胞を線条体に移植した(図 13A)。移植 1 週間後において、半数以上のコントロール神経幹細胞が GFAP 陽性アストロサイトへと分化した(図 13B および C)。コントロールとは対照的に、MeCP2 を発現する移植神経幹細胞は劇的に DCX 陽性の未成熟なニューロンへと分化した。定量した結果、コントロール細胞の 59% が GFAP 陽性アストロサイトへ、11% が DCX 陽性ニューロンへと分化した。一方、MeCP2 を発現する細胞の 10% が GFAP 陽性アストロサイトへ、62% が DCX 陽性ニューロンへと分化した(図 13C)。この分化傾向は移植 2 週間後においても同様に観察された(図 15A)。そのため、これらの結果は MeCP2 が非神経新生領域としてよく知られる線条体においてもニューロン分化を促進およびアストロサイト分化を抑制することを示している。

これまでの報告において、他の非神経新生領域である脊髄に移植した神経幹細胞もグリア細胞へと分化することが示されている(Cao et al., 2001)。そこで、脊髄においても MeCP2 の作用が同様に観察されるかどうか調べるため、コント

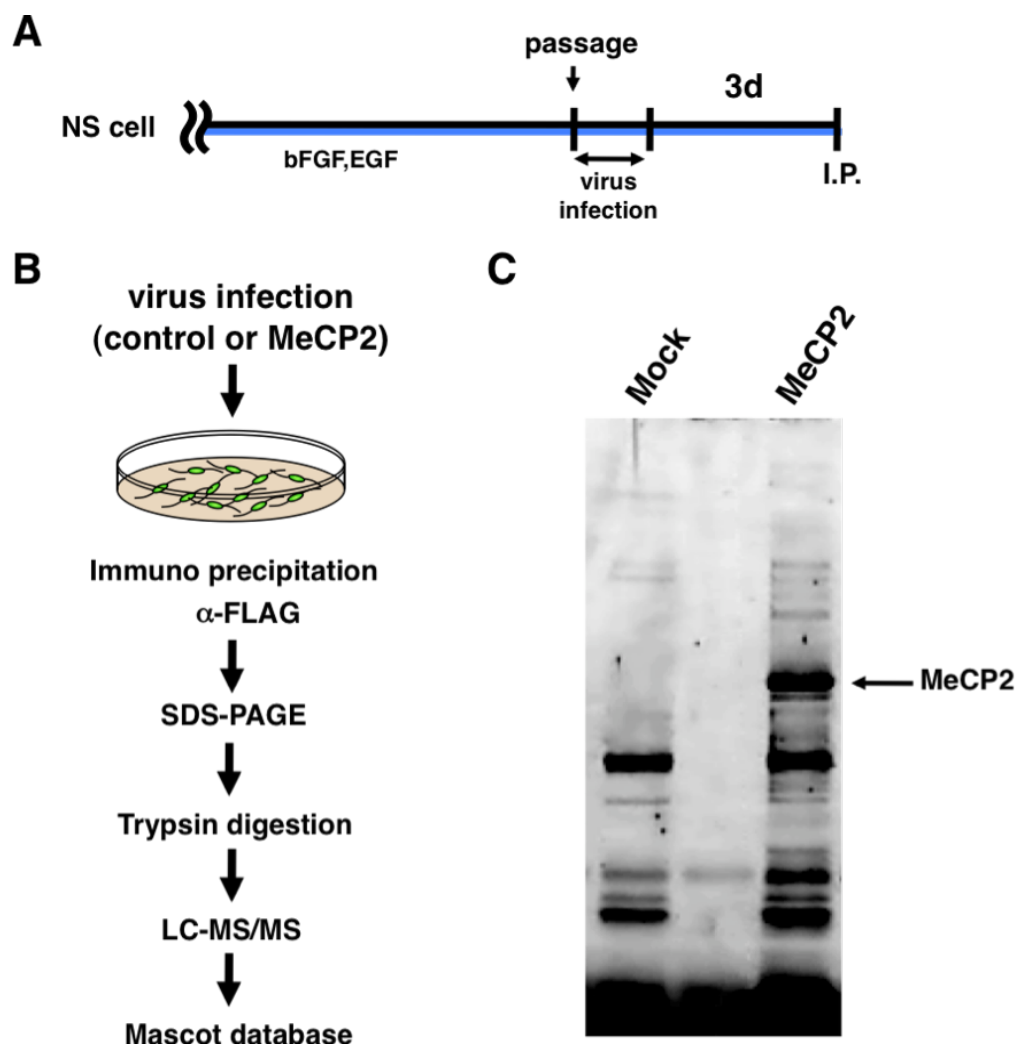


図 12. 神経幹細胞における MeCP2 結合タンパク質の同定。

(A) 細胞培養とウイルス感染の培養過程の模式図。(B) 結合タンパク質同定までの実験簡略図。(C) フラミンゴ染色によるタンパク質の検出結果。矢印は MeCP2 のバンド位置を示している。

表 1 神経幹細胞において同定された MeCP2 結合タンパク質

Gene name	Molecular function	Biological process
HDAC2	Histone deacetylase activity	Chromatin modification Regulation of transcription
Transcription repressor p66 component of the MeCP1 complex	Transcription factor Co-repressor	Regulation of transcription
SNF2H (ATP-dependent DNA helicase)	ATPase and helicase activity Transcription activator activity	Chromatin remodeling
ZEB1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1)	Transcription factor Co-repressor or activator	Central nervous system development
ZEB2 (Zinc finger E-box-binding homeobox 2)	Transcription factor SMAD-binding	Central nervous system development
CAMK II B	Calmodulin-dependent protein kinase	Protein amino acid phosphorylation
DDX5 (DEAD box protein 5)	RNA helicase RNA binding	RNA splicing Cell growth
DDX17 (DEAD box protein 17)	RNA helicase RNA binding	RNA processing
hnRNP-G	RNA binding Protein binding	RNA splicing

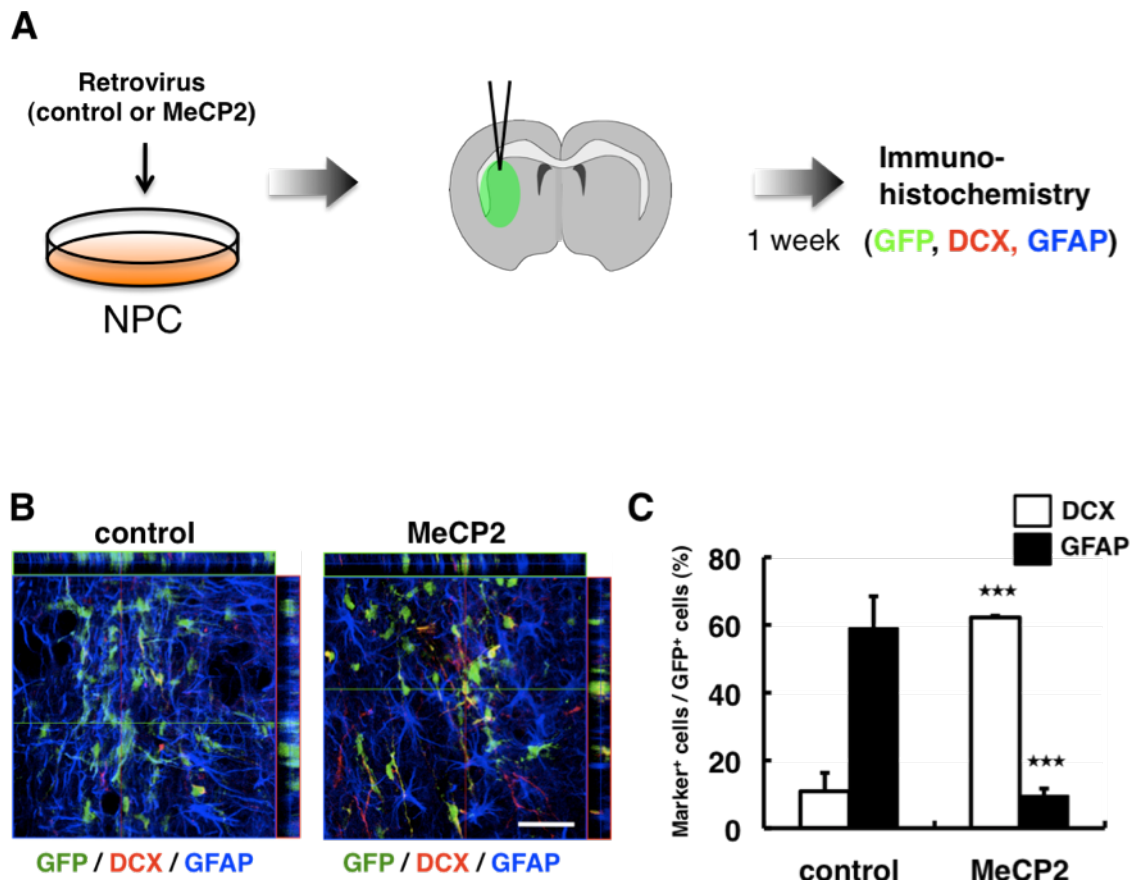


図 13. MeCP2 を発現する神経幹細胞は線条体においてもニューロンへと分化する。
 (A) 実験の模式図。緑の円は線条体に移植された細胞の領域を表す。(B) GFP のみ、および MeCP2 と GFP を発現する組換えレトロウイルスを神経幹細胞に感染させ、線条体へ移植した。一週間後、マウスから脳組織切片を作製し、GFP(緑)、DCX(赤)、GFAP(青)に対する抗体を用いて染色した。Scale bar = 50 μ m. (C) (B) における GFP 陽性細胞中の Tuj1- および GFAP-陽性細胞の数を定量した。(mean $\pm$ S.D.; t-test, n = 3; *** $P < 0.001$ compared with the control)。

ロールおよび MeCP2 を発現するレトロウイルスを神経幹細胞に感染させ、脊髄に移植した(図 14A)。移植 1 週間後、コントロール細胞の 56%が GFAP 陽性アストロサイトへ、9%DCX 陽性ニューロンへと分化した。コントロールとは対照的に、MeCP2 を発現する移植神経幹細胞の 54%が DCX 陽性ニューロンへ、6%の細胞が GFAP 陽性アストロサイトへと分化した(図 14B および C)。この結果は移植 2 週間後においても同様に観察された(図 15B)。したがって、MeCP2 は非神経新生領域である脊髄においてもアストロサイト分化を抑制しつつ、ニューロン分化を促進できることが示された。

MeCP2 は損傷脊髄においても神経幹細胞のニューロン分化を促進する

成体哺乳類の中樞神経系の損傷部においては、内在性および移植神経幹細胞のどちらも大部分がアストロサイトへと分化してしまい、その結果、グリア瘢痕が形成されることで機能回復が妨げられる。その原因として、損傷部においてはアストロサイトへの分化を誘導するような LIF は BMP などの炎症性サイトカインの発現が上昇するためであると考えられている。

これまでの結果から、MeCP2 が *in vitro* および線条体や脊髄といった非神経新生領域のアストロサイト誘導性サイトカイン存在下にも関わらず、MeCP2 は劇的にアストロサイト分化を抑制し、なおかつニューロン分化を促進させることが明らかになった。そこで、この MeCP2 の作用が中枢神経系の損傷治療に応用可能かどうかを検討した。生後 15 週齢の ICR 雄マウスの第 9 胸髄に脊髄損傷を施し、脊髄損傷モデルマウスを作製した。7 日後、損傷部へコントロールとして GFP のみを発現する神経幹細胞および MeCP2 と GFP を発現する神経幹細胞を移植した。3 週間後にマウスを灌流固定し、脊髄を摘出、凍結切片を作製後、免疫組織染色により移植細胞の分化傾向を解析した。その結果、コントロールとして GFP のみを発現している神経幹細胞はこれまでの報告通りほとんどの細胞が GFAP 陽性アストロサイトへと分化した。一方、MeCP2 を発現する神経幹細胞

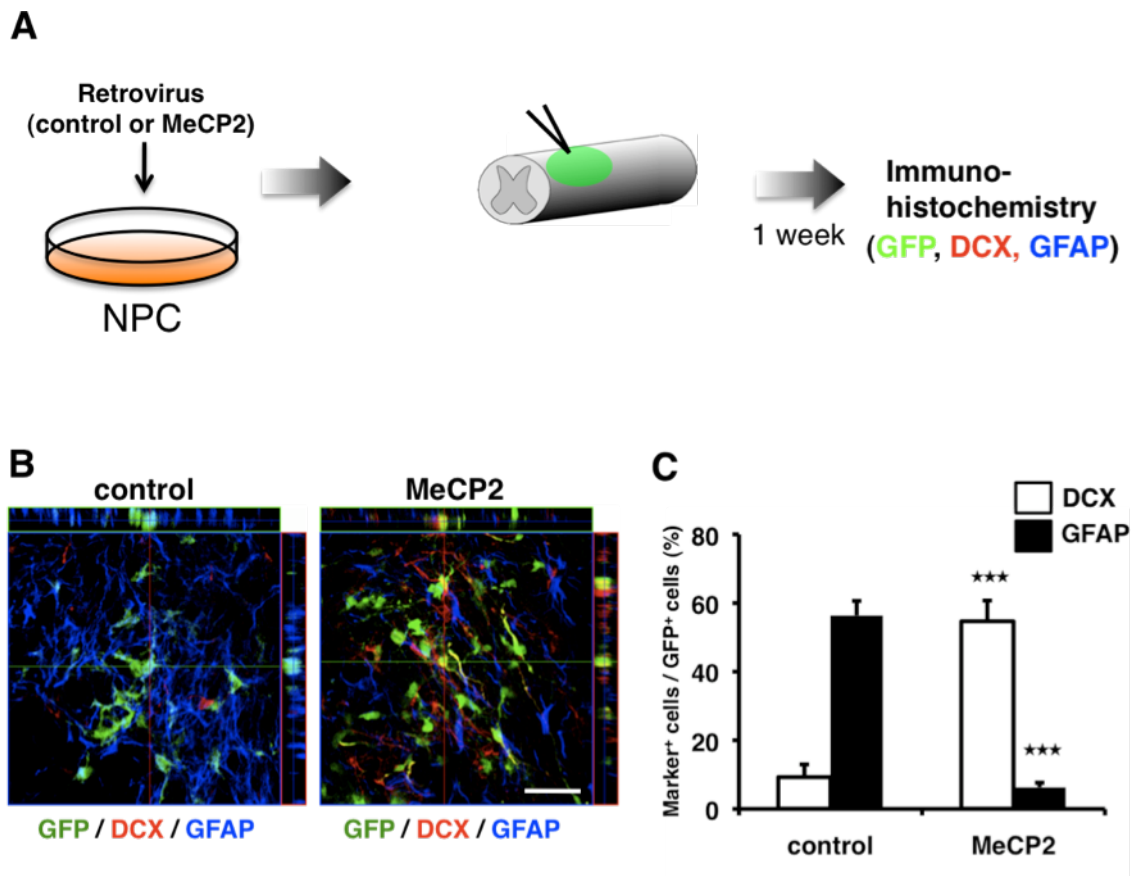


図 14. MeCP2 を発現する神経幹細胞は脊髄においてもニューロンへと分化する。

(A) 実験の模式図。緑の円は脊髄に移植された細胞の領域を表す。(B) GFP のみ、および MeCP2 と GFP を発現する組換えレトロウイルスを神経幹細胞に感染させ、脊髄へ移植した。一週間後、マウスから脊髄組織切片を作製し、GFP(緑)、DCX(赤)、GFAP(青)に対する抗体を用いて染色した。Scale bar = 50 μ m. (C) (B) における GFP 陽性細胞中の Tuj1- および GFAP-陽性細胞の数を定量した。(mean $\pm$ S.D.; t-test, n = 3; *** $P < 0.001$ compared with the control).

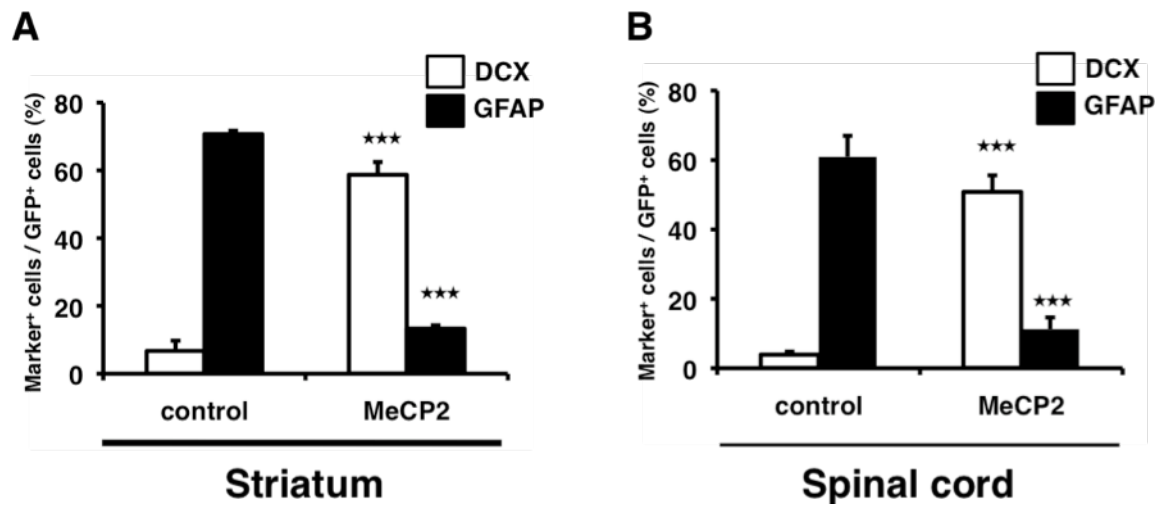


図 15. MeCP2 を発現する神経幹細胞は非神経新生領域においてもニューロンへと分化する。(A and B) GFP のみ、および MeCP2 と GFP を発現する組換えレトロウイルスを神経幹細胞に感染させ、線条体および脊髄へ移植した。二週間後、マウスから脳組織(A)もしくは脊髄組織(B)切片を作製し、GFP、DCX、GFAP に対する抗体を用いて染色した。GFP 陽性細胞中の DCX- および GFAP-陽性細胞の数を定量した。(mean $\pm$ S.D.; t-test, $n = 3$; *** $P < 0.001$ compared with the control)。

胞においてはアストロサイト分化が顕著に抑制され、60%以上の細胞が double cortin(DCX)陽性ニューロンへと分化した(図 16)。これらの結果は、MeCP2 の作用が中枢神経系の損傷治療に応用できる可能性を示唆している。

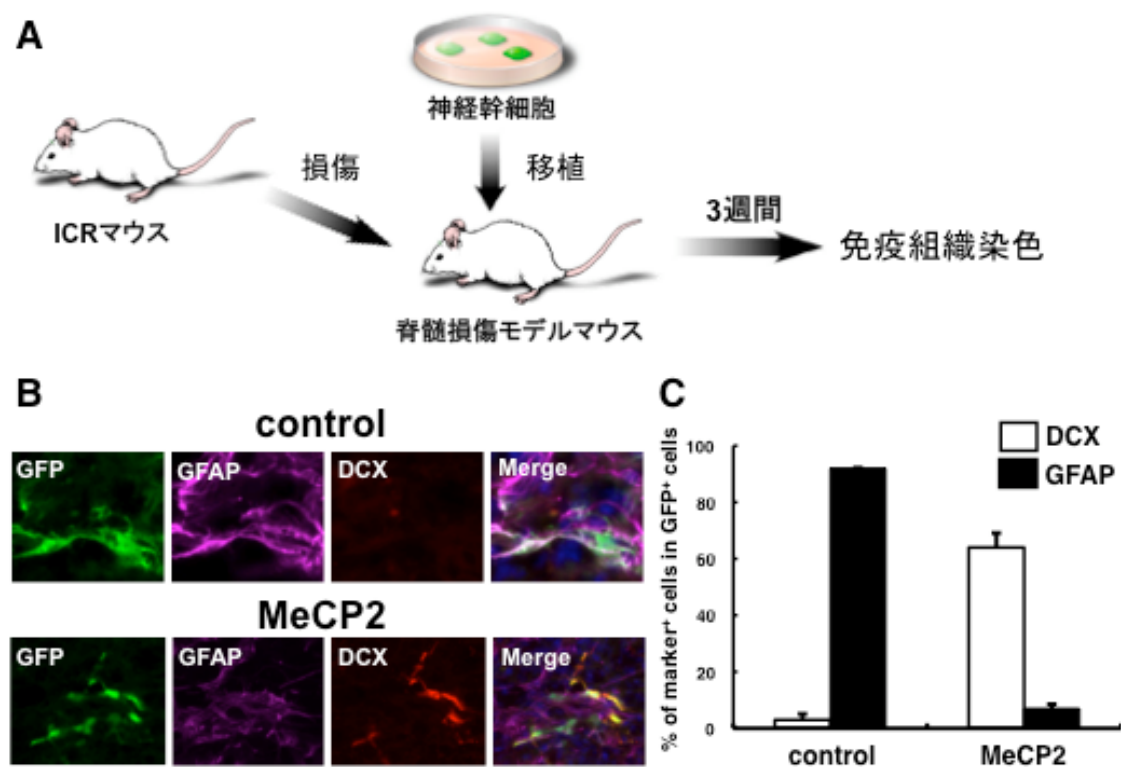


図 16. MeCP2 を発現する神経幹細胞は損傷脊髄においてもニューロンへと分化する。

(A) 実験の模式図。成体 ICR マウスに脊髄損傷を施し、脊髄損傷モデルマウスを作製した。7 日後、コントロールとして GFP のみを発現する神経幹細胞と MeCP2 と GFP を発現する神経幹細胞を損傷部へ移植した。3 週間後、脊髄を取り出し免疫組織染色を行なった。(B) コントロールである GFP のみを発現する移植細胞はほとんどが GFAP 陽性アストロサイトへ分化した。一方、MeCP2 を発現する神経幹細胞はアストロサイトへは分化せずに多くの細胞が DCX 陽性ニューロンへと分化した。GFP(緑)、DCX(赤)、GFAP(紫)。Scale bar = 20 μ m. (C) (B)における GFP 陽性細胞中の DCX- および GFAP-陽性細胞の数を定量した。(mean $\pm$ S.D.; t-test, n = 3)。

考察

MeCP2 遺伝子の変異により重度の精神神経疾患である RTT が発症する。MeCP2 は中枢神経系においてはニューロンで高発現しており、遺伝子発現のリプレッサーとして機能する。しかしながら、MeCP2 の機能不全により RTT の神経系特異的な表現型が引き起こされる分子メカニズムはほとんど明らかにされていない(Chen et al., 2001)。Kishi と Macklis (2004)は MeCP2 変異マウスを用いた *in vivo* と *in vitro* の解析から、MeCP2 は細胞運命決定というよりは神経細胞の成熟に関与することを報告した。一方、本研究において、我々は神経幹細胞への MeCP2 の異所的発現が、*in vivo* と *in vitro* 双方においてアストロサイト分化を抑制するだけでなくニューロン分化を促進することを実証した。これらの結果は、特定の条件において MeCP2 は明らかに神経幹細胞の運命決定を制御する能力をもっていることを示唆している。また、我々は RTT 患者にみられる欠失変異体は野生型 MeCP2 に見られるこの二つの作用が失われていることを示した。この発見は R168X 変異体が機能していないことに加え、RTT の病態を一部反映しているものかもしれない。このことを裏付けるように、RTT 患者においていくつかのアストロサイト特異的遺伝子の発現が上昇していることが報告されている(Colantuoni et al., 2001)。さらに、本研究において RTT 患者にみられるメチル化 DNA 結合ドメイン(MBD)および転写抑制ドメイン(TRD)のミスセンス変異体も野生型 MeCP2 の作用が消失していることを明らかにした。MBD ドメインのミスセンス変異体(T158M)は野生型でみられる核内のドット状の局在が消失しているため、標的メチル化遺伝子に結合できなくなっていることが考えられた。TRD ドメインのミスセンス変異体(R306C)は核内局在が正常なものの、野生型のニューロン分化促進作用が失われている。そのため、このミスセンス変異体は標的遺伝子に結合することはできるが、他のタンパク質との相互作用が欠損しているため、野生型にみられる作用を発揮できないことが考えられる。これら

の結果は、MeCP2 が正常な作用を発揮するためには MeCP2 自身が標的遺伝子に結合することに加え、MeCP2 の正常な複合体形成および結合因子との相互作用が重要な役割を果たしていることを示唆している。そのため MeCP2 の作用メカニズムおよび RTT の分子病態の解明には、MeCP2 標的遺伝子の解析に加え、MeCP2 結合タンパク質を同定することが重要である。

Ras-ERK 経路が神経幹細胞のニューロン分化において重要ということが報告されている(Menard et al., 2002; Paquin et al., 2005)。我々は本研究において MEK 阻害剤である U0126 が MeCP2 のニューロン分化促進とアストロサイト分化抑制という二重作用を消失させることを示した。このことは、ERK の活性化が少なくとも部分的には MeCP2 の機能に関与することを示唆している。そのため、他のタンパク質と機能的複合体を形成するために MeCP2 が ERK によってリン酸化される可能性が考えられる。MeCP2 のリン酸化修飾については、神経活動に応答して CaMKII 依存的メカニズムにより 421 番目のセリン残基がリン酸化されることに加え、神経活動とは非依存的に 80 番目と 229 番目のセリン残基がリン酸化修飾を受けることが示されている(Zhou et al., 2006)。そのため、我々は 80 番目、229 番目、421 番目に位置するそれぞれのセリンをアラニンに置換した 3 つの 1 アミノ酸置換変異体を作製した。しかしながら、これら 3 つの変異体は野生型 MeCP2 と同様の二重作用が観察された(data not shown)。

本研究では解明されていない重要な疑問として、どのように MeCP2 はアストロサイト分化を抑制しニューロン分化を促進するのかということが挙げられる。一つの可能性として、MeCP2 は非神経系細胞において神経特異的遺伝子の発現を抑制する neuron-restrictive silencer factor/RE-1 silencing transcription factor (NRSF/REST) のような神経分化抑制因子の発現を抑制することが考えられる(Chong et al., 1995; Schoenherr and Anderson, 1995)。また、プロニューラル basic helix-loop-helix (bHLH) 転写因子である neurogenin1 (NEUROG1) はアストロサイト特異的遺伝子から、CREB binding protein (CBP)-Smad1 複合体を隔離すること

に加え、アストロサイト分化に必須な STAT の活性化を阻害することにより *gfap* の転写を抑制することが示されている(Sun et al., 2001)。したがって、*Neurog1* のようなプロニューラル bHLH 遺伝子の発現がいくらか誘導され、その遺伝子産物が MeCP2 と協調して機能している可能性がある。最近、MeCP2 が視床下部において転写活性化因子である cAMP responsive element binding protein (CREB) と相互作用し、その結果 MeCP2 が転写活性化因子として機能できるという報告がなされた(Chahrour et al., 2008)。CREB は ERK によってリン酸化されることが示されている(Brami-Cherrier et al., 2005)。そのため、MeCP2 はリン酸化された CREB と結合しアクチベーターとして機能しているかもしれない。このことは MeCP2 を介した神経幹細胞からニューロンへの分化が MEK 阻害剤である U0126 により消失した理由を説明できる可能性がある。本研究において質量分析を用いた MeCP2 結合タンパク質の解析から、これまで MeCP2 と結合することが報告されている HDAC2 やクロマチンリモデリング因子、上述の CaMKII が同定された。このことは本研究の実験方法により、少なくとも一部の機能的な MeCP2 複合体および結合タンパク質を検出できていることを示している。しかしながら、当研究では上述の CREB は検出されなかった。この理由として、これまで CREB はニューロンにおいて発現および機能することが報告されており、神経幹細胞では発現量が少ないため検出されなかった可能性や、神経幹細胞では CREB に代わる因子が MeCP2 と相互作用している可能性が考えられる。我々の研究から、MeCP2 の新規結合タンパク質として、ZEB1、ZEB2 といった転写因子や RNA 結合タンパク質である DDX5、DDX17 などが同定された。ZEB2 は smad に結合することで TGF- β /BMP シグナルを阻害することや、ZEB2 遺伝子の変異は精神遅滞や小頭症を呈する Mowat-Wilson 症候群を引き起こすことなどが報告されている(Verschuere et al., 1999; Wakamatsu et al., 2001)。また、胎生期の背側終脳において ZEB2 を conditional-knockout すると海馬や脳梁形成に異常をきたすことも示されている(Miquelajauregui et al., 2007; Verschuere et al., 1999)。

MeCP2 も神経幹細胞において BMP シグナルを阻害するような作用をもつことや、Mowat-Wilson 症候群が Rett 症候群と一部類似した臨床症状を示すことなどから、ZEB2 が MeCP2 の正常な機能に重要な役割を果たしている可能性がある。また、RNA 結合タンパク質である DDX5 や DDX17 はヒト Drosha の large complex の構成因子であり特定の micro RNA(miRNA)のプロセッシングに関与すること、p53 と相互作用することで DNA 損傷に応答した miRNA のプロセッシングを促進することなどが報告されている(Fukuda et al., 2007; Suzuki et al., 2009)。これらの報告から、MeCP2 は miRNA のプロセッシングを制御し、ニューロン分化を促進するような成熟 miRNA の発現を誘導することで神経幹細胞からニューロンへの分化を促進することが考えられる。これまで、MeCP2 の機能不全により RTT のような表現型が引き起こされる分子メカニズムはほとんどわかっていない。MeCP2 は結合因子を変えることにより多様な機能を発揮することが明らかになりつつあり、これまでに報告されていない未知の機能が RTT の病態に深く関与している可能性がある。本研究によって明らかとなった MeCP2 のアストロサイト分化阻害およびニューロン分化促進作用はこれまで全く報告されていなかった MeCP2 の新規作用である。RTT 患者に見られるいくつかの変異体はこの作用を失っていることから、本研究で行なわれた実験系は今後 MeCP2 の機能を解析する上で有用なものになると考えられる。今後、この MeCP2 の作用メカニズムが解明されれば、RTT の病態解明につながることを期待できる。

損傷を受けた哺乳類の中枢神経系は自発的回復能力が非常に乏しいことが知られているので、神経幹細胞は神経変性疾患や中枢神経系の損傷に対する治療を目指した細胞補充療法のための有望な供給源として考えられている。アストロサイト分化を促進する LIF や BMP などの炎症性サイトカインは中枢神経系の損傷部において発現が上昇する(Nakamura et al., 2003; Setoguchi et al., 2004)。損傷に応答して成体の神経幹細胞は増殖するが、それらの新しく産生された細胞の大部分はアストロサイトへと分化する(Johansson et al., 1999; Namiki and Tator,

1999)。また、損傷した中枢神経系に外来性の神経幹細胞を移植しても同様に大部分の細胞はアストロサイトへと分化してしまう (Ogawa et al., 2002; Vroemen et al., 2003)。このニューロン分化を犠牲にした神経幹細胞からアストロサイトへの分化は再生医療における主な障壁の一つと考えられている。成体の中枢神経系におけるグリア新生に傾いた環境は LIF や BMP のような内因性環境因子によって支配されていると考えられている。そのため、機能回復のための重要な鍵は内在性あるいは移植神経細胞のアストロサイト分化を抑制し他の細胞系譜へと分化促進させるような手段である。本研究において、我々は *in vitro* および線条体や脊髄といった非神経新生領域のアストロサイト誘導性サイトカイン存在下にも関わらず、MeCP2 は劇的にアストロサイト分化を抑制し、なおかつニューロン分化を促進させることを明らかにしている。このことは、損傷した中枢神経系においても MeCP2 は神経幹細胞の運命決定を制御できる事とそれによって機能回復を改善することができる可能性を示唆している。実際に MeCP2 を発現する神経幹細胞を損傷脊髄に移植した結果、これらの移植細胞はアストロサイトへは分化せずにニューロンへと分化することを見いだしている。今後は MeCP2 を発現する神経幹細胞の移植が機能回復に寄与できるのかどうかを調べる必要がある。

脊髄損傷モデルラットを用いた研究において、移植前の神経幹細胞に *Neurog2* を導入することにより、アストロサイト分化を抑制し、機能回復を改善したということが報告されている (Hofstetter et al., 2005)。しかし、発生においては *Neurog2* の発現は一過的であり、ニューロンが成熟するにつれてその発現は減少していく。したがって、*Neurog2* の持続的発現は予期しない副作用が引き起こされる可能性がある。一方、MeCP2 タンパク質量はニューロンの成熟に伴って上昇し、成熟ニューロンにおいてもその発現は維持される (Kishi and Macklis, 2004)。そのため、神経幹細胞への MeCP2 遺伝子の導入は予想外の副作用が *Neurog2* よりも少ないと考えられる。しかしながら、MeCP2 の発現量は正常な神経機能に

重要ということや(Chao et al., 2007)、MeCP2 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックマウスは RTT にみられるような神経機能障害を示すことが報告されている(Collins et al., 2004)。したがって、神経機能の最適な制御を達成するためには、神経幹細胞において MeCP2 発現量を制御することが必須である。

結論として、本研究における発見は神経幹細胞からニューロンへの分化を誘導する新規の有望な手段を示した。今後、本研究により MeCP2 の作用機序が解明されれば、中枢神経系の発生異常による疾患の解明や障害された中枢神経系の神経幹細胞を用いた再生治療法の開発のみならず、エピジェネティクス機構の普遍性から全ての器官・組織における再生治療法の開発および様々な神経疾患の新規治療法開発にも非常に有用なものとなる可能性を秘めている。

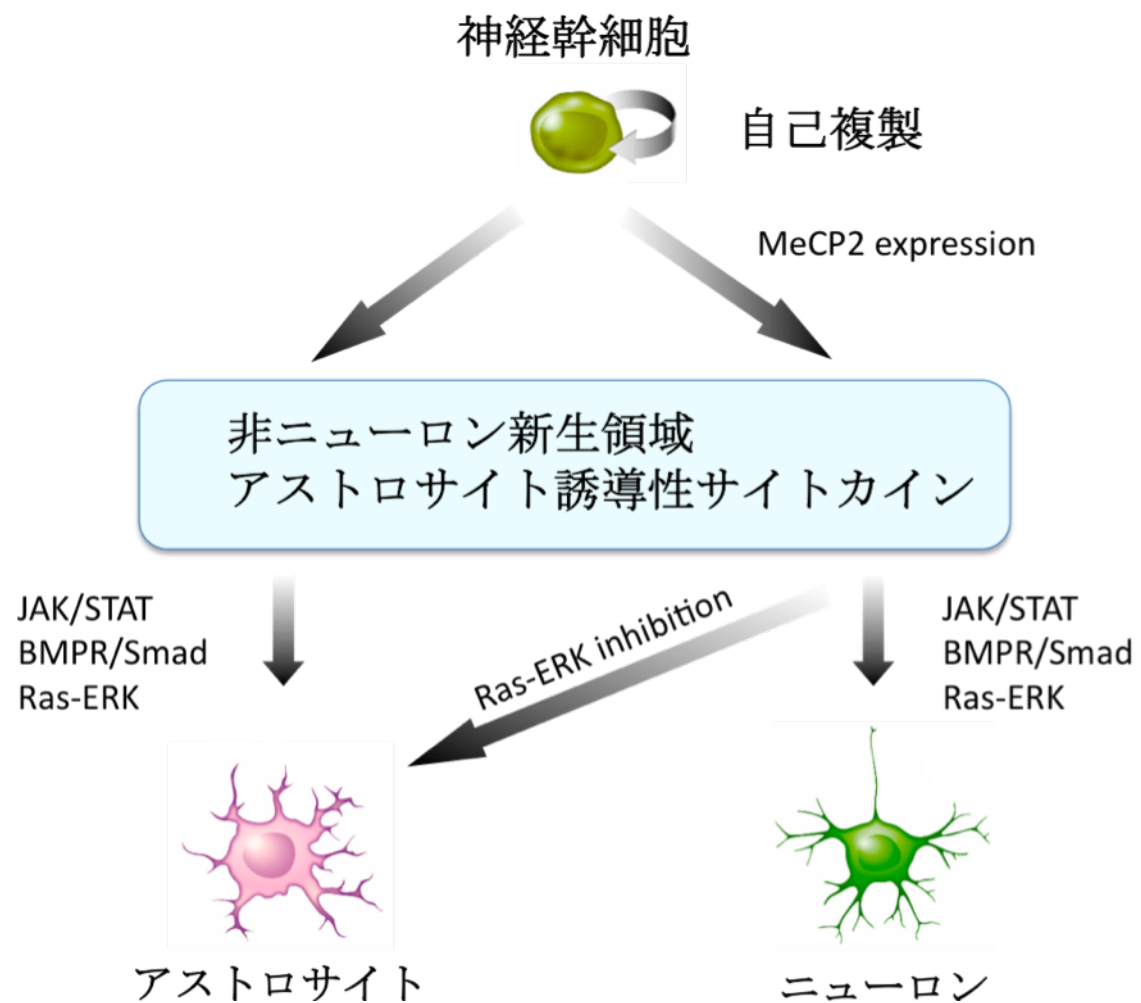


図 17. MeCP2 はアストロサイト誘導性条件下においてもニューロン分化を促進する。

通常の神経幹細胞はアストロサイト誘導性サイトカイン条件下や非ニューロン新生領域に移植した場合、アストロサイトへの分化が誘導されるが、神経幹細胞に MeCP2 を発現させると上記のようなアストロサイト誘導性条件下においてもアストロサイト分化が抑制され、かつニューロン分化が促進される。この MeCP2 の作用は Ras-ERK 経路を阻害すると消失する。

謝辞

中島欽一教授には、大変恵まれた研究環境を与えてくださったこと、研究に対する真摯な姿勢や研究の進め方・考え方などを教えていただいたことに感謝を申し上げます。

当研究室の助教である神山淳先生、滝沢琢巳先生、波平昌一先生、研究員の精松昌彦先生には研究方針に関して有益なご助言を数多く頂きました。深く感謝申し上げます。

遺伝子発現調節学講座の別所康全教授と松井貴輝助教には研究進捗会にて様々なアドバイスをいただきました。深く感謝申し上げます。

質量分析に関しては、植物ユニットの深尾陽一郎ユニットリーダー、藤原正幸研究員、倉田理恵技術補佐官に技術的指導やアドバイスをしていただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

Dr. I. Smith には論文校正および有益な助言をしていただきました。御礼申し上げます。

秘書の植田さん、田野さんには書類手続きなどを含めた事務的補助をしていただきました。

最後に、本研究を進めていくにあたり、多大なご協力を頂きました当研究室の皆様はこの場を借りて心より御礼を申し上げます。

参考文献

- Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., and Zoghbi, H.Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23, 185-188.
- Amir, R.E., and Zoghbi, H.Y. (2000). Rett syndrome: methyl-CpG-binding protein 2 mutations and phenotype-genotype correlations. *Am J Med Genet* 97, 147-152.
- Avruch, J. (1998). Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem* 182, 31-48.
- Ballas, N., Liroy, D.T., Grunseich, C., and Mandel, G. (2009). Non-cell autonomous influence of MeCP2-deficient glia on neuronal dendritic morphology. *Nat Neurosci* 12, 311-317.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21.
- Bonni, A., Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Bhatt, A., Frank, D.A., Rozovsky, I., Stahl, N., Yancopoulos, G.D., and Greenberg, M.E. (1997). Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278, 477-483.
- Brami-Cherrier, K., Valjent, E., Herve, D., Darragh, J., Corvol, J.C., Pages, C., Arthur, S.J., Girault, J.A., and Caboche, J. (2005). Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1-deficient mice. *J Neurosci* 25, 11444-11454.
- Cao, Q.L., Zhang, Y.P., Howard, R.M., Walters, W.M., Tsoulfas, P., and Whittemore, S.R. (2001). Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Exp Neurol* 167, 48-58.
- Cerny, J., and Quesenberry, P.J. (2004). Chromatin remodeling and stem cell theory of relativity. *J Cell Physiol* 201, 1-16.
- Chahrour, M., Jung, S.Y., Shaw, C., Zhou, X., Wong, S.T., Qin, J., and Zoghbi, H.Y. (2008). MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 320, 1224-1229.
- Chao, H.T., Zoghbi, H.Y., and Rosenmund, C. (2007). MeCP2 controls excitatory synaptic strength by regulating glutamatergic synapse number. *Neuron* 56, 58-65.
- Chen, R.Z., Akbarian, S., Tudor, M., and Jaenisch, R. (2001). Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet* 27, 327-331.
- Chong, J.A., Tapia-Ramirez, J., Kim, S., Toledo-Aral, J.J., Zheng, Y.,

Boutros, M.C., Altshuller, Y.M., Frohman, M.A., Kraner, S.D., and Mandel, G. (1995). REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell* 80, 949-957.

Colantuoni, C., Jeon, O.H., Hyder, K., Chenchik, A., Khimani, A.H., Narayanan, V., Hoffman, E.P., Kaufmann, W.E., Naidu, S., and Pevsner, J. (2001). Gene expression profiling in postmortem Rett Syndrome brain: differential gene expression and patient classification. *Neurobiol Dis* 8, 847-865.

Collins, A.L., Levenson, J.M., Vilaythong, A.P., Richman, R., Armstrong, D.L., Noebels, J.L., David Sweatt, J., and Zoghbi, H.Y. (2004). Mild overexpression of MeCP2 causes a progressive neurological disorder in mice. *Hum Mol Genet* 13, 2679-2689.

Conti, L., Pollard, S.M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q.L., Cattaneo, E., *et al.* (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* 3, e283.

Edlund, T., and Jessell, T.M. (1999). Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 96, 211-224.

Fan, G., Martinowich, K., Chin, M.H., He, F., Fouse, S.D., Hutnick, L., Hattori, D., Ge, W., Shen, Y., Wu, H., *et al.* (2005). DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development* 132, 3345-3356.

Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., *et al.* (2007). DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol* 9, 604-611.

Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.

Gomes, W.A., Mehler, M.F., and Kessler, J.A. (2003). Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment. *Dev Biol* 255, 164-177.

Gross, R.E., Mehler, M.F., Mabie, P.C., Zang, Z., Santschi, L., and Kessler, J.A. (1996). Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* 17, 595-606.

Hendrich, B., and Bird, A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18, 6538-6547.

Hofstetter, C.P., Holmstrom, N.A., Lilja, J.A., Schweinhardt, P., Hao, J., Spenger, C., Wiesenfeld-Hallin, Z., Kurpad, S.N., Frisen, J., and Olson,

- L. (2005). Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nat Neurosci* *8*, 346-353.
- Horike, S., Cai, S., Miyano, M., Cheng, J.F., and Kohwi-Shigematsu, T. (2005). Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet* *37*, 31-40.
- Hsieh, J., and Gage, F.H. (2004). Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev* *14*, 461-469.
- Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., and Frisen, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* *96*, 25-34.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A.P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* *19*, 187-191.
- Jung, B.P., Zhang, G., Ho, W., Francis, J., and Eubanks, J.H. (2002). Transient forebrain ischemia alters the mRNA expression of methyl DNA-binding factors in the adult rat hippocampus. *Neuroscience* *115*, 515-524.
- Kishi, N., and Macklis, J.D. (2004). MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol Cell Neurosci* *27*, 306-321.
- Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* *31*, 89-97.
- Kohyama, J., Kojima, T., Takatsuka, E., Yamashita, T., Namiki, J., Hsieh, J., Gage, F.H., Namiyama, M., Okano, H., Sawamoto, K., *et al.* (2008). Epigenetic regulation of neural cell differentiation plasticity in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 18012-18017.
- Kouhara, H., Hadari, Y.R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* *89*, 693-702.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., and Gage, F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* *16*, 2027-2033.
- Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* *28*, 713-726.
- Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and

glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 2074-2077.

Meehan, R.R., Lewis, J.D., and Bird, A.P. (1992). Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res* *20*, 5085-5092.

Menard, C., Hein, P., Paquin, A., Savelson, A., Yang, X.M., Lederfein, D., Barnabe-Heider, F., Mir, A.A., Sterneck, E., Peterson, A.C., *et al.* (2002). An essential role for a MEK-C/EBP pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis. *Neuron* *36*, 597-610.

Miquelajauregui, A., Van de Putte, T., Polyakov, A., Nityanandam, A., Boppana, S., Seuntjens, E., Karabinos, A., Higashi, Y., Huylebroeck, D., and Tarabykin, V. (2007). Smad-interacting protein-1 (Zfhx1b) acts upstream of Wnt signaling in the mouse hippocampus and controls its formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 12919-12924.

Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* *7*, 1063-1066.

Nakamura, M., Houghtling, R.A., MacArthur, L., Bayer, B.M., and Bregman, B.S. (2003). Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord. *Exp Neurol* *184*, 313-325.

Nakashima, K., Takizawa, T., Ochiai, W., Yanagisawa, M., Hisatsune, T., Nakafuku, M., Miyazono, K., Kishimoto, T., Kageyama, R., and Taga, T. (2001). BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 5868-5873.

Nakashima, K., Wiese, S., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., Sendtner, M., and Taga, T. (1999a). Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J Neurosci* *19*, 5429-5434.

Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., and Taga, T. (1999b). Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* *284*, 479-482.

Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Sanosaka, T., Deneen, B., Taga, T., and Nakashima, K. (2009). Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Dev Cell* *16*, 245-255.

Namihira, M., Nakashima, K., and Taga, T. (2004). Developmental stage dependent regulation of DNA methylation and chromatin modification in a immature astrocyte specific gene promoter. *FEBS Lett* *572*, 184-188.

Namiki, J., and Tator, C.H. (1999). Cell proliferation and nestin expression in the ependyma of the adult rat spinal cord after injury. *J Neuropathol Exp Neurol* *58*, 489-498.

Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389.

Ogawa, Y., Sawamoto, K., Miyata, T., Miyao, S., Watanabe, M., Nakamura, M., Bregman, B.S., Koike, M., Uchiyama, Y., Toyama, Y., *et al.* (2002). Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J Neurosci Res* 69, 925-933.

Paquin, A., Barnabe-Heider, F., Kageyama, R., and Miller, F.D. (2005). CCAAT/enhancer-binding protein phosphorylation biases cortical precursors to generate neurons rather than astrocytes in vivo. *J Neurosci* 25, 10747-10758.

Pollard, S.M., Conti, L., Sun, Y., Goffredo, D., and Smith, A. (2006). Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1, i112-120.

Qian, X., Shen, Q., Goderie, S.K., He, W., Capela, A., Davis, A.A., and Temple, S. (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron* 28, 69-80.

Rajan, P., and McKay, R.D. (1998). Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* 18, 3620-3629.

Schoenherr, C.J., and Anderson, D.J. (1995). The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science* 267, 1360-1363.

Setoguchi, H., Namihira, M., Kohyama, J., Asano, H., Sanosaka, T., and Nakashima, K. (2006). Methyl-CpG binding proteins are involved in restricting differentiation plasticity in neurons. *J Neurosci Res* 84, 969-979.

Setoguchi, T., Nakashima, K., Takizawa, T., Yanagisawa, M., Ochiai, W., Okabe, M., Yone, K., Komiya, S., and Taga, T. (2004). Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Exp Neurol* 189, 33-44.

Shahbazian, M.D., Antalffy, B., Armstrong, D.L., and Zoghbi, H.Y. (2002). Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet* 11, 115-124.

Stancheva, I., Collins, A.L., Van den Veyver, I.B., Zoghbi, H., and Meehan, R.R. (2003). A mutant form of MeCP2 protein associated with human Rett syndrome cannot be displaced from methylated DNA by notch in *Xenopus* embryos.

Mol Cell 12, 425–435.

Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M.Z., Zubiaga, A., Hua, X., Fan, G., and Greenberg, M.E. (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104, 365–376.

Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 460, 529–533.

Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa, M., Fujita, N., Nakao, M., and Taga, T. (2001). DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* 1, 749–758.

Van den Veyver, I.B., and Zoghbi, H.Y. (2000). Methyl-CpG-binding protein 2 mutations in Rett syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 10, 275–279.

Verschueren, K., Remacle, J.E., Collart, C., Kraft, H., Baker, B.S., Tylzanowski, P., Nelles, L., Wuytens, G., Su, M.T., Bodmer, R., *et al.* (1999). SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. *J Biol Chem* 274, 20489–20498.

Vroemen, M., Aigner, L., Winkler, J., and Weidner, N. (2003). Adult neural progenitor cell grafts survive after acute spinal cord injury and integrate along axonal pathways. *Eur J Neurosci* 18, 743–751.

Wakamatsu, N., Yamada, Y., Yamada, K., Ono, T., Nomura, N., Taniguchi, H., Kitoh, H., Mutoh, N., Yamanaka, T., Mushiake, K., *et al.* (2001). Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat Genet* 27, 369–370.

Watt, F., and Molloy, P.L. (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* 2, 1136–1143.

Young, J.I., Hong, E.P., Castle, J.C., Crespo-Barreto, J., Bowman, A.B., Rose, M.F., Kang, D., Richman, R., Johnson, J.M., Berget, S., *et al.* (2005). Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17551–17558.

Zhou, Z., Hong, E.J., Cohen, S., Zhao, W.N., Ho, H.Y., Schmidt, L., Chen, W.G., Lin, Y., Savner, E., Griffith, E.C., *et al.* (2006). Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron* 52, 255–269.