

論文内容の要旨

申請者氏名 蟬 克憲

中枢神経系の細胞種は共通の神経幹細胞から産生されるが、各々の細胞種への分化には DNA のメチル化、ヒストン修飾に代表されるエピジェネティクスと呼ばれる遺伝子発現制御機構が密接に関与している。申請者は共同研究者とともに、胎生中期から後期にかけてアストロサイト特異的遺伝子プロモーター領域に誘導される DNA 脱メチル化に着目し、その誘導機構について検討を行った。その結果、胎生中期に産生されるニューロンが神経幹細胞の Notch シグナルの活性化することで、アストロサイト特異的遺伝子 *Gfap* のプロモーター領域の DNA 脱メチル化が誘導されることが明らかとなった。また、DNA 脱メチル化を誘導する因子として、Notch シグナルの下流で発現が誘導される転写因子 *Nfia* が同定された。クロマチン免疫沈降法により、NFIA が *Gfap* 遺伝子のプロモーター領域に結合すること、DNA 脱メチル化が誘導されることをクロマチン免疫沈降法、及び Bisulfite sequence 法による DNA メチル化解析により示した。次に申請者は、*Nfia* 遺伝子欠損マウス由来神経幹細胞の長期培養の結果、野生型神経幹細胞と同様にアストロサイト分化能の獲得が誘導されることから、*Nfia* 遺伝子欠損マウス由来神経幹細胞ではアストロサイト分化が遅延していることを示した。また、NFIA と同じ NFI ファミリー転写因子である NFIB の強制発現により、アストロサイト分化能の獲得が誘導されることを示した。続いて、NFIA の誘導する DNA 脱メチル化と、オリゴデンドロサイト分化との関連性について検討を行った。転写因子 *Olig1* は、*Gfap* 遺伝子と同様に胎生中期から後期にかけてプロモーター領域に脱メチル化が誘導される。胎生中期神経幹細胞に対する NFIA の強制発現により *Olig1* 遺伝子プロモーター上に早期の DNA 脱メチル化が誘導されることが示された。さらに、*Nfia* 遺伝子欠損マウスの解析から、アストロサイト分化と同様に、オリゴデンドロサイトの成熟遅延が観察されたことから、この遅延の原因が *Olig1* 遺伝子の発現低下によるものである可能性が示唆された。続いて、*Olig1* 遺伝子プロモーター領域の機能解析を行った結果、DNA 脱メチル化領域がプロモーター活性を亢進すること、DNA メチル化によりプロモーター活性の亢進が阻害されることが明らかとなった。また、アセチル化ヒストン H3 (H3K27ac) の ChIP-seq データから、発生期の進行に伴って、DNA 脱メチル化領域に H3K27ac のピークが観察された。これらの結果は、*Olig1* 遺伝子プロモーター上の DNA メチル化領域が DNA 脱メチル化を受けた結果、プロモーター活性を亢進するエンハンサーとして機能し、*Olig1* 遺伝子プロモーターの活性化を誘導していると考えられる。

以上の点から、NFIA は胎生中期神経幹細胞において DNA 脱メチル化を誘導することにより、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトの分化、成熟の時期を制御していることが示された。これらの結果は、DNA メチル化が発生過程における神経系細胞種の分化時期を規定する主要制御因子であることを示唆している。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 蟬 克憲

哺乳類の中樞神経系を構成するニューロンとグリア細胞（アストロサイトとオリゴデンドロサイト）は発生過程において共通の神経幹細胞から産生される。しかし、神経幹細胞は胎生中期には主にニューロンを産生し、アストロサイトとオリゴデンドロサイトは胎生後期以降に産生する。申請者は、エピジェネティクス機構の一つである DNA メチル化に着目し、この発生段階依存的な神経幹細胞のグリア細胞産生機構の解明に取り組んだ。

申請者は共同研究者とともに、胎生中期の脳内で先に産生されたニューロンが、残存する神経幹細胞の Notch シグナルを活性化し、その活性化が神経幹細胞のアストロサイト特異的発現遺伝子 *Gfap* の転写調節領域の脱メチル化を誘導することを見出した。また、DNA 脱メチル化を促す因子として転写因子 *Nfia* を見出し、Notch シグナルの活性化に伴って発現上昇した *Nfia* が、*Gfap* の転写調節領域に結合し、DNA メチル化酵素 DNMT1 の結合を阻害することで DNA 脱メチル化を誘導するということも明らかにした。一方で申請者は、*Nfia* が欠損したマウスから得られた神経幹細胞を長期培養することで、*Gfap* の転写調節領域の脱メチル化が誘導されるとともに、アストロサイト分化能を獲得できること発見した。加えて、NFI ファミリー転写因子の一つである NFIB の強制発現によっても、本来アストロサイト分化能を有していない胎生中期神経幹細胞が、サイトカイン刺激に応じてアストロサイトへと分化可能になることを突き止めた。これらの結果は、神経幹細胞におけるアストロサイト特異的発現遺伝子の発生段階依存的な DNA 脱メチル化が、NFI ファミリーによって厳密に制御されていることを示している。

更に申請者は、*Nfia* ノックアウトマウスの生後の脳内においては、オリゴデンドロサイトの分化も遅延していることを見出した。神経幹細胞のオリゴデンドロサイトの分化には、転写因子 *Olig1* と *Olig2* の発現が必須である。また、特に *Olig1* の転写調節領域は、*Gfap* と同様に、発生段階依存的に脱メチル化されることが知られている。申請者は、NFIA の胎生中期神経幹細胞への強制発現が、*Olig1* の脱メチル化を促進することも突き止めた。また、この脱メチル化される領域が、*Olig1* の発現に重要であることも明らかにしている。これらの結果は、神経幹細胞のオリゴデンドロサイトの産生についても、領域特異的な DNA 脱メチル化によって調整されていることを示している。さらに、その脱メチル化には NFI ファミリーが重要な役割を担っていることを示唆している。

以上のように、本論文は、哺乳類の神経幹細胞の発生段階依存的な多分化能獲得機構について、新規の分子基盤を明示したものである。さらに、未だ明らかにされていない、発生の進行に伴う領域特異的な DNA メチル化機構についても、その分子基盤解明に重要な示唆を与えるもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。