

論文内容の要旨

申請者氏名 裏山 悟司

ほ乳類の脳・神経系を構成するニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトは、共通の神経幹細胞から分化・産生されるが、神経幹細胞の各細胞種への分化能獲得は、時空間的に厳密に制御されていることが知られている。神経幹細胞のアストロサイト分化においては、転写因子 **STAT3** の活性化と、DNA のメチル化といったエピジェネティックなゲノム修飾が重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、このアストロサイト分化における、神経幹細胞の発生段階依存的な DNA のメチル化制御機構については、未だ不明な部分が多い。

そこで申請者は、アストロサイト特異的遺伝子 *Gfap* の発現機構を解析するために、*Gfap* 遺伝子の発現が報告されていない ES 細胞において、*Gfap* 遺伝子の異所的な発現誘導を試みた。具体的には、①DNA のメチル化酵素をコードする主要遺伝子を欠損した ES 細胞 (TKO ESCs)、②ヒストン H3 の 9 番目のリシン残基のジメチル化 (H3K9me2) 修飾を触媒する責任酵素をコードする遺伝子を欠損した ES 細胞 (G9a KO ESCs)、③27 番目のリシン残基のトリメチル化 (H3K27me3) 修飾を触媒する酵素複合体の構成因子の発現量を低下させることができる ES 細胞 (Eed cKO ESCs) を使用した。さらに、③における解析結果から、Eed cKO ESCs で H3K27me3 の修飾を低下させた時に、*Gfap* 遺伝子プロモーター近傍の H3K9me2 の修飾レベルが低いことがわかったため、この細胞を 5-aza-dC で処理することにより、ゲノム全体での DNA の脱メチル化を行った。すなわち、④DNA の脱メチル化と抑制性のヒストンのメチル化修飾を低下させた。しかし、①～④の全ての場合において、ES 細胞では、*Gfap* 遺伝子の発現を誘導することはできず、このことは何らかの未知の機構が *Gfap* 遺伝子の発現抑制に作用していることを示唆している。

次に、ES 細胞に加え、LIF 依存的に *Gfap* 遺伝子を発現することができない神経系の細胞 (胎生中期神経幹細胞、ニューロン)、LIF 依存的に *Gfap* 遺伝子を発現することが出来る細胞 (胎生後期神経幹細胞、アストロサイト) において、マイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) を用いて、GSBS 近傍の **STAT3** 結合配列におけるクロマチンアクセシビリティの解析を行った。その結果、*Gfap* 遺伝子を発現できる能力を持った細胞群は、持っていない細胞群と比較して、*Gfap* 遺伝子の **STAT3** 結合配列近傍におけるクロマチンアクセシビリティが増加していることが示された。また、*in vitro* において胎生中期の神経幹細胞の長期培養実験を行った結果から、このクロマチンアクセシビリティの変化が、*Gfap* 遺伝子の発現に密接に関与していることがわかった。さらに、このクロマチンアクセシビリティの変化は、胎生中期から胎生後期へと発生が進む過程において、DNA の脱メチル化を促進する作用を持つ転写因子 **NF-1A** によって、亢進されることがわかった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 裏山 悟司

神経幹細胞は自己複製能を持つとともに、脳・神経系を構成する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分化能を持った細胞である。この神経幹細胞の各種細胞への分化制御は、細胞外因子や DNA のメチル化といった細胞内在性のプログラムによって厳密に制御されている。上記の3細胞種のうち、神経幹細胞からアストロサイトへの分化制御機構は、アストロサイト特異的遺伝子 *Gfap* の発現制御機構の研究を通して明らかにされて来た。しかしながら、その全容は明らかになっていない。そこで申請者らは、①エピジェネティクス修飾を変異させた ES 細胞を用いた解析、および②マイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) を用いたクロマチンアクセシビリティーの解析を行うことにより、*Gfap* 遺伝子の新規発現抑制機構の探索を行った。

①エピジェネティクス修飾を変異させた ES 細胞を用いた解析：*Gfap* 遺伝子プロモーター上の DNA のメチル化を除去した ES 細胞、及び抑制性ヒストンのメチル化を除去した ES 細胞、そして両者の修飾を除去した ES 細胞において、*Gfap* 遺伝子を異所的に発現させることを試みた。このことにより、*Gfap* 遺伝子を誘導することができれば、その修飾が *Gfap* 遺伝子の発現制御機構に重要な役割を果たしていることを示唆することになる。しかしながら、それらの ES 細胞において、*Gfap* 遺伝子の発現を誘導することはできなかった。

② マイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) を用いたクロマチンアクセシビリティーの解析：LIF 依存的に *Gfap* 遺伝子の発現可能な細胞、および不可能な細胞において、転写因子が標的配列にアクセスできるかどうか (クロマチンアクセシビリティー) の解析を行った。その結果、*Gfap* 遺伝子の発現と相関して、*Gfap* 遺伝子プロモーター中の STAT3 結合配列近傍のクロマチンアクセシビリティーが変動することを示した。また、このクロマチンアクセシビリティーの変化は NF-1A によって亢進することが示された。

以上のように、本論文は *Gfap* 遺伝子の発現制御機構における DNA のメチル化、及びヒストンのメチル化修飾について、また神経幹細胞のアストロサイト分化制御機構におけるクロマチンアクセシビリティーの関与について考察を行ったもので、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。