

ヒストンユビキチンリガーゼ *Bre1* による 神経幹細胞の増殖・分化の制御

滋賀医科大学 生理学講座 統合臓器生理学部門
等 誠司

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

成体脳にも多分化能と自己複製能を併せ持った神経幹細胞が存在し、生涯に亘って嗅球や海馬に新生神経細胞を供給することが知られ、嗅覚やある種の記憶の形成・消去に関与するとされている。海馬における神経細胞新生は変化に富む環境での飼育や学習によって増加し、一方ストレス環境下では減少することから、神経幹細胞—神経細胞新生システムと気分(障害)との関係が示唆される。本研究者は、神経幹細胞に直接的に作用する薬物を探索する目的で、精神神経疾患の治療薬をスクリーニングし、双極性気分障害の治療に用いられる気分安定薬が、神経幹細胞の自己複製能を亢進させることを見出した。気分安定薬が髄液中治療域の濃度でNotchシグナルを活性化することは既に報告したが(Higashi et al., *Stem Cells*, 2008)、その際気分安定薬の直接の標的分子/遺伝子は不明である。これまでに、気分安定薬を添加して培養した神経幹細胞のマイクロアレイ解析などから、薬物添加によって発現低下する遺伝子として*Bre1* (もしくは*Ring finger protein 20*)を同定した。

*Bre1*はC端にring finger domainをもち、ヒストンH2BのE3ユビキチンリガーゼだと考えられている。ヒストンH2Bがモノユビキチン化されると、ヒストンH3の4番目リジン残基のトリメチル化を誘導し、遺伝子発現に対して促進的に働くと言われている(Wood et al., *Mol Cell*, 2003; Hwang et al., *Mol Cell*, 2003; Kim et al., *Cell*, 2009)。また、*Drosophila*において、*Bre1*がNotchシグナルを修飾する可能性が指摘されているが(Bray et al., *Dev Cell*, 2005)、詳細な機能はわかっていない。そこで本研究は、*Bre1*の過剰発現や機能喪失の表現型を解析することにより、中枢神経の発生過程や成体脳での神経幹細胞—神経細胞新生システムにおける*Bre1*の機能を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

神経幹細胞の培養には、Neurosphere assayを用いた(Renynolds et al., *J Neurosci*, 1992)。これは、神経幹細胞が fibroblast growth factor-2 (FGF2)や epidermal growth factor (EGF)に反応して無血清培地中で活発に増殖し、約1週間で直径0.1~0.2 mmの浮遊細胞塊(neurosphere)を形成することを利用した培養法である。*Bre1* 遺伝子のノックダウンには、coding region内のstopコドン周辺配列もしくは3' UTRの配列に対するshRNAを用いた。Neurosphereに対してはレンチウイルスを用いてshRNAを導入し、子宮内エレクトロポレーション法では発現ベクターを用いた。

Bre1 遺伝子の遺伝子改変マウスを作製した。機能喪失については、Splicing acceptorによって正常なsplicingを阻害するトラップカセットが*Bre1* 遺伝子の1stイントロンに挿入されたES細胞を用い、常法に従ってノックアウトマウスを得た。機能獲得については、神経幹/前駆細胞で発現するNestin promoter/enhancerの制御下で*Bre1* 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを作製した。

3. 結果 研究成果

Bre1 遺伝子は、胎仔脳および成体脳で神経幹細胞が存在する脳室周囲組織に強く発現していた。また、神経幹細胞と、それより分化の進んだ神経前駆細胞との混合体であるneurosphere内でも発現していることから、神経幹/前駆細胞で何らかの役割を担っていることが予想される。レンチウイルスを用いてneurosphere細胞で*Bre1* 遺伝子をノックダウンしたところ、予想通り*Bre1* タンパク質の発現の減少が確認された。*Bre1* 遺伝子をノックダウンした細胞の増殖は遅延

し、neurosphere の形成が低下した。一方、神経幹細胞の分化能には影響が見られなかった。

脳の発生に対する *Bre1* 遺伝子の機能を *in vivo* で調べるため、*Bre1* 遺伝子 shRNA を U6 プロモーターの発現ベクターにクローニングした。3種類の *Bre1* shRNA 発現ベクターを子宮内エレクトロポレーション法によって胎生 13.5 日目の胎仔大脳皮質に導入した。プラスミドは ventricular zone (VZ) に存在する神経幹/前駆細胞に導入され、24 時間後には subventricular zone (SVZ) まで、72 時間後には cortical plate (CP) まで放射状に細胞が移動する。エレクトロポレーション 24 時間後に、*Bre1* shRNA 発現ベクターを導入した大脳皮質では、VZ のマーカーである Pax6 陽性細胞が増加し、SVZ のマーカーである Tbr2 陽性細胞が減少していた。さらに 72 時間後では、コントロール群では細胞が CP の最外層まで移動していたのに対し、*Bre1* shRNA 群では細胞の移動が阻害されていた。これらの結果は、*Bre1* 遺伝子のノックダウンによって神経幹/前駆細胞の分化が抑制され、放射状に移動しながら神経細胞へと分化する過程が障害されていると考えられた。

市販のトラップライン ES 細胞を用いて *Bre1* 遺伝子のノックアウトマウスを作製した。ES 細胞を blastocyst に注入することによって得られたキメラマウス、および継代して得られた *Bre1* 遺伝子ヘテロノックアウトマウスは正常に出生し、明らかな異常なく成長した。ヘテロノックアウトマウス同士の交配では、*Bre1* ホモノックアウトマウスの産仔は得られず、また胎仔の解析でも胎生 5.5 日以降にホモノックアウトマウスは回収されなかった。*Bre1* はヒストン H2B の E3 ユビキチンリガーゼとして細胞の複製などに重要な働きを担っていることから、*Bre1* ホモノックアウトマウスは非常に早期の段階で致死となっていると考えられた。さらに解析を進めたところ、胎生 3.5 日の blastocyst stage までは発生することが判明したので、*Bre1*^{-/-} blastocyst より ES 細胞の樹立を試みた。*Bre1* ヘテロノックアウトマウス同士の交配で約 50 個の blastocyst から ES 細胞樹立を試み、2 ラインの ES 細胞が樹立できた。しかし、これら *Bre1*^{-/-} ES 細胞およびコントロール ES 細胞で *Bre1* の発現をみたところ、*Bre1*^{-/-} ES 細胞においても野生型の約 20-30% の *Bre1* タンパク質発現が確認された。これはトラップカセットのリークによるものと考えられ、*Bre1* タンパク質が全く発現しない ES 細胞は増殖しないために樹立できないことが推測された。

樹立できた *Bre1*^{-/-} ES 細胞を用いて増殖のキネティクスを解析したところ、野生型の約 10% まで増殖速度が低下していた。興味深いことに、*Bre1*^{+/-} ES 細胞の増殖速度も野生型と比べて約 50% まで低下しており、gene dosage effect があると考えられた。*Bre1* 遺伝子ノックアウトの効果を *in vivo* で解析することはできなかったため、これら *Bre1* ホモ/ヘテロノックアウト ES 細胞を用いて、神経系への分化や神経幹細胞の誘導への影響を今後解析していく必要がある。

Nestin promoter/enhancer-*Bre1* トランスジェニックマウスは正常に出生し、中枢神経系に明らかな異常を呈することなく成長した。トランスジェニックマウス胎仔や成体の神経幹細胞についてもこれまでのところ異常は観察されていない。しかしながら、交配効率が非常に悪く、また仔を出産してもしばしば食殺することから、哺育行動に問題がある可能性がある。これまで繁殖が悪いために行動解析ができていないが、今後の課題である。

4. 考察 まとめ

神経幹細胞の増殖・維持・分化には多岐にわたる因子/遺伝子がかかわっている。例えば、Notch シグナルの活性化が、自己複製能の亢進を介して神経幹細胞の維持に重要であることを、本研究者らは明らかにしてきた(Hitoshi et al., Genes & Dev, 2002)。神経幹細胞自身が活発に増殖しつつ、大量の神経細胞と次いでグリア細胞を産生する胎仔期から、静的な状態を保ちつつも絶えず新生神経細胞を供給している成体脳神経幹細胞へ移行していく過程も、多くの内的外的因子によって複雑に制御されている。近年、このような神経幹細胞の動態制御に関して、その分子機構の理解が急速に進んでいるものの、未だ不十分な部分が多々残されている。中でも未解明な点が多いのが、エピジェネティクス機構による遺伝子発現制御を介した動態制御である。エピジェネティクス機構には、遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化やヒストンのアセチル化/メチル化が知られている。神経幹細胞の発生過程(Hitoshi et al., Nat Neurosci, 2011)や、神経幹細胞から分化していく細胞群の運命決定の変化(Namihira et al., Dev Cell, 2009; Hirabayashi et al., Neuron, 2009)、成体脳での神経細胞新生(Ma et al., Science, 2009)などにもエピジェネティクス機構の関与が指摘されている。

本研究が対象とした *Bre1* もエピジェネティクス機構の一翼を担う因子であり、ヒストン H2B

のモノユビキチン化を介してヒストンH3リジン残基のメチル化を促進し(Wood et al., Mol Cell, 2003; Hwang et al., Mol Cell, 2003; Kim et al., Cell, 2009)、oncogenesやtumor suppressor genesの転写を制御することが報告されている(Shema et al., Genes Dev, 2008)。また、前述のように*Drosophila*ではBre1がNotchシグナルを修飾し、幹細胞の自己複製能を調節している可能性が指摘されている(Bray et al., Dev Cell, 2005)。しかし、これまでのBre1研究のほとんどは酵母もしくは培養細胞を用いて行われており、*Drosophila*を用いた幾つかの報告を除けば、(単細胞ではない) 個体発生や臓器形成における役割についてはほとんど調べられておらず、Bre1の機能喪失実験については全く報告がない。本研究は未だ不完全ながらも、胎仔期の神経幹/前駆細胞の増殖や移動におけるBre1の役割を明らかにし、他のエピジェネティクス機構による神経幹細胞の動態制御の中でのBre1の位置づけを解明しつつある。今後、Bre1遺伝子改変マウスの詳細な解析によって、新たなエピジェネティクス機構の関与を明らかにすることができると期待される。

5. 発表論文、参考文献

- Bray S, Musisi H, Bienz M. (2005) Bre1 is required for Notch signaling and histone modification. **Dev Cell** 8, 279–286
- Higashi M, Maruta N, Bernstein A, Ikenaka K, Hitoshi S. (2008) Mood stabilizing drugs expand the neural stem cell pool in the adult brain through activation of Notch signaling. **Stem Cells** 26, 1758–1767
- Hirabayashi Y, Suzuki N, Tsuboi M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J, Koseki H, Vidal M, Gotoh Y. (2009) Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. **Neuron** 63, 600–613
- Hitoshi S, Alexon T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, Conlon RA, Mak TW, Bernstein A, van der Kooy D. (2002) Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not for the generation, of mammalian neural stem cells. **Genes Dev** 16, 846–858
- Hitoshi S, Kumar A, Ishino Y, Tanaka K F, Bernstein A, Kondo T, Kato S, Hosoya T, Hotta Y, Ikenaka K. (2011) Mammalian *Gcm* genes induce *Hes5* expression by active DNA demethylation and induce neural stem cell generation. **Nat Neurosci** 14, 957–964
- Hwang W, Venkatasubrahmantam S, Ianculescu AG, Tong A, Boone C, Madhani HD. (2003) A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. **Mol Cell** 11, 261–266
- Kim J, Guermah M, McGinty RK, Lee J-S, Tang Z, Milne TA, Shilatifard A, Muir TW, Roeder RG. (2009) RAD6-mediated transcription-coupled H2B ubiquitylation directly stimulates H3K4 methylation in human cells. **Cell** 137, 459–471
- Ma DK, Jang MH, Guo JU, Kitabatake Y, Chang ML, Pow-Anpongkul N, Flavell RA, Lu B, Ming GL, Song H. (2009) Neuronal activity-induced Gadd45b promotes epigenetic DNA demethylation and adult neurogenesis. **Science** 323, 1074–1077
- Namihira M, Kohyama J, Semi K, Sanosaka T, Deneen B, Taga T, Nakashima K. (2009) Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. **Dev Cell** 16, 245–255
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss, S. (1992) A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. **J Neurosci** 12, 4565–4574
- Shema E, Tirosh I, Aylon Y, Huang J, Ye C, Moskovits N, Raver-Shapira N, Minsky N, Pirngruber J, Tarcic G, Hublarova P, Moyal L, Gana-Weisz M, Shiloh Y, Yarden Y, Johnsen SA, Vojtesek B, Berger SL, Oren M. (2008) The histone H2B-specific ubiquitin ligase RNF20/hBRE1 acts as a putative tumor suppressor through selective regulation of gene expression. **Genes Dev** 22, 2664–2676
- Wood A, Krogan NJ, Dover J, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Golshani A, Zhang Y, Greenblatt JF, Johnston M, Shilatifard A. (2003) Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. **Mol Cell** 11, 267–274