

PR ドメインタンパク質が発生期大脳皮質における多極性形態期の調節に果たす役割

井上 真悠子

目次

	ページ
論文要旨	3
略号	5
第一章 序論	6
1. はじめに	6
1-1. 大脳皮質の神経発生とその制御機構について	6
1-2. PR ドメインタンパク質ファミリーの生理機能	11
1-3. 発生期大脳皮質における多段階の分化過程の制御	16
1-4. PR ドメインタンパク質と神経発生	18
1-5. 本研究の目的	20
図 1-1~1-5	21
第二章 実験手法	25
図 2	37
第三章 結果	38
3-1. Prdm8 は発生期大脳皮質において、中間帯の限られた領域で特異的に発現する	38
3-2. Prdm8 は多極性形態期を調節する	40
3-3. Prdm8 は大脳皮質の層形成を調節する	42
3-4. Prdm8 による多極性形態期の調節と関連分子の同定	43

3-5. <i>Prdm8</i> 完全ノックアウトマウスの作製	45
3-6. <i>Prdm8</i> ノックアウトマウスの表現型解析	46
図 3-1~3-18	47
表 1	65
第四章 考察	66
4-1. <i>Prdm8</i> の発生期大脳皮質における役割について	66
4-2. 複数の PR ドメインタンパク質による多極性形態期の統括的な制御機構	72
4-3. 本研究のまとめと今後の展望	73
図 4	75
引用文献	76
謝辞	90

要旨

思考や行動様式などの高次機能を担う大脳皮質は、秩序だった細胞同士の接続を介して神経回路網を構築し、多彩な機能の発現を可能にしている。この大脳皮質を構成するニューロンは、脳室側に存在する神経前駆細胞の分裂によって生み出され、生み出された細胞集団の多くは中間帯で一過的な多極性形態を獲得し、その後双極性形態へと再び形態変化して脳表面に向かって移動し、最終分化を遂げる。このように、ニューロンが生み出され、正しい分化・移動過程を経て、機能を発揮すべき最終目的地に正確に到達することは、正常な脳の構築・回路形成・機能発現において最も基盤となる細胞挙動と考えられている。近年、中間帯における多極性形態細胞の分化過程の異常が、神経疾患の発症に深く関わるということが明らかになり、大脳皮質発生過程における中間帯の重要性が注目されている。しかしながら、中間帯における多極性形態期を制御する分子機序の詳細は不明である。

本研究では、発生・分化の重要な制御因子として知られる PR ドメインタンパク質ファミリーの一員であり、発生期のマウス大脳皮質において特徴的な発現パターンを示す *Prdm8* に着目し、*Prdm8* が大脳皮質の分化過程に与える影響を解析することで、未だ未解明な点の多い発生期大脳皮質の多段階の分化過程の詳細に迫ることを目的とした。

免疫組織学的な解析の結果、*Prdm8* が発生期の大脳皮質において、中間帯の限られた領域で特異的に発現することを見出し、多極性形態期との関連性が示唆された。そこで、子宮内エレクトロポレーション法を用いて機能解析したところ、*Prdm8* の過剰発現によって多極性から双極性への形態変化が抑制されることで、多極性形態期が長く維持される一方で、*Prdm8* をノックダウンすると早期に双極性形態に変化したことから、*Prdm8* が多極性形態期の長さを調節することが明らかになった。さらに、*Prdm8* ノックアウトマウスでも、多極性形態期の進行に異常が確認された。また、発生期における *Prdm8* の発現の変化が、生後の大脳皮質の適切な層形成にも影響を及ぼすことが示されたことから、正確な多極性形態期の推移が、後のニューロンの分化運命の獲

得に必要であることが推察された。加えて、*Prdm8*のレポーターマウスを用いた網羅的な発現解析から、*Prdm8*は複数のガイダンス分子を制御することで、これらの多極性形態期の進行を調節している可能性が見出された。

以上の結果から、発生期大脳皮質の多段階の分化過程において、*Prdm8*が多極性形態期の進行を制御する重要分子として機能しているのではないかと結論付けられる。

略号

BAT	brown adipose tissue	褐色脂肪細胞
bHLH	basic helix-loop-helix	塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス
BP	bipolar	双極性
CP	cortical plate	皮質板
CR	Cajal-Retzius	カハールレチウス
GABA	γ -aminobutyric acid	γ -アミノ酪酸
IZ	intermediate zone	中間帯
MGE	medial ganglionic eminence	内側基底核原基
MP	multipolar	多極性
MZ	marginal zone	辺縁帯
NPC	neural progenitor cell	神経前駆細胞
PP	preplate	プレプレート
SP	subplate	サブプレート
SVZ	subventricular zone	脳室下帯
VZ	ventricular zone	脳室帯
WAT	white adipose tissue	白色脂肪細胞

第一章 序論

1. はじめに

思考や行動様式などの高次機能を担う脳は、決まった種類、決まった細胞同士の接続を介して三次元の神経回路網を構築することで、多彩な機能の発現を可能にしている。脳は、情報の伝達に中心的な役割を果たすニューロンと、その働きをサポートするグリア細胞から構成されている。脳の全体的な体積やニューロンの数は、個体間で著しく似通っており、脳の形態のわずかな違い、脳を構成する各種細胞の割合や機能のわずかな変化が、精神発達遅延やてんかんなどの神経疾患を引き起こすと考えられている (Walsh,1999)。したがって、発生期の脳において、神経系前駆細胞の増殖と分化によって、適切なタイミングで適切な数のニューロンやグリア細胞がつくられ、その後それらの細胞が長い距離を移動して、機能を発揮すべき最終目的地に正確に到達することは、正常な脳の構築・回路形成・機能発現において最も基盤となるステップである。このことから、発生期における一連の神経分化過程の制御機構を分子的に明らかにすることは、様々な神経変性疾患の病因の解明に繋がり、更には iPS 細胞を用いた中枢神経細胞への分化誘導技術の開発といった再生医療への応用の観点からも極めて重要であるといえる。

1-1. 大脳皮質の神経発生とその制御機構について

1-1-1. 脳の構造

脳は、終脳 (大脳半球)・間脳・橋・小脳・延髄に区分される (図 1-1A 左)。ニューロンの細胞体が集まる部位を灰白質、軸索が占める部分を白質という。本研究で注目している大脳皮質とは、大脳半球の外側にある神経細胞の密集した灰白色の層を指す。大脳皮質はさらに、①大脳新皮質、②古皮質、③原皮質に区別される (図 1-1A 右)。原皮質には海馬体 (アンモン角 (海馬)・歯状回・海馬台) も含まれる。大脳皮質は、哺乳

類のみが持つ構造であり、知覚・思考・記憶などの高次機能は、大脳皮質において特定の場所に配置された神経細胞が互いにネットワークを作って情報のやり取りを行うことによって実行される。

1-1-2. 大脳皮質の構造とニューロン

大脳皮質ニューロンは介在ニューロンと投射ニューロンの 2 種類に大別される。介在ニューロンは局所回路を形成するのに対し、投射ニューロンは主に遠方へ軸索を投射する。大脳皮質ニューロンの約 80%は投射ニューロンであるが、投射ニューロンはグルタミン酸作動性ニューロンであり、一般的に錐体型をしている。これらの細胞は、大脳皮質背側脳室帯(脳室面)の神経前駆細胞 (Neural Progenitor Cell) から分化し (図 1-1B)、それが脳表面にむかって放射状に移動して、似たような形態・投射先をもつ神経細胞が集まって、秩序だった 6 層の構造を形成している (図 1-1C)。6 層はそれぞれ、(I) 分子層、(II) 外顆粒層、(III) 外錐体細胞層、(IV) 内顆粒層、(V) 神経細胞層 (内錐体細胞層)、(VI) 多型細胞層と呼ばれている。一般的に、大脳皮質の投射ニューロンは局在する層特異的な軸索投射パターンを有している。第 II 層、第 III 層のニューロンは主に、同側もしくは脳梁を介して対側皮質への投射を行う。第 V 層、第 VI 層ならびにサブプレートニューロンは脊髄、橋、中脳、視床などへの皮質外投射を行う。第 I 層、第 IV 層ニューロンは主に同側の第 II、第 III 層への近距離の投射を行うことが知られている (Leone et al., 2008)。このほ乳類に特有な大脳皮質の 6 層構造が乱れると、てんかんや精神遅滞などを伴う重篤な脳疾患を引き起こすことが明らかになっており、脳が正しく機能するためには、適切な層構造の形成が必須になる。

一方で、大脳皮質を構成する残りの 20%のニューロンにあたる介在ニューロンは、 γ -アミノ酪酸(γ -aminobutyric acid; GABA)作動性の抑制性ニューロンである。これらのニューロンは終脳腹側脳室帯の内側基底核原基 (medial ganglionic eminence: MGE) 神

経前駆細胞から分化し、脳表面に対して接線方向に移動して大脳皮質に到達する (Nakajima, 2007)。これらのニューロンは、大脳新皮質のどの層においても満遍なく分布している。

脳が正常に機能するためには、これらの興奮性ニューロンと抑制性ニューロンがバランスよく配置されることがきわめて重要である。これは、抑制性ニューロンは異常な興奮を抑制するという側面（バランスが崩れるとけいれん発作を起こしやすくなる）以外に、ニューロンの同期的な発火の制御 (Synchronization) にも関わっていると考えられているためである。統合失調症などの高次機能が異常になる病態に、抑制性ニューロンの機能低下によるこの興奮/抑制バランスの異常がかかわっている可能性が近年注目されている。

1-1-3. 大脳皮質の発生

発生過程の大脳皮質では、脳室帯 (ventricular zone: VZ) と呼ばれる神経前駆細胞層が脳室に隣接して形成される。発生が進行すると、脳室帯の上層に脳室下帯 (subventricular zone: SVZ) と呼ばれるもう一つの神経前駆細胞層が形成される。E10.5 頃、最初に生み出される post-mitotic なニューロン (すなわち、細胞周期を離れた分化に向かう細胞) が脳室帯より誕生し、プレプレート (preplate: PP) と呼ばれる層構造を形成する。プレプレートは後に基底膜側の辺縁帯 (marginal zone: MZ) と、脳室側のサブプレート (subplate: SP) に分かれる。発生過程で postmitotic ニューロンによって構成される層構造は皮質板 (cortical plate: CP) と呼ばれるが、皮質板は辺縁帯とサブプレートの中に形成され、発生の進行とともに肥厚していく。脳室帯または脳室下帯で誕生したニューロンは、法射方向に移動して皮質板へと侵入し、皮質ニューロンとして配置する。この際、皮質ニューロンの配置には細胞の誕生時期が深く関与しており、早生まれの細胞はより深層 (脳室側) に、遅生まれの細胞はより表層 (基底膜側) に配置

されるという、いわゆる「インサイドアウト」パターンをとる (Angevine and Sidman, 1961) (図 1-2A)。つまり、大脳皮質ニューロンは、概ね第 VI 層→第 V 層→第 IV 層→第 III 層→第 II 層という順番で前駆細胞より分化する (図 1-2B)。ニューロンの産生が終了するころになると、神経前駆細胞はグリア細胞の一種である、アストロサイトやオリゴデンドロサイトの産生を開始するようになる。

大脳皮質ニューロンが脳室帯または脳室下帯から分化することはすでに述べたが、発生がすすむにつれて神経前駆細胞の分化能は、経時的に制限されることが明らかにされている。すなわち、通常大脳皮質深層へと分化する発生初期の神経前駆細胞は多分化能をもち、大脳皮質上層のニューロンへも分化できるのに対し、大脳皮質上層へと分化する発生後期の神経前駆細胞は、より早生まれの深層ニューロンへ分化することができないことが、フェレットを用いた移植実験により明らかにされ (Frantz and McConnell, 1996; Desai and McConnell, 2000)、同様の現象はマウスでも確認されている (Mizutani and Saito, 2005)。このことから、大脳皮質ニューロンの分化には、ニューロンが発生した時期が重要であることは明らかである。一方、同時期に誕生し、同じ環境の下で分化したにもかかわらず、異なる軸索投射を行うニューロンが作りだされることもある (Fishell and Hanashima, 2008)。これは、ニューロンのサブタイプ分化には、時間的制御のみならず、転写因子などの細胞内在性因子による制御が必要であることを示唆している。しかしながら、この細胞内在性因子が如何なる分子機序によって、如何なるサブタイプの決定に関与しているかについて、その詳細は未解明の問題として残されている。

1-1-4. 大脳皮質ニューロンの分化制御とサブタイプの獲得

大脳皮質形成過程では、脳室帯の神経幹細胞からはじめにCajal-Retzius (CR) 細胞がつくられ、CR細胞はその後最表層にとどまって糖タンパク質Reelin等を分泌し、後か

ら生まれる投射ニューロンの移動や層構造の形成を誘導する。ニューロン産生が始まる発生初期（胎齢11日頃）の脳室帯では、神経前駆細胞のCR細胞への分化が抑制（Hanashima et al., 2007; Kumamoto et al., 2013）され、神経前駆細胞は主に非対称分裂をするようになり、一方は神経幹細胞（母細胞）として脳室帯にとどまり、もう一方は脳室帯を離れて分化に向かう（娘細胞）ことで深層（第V・VI層）ニューロンを生み出す。大脳皮質発生中期（胎齢14日頃）以降では、脳室帯を離れた細胞はすぐに分化に向かうのではなく、脳室下帯に入って中間型前駆細胞としてもう一度だけ対称分裂を行い（Molyneaux et al., 2007）、上層ニューロン（第II～IV層）を生み出すようになる（図1-2B）。発生期では、各々の層特異的な発現パターンを示す転写因子が、異なる時期に異なる組み合わせで領域特異的に発現しており、それぞれの発現が皮質板における層構造の構築やニューロンのサブタイプの獲得に関与していることが示唆されている（Guillemot et al., 2006; Braddley et al., 2007）。例えば、大脳皮質発生初期の脳室帯ではFezf2、Otx1、Sox2、Emx2などの複数の転写因子が発現しており、新しく生まれたニューロンを深層ニューロンへの運命をたどる方向に導いている。一方で、発生中期の脳室帯や脳室下帯では、生後II～IV層で発現するCux1、Cux2やSvet1 (non-coding RNA) の発現がみられる。

1-1-5. 深層ニューロンおよび上層ニューロンサブタイプの決定因子

近年の研究で、6層構造を構成する（図2-2C）投射ニューロンのサブタイプを制御する因子として、いくつかの転写因子の存在とそれらの機能が明らかになってきた。Tbr1はpost-mitoticニューロンで発現する転写因子で、第VI層ニューロンとサブプレートに発現する。Tbr1のノックアウトマウスでは、Bcl6やCdh9といった遺伝子の発現減少と共に第VI層ニューロンが顕著に失われ、第V層ニューロンの特性を示す分子マーカ

一である *Bhlhb5* や *Fezf2* の発現が増加する (Bedogni et al., 2010)。 *Ctip2* は第 V 層の皮質外投射ニューロンで強く発現し、ノックアウトマウスの解析より、脊髄への皮質外投射の制御因子であること (Arlotta et al., 2005) が示されている。

第 II～IV 層ニューロンの分化制御因子として、POU ドメイン転写因子 *Brn-1*、*Brn-2* がある。これらの遺伝子は脳皮質発生中期に脳室帯と脳室下帯で発現しはじめ、これらの遺伝子の発現開始が *Ctip2* 陽性の深層ニューロンから *Satb2* 陽性の上層ニューロンへの運命変化のスイッチとなる (Dominguez et al., 2013)。また *Brn-1* と *Brn-2* の二重ノックアウトマウスでは、脳室帯と脳室下帯の増殖に異常がみられ、その結果、上層ニューロンの数が顕著に減少することが報告されている (Sugitani et al., 2002)。他にも、ホメオドメイン遺伝子の *Cux1* と *Cux2* は上層ニューロンを生み出す脳室下帯の神経前駆細胞で発現しており、*Cux2* は脳室下帯における神経前駆細胞の細胞周期の離脱を促進する役割があること、上層ニューロンの神経前駆細胞の数の維持に寄与していることが報告されている (Cubelos et al., 2008)。また、*Cux1* および *Cux2* が、上層ニューロンの適切な突起形成を制御していることも報告されている (Cubelos et al., 2010)。さらに、*Satb2* は第 II～V 層ニューロンで主に発現しており、クロマチンリモデリング因子との相互作用を介して遺伝子発現制御を行う。*Satb2* は *Ctip2* の転写を直接制御することで、皮質内投射から皮質外投射への経路選択に機能することが報告されている (Alcamo et al., 2008; Britanova et al., 2008)。

以上のように、細胞内在性因子によるグルタミン酸作動性のニューロンのサブタイプの細胞運命の決定に関する理解が近年著しく進んでいるが、未解明な点が多いのが現状である。

1-2. PR ドメインタンパク質ファミリーの生理機能

本研究では、上述の脳皮質の発生・分化を制御する新規の分子として、PR ドメイン

タンパク質に注目した。PR ドメインは、既知の 2 つのタンパク質、B 細胞から形質細胞への最終分化に必須な PRDI-BF1 (Positive regulatory domain I-binding factor1) と癌抑制遺伝子 *Rb* のタンパク質に結合する RIZ1 (Retinoblastoma-interacting zinc-finger protein) との間に相同性の高い領域が存在することが明らかとなり、それぞれの遺伝子名をとって名付けられたドメインである (Buyse et al., 1995)。PR ドメインタンパク質をコードする *Prdm* 遺伝子は、マウスでは *Prdm1* から *Prdm16* までが報告されている (図 1-3) (Hohenauer and Moore, 2012; Kinameri et al., 2008)。

1-2-1. PR ドメインタンパク質の分子構造と特徴

PR ドメインファミリータンパク質では共通してアミノ酸末端領域に PR ドメインを持ち、カルボキシ末端領域に DNA 結合ドメインとして知られる C2H2 型のジンクフィンガーモチーフを複数個持つ。PR ドメインはヒストンメチル化酵素ドメインである SET ドメインと 20-30%の相同性をもつことがわかり、新規のヒストンメチル化酵素タンパク質である可能性から注目を集め(Huang et al., 1998)、その後、数多くの機能が報告されている (Hohenauer and Moore, 2012)。

1-2-2. エピジェネティクスと SET ドメインタンパク質

多細胞生物を構成する細胞は、受精卵あるいは幹細胞といった一つの細胞を出発点として、多種多様な細胞が生み出される。このように遺伝的に均一な細胞から、機能的多様性を作り出すために不可欠なのが、エピジェネティックな発現制御機構である。エピジェネティックな制御機構とは、遺伝子の配列に変化を与えずに、特定の遺伝子の発現のオンとオフを切り替えることで遺伝情報の発現を制御する仕組みである。エピジェネティックな変化は細胞分裂後も安定的に維持され、いわば細胞にとって「記憶」の役割を果たす。エピジェネティックな制御機構は、発生期だけではなく、分化した細胞がそ

の性質を生産維持する過程においてもきわめて重要な役割を果たしている。

最もよく知られているエピジェネティックな現象の一つはヒストン修飾である。ヒストンは、ヒストンテールと呼ばれるアミノ酸末端構造に、メチル化、アセチル化、ユビキチン化、リン酸化など、様々な化学修飾を受けることでクロマチンの構造変化を引き起こし、遺伝子の発現を正、あるいは負に制御する。代表的なヒストン修飾の一つであるメチル化に関して、ヒストン H3 の 4 番目のリジン残基のメチル化(H3K4、H3K9、H3K27、H3K36、H3K79、H3K20)が知られているが、これらの修飾はほぼすべて SET [Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax] ドメインをもつタンパク質によって触媒されており (Sims et al., 2003)、この SET ドメインタンパク質が、様々な生命現象において重要な役割を担うことが報告されている (Schneider et al., 2002; Schotta et al., 2004)。

1-2-3. PR ドメインタンパク質ファミリーの分子機能

PR ドメインは SET ドメインと相同性を持つとされており、現在までに RIZ1(ヒト Prdm2)タンパク質が、ヒストン H3K9 メチル化活性をもつこと (Kim et al., 2003)、Meisetz (Meiosis-induced factor containing PR/SET domain and zinc finger motif) (マウス Prdm7/9) がヒストン H3K4 のトリメチル化活性をもつことが報告されている (Hayashi et al., 2005)。Prism (Prdm6) もヒストン H4K20 のメチル化活性を持つことが報告されているが、この活性は PR ドメインを欠いても保持されることが明らかになっている (Wu et al., 2008)。

しかし一方で、SET ドメインタンパク質で高度に保存されている、酵素活性に必須の NHSC モチーフが、PR ドメインタンパク質では保存されていないことから、PR ドメインが SET ドメインとは異なる基質特異性をもつ可能性やメチル化活性をもたない可能性も示唆されている (Kouzarides, 2002)。実際、上記以外の PR ドメインタンパク質は

これまでのところ *in vitro* 解析でヒストンメチル化活性は検出されていない (Hohenauer and Moore., 2012)。しかしながら、PR ドメインタンパク質が、他のヒストン修飾酵素との相互作用を介して遺伝子発現制御を行っているという報告も多く、例えばヒストン H3K9 メチル化酵素 G9a や Suv39H を標的遺伝子座へリクルートし、転写抑制因子として機能していることや、ヒストンアセチル化酵素 p300/CBP や P/CAF をリクルートし、転写を活性化させるものも報告されている (Kouzarides, 2007; Yang and Shinkai, 2013)。ヒストン修飾酵素のリクルートは、ジンクフィンガーを介している場合もあれば、Prdm1 や Prdm3 で報告されているように、プロリン-rich ドメインなど、その他のドメインを介している場合もある (Huang et al., 1998; Bartholomew et al., 1997)。

PR ドメインタンパク質はまた、ジンクフィンガードメインを介して DNA に直接結合することが知られている (Bard-Chapeau et al., 2012; Baudat et al., 2010; Chia et al., 2010; Delwel et al., 1993; Duan et al., 2007; Funabiki et al., 1994; Kuo and Calame, 2004; Ma et al., 2011; Seale et al., 2007)。また、クロマチン免疫沈降 (Chromatin Immuno Precipitation: ChIP) 後のシーケンスによるゲノム上の結合領域の網羅的解析により、Prdm1, Prdm3 および Prdm14 がゲノム上の非常に多くのターゲット領域に結合することがわかり (Bard-Chapeau et al., 2012; Chia et al., 2010; Doody et al., 2011; Ma et al., 2011; von Hofsten et al., 2008)、さらに同じ PR ドメインタンパク質が、様々な異なる種類の細胞内において、多岐にわたるターゲット遺伝子を制御していることから、PR ドメインタンパク質は状況に応じてそのターゲットを選択的に変えていることが示されてきた (Hohenauer and Moore., 2012)。PR ドメインタンパク質はまた、幅広いパートナーと複合体を形成することができ、そのパートナーの選択が状況に応じた遺伝子発現制御に寄与していることも報告されている。例えば Prdm3 は自身が複合体としての働きを強めたり弱めたりすることによって、癌因子 Fos や転写因子 Ap1 の結合を

調節することができる(Bard-Chapeau et al., 2012)。

このように、PR ドメインタンパク質は、直接的なヒストンメチル化酵素として機能する一方で、他のヒストン修飾酵素を特定のターゲット遺伝子領域にリクルートすることができる。そしてゲノム上の多岐にわたる遺伝子領域で状況依存的に発現を調節し、細胞の状態の維持や次の状態への遷移を活性化する役割を果たすことで、多面的な発生シグナル経路を調節している。

1-2-4. PR ドメインタンパク質と発生・分化制御

近年、PR ドメインファミリータンパク質が各組織における細胞の運命決定や分化に重要な働きをすることが、次々と明らかになってきている。Blimp1 (Prdm1) は体細胞の初期発生プログラムを抑制することで生殖細胞としての運命を決定づける因子であること (Ohinata et al., 2005)、網膜組織では、対立する前駆細胞からの分化経路を抑制することで、光受容体としての特性の獲得と維持を安定化する役割を果たすこと (Brzezinski et al., 2010; Katoh et al., 2010)、また離乳期におけるミルク単独からの新生仔期栄養代謝から、食餌からの成体期栄養代謝への腸細胞代謝の転換を制御していることが報告されている (Harper et al., 2011; Muncan et al., 2011)。さらに、Meisetz(Prdm7/9)はヒストンメチル化修飾を介して減数分裂の進行を制御すること (Hayashi et al., 2005)、Prdm14 は始原生殖細胞の分化過程に必須であること (Yamaji et al., 2008)、Prdm16 が骨格筋芽細胞と褐色脂肪細胞 (brown adipose tissue:BAT) の運命決定のスイッチを制御していること (Kajimura et al., 2008; Kajimura et al., 2009; Seale et al., 2008; Seale et al., 2011; Seale et al., 2007)、PRISM (Prdm6) が平滑筋細胞において増殖プログラムを維持することでその可塑性を制御していること (Davis et al., 2006; Wu et al., 2008) などが報告されている。

以上のように、様々な組織の細胞運命の決定に PR ドメインタンパク質が重要な役割

を果たすことが数多く報告されているが、中枢神経系における機能に関しては極めて情報が限られている。

1-2-5. PR ドメインタンパク質と発がんおよびその他の病気

いくつかの PR ドメインタンパク質は、がんの関連因子としての働きが明らかになっている。例えば、RIZ1(ヒト PRDM2)や PRDM5 が、様々なヒト癌組織で発現抑制されていること(Kim et al., 2003; Steele-Perkins et al., 2001; Shu et al., 2011)、Prdm14 の発現が肺がんにおいて顕著に高くなっていること(Nishikawa et al., 2007)、また MDS1-EVI1(ヒト PRDM3)や MEL1 (ヒト PRDM16) 遺伝子座における転座が骨髄性白血病の原因の一つである可能性が報告されている (Huang, 2002)。

がんの他にも、Prdm1 が膠原病やリウマチといった自己免疫疾患の感受性を担っていること (Gateva et al., 2009; Raychaudhuri et al., 2009)、PRDM3 が肺疾患の感受性遺伝子であること (Soler Artigas et al., 2011)、PRDM5 の変異が、不安定角膜症の原因になること (Burkitt Wright et al., 2011)、PRDM8 が進行性ミオクローヌステんかん(ラフォラ病)の発症に関連すること (Turnbull et al., 2012)、そして PRDM16 の変異が偏頭痛の発症に関連すること (Chasman et al., 2011) が報告されている。

1-3. 発生期大脳皮質における多段階の分化過程の制御

1-3-1. 大脳皮質形成過程と制御分子

上述した通り、大脳皮質のグルタミン酸作動性ニューロンは、発生過程において、ほとんどすべて脳室帯および脳室下帯における神経前駆細胞の分裂によって生み出され、多段階の分化過程を経ながら表層に向かって移動していく。このとき、脳室帯において生み出された細胞集団は、直接皮質板へと分化するのではなく、脳室下帯および中間帯 (intermediate zone: IZ) に移動し、そこで一過的な多極性 (multipolar: MP) 形態を

獲得することが報告されている (Tabata et al, 2009)。多極性形態期 (MP phase) のニューロンは、軸索を伸張しながら、大脳皮質の表面に対し、上下方向だけでなく左右報告にも遊走する。その後これらのニューロンは中間帯の上部において、多極性から双極性 (bipolar: BP) 形態へと再び形態変化 (多極性→双極性形態変化) を遂げる。双極性形態を獲得したニューロンは、ロコモーション (Pakic,1972) と呼ばれる細胞移動様式により、神経前駆細胞から伸びる長い突起に沿って脳表面に向かって移動し、皮質板の内部に配置されていき、最終的に皮質ニューロンとなる (Nadarajah et al., 2001) (図 1-4)。

これまでに様々な遺伝子が、これらの神経分化過程の多段階のステップに関与することが明らかにされている。特に、多くの転写因子は領域・時期特異的に発現し、その下流遺伝子の発現を制御することによって、これらの神経分化過程を調節する分子スイッチとして重要な役割を果たしている。例えば、Pax6 (Götz et al., 1998; Georgala et al., 2011) や Sox2 (Hutton and Pevny, 2011) は脳室帯で特異的に発現し神経幹細胞の特性の獲得・維持に寄与しており、Tbr2 は脳室帯の上部と脳室下帯で発現し、より分化能力が制限された中間型前駆細胞としての性質の獲得を誘導している (Sessa et al., 2008)。また、NeuroD1 は脳室下帯上部と中間帯下部の多極性形態細胞で、Tbr1 はサブプレートと皮質板でそれぞれ発現しており (Lee et al., 2000; Hevner et al., 2001; Englund et al., 2005)、これらの転写因子群の Pax6→Tbr2 →NeuroD1→Tbr1 といった時系列的な発現変化がグルタミン酸作動性ニューロンの正確な発生の進行において重要なステップとなることが示唆されているが (Hevner et al., 2006)、これらの転写因子がどのような細胞挙動を制御しているのか、その詳細については明確化されていないのが現状である。

1-3-2. 中間帯におけるニューロンの移動と形態変化

一方で、上述のような中間帯における多段階の正確なニューロンの移動制御が、適切

な脳組織の形成に重要であることが明らかになっている。ニューロンの移動の異常は、てんかんや精神遅滞を伴う脳奇形のみならず、統合失調症などの高次脳機能疾患とも関連があることが報告され (Kähler et al., 2008; Verrotti et al., 2010; Liu, 2011)、その重要性から、近年中間帯における多極性形態移動期を直接的、あるいは間接的に制御する分子メカニズムが少しずつ明らかにされてきた。例えば、転写因子 Foxg1 は多極性形態期の初期にその発現量が大きく減少し、多極性形態期の後半でまた増加するというダイナミックな発現様式を示し、NeuroD1 を発現する前期多極性形態期 (early-MP phase) から、Unc5D を優先的に発現する後期多極性形態期 (late-MP phase) への細胞の移行を制御することが報告されている (Miyoshi and Fishell, 2012)。またその他にも、多極性形態期におこる Ephrin-EphA シグナルを介したニューロン移動が、大脳皮質内のニューロンの適切な混ざりあいが必要であること (Torii et al., 2009)、さらに、転写抑制因子として知られる RP58 は、Neurogenin-Rnd2 経路を抑制することで、双極性に変化する直前の最終段階の多極性形態細胞 (本論文では、「最終多極性形態期 (terminal-MP phase)」と表記) において適切な多極性から双極性形態変化の進行を調節していることが報告されている (Ohtaka-Maruyama et al., 2013)。しかしながら、これらの多極性形態期を制御する分子機序の詳細は、未だ未解明な点も多く残っている。

1-4. PR ドメインタンパク質と神経発生

1-4-1. PR ドメインタンパク質による中枢神経系における発現と機能

近年、PR ドメインタンパク質の神経発生における機能が注目されている。たとえば、*Prdm* 遺伝子ホモログ *hamlet* は、ショウジョウバエ神経細胞の分化制御に重要な役割を果たすことが報告されている (Moore et al., 2002; Moore et al., 2004; Endo et al., 2012)。マウスにおいても、*Prdm* 遺伝子群 (*Prdm8*, *Prdm12*, *Prdm16*) がマウス中枢神経系において特徴的な発現様式を示し、神経幹細胞の未分化性の維持や脳腫瘍形成

に決定的な役割を果たす Notch シグナル (Mizutani et al., 2007; Kageyam et al., 2009) の調節を介して中枢神経系における分化調節に関与することが明らかにされており (Kinameri et al., 2008)、また Prdm12 が P19 細胞の神経分化過程で誘導され、細胞周期の進行を阻害することや (Yang and Shinkai, 2013)、Prdm16 が成体マウスにおいて、酸素ストレス制御下で神経幹細胞の維持を促進していること (Chuikov et al., 2010) が報告されている。さらには、当研究室の先行研究において、Prdm8 が発生期神経組織(網膜・脊髄・終脳)で特異的に発現し、生後は大脳皮質ニューロンや海馬組織に強く発現することが明らかになっている (Komai et al., 2009)。

1-4-2. 中枢神経系における Prdm8 の役割

以上の背景から、本研究では脳特異的な発現を示す、Prdm8 に注目した。Prdm8 遺伝子はヒトでは第 4 染色体上に、マウスでは第 5 染色体上に位置している。マウス Prdm8 タンパク質はアミノ酸末端領域の PR ドメインに加え、3 つの C2H2 型ジンクフィンガードメインを持っている。(図 1-5) ジンクフィンガーを 3 つしかもたないことやその位置関係から Prdm8 タンパク質が単独でゲノム上の特異的な配列を認識し、結合できる可能性は低いと考えられる。Prdm8 の PR ドメイン領域は特に生物間で高度に保存されており、ヒトとアフリカツメガエルで比較しても、アミノ酸配列で 98%以上が一致する。無脊椎動物では Prdm8 ホモログは存在しないが、発生期のゼブラフィッシュにおける Prdm8 遺伝子は眼を含む中枢神経系で特異的に発現していることが報告されている (Sun et al., 2008)。また当研究室での先行研究によって、マウス Prdm8 が発生期の中枢神経系で発現し、その発現様式は時間的・空間的に厳密に制御されていること、特に大脳皮質では、発生期には移動ニューロンの存在する IZ および CP で強く発現し、生後脳では第 IV 層グルタミン酸作動性ニューロンに強く発現されていることが明らかになり (Komai et al., 2009)、Prdm8 がニューロンの分化、成熟、サブタイプの決定に関与

しているのではないかと推察されている。

また、最近の研究で、発生期および生後の大脳皮質において、Prdm8はDNA配列特異的なbHLH (basic helix-loop-herix) 型転写因子であるBhlhb5(Bhlhe22)と複合体を形成し、ゲノム上の特定の領域に結合することで転写を抑制することが報告されている。

Prdm8およびBhlhb5の欠損マウスは類似した行動様式と、軸索伸張や神経回路形成の異常を示すが、これはCdh11を含むBhlhb5の結合領域にPrdm8がリクルートされ、この転写抑制が関与するとされている (Ross et al., 2012)。

1-5. 本研究の目的

以上のように、大脳皮質を構成する多様な神経細胞は、発生期において多段階の複雑な分化過程を進行する中で、その細胞形態や分子特性をダイナミックに変動させながら、脳表面に向かって移動し、適切な位置に配置して脳の層構造を形成することで、精密な神経ネットワークを構築している。

本研究では、発生・分化の重要な制御因子として知られるPRドメインタンパク質ファミリーの一員であるPrdm8が、発生期のマウス大脳皮質において空間的・時間的に非常に限局された発現パターンを有していることに注目し、Prdm8が、大脳皮質における多段階の分化制御に重要な役割を果たすのではないかと仮説を立てた。抗体染色による詳細な発現解析、エレクトロポレーション法を用いた*in vivo*および*in vitro*の遺伝子導入手法による機能解析、さらには、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスの作製と解析を通じた複合的な手法により、Prdm8が大脳皮質細胞の複雑な分化過程に与える影響を解析することで、未だ不明な点の多い大脳皮質神経細胞の多段階の分化過程の詳細に迫ることを目的とした。

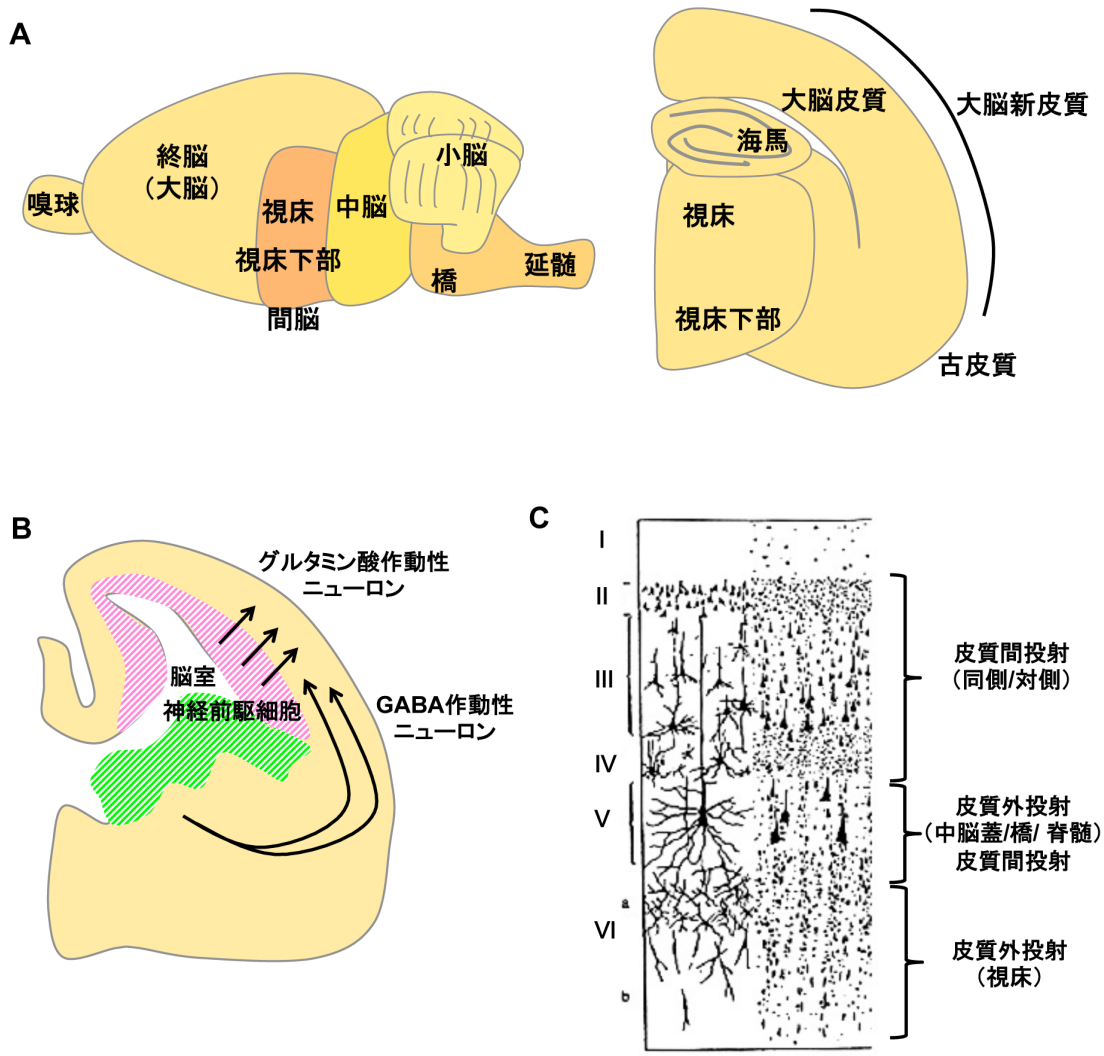


図 1-1: 脳の構造と構成ニューロン

(A) マウス脳外側面。脳は終脳、間脳、橋、小脳、延髄に分類される。大脳皮質は、大脳新皮質、古皮質、原皮質に分類される。海馬は原皮質に含まれる。(B) グルタミン酸作動性ニューロンは終脳背側脳室帯の神経前駆細胞から誕生し、法線方向に移動する。一方 GABA 作動性ニューロンは終脳腹側脳室帯の神経前駆細胞から誕生し、接線方向に移動する。(Dehay and Kennedy, 2007 より改変) (C) 生後の大脳皮質は6層構造をとる。それぞれの層は、特徴的な形態と投射標的をもつ。

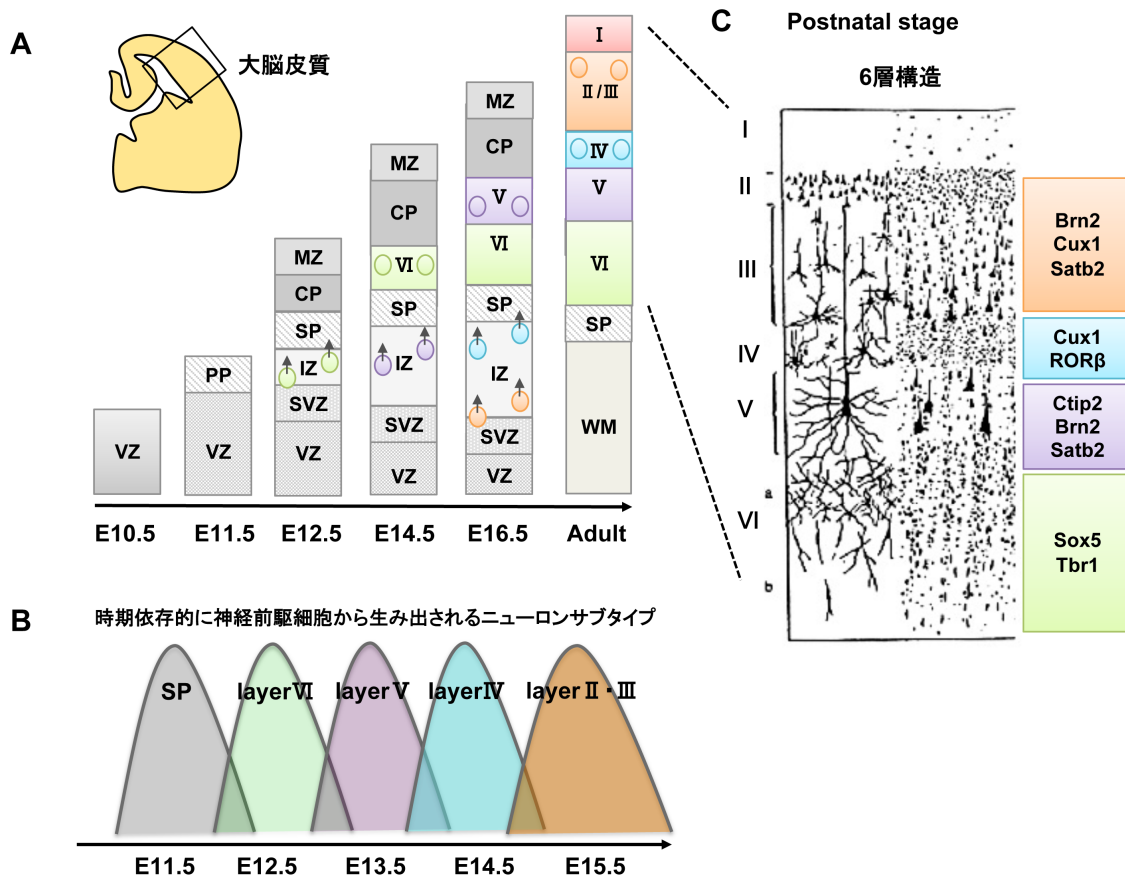


図 1-2: 大脳皮質の発生とインサイドアウトパターン

(A) 発生期の脳皮質で最初に生み出されるニューロンは、プレプレート (preplate: PP) と称され、それが深層側のサブプレート (subplate: SP) と表層側の辺縁帯 (marginal zone: MZ) に分かれる。やがてサブプレートと辺縁帯の間に皮質板 (cortical plate: CP) が形成され、層構造が構築されていくが、このとき、早生まれのニューロンほど深層側に、遅生まれのニューロンほど表層側に配置する、“インサイド・アウト”パターンをとる。(Bradley et al., 2007 より改変) (B) この際、発生時期の進行に伴って、神経前駆細胞から生み出されるニューロンのサブタイプが変化する。(C) 成体の脳皮質は 6 層の構造から成り、各々の層はそれぞれを特徴付ける転写因子を発現している。

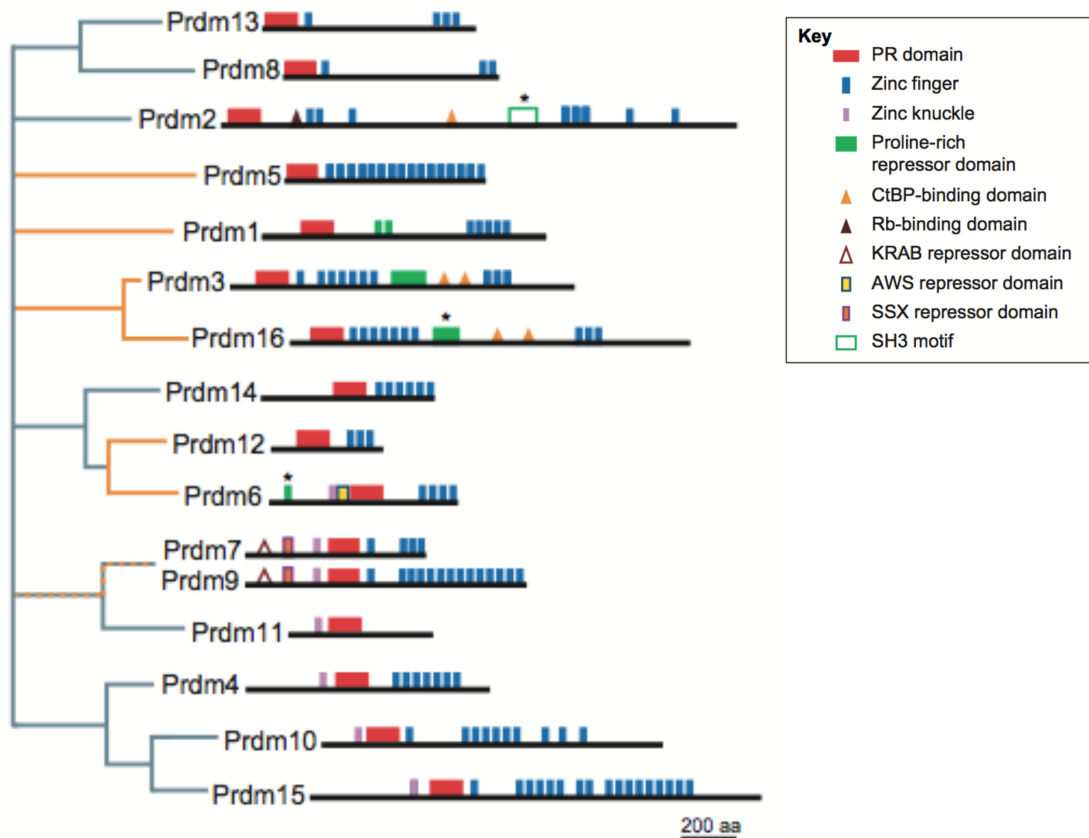


図 1-3: PR ドメインタンパク質ファミリーの構造と系統樹

PR ドメインファミリーは、マウスでは Prdm1 から Prdm16 まで存在する。タンパク質の N 末端に PR ドメインを、C 末端にジンクフィンガーモチーフを持つ (Hohenauer and Moore, 2012 より抜粋)。

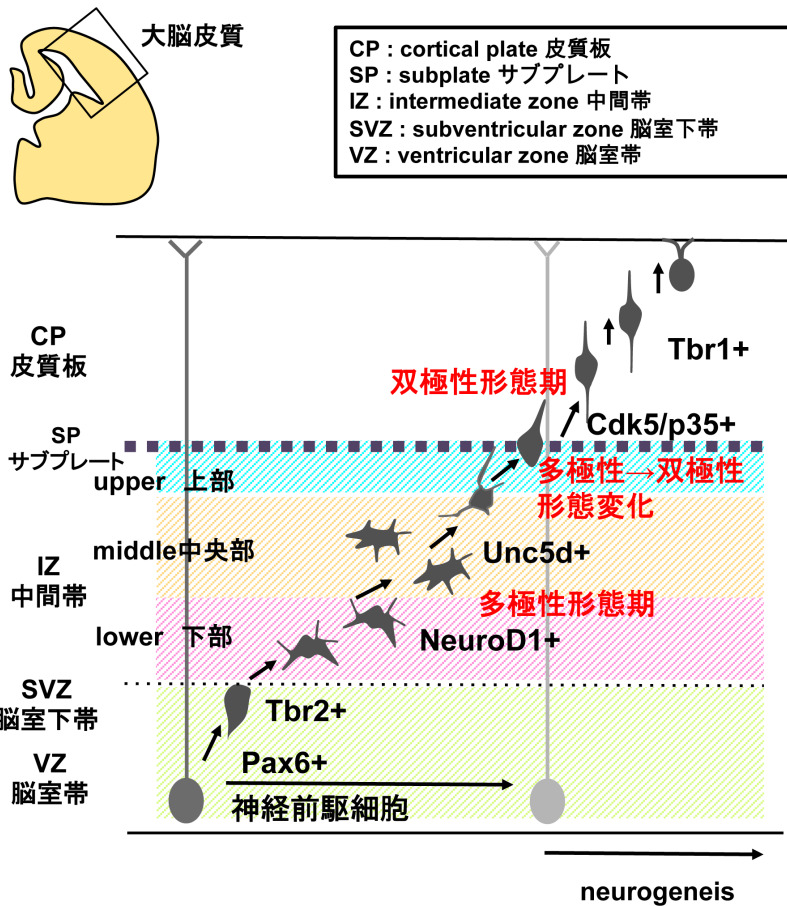


図 1-4: 発生期大脳皮質におけるニューロンの移動と形態変化

発生期大脳皮質の多段階の分化過程と発現分子特性。脳室帯 (ventricular zone: VZ) に存在する神経前駆細胞から生み出され、細胞周期を離れたニューロンは、いったん放射状グリアと呼ばれる前駆細胞がもつ長い線維状の突起を離れ、脳室下帯 (sub ventricular zone: SVZ) 上部および中間帯 (intermediate zone: IZ) 下部で多極性形態を獲得し、突起をのぼしながら、接線方向にも移動する。その後中間帯の上部で双極性形態を獲得し、再び線維に沿って脳表面へと移動していく。この間、多段階の分化過程に伴って、発現する分子マーカーのダイナミックな変動が起こる。

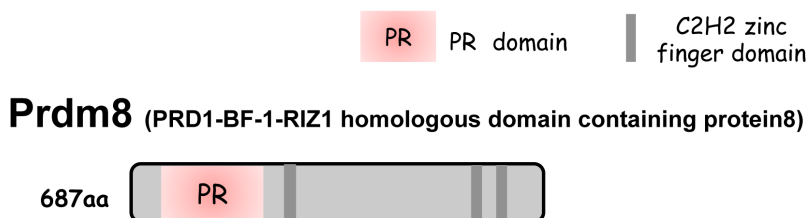


図 1-5: Prdm8 の構造と特性

Prdm8 は PR ドメインと 3 つのジンクフィンガーモチーフを持つ

第二章 実験手法と実験材料

2-1. 細胞株の培養と神経細胞の分化誘導

Neuro2a 細胞株および P19 細胞株の培養には、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (SIGMA) に 10%ウシ胎児血清、非必須アミノ酸 (GIBCO)、ペニシリン・ストレプトマイシン (PC-SM) (GIBCO) を加えた培地を使用した。神経の分化誘導には、レチノイン酸 (Retinoic Acid (RA)) を 10 μ M の濃度で添加し、数日間培養した。

2-2. 使用マウス

本研究では、京都大学動物委員会および同志社大学動物管理委員会で示された指針に基づいてマウスを使用した。マウスは SLC (Japan) もしくは日本クレア (Japan) より、清水実験材料 (京都) を通じて購入した ICR および C57BL/6 マウスを使用した。Prdm8^{mVenus} マウスは BAC を利用した Red/ET Recombination 法によって当研究室で作製した。

2-3. 免疫組織化学染色

脳組織は、PBS (-) 中で解剖後、4%パラホルムアルデヒド/ PBS (-) で浸透固定した。固定はマウス胚終脳では 4 $^{\circ}$ C で 1~4 時間、マウス生後脳では 4 $^{\circ}$ C で一晩行った。固定した組織は、PBS (-) で 2 回洗浄後、4 $^{\circ}$ C で一晩、30%シュウクロース/ PBS (-) 置換を行った。その後、OTC コンパウンドで包埋し、クライオスタットを用いて 20 μ m の厚さの凍結切片を作製した。凍結切片は PBS-0.1%Triton-X (PBST) で 3 回洗浄後、10% donkey serum (SIGMA) / PBST で室温にて 1 時間ブロッキングを行い、10% donkey serum / PBST で希釈した 1 次抗体で、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。PBST で 3 回洗浄した後、10% donkey serum / PBST で希釈した 2 次抗体で、室温で 1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、pro Long Gold (Invitrogen) にマウントし、蛍光顕微鏡 Olympus IX81 (Olympus) およびコンフォーカル顕微鏡 Zeiss LSM 710 (Zeiss) にて観察を行

った。

使用した 1 次抗体を以下に記す; mouse anti-Prdm8(N8506) (1:100; 当研究室で作製), rabbit anti-Tbr2 (1: 300; abcam), goat anti-NeuroD1 (1:100; Santa Cruz), goat anti-Unc5D (1:100; R&D), rat anti-GFP (1:500; nakalai tesk), rabbit anti-GFP (1:200; IBL), mouse anti-PCNA (1:100; Cell Signaling), mouse anti-Tuj1 (1:500; SIGMA), rabbit anti-Tbr1 (1:100; abcam), rabbit anti-DsRed (1:500; Invitrogen), mouse anti-RORb (1:100; PERSEUS PROTEOMICS), rat anti-Ctip2 (1:300; abcam), rabbit anti-Cux1(1:200; Santa Cruz), goat anti-Brn2 (1:100; Santa Cruz), mouse anti-Prdm16(1:100; 当研究室で作製), rabbit anti-Ki67(1:200; abcam), rabbit anti-PH3(1:200; Cell Signaling), mouse anti-Satb2 (1:100; Santa Cruz), Rat anti-Bhlhb5(ハーバード大学・Ross 博士より分与)。

使用した 2 次抗体を以下に記す: Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies 488, 594, 647 (1:1000; Invitrogen)

2-4. 使用したプラスミド

2-4-1. Prdm8 発現ベクター

Prdm8 発現ベクターは、マウス Prdm8 の全長 cDNA クローン (ID: 96300445H02) を FANTOM (Functional Annotation of the mouse) より入手し、全長 cDNA よりコーディング領域を、Takara LA Taq DNA polymerase (Takara) を用いて増幅し、pCAG-FLAG-IRES puro (NRI) ベクターの EcoRI サイトへサブクローニングすることによって構築した。

2-4-2. Prdm16 発現ベクター

Prdm16 の過剰発現ベクターは、Addgene で購入した pcDNA3.1 PRDM16 ベクターを鋳型にして Prdm16 のコーディング領域の全長を Takara ex Taq DNA polymerase (Takara)を用いて増幅し、pCAG-Flag-IRES puro ベクターにサブクローニングすることで構築した。部分欠損型

Prdm16 の発現ベクターは、SMART サイトによるドメイン探索によって、各ドメインに対応する塩基配列を調べ、N 末端の PR ドメインを欠いた Prdm16 Δ PR、C 末端の ZF ドメインを欠いた Prdm16 Δ cZF の配列を PCR で増幅後、それぞれ pCAG-FLAG-IRES puro ベクターへサブクローニングすることで構築した。

2-4-3. shRNA 発現ベクター

Prdm8 に対する短鎖ヘアピン RNA (short hairpin RNA: shRNA) 発現ベクターは pSUPERpuro ベクターに標的配列 (#629) を導入して作製したものを使用した(当研究室で作製)。#629: 5'-AAAAAAATGTGTAAGGAGACGACCCGTTGACAGGAAGGGGTCGTCTCCTTACACATGCG-3

ベクターによるノックダウンの効果は、shRNA 発現ベクターと Prdm8 発現ベクターを神経前駆細胞にトランスフェクションで導入し、ウェスタンブロット法で確認した (データ未掲載)。

2-5. 子宮内エレクトロポレーションによる胎仔脳への遺伝子導入

胎齢 12.5~14.5 日目の妊娠 ICR マウスを、ネンブタール (第日本住友製薬) の腹腔内投与で麻酔を施した後、腹部下部を切開し、子宮を取り出した。トレーサーとして Fast Green を加えた DNA 溶液を、ガラスキャピラリーを用いてマウス脳室側脳へ注入した。子宮の外側から電極 (CUY 650-5) をあて、CUY21 in vivo EDIT 遺伝子導入装置 (ネッパジーン) を用いてエレクトロポレーション (voltage: 32~35V, 50msec パルスを発した後に 950msec パルスを止め、これを 5 回繰り返した) を行った (図 2)。腹部は縫合し、胎仔を回収する時期まで通常通り飼育した。使用した DNA 溶液中のベクターと濃度は以下の通り。

pCAG-Flag-IRES puro(NRI), pCAG-Flag-Prdm8 full, shPrdm8(#629), pCAG-Flag-Prdm16, shPrdm16 GFP Neo (カリフォルニア大学・梶村博士より分与) : 2.5 μ g/ μ l

pCAG-GFP, pCAG-mCherry: 0.8 μ g/ μ l

pCAG-FloxP-GFP-N1 (理化学研究所・下向博士より分与) : 1 μ g/ μ l

pCAG-Cre (理化学研究所・下向博士より分与) : 0.3ng/ μ l

神経細胞の形態分類は、典型的な放射状多極性形態を multipolar 細胞([MP]), その他の単極性 (unipolar)、双極性 (bipolar) それ以外の細胞 (undefined) 細胞([UP/BP/undifined]) として二分類し、計数した。また、導入された GFP 細胞の位置は、脳室側から表層までを 10 等分、または 5 等分し、GFP 陽性細胞全体における割合(%)を Bin として算出した。

2-6. EdU ラベル

生体内大脳皮質における 5'-エチニル-2'デオキシウリジン (EdU) ラベルには、EdU Kit (invitrogen) を使用した。EtOH に希釈した EdU をマウス腹腔内に注射(12.5mg/kg EdU)し、数日間維持した。解剖後作製した切片を使用して、プロトコールに従って EdU の検出を行った。

2-7. 大脳皮質神経細胞の分散

胎齢 13.5 日目のマウス胚を取り出し、PBS (-) で洗浄後、終脳胚外側部を切り出し NPC 培地へ移した。組織片に TripLE Express (GIBCO) を加え、37°C の湯浴で 3 分間インキュベートした後、DNase (SIGMA) (20U/mL) を含んだ DMEM Ham's/F12 (DMEM+DNase) を加えて穏やかに懸濁後、400 g で 3 分間遠心し、回収した細胞をニューロスフェア(Neurosphere: NS)培地、あるいは ACM 培地で再懸濁した (2-12、2-16 に記載)。

2-8. FACS を用いた細胞の選別

細胞の選別は、BD FACS Aria II Cell sorter を用いて行った (同志社大学・生命医科学部) 。遺伝子未導入の神経前駆細胞をネガティブコントロールとし、GFP 陽性細胞を TRIzol (ambion) に回収後、RNA を精製した。

2-9. RNA の抽出と cDNA の合成

細胞および脳組織の Total RNA は、TRIzol に回収した細胞および組織から、RNeasy Mini kit (QIAGEN)を用いて抽出後、Bio Photometer Plus (Eppendorf) を使用して RNA 濃度と品質をチェックした。抽出した RNA 400ng~1 μ g を鋳型として、Quick RT transcripton Kit (QIAGEN)の試薬を用い、マニュアルに従ってゲノム DNA の除去と cDNA 合成を行った。

2-10. DNA マイクロアレイ

Total RNA を使用したマイクロアレイによる発現遺伝子の網羅的解析は、3'IVT-Express Kit according to manufacturer's instructions (Affymetrix)に従って行った。マウス遺伝子の 39,000 プローブを含むカートリッジ(Mouse Genome 430 2.0) にハイブリダイズして、網羅的に発現解析を行った。得られた結果は Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix)に従って、Genespring を用いて解析した。

2-11. Neon を利用した神経前駆細胞への核内遺伝子導入

神経初代培養細胞および P19 細胞への遺伝子導入は、NeonTM Transfection System (Life Technologies)を用いてマニュアルに従って行った。遺伝子導入には#21 (voltage: 1300v, width: 10ms, pulses: 3pulses) の条件を使用した。

2-12. ニューロスフェアの培養

遺伝子導入した神経初代培養細胞を、bFGF を含む NS 培地で希釈し、100mm ϕ dish に播いた。その後、37°C、5%CO₂環境下で培養した。NS 培地の組成は以下の通り。DMEM Ham's /F12 (GIBCO) 、N2 supplement (Invitrogen) 、B-26 without VitaminA supplement (Invitrogen) 、PC-SM (50U/ml)、Heparine Na (ナカライテスク) 、FGF (10ng/ml) 、EGF (20ng/ml)

2-13. Real-time PCR による RNA の比較定量

定量 real-time PCR は SYBR green (SYBR Premix Ex TaqII, Takara) と TP850 Real-Time PCR System (Takara)を用いて行った。使用した Primer の配列は以下の通り。GAPDH を内在性の RNA 量のコントロールとして補正を行った。

GAPDH FW: AAACCCATCACCATCTTCCAG

GAPDH RV: AGGGGCCATCCACAGTCTTCT

Prdm8 FW: TCCCAGAGAACGCCATATTC

Prdm8 RV : TTATCTCGGGCTGATTGGAC

Unc5d FW: CACCAGGGCTGACCATAAC

Unc5d RV: TCCATTCACGTAGACCACC

Calb2 FW: TCCAGGAGTACACCCAGACC

Calb2 RV: GGCGTCCAGTTCATTCTCAT

Nhh2 FW: GAAGAGCCAAGAAGCCACAC

Nhh2 RV: AAAGGGCTTGTGGTGAAATG

Ebf3 FW: GCACAACAATTCCAAACACG

Ebf3 RV: GGGGTTATCAGCTCACTCCA

Nrp2 FW: GCTGATCTTGGCACTCGTTG

Nrp2 RV: TGGGCACTTCTCTCCTCCTT

Epha6 FW: TTTCTTCTTGCCCCTGCTAA

Epha6 RV: GCCAGTTGTTCTGGTTTGGT

2-14. クロマチン免疫沈降 (ChIP)と ChIP シークエンス

胎齢 16.5 日目のマウス胎仔脳細胞を分散し、PBS で洗浄後、10%FBS を加え、ホルムアルデヒドを含む PBS (Final 1.0%) にて、37°C で 5 分間で固定した。以降の操作は、理化学研究所・

眞貝細胞記憶研究室の加藤雅紀研究員との共同研究として行った。ChIP シークエンスの結果解析は、京都大学ウイルス研究所・竹本経緯子博士の協力のもとで行った。

2-15. ノックアウトマウスの作製

BACPAC Resource Center, Children's Hospital Oakland Research Institute より、Prdm8 遺伝子座領域を含む BAC (bacterial artificial chromosome) (Clone ID: RP23-463H17) を購入し、Red/ET Recombination 法 (Copeland et al., 2001) に従い、ノックアウトマウスの作製を行った。

2-15-1. ES 細胞の培養

ES 細胞の培養には、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (SIGMA) に 15%ウシ胎児血清、非必須アミノ酸、2-メルカプトエタノール、PC-SM を加えた培地を使用した。

2-15-2. ES 細胞 Prdm8 遺伝子上流へのターゲティング

RP23-463H17 を鋳型として PCR を行い、Prdm8 遺伝子の第 2Exon 内に loxP-Neo 配列を挿入するようデザインした、Prdm8 ターゲティングベクター1 を作製した。ターゲティングベクターは制限酵素処理によって線状化し、マウス ES 細胞 M1 (B6/129) (理研免疫・アレルギー科学総合研究センター・古関明彦博士より分与) にエレクトロポレーション法によって導入した。ES 細胞は実効値 150 μ g/ml の G418 (ナカライテスク) によって薬剤選択を行った。1 週間後得られたコロニーを回収し、サザンブロット法によって目的とした領域で相同組み換えが行われているクローンの解析を行った。(Prdm8_SB1 プローブ使用)

2-15-3. サザンブロットティング

薬剤選択後回収したコロニーを培養し、増殖した細胞を終濃度 40 μ g/ml の Proteinase K (ナカ

ライテスク) を含む Salting Method solution (20mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 400mM NaCl, 0.5%SDS) に懸濁し、56°C で一晩加温した。フェノール/クロロホルム抽出後にエタノール沈殿を行い、ゲノム DNA を回収した。ゲノム DNA は EcoRI で、37°C で一晩制限酵素処理を行い、0.8%アガロース TAE ゲルで泳動、分離を行った。ゲルは蒸留水でリンスし、0.25N HCl 溶液に移して 30 分間振とうした。ゲルを蒸留水でリンスし、0.4N NaOH 溶液へ移してさらに 20 分振とう後、0.4N NaOH でナイロン膜 (Paul) に転写した。膜は 2×SSC で洗浄後、80°C で 2 時間加熱し、DNA を固定した。ナイロン膜はプレハイブリダイゼーションバッファー (50%ホルムアミド, 5×SSCPE, 1×デンハルト液, 0.5mg/ml サケ精子 DNA, 1×SDS) で 1 時間、42°C でプレハイブリダイゼーション後 α -32P-dCTP で標識したプローブ液 (50%ホルムアミド, 5×SSCPE, 1×デンハルト液, 0.2mg/ml サケ精子 DNA, 1×SDS, 100mg/ml デキストラン硫酸ナトリウム) で、42°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後 0.1%SDS を含む 2×SSC を用いて 65°C で 1 時間洗浄し、イメージングプレートに焼きつけ、BAS-5000 (FUJIFILM) でオートラジオグラムイメージ解析を行った。プローブ作製に用いたプライマーは以下の通りである;

Prdm8_SB1_F: GAAAGGTGTTGGGTTTAAGG

Prdm8_SB1_R: GGTTGCTGCAAAGAAGGCTC

Prdm8_SB2_F: ATAGAATTCATTGGCTGAAGCGGTGTTAA

Prdm8_SB2_R: ATAGAATTCACTAGTTCCTGCCCTACTGA

2-15-4. ES 細胞のインジェクション

得られた ES 細胞のクローンを定法にて ICR マウスの 8 細胞へのインジェクションを行い (京都大学ウイルス研究所・マウス作製支援チーム)、キメラマウスを得た。最もキメラ率の高かった ES 細胞 line (#4-359) を用いて、以下の操作を進めた。

2-15-5. Adeno-Cre による Neo 耐性遺伝子の欠失

#4-359ES 細胞を ES 培地中で 37°C、6 時間培養後、回収して新たな ES 培地に再懸濁し、Adeno-Cre ウイルスを加え、さらに 1 時間 37°C で培養した。その後 ES 細胞をプレートに播き、7 日後コロニーを回収した。サザンブロット法によって Neo 耐性遺伝子が欠失したクローンを選択 (Neo プローブを使用) し、あわせて PCR にて単独の loxP 配列が残っていることを確認した。

2-15-6. Prdm8 遺伝子下流へのターゲティング

Prdm8 遺伝子の第 5 エクソンの下流に loxP-FRT-Neo 配列を挿入するようデザインした *Prdm8* ターゲティングベクター 2 を作製した。上記と同様に、ターゲティングベクターを制限酵素処理により線状化し、エレクトロポレーション法にて上記で得られた ES 細胞 (#359-1) に導入した。この際、ターゲティング効率を向上させることを目的に、相同組み替えを制御する Blm タンパク質の発現を、short hairpin の遺伝子導入によって一過的に低下させた状態で、2 日後ターゲティングを行った。

2-15-7. Blm タンパク質のノックダウン

Blm に対する短鎖ヘアピン RNA (short hairpin RNA: shRNA) 発現ベクターは、pSUPER retro puro ベクターに標的配列を導入したものを当研究室で作製した。shRNA によるノックダウンの効果は、ES 細胞に Blm の shRNA ベクターをトランスフェクションで遺伝子導入し、2 日後に細胞を回収し、ソニケーション後、ウェスタンブロットによってタンパク質の減少を確認した。その際のポジティブコントロールとして、Blm のノックアウト ES 細胞(大阪大学・竹田博士より分与)を使用した。

2-15-8. ウェスタンブロット法

回収した細胞を、1×PBS (-) で洗浄後、1×SDS サンプルバッファー (50mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% Glycerol, 5% 2-メルカプトエタノール) に 2×10^5 個/ 10 μ L となるよう懸濁した。サン

プルは超音波処理後、96°C のヒートブロックで 5 分間加熱処理した。タンパク質サンプルはポリアクリルアミドゲルで泳動分離後、ニトロセルロース膜へ転写した。その後、膜をボンソーS (Sigma) で染色し、各レーンのタンパク質の量を確認した。ブロッキングはブロッキングバッファー (1×TBS, 0.01%Tween, 5%スキムミルク) で、4°C で一晩また室温で 1 時間行った。一次抗体は TBST (1×TBS, 0.01%Tween) で希釈し、室温で 60 分間反応させた。TBST で洗浄後、二次抗体は TBST で希釈し、室温で 45 分間反応させた。TBST で洗浄し、HRP 化学発光液 (Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus PerkinElmer) と 1 分間反応させ、膜はラップで包み、LAS-4000 (FUJIFILM) で検出した。使用した一次抗体は以下に示す; Anti-Blm(1: 1000), rabbit polyclonal(BETHYL)(1: 1000); Anti-FLAG, mouse monoclonal (SIGMA) (1: 2000) ; Anti-Prdm8 (N8506A) (1: 1000) , mouse monoclonal (本研究室で作製) 。
使用した二次抗体は以下に示す; HRP-anti-mouse IgG (amarsham) (1: 10000) ; HRP-anti-rabbit IgG (amarsham) (1: 10000)。

2-15-9. PCR によるターゲティングクローンのスクリーニング

ターゲティング後の細胞は、同様に G418 で薬剤選択し、ゲノムを回収後、下記の primer を用いた PCR によって、Exon5 下流にターゲティングされた allele を持つクローンの 1st screening を行った。1.8kb のバンドが出現したクローンを選別した。Blm のノックダウンの結果、ノックダウンしていない場合と比較し、ターゲティング効率が顕著に上昇した。(8/1000 クローン →15/376 クローン)

POL2: cgcacgccttctatcgccttcttgacgag

H17_48308_F: gatgggtcctgcgtaggatctct

さらに 1st screening によって選別されたクローン(15 個)において、目的の領域で相同組み換えが行われているかどうかを、サザンロットで確認した (Prdm8_SB2 プローブ使用)5.6kb→3.6kb

2-15-10. PCR によるターゲティング Allele の選別

Exon2 間領域にターゲティングされている allele と同側で、Exon 5 下流がターゲティングされているクローンのみを選別するため、PCR による確認方法を樹立した。得られたコロニーを培養し、Adeno-Cre 処理から 48 時間後に細胞の DNA を回収し、下記のプライマーを用いて PCR を行った。同じ allele がターゲティングされている場合のみ Exon2~Exon5 の領域が欠失し、560bp のバンドが増幅された。9/15 クローンでバンドが検出された。

pl451-2479F: TAGAGCTTGGAACCCTTC

H17-41220F:ACAAAAGCCCTACCTTCGCCCC

2-15-11. ES 細胞のインジェクション

以上の操作により、*Prdm8* Exon2 内に loxP 配列を含み、Exon5 下流に loxP-FRT-Neo-FRT 配列が挿入された ES 細胞の中から、4 クローンを選出した(#21、#28、#118、#443)。ES 細胞のクローンを上記と同様に ICR マウスの 8 細胞へのインジェクションを行い、キメラマウスを得た。

2-15-12. VASA-Cre マウスとの交配

4 つの ES 細胞クローンをインジェクションしたマウスのうち、キメラ率の高かった#443 および#11 のマウスを用いて、それらの♂マウスと、生殖細胞で Cre を発現する VASA-Cre マウス(テキサス大学・Southwestern Medical Center の Diego H. Castrillon 博士より分与) の♀マウスを交配し、*Prdm8* の Exon2~Exon5 の領域が欠損した allele を持つヘテロマウス(*Prdm8*^{+/-})を得た。*Prdm8* 遺伝子領域の欠失は、マウスの tail から採取した DNA を用いた PCR によって確認した。

2-15-13. 脳組織からのタンパク質の抽出

脳組織からのタンパク質の抽出には、抽出液として NE1(10mM Hepes pH7.9, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl)および NE2(20mM Hepes pH7.5, 1.5mM MgCl₂, 420mM NaCl, 0.1%NP-40)に protease inhibitor(Roche: complete tablet)を加えたものを使用した。解剖後、脳組織を直ちに液体窒素の中で凍結し、-80°C に保存した。その後組織を解答し、NE1 を加えて、セルクラッシャーを用いて組織を粉碎した。さらに等量の NE2 を加え、液がさらさらになるまで懸濁し、30 分間氷上で静置した。懸濁液を 4°C 10000rpm で 10 分間遠心し、上清をタンパク質抽出液として使用した。

2-16. 初代神経前駆細胞の接着培養

分散した初代神経前駆細胞を、bFGF を含む Attached Neural Progenitor Cells (ACM) 培地で希釈し、コーティング処理をした 100mmφ dish に播いた後、37°C、5%CO₂ 環境下で培養した。Dish のコーティングには、poly-L-Lysine (PLO) を 37°C で 1 時間コートした後、PBS で洗浄し、Fibronectin で 3 時間コートした。ACM 培地の組成は以下の通り。DMEM Ham's/ F12 (GIBCO) に PC-SM (GIBCO 10,000U/ml) (50U/ml) 、 transferrin (100μg/ml) 、 insulin (25μg/ml) 、 progesteron (20nM) 、 Na Selenite (30nM) 、 Putrescine (60μM) 、 FGF (Invitrogen) (10ng/ml) 、 EGF (Invitrogen) (20ng/ml)

2-17. レポーターアッセイ

2-17-1.レポータープラスミド

Neurogenin2(Ngn2) および *NeuroD1* 遺伝子のプロモーター活性の検出には、*Ngn2-luc* および *NeuroD1-luc(+)*3'UTR ベクターを使用した(京都大学、影山研究室より分与)。遺伝子導入効率の内在性コントロールとして、pRL-TK (ウミシイタケルシフェラーゼレポーターベクター) (Promega)を使用した。

2-17-2. PEI を用いた Neuro2a 細胞への遺伝子導入

神経細胞株 Neuro2a 細胞への遺伝子導入には、ポリエチレンジアミン (PEI) (Polyscience Inc.) を用いた。Neuro2A 細胞を 3×10^5 個ずつ 24well plate に播き、24 時間後に遺伝子導入し、48 時間に解析した。遺伝子導入した細胞を PBS で洗浄し、1x Passive Lysis Buffer を加え、室温で 15 分間攪拌した後、細胞の溶解液を回収した。細胞溶解液を 4°C 10000rpm で 10 分間遠心し、上清を回収してレポーターアッセイのサンプルとした。

2-17-3. ルシフェラーゼアッセイ

アッセイは、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) のプロトコールに従って行った。各種のベクターと同時に、遺伝子導入効率のコントロールとして pRL-TK を導入した後 48 時間の サンプルを回収した。蛍光の検出は Dual-Luciferase Reporter Assay System のマニュアルに従って行った。ルミノメーター (Promega) を用いてルミノ活性値を測定し、ウミホタルルミノ活性値を内在性コントロールであるウミシイタケルミノ活性値を基準として補正し、コントロールプラスミド pGL3E と比較した値を算出した。

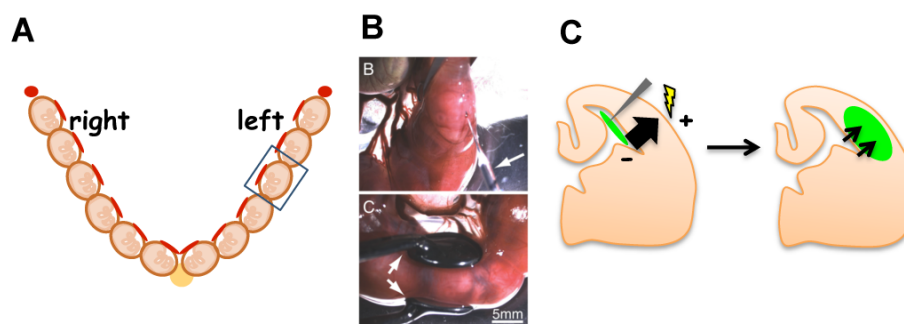


図 2: 子宮内エレクトロポレーション法の概要

妊娠マウスの子宮を取り出し、胎仔脳に直接遺伝子を導入する (A)。マウス胎仔の脳室にプラスミド DNA を、ガラス針を用いて注入した (B) (Saito and Nakatsuji, 2001 より抜粋) 後、脳を電極で挟み、電気穿孔法によって大脳皮質の目的領域に遺伝子を導入する (C)。

第三章 結果

3-1. Prdm8 は発生期大脳皮質において、中間帯の限られた領域で特異的に発現する

これまでの研究で、Prdm8 は中枢神経組織で特異的に発現することが明らかになっている。特に発生期においては網膜・脊髄・大脳の限られた領域で発現し、また生後脳では大脳皮質第 IV 層や海馬で特異的に発現することが報告されている(Komai et al., 2008)。中でも、私は発生期大脳皮質において Prdm8 が未分化な細胞が存在する脳室帯 (VZ) および脳室下帯 (SVZ) では発現が抑制されている一方で、細胞周期を離れた post-mitotic な分化過程の細胞において、限られたタイミングで特異的に発現することに注目した。実際に、P19 細胞と Neuro2A 細胞を用いて、レチノイン酸(Retinoic Acid: RA)処理によりニューロンへの分化誘導を行い、Prdm8 の経時的な発現量を調べたところ、分化誘導に従って Prdm8 の発現が増加することがわかった (データ未掲載)。これまでの報告で、いくつかの PR ドメインファミリータンパク質は、細胞分化の重要な制御因子として働くことが報告されていることから、大脳皮質において post-mitotic な細胞に特徴的に発現する Prdm8 遺伝子は、発生期大脳皮質における、神経前駆細胞からニューロンへの分化過程において重要な役割を果たしているのではないかと考えた。

発生期の大脳皮質では、脳室帯や脳室下帯において分裂して生み出された細胞が、多極性の形態を獲得しながら中間帯 (IZ) 下部から上部へと移動し、多極性形態から双極性形態へと再び形態を変えた後に、放射状線維に沿って細胞移動し、皮質板 (CP) に配置されるといった多段階の分化過程を経ることが知られている (Bradley et al., 2007; Nadarajah et al., 2001)。Prdm8 がこのような多段階の分化過程のどのステップにおいて発現しているのかをより詳細に調べるため、特に胎齢 15.5 日目のマウス大脳皮質に着目し、抗 Prdm8 抗体(当研究室で作製)を用いて大脳皮質の特定の細胞で発現する分子マーカーと共染色することで、発現細胞を比較した (図 3-1A-D)。その結果、Prdm8 の発現は、脳室帯で発現する Pax6 や脳室下帯で発現する Tbr2 陽性の細胞では発現しない一方で、中間帯下部の前期多極性形態細胞で発現する NeuroD1 陽性細

胞の一部は Prdm8 陽性であり、また中間帯中央部から上部にかけての後期多極性形態細胞で発現する Unc5d 陽性細胞と Prdm8 陽性細胞はほとんど一致することが見出された。

さらに、Prdm8 陽性細胞の発現場所をより詳細に解析するために、当研究室で作製した Prdm8 のレポーターマウス (Prdm8-mVenus) を解析した (図 3-2A)。このマウスでは、Prdm8 のプロモーター制御下で膜局在型の蛍光タンパク質 membrane-Venus (mVenus) が発現することから、Prdm8 陽性細胞がより明瞭に観察できることが期待される。このマウスでは、mVenus の発現が胎齢 13~15 日目頃に顕著に強く、発生が進むに従ってその発現が減弱していくことが確認された (図 3-2C, D, E)。胎齢 15 日前後の時期において、大脳皮質における mVenus の発現は内在性のタンパク質の発現とほぼ一致しており (図 3-2B, B', B'')、未分化細胞では発現せず、分化したニューロンのみで発現していた (図 3-3A, B)。特に、mVenus の発現は中間帯中央部と上部で強くなっていることから、Unc5d との共染色を検討した結果、興味深いことに、Prdm8 と Unc5d の発現の強さは相反する傾向が確認され、Unc5d の発現が徐々に低下し始める位置で、Prdm8 の発現が徐々に増加する様子が観察された (図 3-3C, D)。さらに、mVenus 陽性細胞の形態を可視化するため、子宮内エレクトロポレーション法を用いて胎齢 12.5 日目の Prdm8-mVenus マウスに CAG プロモーターで制御した mCherry (蛍光タンパク質) 発現ベクターを大脳皮質に直接遺伝子導入した。48 時間後にマウスを解剖し、細胞の形態と mVenus の発現を調べたところ、中間帯上部に存在する mCherry 陽性の多極性形態細胞と双極性形態細胞では mVenus が強く発現する一方で、中間帯下部に存在する多極性形態細胞では、その発現が弱いことを確認した (図 3-4A)。

これらの結果から、胎齢 15 日前後の大脳皮質では、中間帯における位置に応じて、つまり、多極性形態期の分化過程のステップに応じて、Prdm8 の発現レベルが変化することが示唆された (図 3-4B)。これらの発現特性に基づいて、Prdm8 が最終多極性形態期における、双極性細胞への形態変化に重要な役割を果たしているのではないかと仮説を立て、以下の機能解析を試みた。

3-2. Prdm8 は多極性形態期を調節する

発生期大脳皮質における Prdm8 の役割を調べるために、子宮内エレクトロポレーション法を用いて Prdm8 の過剰発現と発現抑制実験を行った。まずは、胎齢 14.5 日目の大脳皮質にそれぞれコントロールベクター (pCAG-Flag-IRES puro)、過剰発現ベクター (pCAG-Flag-Prdm8)、およびノックダウンベクター (pPrdm8sh#629) を、GFP 発現ベクター (pCAG-GFP) と共に遺伝子導入し、その影響を比較した。これまでの報告で、胎齢 14.5 日頃にエレクトロポレーションによって GFP 発現ベクターを遺伝子導入された大脳皮質において、GFP 陽性細胞がおおよそ 36 時間後には NeuroD1 陽性細胞として脳室帯の直上に多極性形態を有して留まり、その後 60 時間後には中間帯上部において最終多極性形態期を迎え双極性形態へと形態変化を始める様子が観察されることが示されている (Tabata et al., 2009)。こうした背景から、Prdm8 の多極性形態期の各ステップにおける働きを詳細に調べることを目的として、遺伝子導入から 48、60、72、120 時間後に解析し、その影響を経時的に調べた (図 3-5A)。

その結果、遺伝子導入後 48 時間では、GFP 陽性細胞の位置 (脳室帯、脳室下帯と中間帯の下部および中央部) に大きな差は見られなかったが、Prdm8 の過剰発現時に、多極性形態を有する細胞が多く観察された (図 3-5B, C, D)。そこで次に、60 時間後に解析した結果、コントロールでは大多数の細胞が中間帯において双極性形態細胞へと変化している様子が観察された (図 3-6A, A', A'') のに対して、Prdm8 を過剰発現すると、多極性形態から双極性形態への変化が抑制され、サブプレート (sub plate: SP) 直下においても多極性形態細胞が維持されることが明らかになった (図 3-6B, B', B'')。一方で Prdm8 をノックダウンすると、細胞が未成熟に分化し、双極性形態細胞へと早期に変化してしまう様子が観察された (図 3-6C, C', C'')。これらの切片において、細胞の形態を、典型的な放射状突起を持つ多極性形態細胞 [multipolar: MP] と、単極性・双極性形態細胞および変化途中とみられる形態細胞 [uni(UN)-bipolar(BP)/ undefined] の 2 つに分類してカウントし全 GFP 陽性細胞に占める割合を調べた。その結果、Prdm8 の過剰発現では [MP] の割合が顕著に増加 (Prdm8 過剰発現; 68.3±2.3、コントロール; 56.1±2.6%) し、Prdm8 をノ

ックダウンでは [UN-(BP)/ undefined] の割合が顕著増加することが見出された (Prdm8 ノックダウン; $51.0 \pm 1.6\%$ 、コントロール; $43.9 \pm 2.6\%$) (図 3-6D)。

また、このような細胞の形態的特徴をより詳細に観察するために、Cre-loxP システムを使って細胞単体を GFP で標識した。具体的には、loxP 配列に挟まれた GFP 遺伝子配列を持つ pCAG-FloxP-EGFP-N1 と CAG-Cre ベクターを、コントロールベクター、Prdm8 過剰発現ベクター、Prdm8 ノックダウンベクターそれぞれと同時に遺伝子導入し、GFP 陽性細胞を数的に制限することで、遺伝子導入細胞単体の形態をより明瞭にした。その結果、48 時間後、60 時間後のいずれにおいても、Prdm8 の過剰発現により顕著な多極性形態細胞の増加が確認された (図 3-7)。これらの結果から、Prdm8 の発現レベルが、中間帯における適切なタイミングでの多極性形態細胞から双極性形態細胞への変化に重要であることが示唆された。

さらに、72 時間後に解析すると、Prdm8 を過剰発現した細胞の大多数が皮質板に侵入せずに、多極性形態を有したまま中間帯にとどまっている様子が確認され (図 3-8B, D, 図 3-9B)、これらの多極性形態細胞は、Unc5d を発現していないことも明らかになった。(図 3-9E, E')。一方で、Prdm8 をノックダウンした細胞は、その多くが双極性形態を有して皮質板に侵入している様子が観察され (図 3-8 C, D, 図 3-9C, F)、コントロールと比較して脳室帯・脳室下帯および下部中間帯の位置にほとんど細胞がない (図 3-8D) ことから、早期に分化ステップが進行している様子がみられた。しかしながら、120 時間後の解析では、Prdm8 の過剰発現細胞が皮質板の内部に侵入している様子がみられた (図 3-9A, B, C) ことから、Prdm8 の過剰発現は多極性形態を維持するが、分化を完全に抑制する訳ではないことが見出された。さらに、各々の分子マーカーとの共染色を行った結果、Prdm8 の過剰発現では GFP 陽性細胞の移動が遅れる一方で、Prdm8 のノックダウンでは GFP 陽性細胞の移動が早く進む様子が観察された (図 3-10)。

以上の結果から、Prdm8 は多極性形態から双極性形態への形態変化に重要な役割を果たし、Prdm8 の発現レベルが多極性形態期の長さを調節していることが見出された。

3-3. Prdm8 は大脳皮質の層形成を調節する

Prdm8 が生後の層構造の形成に与える影響を調べるため、胎齢 12.5 日目にコントロールベクター、Prdm8 過剰発現ベクター、Prdm8 ノックダウンベクターを子宮内エレクトロポレーション法によって遺伝子導入し、大脳皮質におけるニューロンの移動と層構造の形成がほぼ完了する、生後 5 日目に解析した (図 3-11A)。コントロールでは、胎齢 12.5 日目に遺伝子導入された細胞が主に **IV~VI** 層に配置されているが、Prdm8 を過剰発現した細胞はより上層側に配置される割合が増えるのに対して、Prdm8 をノックダウンした細胞はより下層に優先的に配置されることが明らかになった (図 3-11B-F)。

しかしながら、遺伝子導入細胞の最終的な配置だけでは、①Prdm8 の発現レベルが単に脳室帯で生み出されたニューロンの移動のタイミングに影響を与えた結果として最終的な配置が変化し、細胞の運命そのものには影響を与えていないのか、あるいは②Prdm8 の発現レベルが細胞の運命 (分子特性) の獲得に対しても重要な役割を果たしているのかは分からない。そこで、胎齢 12.5 日目に遺伝子を導入した直後に EdU を腹腔内注射し、S 期の細胞 (その時期に脳室帯において分裂して生み出され、細胞周期を離れた細胞) を標識した (図 3-12A)。その結果、Prdm8 をノックダウンした場合、EdU と GFP の二重陽性細胞の割合が増加し (図 3-12B-E)、その二重陽性細胞は、コントロールと比較してより下層に配置されることが明らかになった (図 3-12F)。このことは、Prdm8 の発現レベルが、胎児期の神経分化のタイミングに直接影響を及ぼす可能性を示唆している。次に、遺伝子導入された細胞の分子特性を、それぞれの層特異的な分子マーカー (第 **VI** 層マーカー: Tbr1、第 **V** 層マーカー: Ctip2、第 **IV** 層マーカー、ROR β 、第 **III/II** 層マーカー: Brn2) との共染色をもとに調べた。その結果、コントロールにおける GFP 陽性細胞は、その位置に応じた分子特性を示しているのに対して (図 3-13A, D, G)、Prdm8 をノックダウンした細胞では、下層 (**V-VI** 層) に配置された細胞で、それぞれの層に応じた分子特性を獲得しているものの割合が顕著に減少しており (図 3-13C, F, I)、Tbr1、Ctip2、ROR β 、Brn2 のどの分子マーカーも陽性にならない細胞が下層に配置していることが明らかになった (図 3-13J)。ただし、

細胞死に向かう細胞は増加していない（データ未掲載）ことから、ある種の細胞集団が選択的に排除されてしまったという可能性は低いと考えられる。これらの結果をまとめると、Prdm8 のノックダウンはニューロンの分化のタイミングに影響を与え、分化したニューロンはより下層に優先的に配置されるが、それらの細胞では層の位置に応じた分子特性が獲得されていないということが確認された。一方で、Prdm8 を過剰発現すると、遺伝子導入細胞はより上層側に配置され、Brn2 陽性細胞の数自体はコントロールと比較して増加した（図 3-13B, E, H）が、その Brn2 陽性細胞の割合は、コントロールと比較して有意な差は確認出来なかった（図 3-13J）。ただし、II/III 層に配置された細胞の中には、細胞の形態特性が異なる Brn2 陰性細胞も確認された（図 3-13K）。

これらの実験から、多極性形態期の推移に伴う Prdm8 の適切な発現が、ニューロン分化のタイミングの制御に重要であり、これが大脳皮質の層形成に決定的な役割を果たす可能性が示唆された。

3-4. Prdm8 による多極性形態期の調節と関連分子の同定

脳室帯から生み出された細胞が細胞周期を離れて分化に向かう際に、多様な遺伝子の発現がそれを制御していることは既に述べたが、特に中間帯の多極性形態期における細胞内在特性、発現遺伝子の変動に関しては、ほとんど明らかにされていない。そこで、Prdm8-mVenus マウスにみられる mVenus タンパク質の中間帯中央部から中間帯上部への非常に限局された発現特性を活かし、後期多極性形態期および最終多極性形態期で発現が高いと思われる候補遺伝子の同定を試みた。具体的には、胎齢 15.5 日目の Prdm8-mVenus の大脳皮質の細胞を分散し、FACS を用いて mVenus 陽性と mVenus 陰性の細胞をそれぞれソートし、回収した（図 3-14A）。これらのソートした細胞を TRIzol に回収し、その後 RNA 抽出・精製後、DNA マイクロアレイ解析を行うことでその遺伝子発現を網羅的に比較した。

その結果、Reeln や Nhlh1 など、この時期の中間帯で限局的に発現している遺伝子の発現が mVenus 陽性の集団で高く、一方で脳室帯・脳室下帯で強く発現する Pax6、Sox2、Hes1、Tbr2

などの発現は mVenus 陰性の集団で高く発現することが確認された (図 3-14B)。マイクロアレイの結果から、90 以上の遺伝子がこの時期の mVenus 陽性細胞で mVenus 陰性細胞と比較して 2 倍以上発現することが示された (表 1)。興味深いことに、これらの後期多極性形態期および最終多極性形態期に優先的に発現していると思われる候補遺伝子の中にはセマフォリン (semaphorin) シグナル (*Plxnd1*, *Ebf3*, *Nrp2*, *sema3c*)、エフリン (ephrin) シグナル (*Epha6*)、スリット (slit) シグナル (*Slit3*) といったガイダンスシグナル分子が含まれることが見出された。このことは、これらのガイダンス分子が、多極性形態期の移動や形態変化と密接に関わっている可能性を示唆している。

更には、マイクロアレイのデータと、Allen Brain Atlas の in situ hybridization のデータベースを照らし合わせ、胎生期の大脳皮質で発現する、後期多極性形態期および最終多極性形態期での発現が期待される 10 遺伝子を最終的に選出した (図 3-15A)。これらの遺伝子が mVenus 陽性細胞で高く発現することは、Real time PCR による比較定量でも確認された。

Prdm8 がこれらの遺伝子と関連性があるか否かを調べるために、胎齢 14.5 日目の大脳皮質細胞を初代培養し、Neon (Life Technology) を用いた遺伝子導入法により、コントロールベクターおよび Prdm8 過剰発現ベクターを、GFP 発現ベクターと共にそれぞれ細胞に導入し、ニューロスフェア培地で 2 日間培養後、FACS を用いて GFP 陽性細胞をソートし、RNA を抽出した。Total RNA から合成した cDNA を用いて、Real time PCR によって候補遺伝子の発現レベルを比較定量した結果、Prdm8 の過剰発現によって候補遺伝子の内のいくつか (*Calb2*, *Nhlh2*, *Ebf3*, *Nrp2*, *Epha6*) の発現が、いずれも抑制された (図 3-15B)。すなわち、Prdm8 とこれらの多極性形態期に発現すると推察されるガイダンス分子が、関連性を有する可能性が示唆された。さらには、Prdm8 と発現の強弱が逆相関を示した *Unc5d* 遺伝子の発現が、Prdm8 の過剰発現によって抑えられることが見出された。一方で、同様の実験系によって *Unc5d* を過剰発現させると、これらの候補遺伝子のいくつか (*Calb2*, *Ebf3*, *Nrp2*, *Epha6*) の発現が抑えられ、また興味深いことに、Prdm8 の発現も抑制されることが示された (図 3-15C)。

これらの結果から、Prdm8 と Unc5d がお互いを抑制し合っていることが明らかになり、またそれらの下流因子と考えられるガイダンス分子の働きが、多極性形態期の多段階の分化過程を制御している可能性が示唆された。

3-5. Prdm8完全ノックアウトマウスの作製

大脳皮質発生過程における Prdm8 の役割をより明確にすることを目的として、Prdm8 タンパク質をコードしている遺伝子領域 (Exon2 から Exon5) をすべて欠失させた、Prdm8 完全ノックアウトマウスを作製した (図 3-16A)。はじめに Exon2 の内部にターゲティングし、Adeno-Cre を処理することで Exon2 の内部に loxP 配列を一つ挿入した。その後 Exon5 の下流に再びターゲティングし、Exon5 の下流に loxP 配列を挿入することで、Exon2 から Exon5 の領域を loxP 配列ではさみこんだ ES 細胞 (*loxP-Prdm8-loxP-FRT-Neo-FRT*) を樹立した。当初 Exon5 下流へのターゲティング効率が非常に低く (8/1000 クローン)、ES 細胞の樹立までに時間がかかることで ES 細胞がうまく受精卵に定着せず、キメラ率の高いキメラマウスを得ることが出来なかった。そこで、Exon5 下流のターゲティングの際に、相同組み替え効率を上昇させることを目的として Blm タンパク質の発現を、siRNA を用いて一過的にノックダウンした (Brown AD et al., 2011) (図 3-16B)。その結果、ターゲティング効率が顕著に上昇し (15/376 クローン)、高い確率で目的の ES 細胞を樹立することに成功した。その後得られた ES 細胞をマウスの受精卵に挿入し、高いキメラ率を持つキメラマウスを選別し、生殖細胞に改変遺伝子が乗っていることを確認後、VASA-Cre マウスとの交配によって、loxP で挟まれた Prdm8 の Exon2 から Exon5 領域を欠いた Prdm8null の遺伝子座をもつマウスを樹立した。実際に生後 13 日目の Prdm8 ノックアウトマウスの脳からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法で確認したところ、Prdm8 タンパク質の消失が確認された (図 3-16C)。また、ノックアウトマウスの大脳皮質の免疫染色の結果からも、Prdm8 タンパク質の欠失が確認された (データ未掲載)。

Prdm8 完全ノックアウトマウスは、メンデルの法則に従って出生するが、生後 5~8 日前後の体

重および脳重量は、野生型と比較して減少することが観察された (図 3-17A)。さらに、*Prdm8* ノックアウトマウスは生後 2 ヶ月齢を過ぎた頃から、皮膚のただれ症状を呈するものが確認された (図 3-17B)。*Prdm8* は皮膚では発現していないことから、この表現型は *Prdm8* ノックアウトマウスの行動異常によって引き起こされている可能性が高いと考えられる。

3-6. *Prdm8* ノックアウトマウスの多極性形態期における表現型解析

上述した *Prdm8* の過剰発現やノックダウンの結果を考慮して、多極性形態期の細胞移動および形態変化に影響があるのではないかと考え、胎齢 14.5 日目の野生型(*Prdm8*^{+/+})、ヘテロ(*Prdm8*^{+/-})、ノックアウト(*Prdm8*^{-/-})のそれぞれの大脳皮質に、子宮内エレクトロポレーション法によって GFP 発現ベクターを遺伝子導入し、54 時間後にその細胞の移動および形態を解析した。その結果、野生型と比較して、ノックアウトマウスでは中間帯における多極性形態細胞 [MP] の割合が減少することが見出された (図 3-18)。

このことから、*Prdm8* の欠損によって、中間帯における多極性形態期の正常な形態変化および推移が、阻害されている可能性が推察される。*Prdm8* のノックアウトマウスにおける表現型は、エレクトロポレーションによる一過的な強制発現やノックダウン実験によって見られた表現型よりも小さかったが、これは *Prdm8* ノックアウトマウスでは、その機能を助けるために別の遺伝子が働き、その影響がレスキューされている結果ではないかと推察される。今後はこのマウスを用いた網羅的な発現解析や、ガイダンス分子を含めた関連分子の詳細な発現を解析し、ターゲット遺伝子の同定を進める予定である。

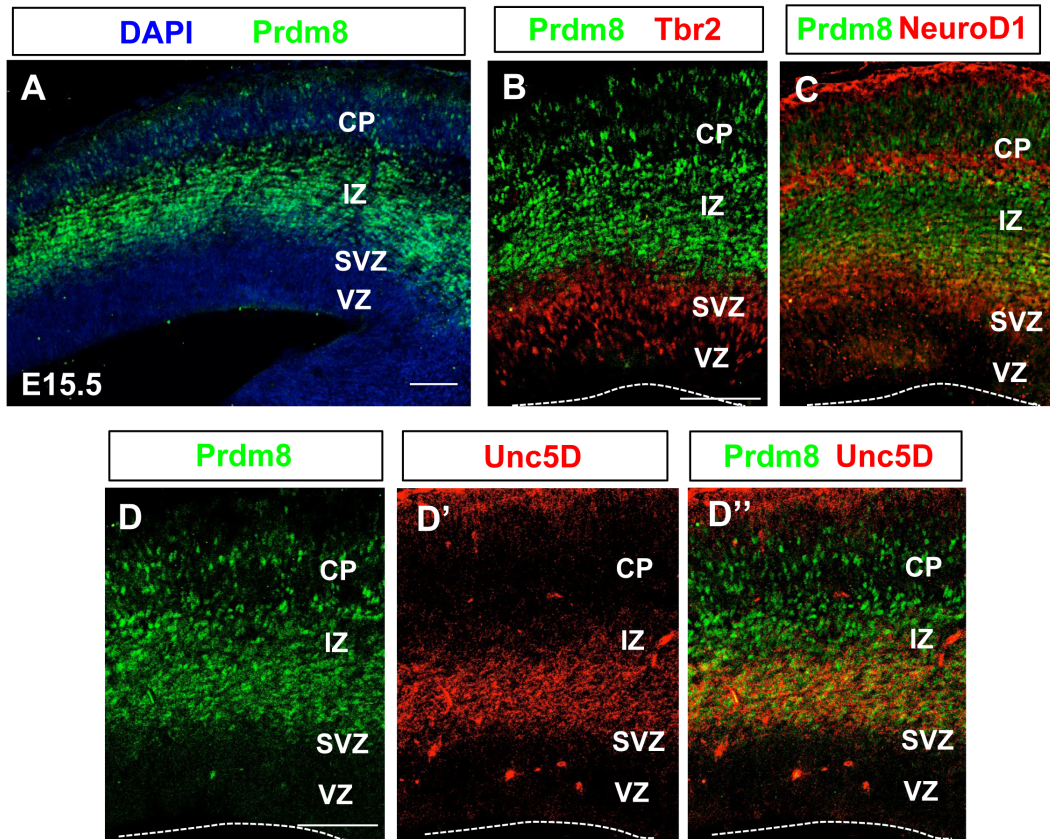


図 3-1: Prdm8 は発生期大脳皮質において中間帯で強く発現する

胎齢 15.5 日目のマウス大脳皮質における発現を、Prdm8 抗体を用いて検出した。Prdm8 は中間帯(IZ)付近で強く発現しており (A)、脳室下帯 (SVZ) のマーカーである Tbr2 とは共発現しない(B)が、中間帯下部のマーカーである NeuroD1 とは一部共発現していた (C)。Prdm8 と Unc5d はその発現領域がほぼ重なり、中間帯中央部から発現がはじまる (D, D', D'')。白線: 100 μ m

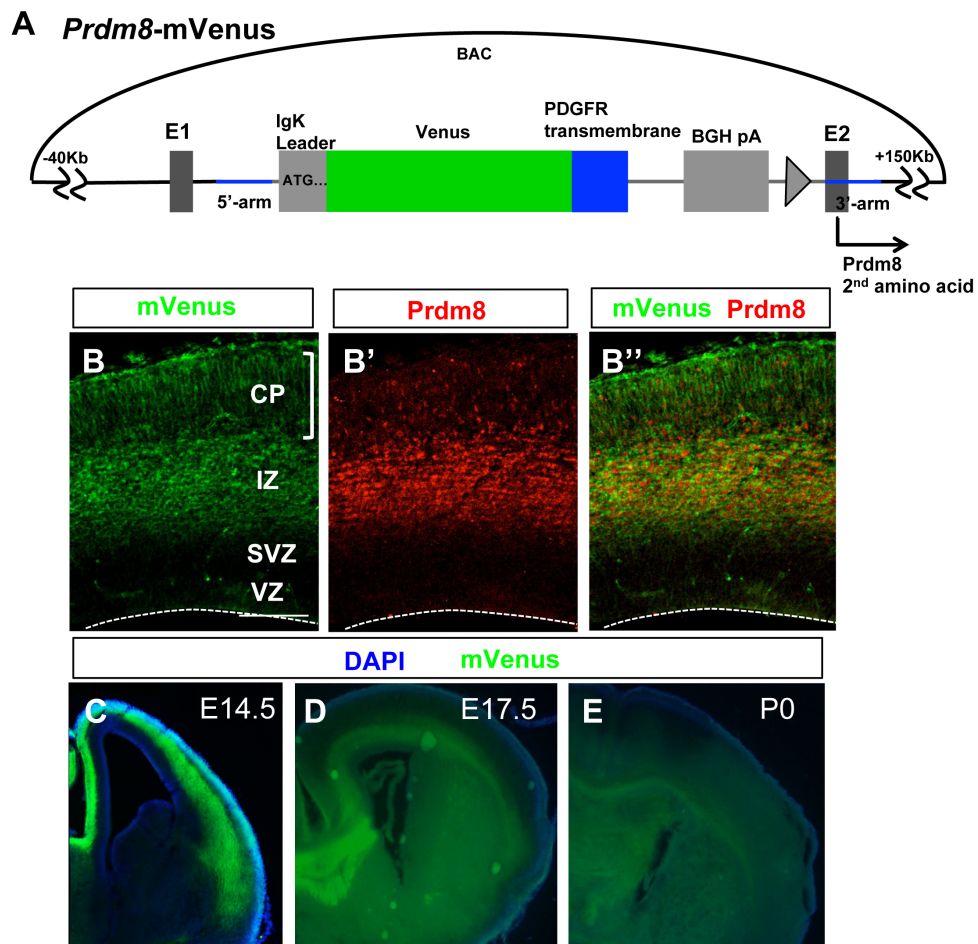


図 3-2: *Prdm8*-mVenus の作製と mVenus の発現

Prdm8-mVenus を作製のストラテジー。*Prdm8* のプロモーター制御下で細胞膜局在型の mVenus タンパク質を発現する (A)。mVenus と内在性の *Prdm8* タンパク質は、胎齢 15.5 日目の大脳皮質においては同領域に発現していることが確認された (B, B', B'')。mVenus の発現は、胎齢 14 日前後の中間帯 (IZ) で強く、その後発現が減少していく (C, D, E)。白線: 100µm

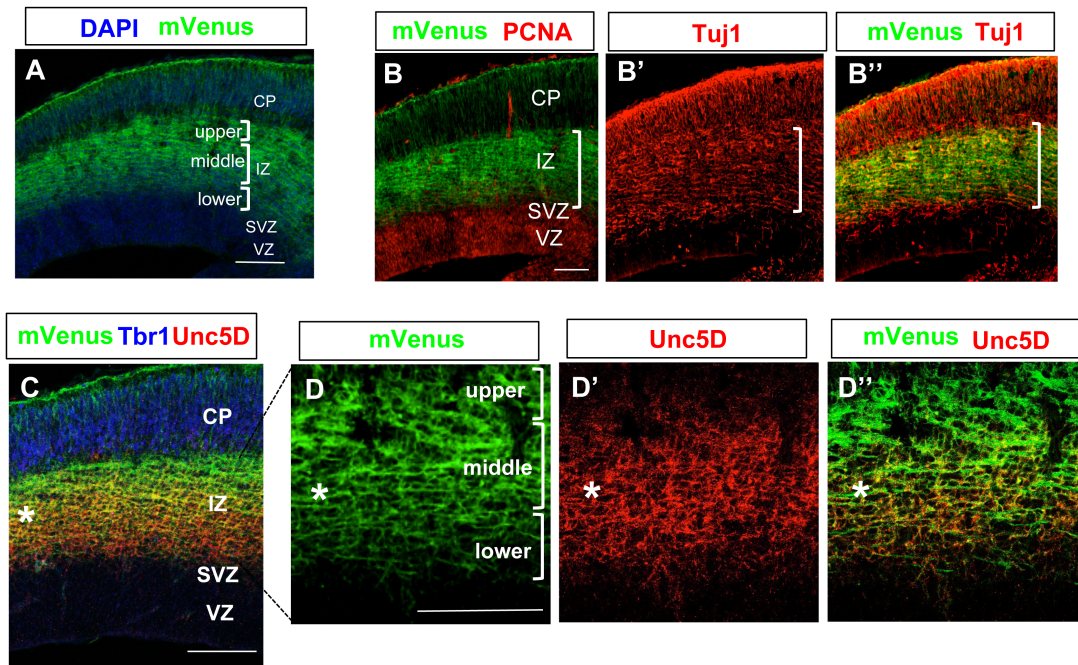


図 3-3: Prdm8 は中間帯の中央部から上部にかけて強く発現し、その発現の強さは Unc5d と逆相関する

胎齢 15.5 日目の *Prdm8*-mVenus を用いた発現解析。mVenus は中間帯 (IZ) で強く発現し (A)、神経前駆細胞ではなく、post-mitotic な細胞でのみ発現することが確認された (B, B', B'')。中間帯中央部で発現する *Unc5d* と皮質版 (CP) で発現する *Tbr1* との共染色の結果、mVenus は中間帯の中央部から上部にかけて発現しており、*Unc5d* の発現が下がり始めるところで、mVenus の発現が上がり始める (*) という、逆相関を示す (D, D', D'')。白線: 100 μ m

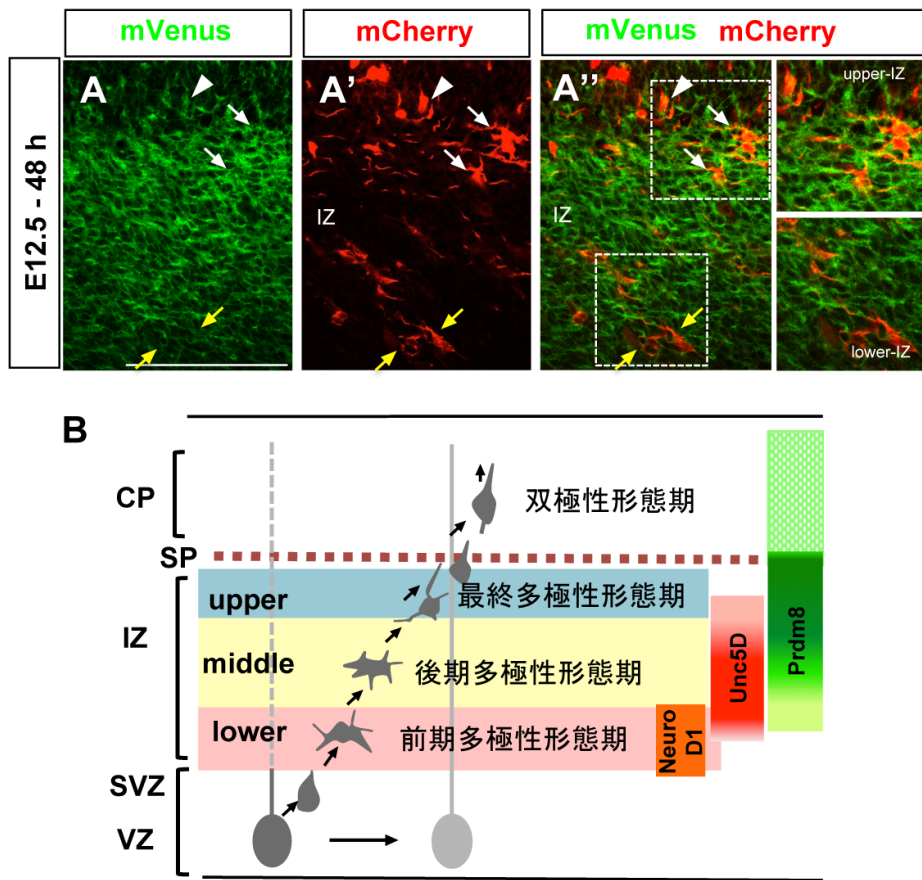


図 3-4: Prdm8 は最終多極性形態期の細胞で強く発現する

胎齢 12.5 日目のマウス大脳皮質に pCAG-mCherry ベクターを子宮内エレクトロポレーション法で導入し、48 時間後に解剖することで、細胞の形態を可視化した (A, A', A'')。Prdm8 は中間帯における位置によって異なる強さを示し、中間帯下部の多極性形態細胞(黄矢印)では弱く、中間帯上部の多極性形態細胞 (白矢印) および形態変化中の細胞 (白矢頭) では強く発現していた。Prdm8 の発現様式と発生期の多極性形態期の進行のまとめ (B)。白線: 100 μ m

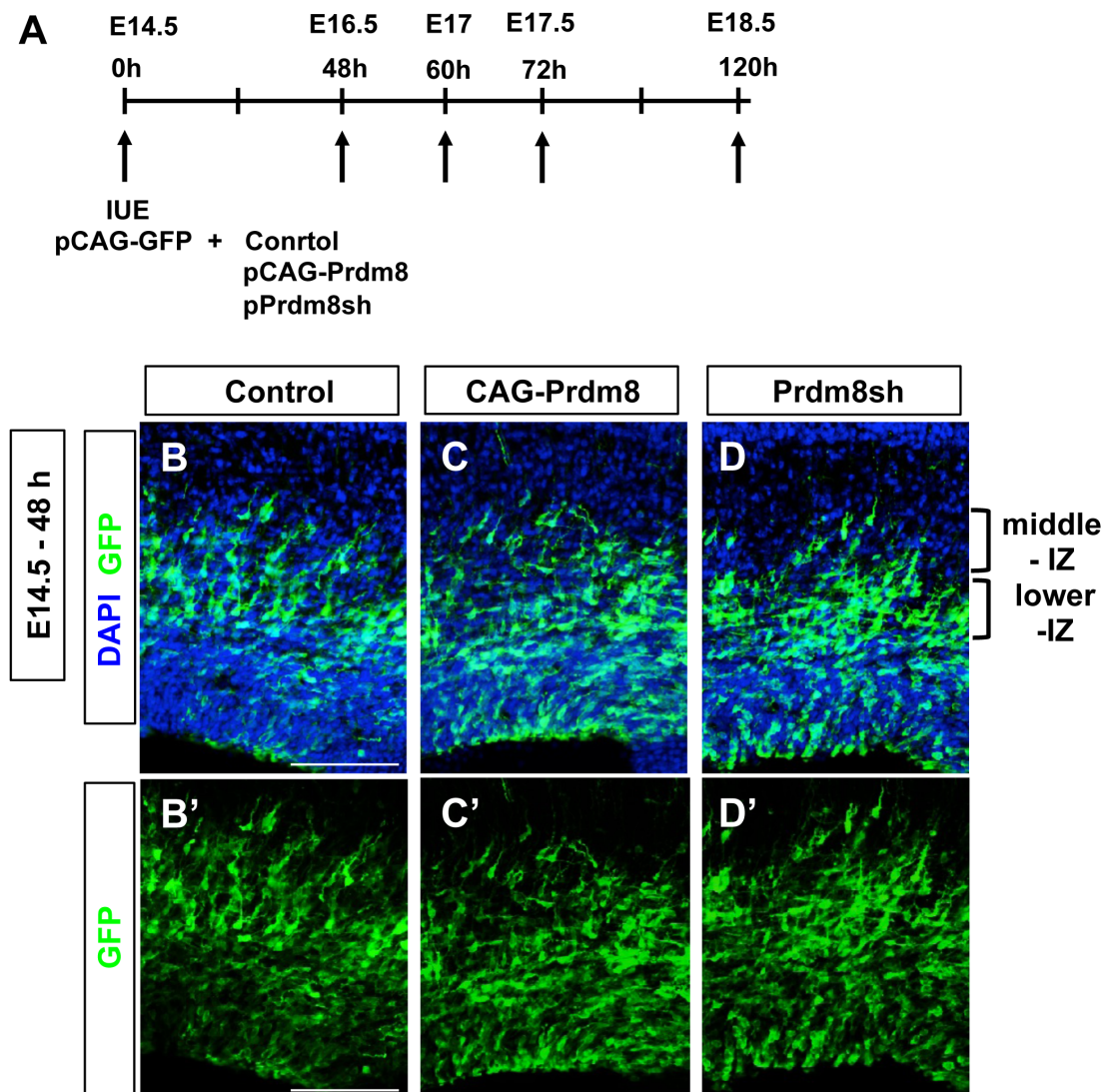


図 3-5: 子宮内エレクトロポレーション法による *in vivo* での Prdm8 の機能解析

子宮内エレクトロポレーション法によって、胎齢 14.5 日目の大脳皮質にコントロールベクター(pCAG-IRES puro)、Prdm8 過剰発現ベクター(pCAG-Prdm8)、ノックダウンベクター(pPrdm8sh)をそれぞれ GFP 発現ベクター(pCAG-GFP)と共に遺伝子導入し、各々のタイミングで解剖し、遺伝子導入細胞に対する影響をそれぞれ評価した (A)。48 時間後に解剖したところ、GFP 陽性細胞の位置に大きな違いはなかったが、Prdm8 の過剰発現で多極性形態を有する細胞の割合の増加傾向がみられた。白線: 100 μ m

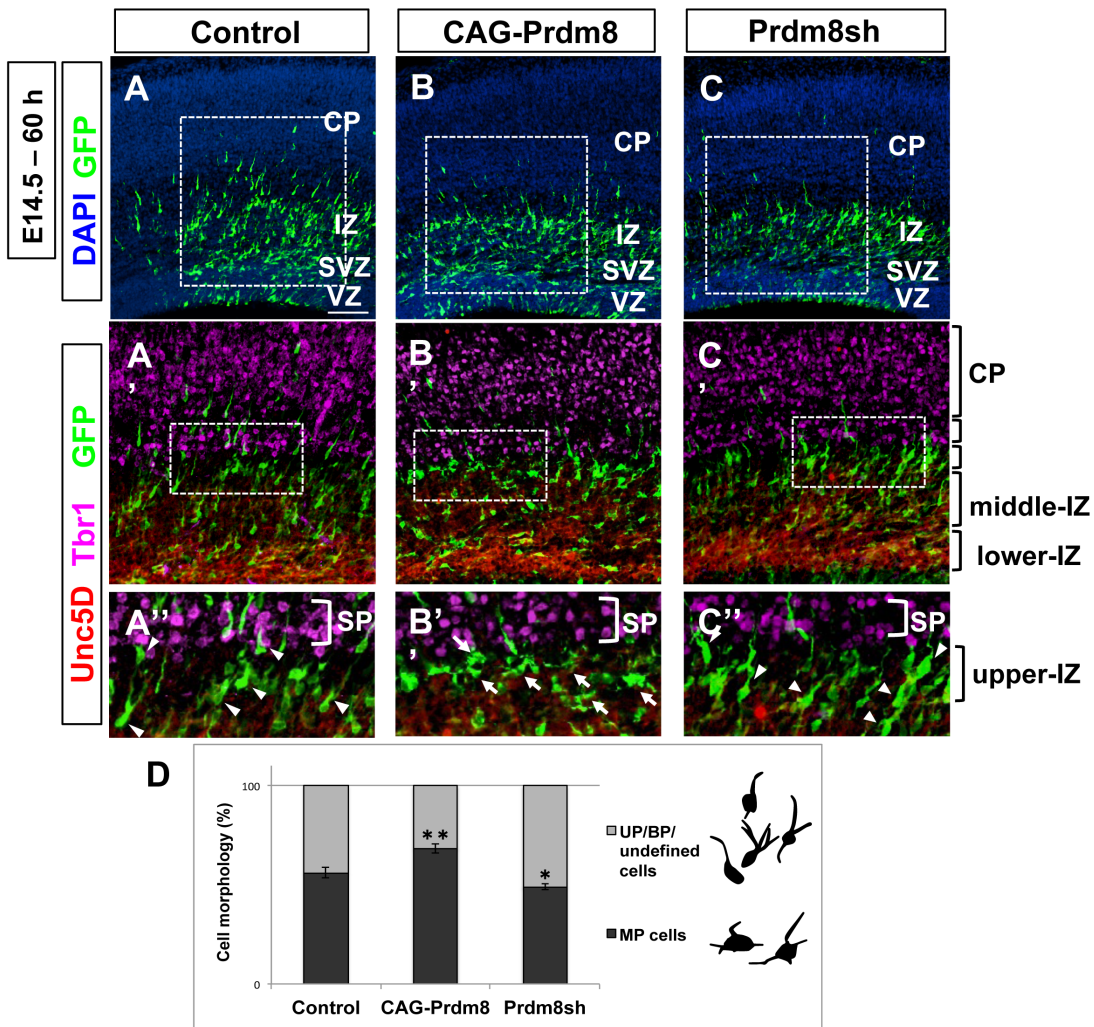


図 3-6: Prdm8 の過剰発現によって、多極性から双極性への変化が抑えられ、多極性形態期が維持される

子宮内エレクトロポレーション法で遺伝子導入後、60 時間後に評価した (A-C)。Prdm8 を過剰発現すると、サブプレート (SP) の下に、多極性形態細胞が維持されていた (B', B'': 矢印)。一方で、Prdm8 をノックダウンすると、双極性形態細胞への早期の分化がみられた (C', C'': 矢頭)。GFP 陽性細胞を多極性形態細胞 [multipolar: MP] と単極性/双極性/その他の形態細胞 [unipolar: UP/bipolar: BP/ undifined] に分けてその割合を比較した。**p<0.01, *p<0.05, 白線: 100μm

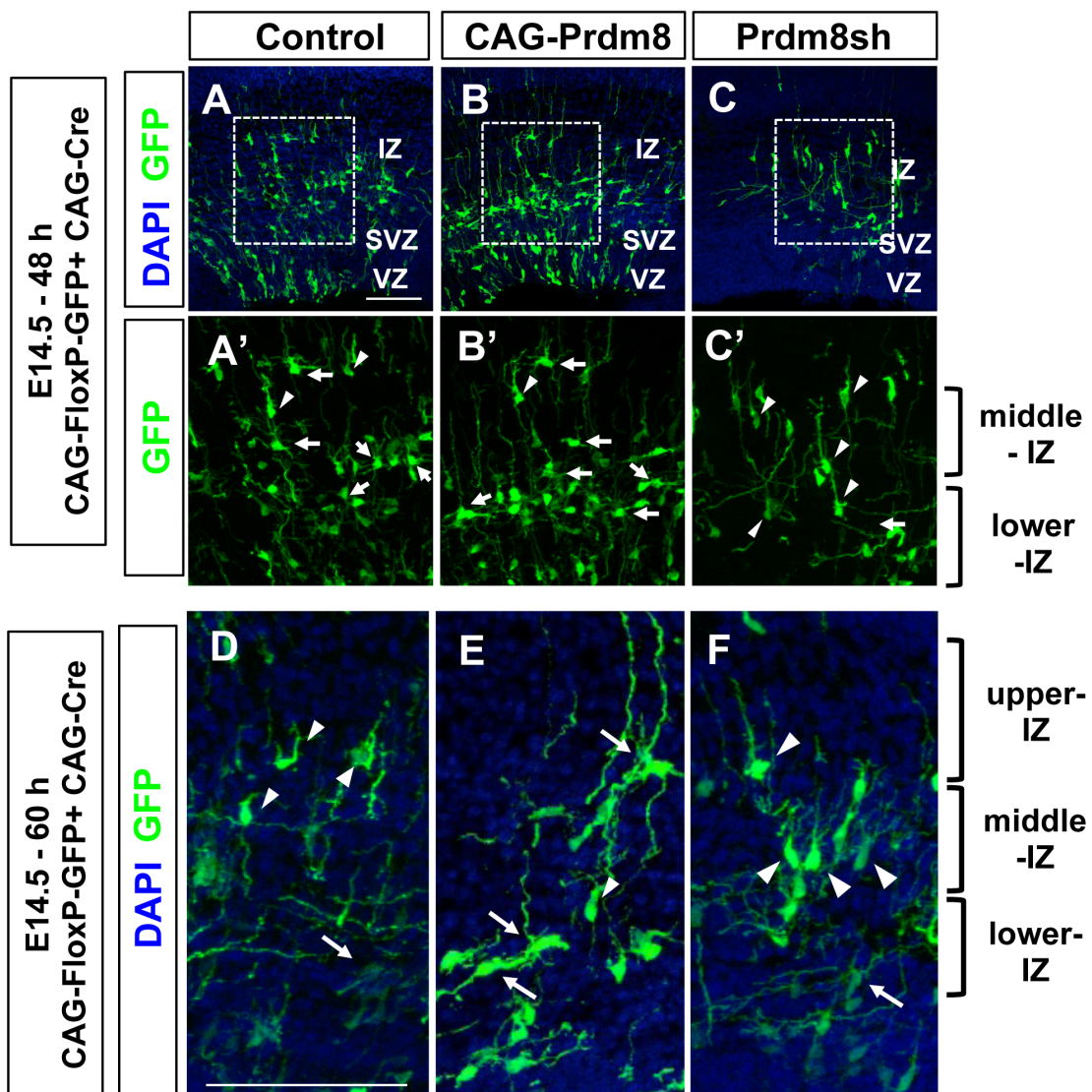


図 3-7: Prdm8 の過剰発現およびノックダウンによって、多極性形態細胞と双極性細胞の割合が変化する

遺伝子導入細胞の形態をより明瞭にするため、pCAG-FloxPGFP ベクターと CAG-Cre を同時に導入し、細胞を単一でラベルした。子宮内エレクトロポレーション法で胎齢 14.5 日目に遺伝子導入後、48 時間 (A-C)、および 60 時間後 (D-F) に評価した。Prdm8 を過剰発現すると、明瞭な多極性形態細胞が増加し (B, B', E: 矢印)、一方で、Prdm8 をノックダウンすると、双極性形態細胞が増加した (C, C', F: 矢頭)。白線: 100 μ m

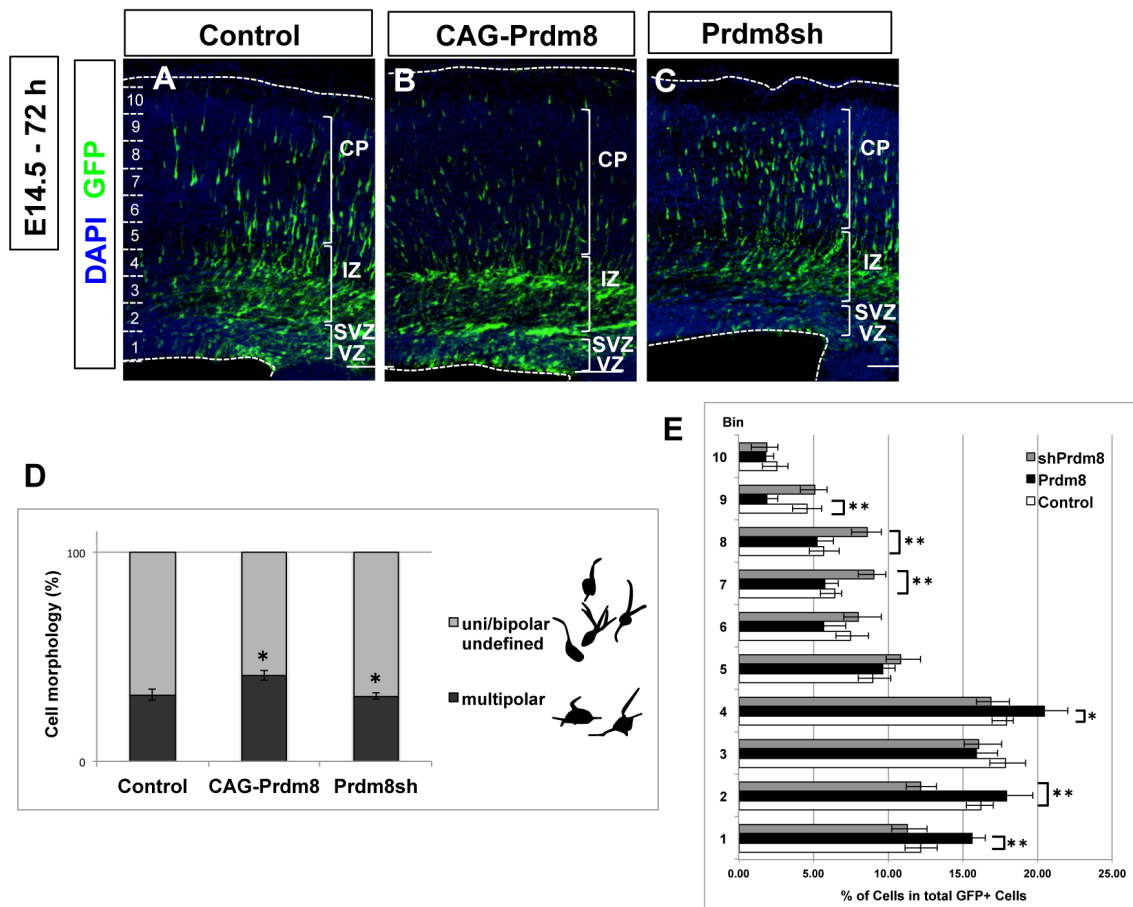


図 3-8: Prdm8 の過剰発現によって多極性形細胞が増加し、皮質板に侵入できずにサブプレート下方に維持される一方で、Prdm8 をノックダウンすると、多極性形態細胞が減少して皮質板への侵入が促進される

子宮内エレクトロポレーション法で遺伝子導入後、72 時間後に評価し (A-C)、GFP 陽性細胞を多極性形態細胞 [MP] と単極性/双極性/その他の形態細胞 [UP/ BP/ undefined] に分類し、その割合を比較した (D)。Prdm8 を過剰発現すると、多極性形態細胞が維持されて増加し、皮質板 (CP) に侵入していない細胞が多くみられた (B, D)。一方で Prdm8 をノックダウンすると、早期に多極性形態細胞から分化し、皮質板に侵入している細胞が多くみられた (C, D)。GFP 陽性細胞の位置を Bin で示し、全ての GFP 陽性細胞に対する割合を算出したところ、Prdm8 の過剰発現では皮質板より下の領域に GFP 陽性細胞が維持されていること、一方で Prdm8 のノックダウンで皮質板領域の細胞の割合が増加していることが確認された (E)。**p<0.01, *p<0.05, 白線: 100µm

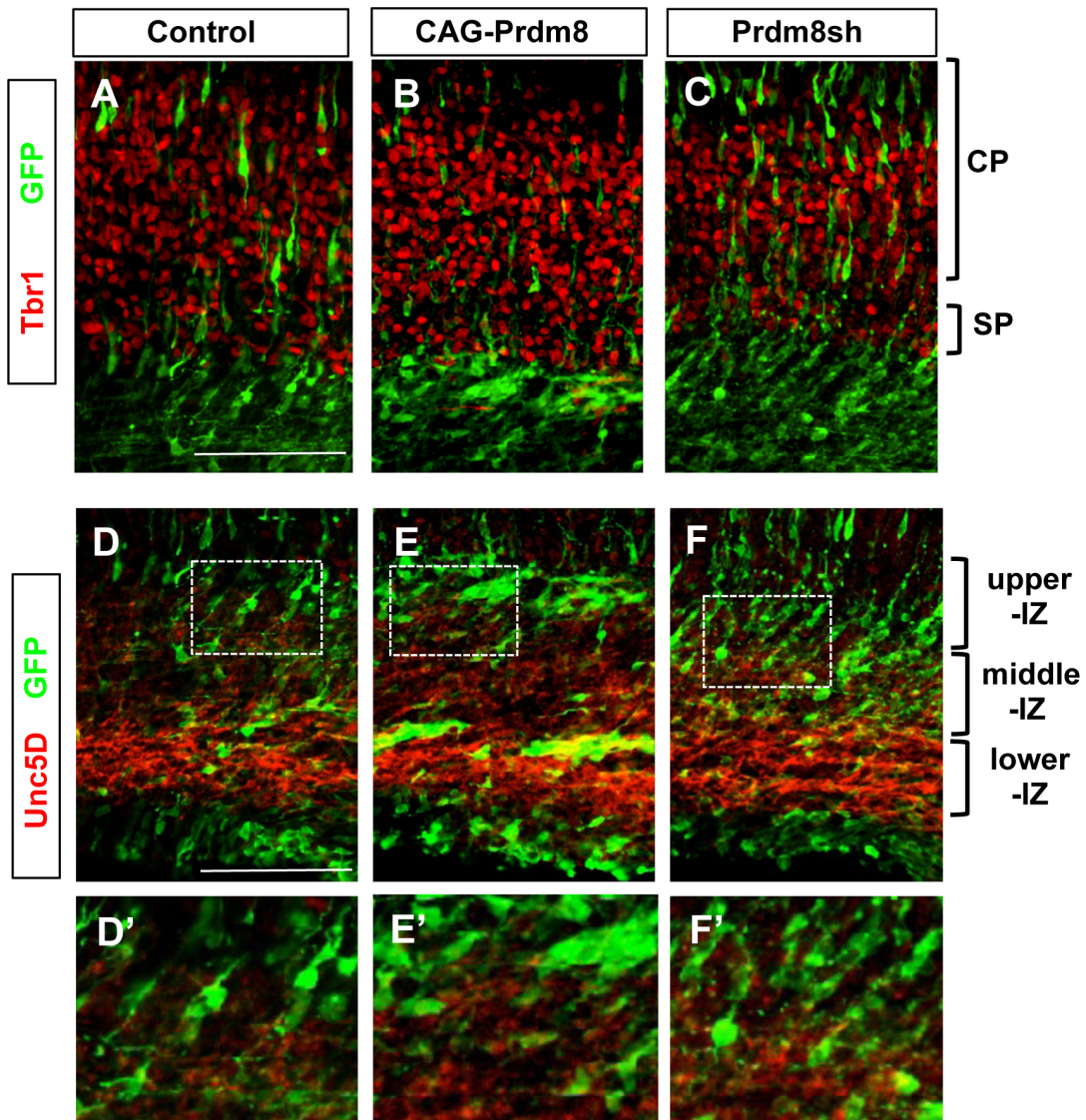


図 3-9: Prdm8 の過剰発現によって増加した多極性形態細胞は、Unc5d を発現しない
 遺伝子導入後 72 時間後の大脳皮質を、サブプレート (SP) および皮質板 (CP) の分子マ
 ーカーである Tbr1 と (A-C) 後期多極性形態細胞の分子マーカーである Unc5d で共染色した
 (D-F)。Prdm8 を過剰発現すると、多極性形態細胞が維持されて増加し、サブプレートを通
 過できない細胞が多くみられる (B) が、この多極性形態細胞は Unc5d を発現していなかつ
 た (E, E')。一方で Prdm8 をノックダウンすると、早期に多極性形態細胞から分化し、皮質
 板に侵入している細胞が多くみられた (C, F)。白線: 100 μ m

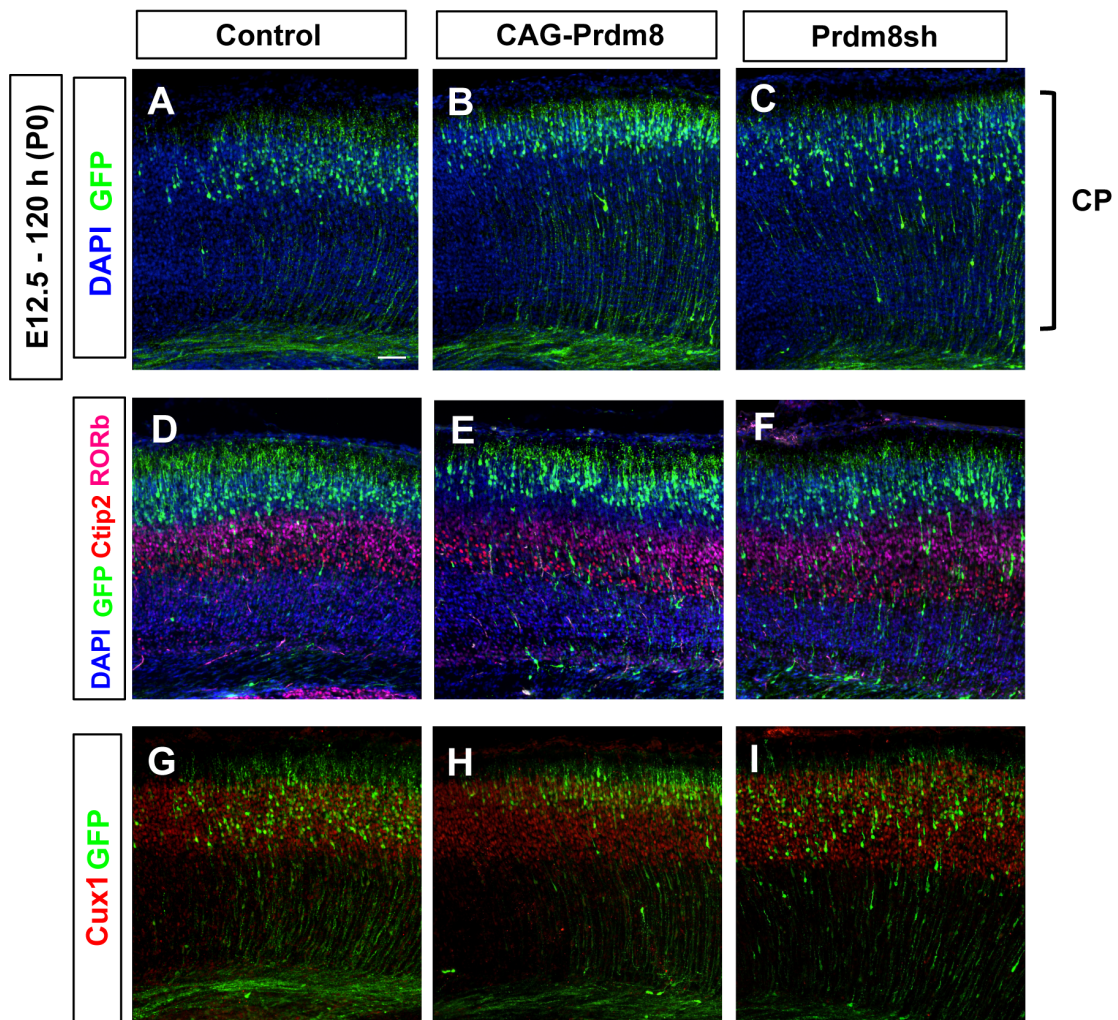


図 3-10: Prdm8 は、多極性形態期の長さを調節する

遺伝子導入後 120 時間の脳皮質において GFP 陽性細胞の位置を解析する (A-C) と、Prdm8 の過剰発現で皮質板 (CP) に侵入できずに維持されていた多極性細胞が、皮質板に侵入している様子が観察され、Prdm8 は多極性形態の長さを維持している可能性が示唆された。各層のマーカ (Ctip2: 第 V 層、ROR β : 第 IV 層、Cux1: 第 II-IV 層) と共染色し、GFP 陽性細胞の位置を明確にした (D-I)。

GFP 陽性細胞は、インサイドアウトパターンで先に移動した細胞が下に配置するようになるが、Prdm8 の過剰発現で細胞が遅れて移動することで、より上層に (E, H)、一方で Prdm8 のノックダウンで細胞移動のタイミングが乱れて、本来の配置とは異なる位置にも GFP 陽性細胞が配置されている (F, I)。白線: 100 μ m

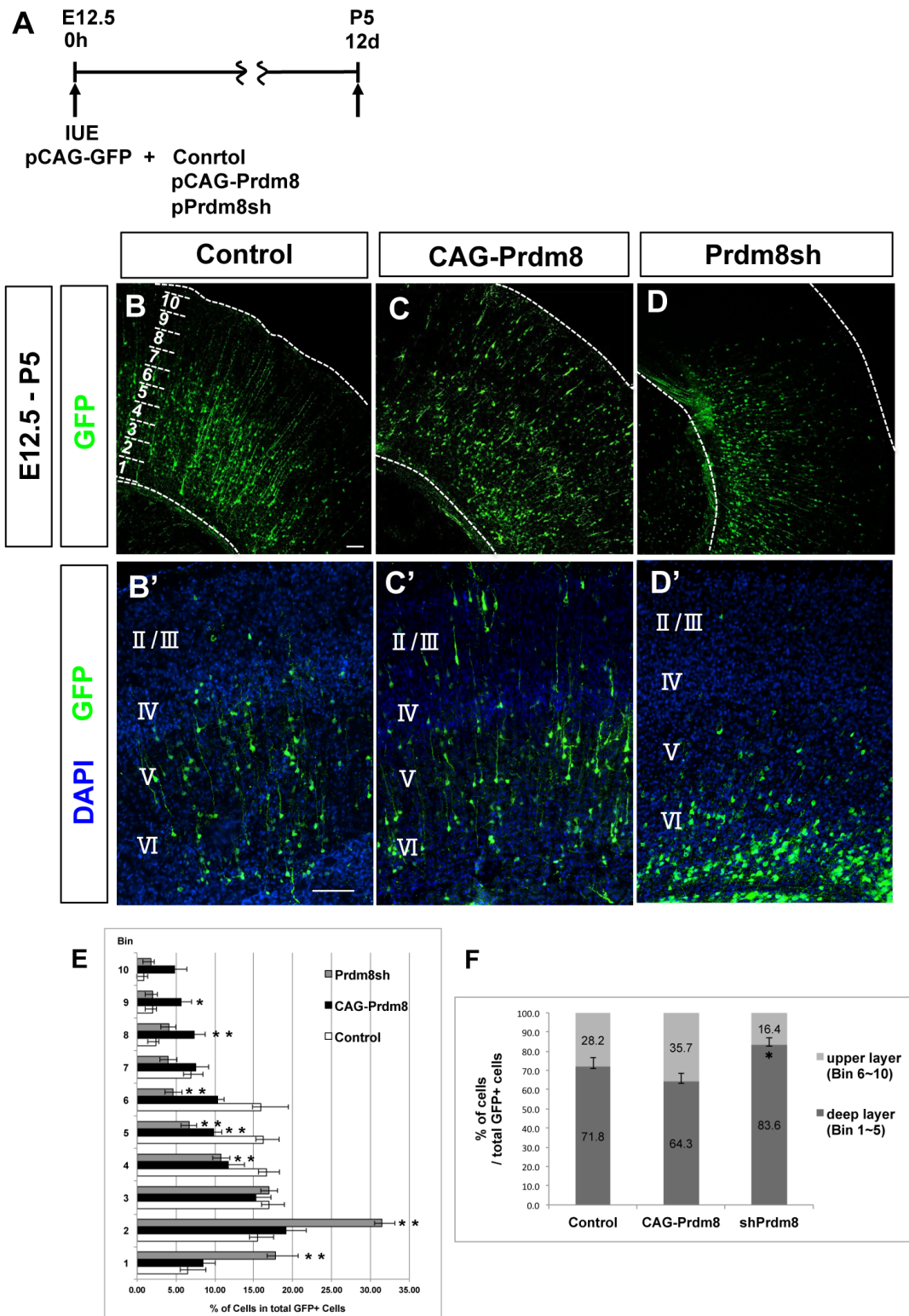


図 3-11: Prdm8 は、正常な層形成に影響を及ぼす

図 3-11: Prdm8 は、正常な層形成に影響を及ぼす

Prdm8 が生後の層構造の形成に影響を及ぼすかを調べるために、胎齢 12.5 日目に Prdm8 の過剰発現ベクター、およびノックダウンベクターを遺伝子導入して、層構造の形成がほぼ完了する、生後 5 日で解析した (A)。コントロールでは、主に **IV-VI** 層あたりに GFP 陽性細胞が配置する (B, B') が、Prdm8 を過剰発現すると、より上層 (**II-III** 層) に配置する GFP 陽性細胞が増加し (C, C')、一方で Prdm8 をノックダウンすると、**V-VI** 層に配置する細胞が増加した (D, D')。

GFP 陽性細胞の位置を Bin で示し、GFP 陽性細胞全体に対する割合を算出した (E) ところ、Prdm8 の過剰発現では上層に配置する GFP 陽性細胞の割合が増加する一方で (Bin8, 9)、Prdm8 のノックダウンでは下層に配置される割合が (Bin1,2) 顕著に増加していた。Bin1~5 をおおよその下層 (**V-VI** 層)、Bin6~10 をおおよその上層 (**II-IV** 層) として GFP 陽性細胞の割合を算出すると、特に Prdm8 のノックダウンによって、下層の割合が顕著に増加していることが確認された。**p<0.01, *p<0.05, 白線: 100 μ m

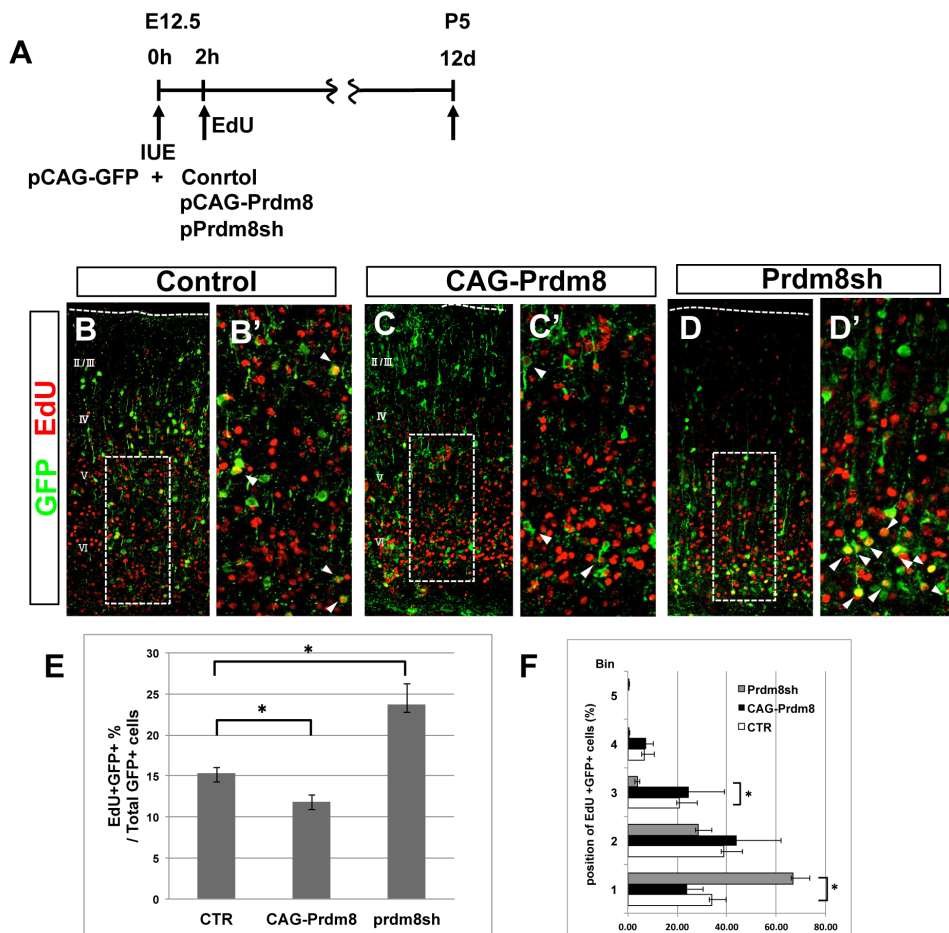


図 3-12: Prdm8 のノックダウンにより、早生まれのニューロンが増加する

図 3-12: Prdm8 のノックダウンにより、早生まれのニューロンが増加する

胎齢 12.5 日目に遺伝子導入し、その 2 時間後に EdU を腹腔内投与することで、その時期に細胞周期から離れ、分化に進む細胞をラベルした (A)。EdU と GFP で染色後 (B)、GFP 陽性細胞における EdU 陽性細胞の割合を調べた結果、Prdm8 をノックダウンすると、EdU 陽性且つ GFP 陽性の細胞が顕著に増加し、過剰発現した場合は減少した (C)。これは、Prdm8 のノックダウンによって、早生まれのニューロンが増加していることを示している。

EdU 陽性且つ GFP 陽性細胞の位置を Bin で算出すると、Prdm8 のノックダウンによって増加した早生まれのニューロンが、コントロールと比較してより深層に配置していることが観察された (D)。* $p < 0.05$, 白線: 100 μm

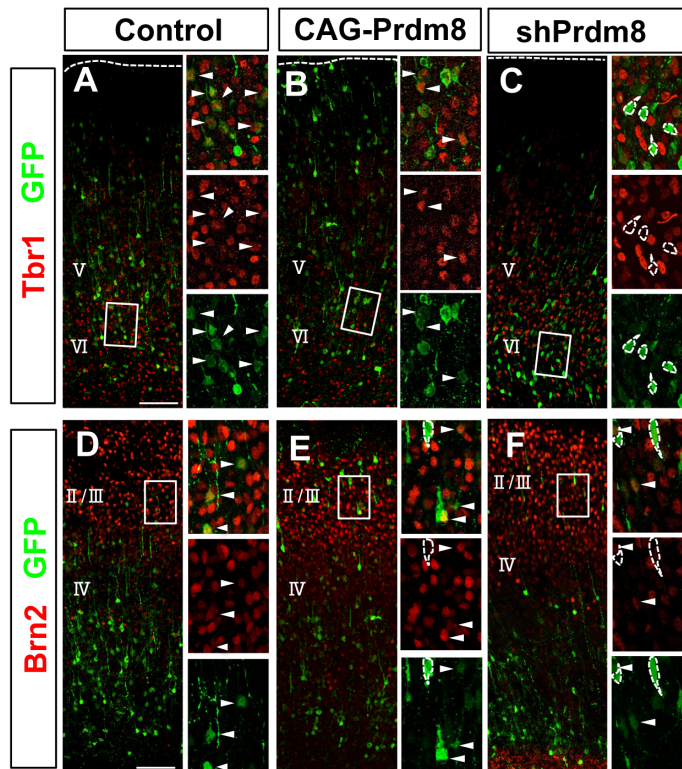


図 3-13: Prdm8 は、正常な分化運命の獲得に影響を及ぼす

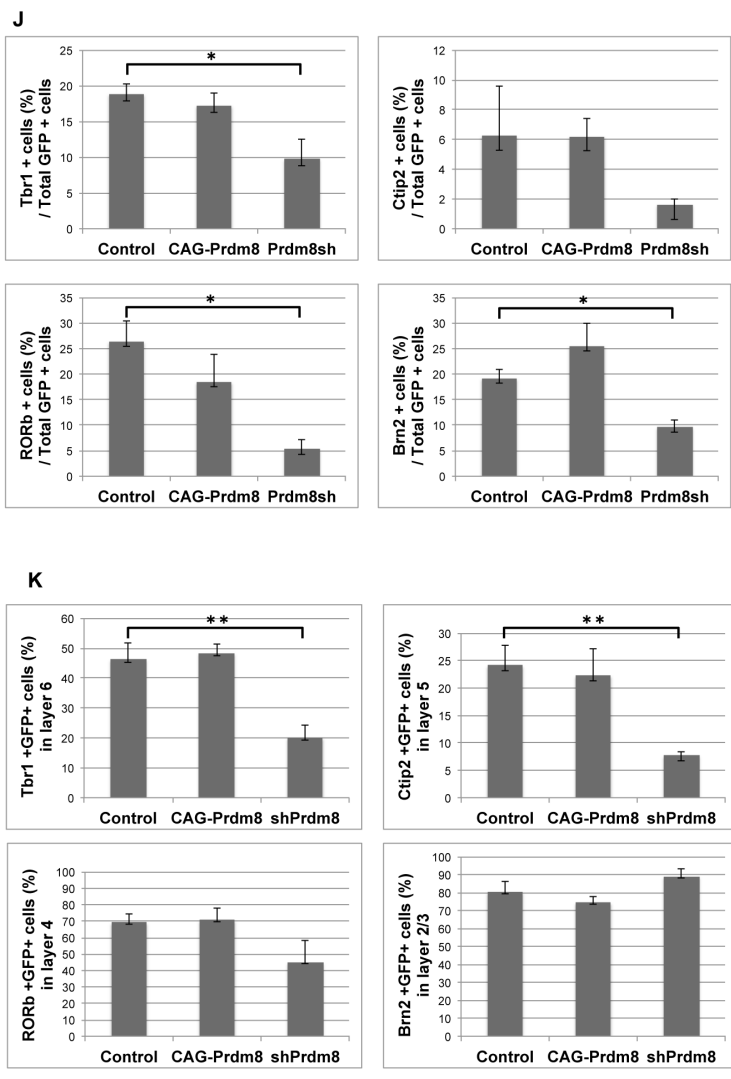
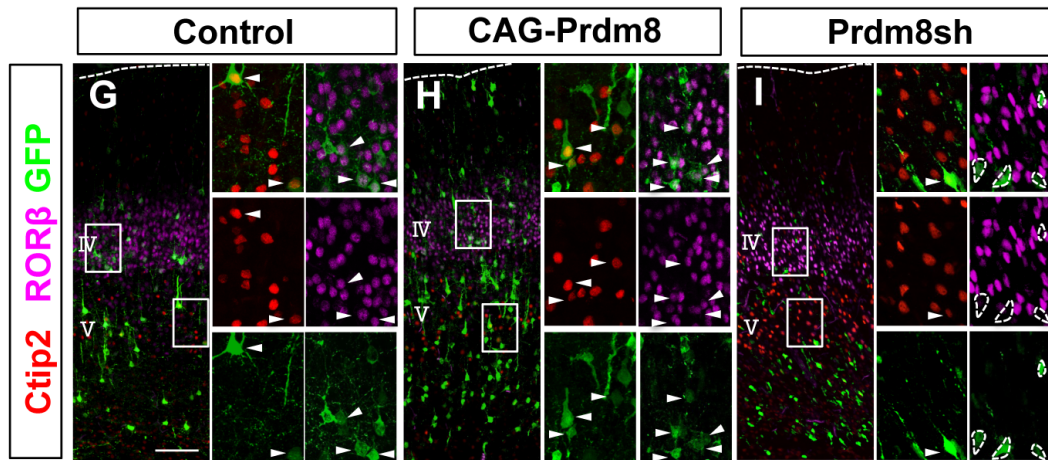


図 3-13: Prdm8 は、正常な分化運命の獲得に影響を及ぼす
胎齢 12.5 日目に遺伝子導入した細胞が、生後 5 日目にどのような分子特性を獲得しているかを検討するために、各層の分子マーカー(第 VI 層: Tbr1; A-C、第 V 層: Ctip2; G-I、第 IV 層: RORβ; G-I、第 II/III 層: Brn2; D-F) との共染色を行った。全ての GFP 陽性細胞における分子マーカー陽性の割合を調べたところ (J)、特に Prdm8 のノックダウンでは、それぞれの分子マーカーの特性を獲得している細胞が減少していた。また、各層の GFP 陽性細胞における分子マーカー陽性の割合を調べたところ (K)、Prdm8 をノックダウンすると、特に V-VI 層に配置している細胞が、相当する分子マーカーを獲得できないことが明らかになった。* $p < 0.05$, 白線: 100 μ m

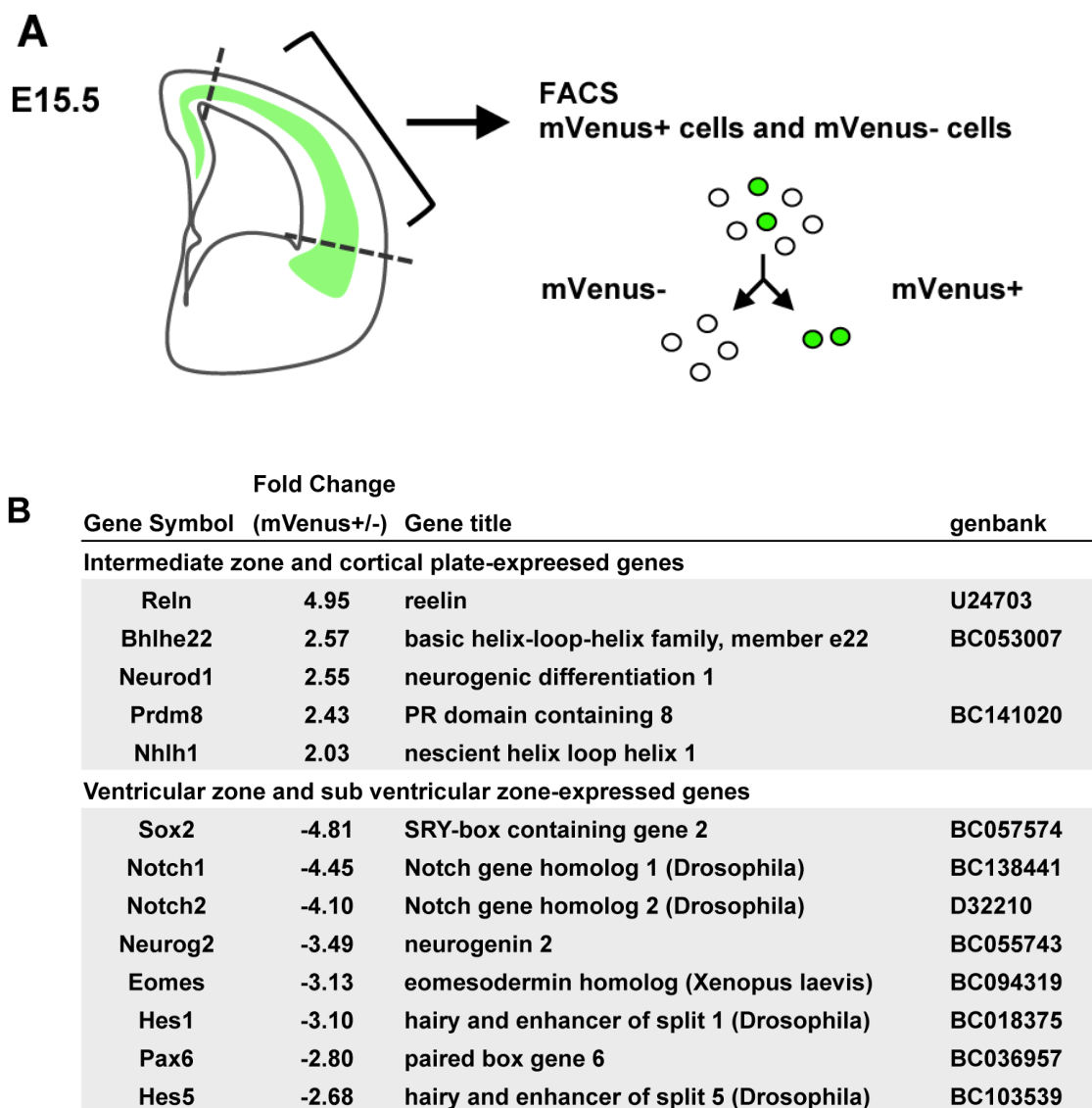


図 3-14: *Prdm8*-mVenus マウスを用いた網羅的発現解析

胎齢 15.5 日目の *Prdm8*-mVenus マウス大脳皮質を用いて mVenus 陽性細胞 (mVenus+) と mVenus 陰性細胞 (mVenus-) をソートし、マイクロアレイを用いて発現遺伝子を網羅的に比較解析した (A)。mVenus の発現と一致して、mVenus 陽性細胞では中間帯 (intermediate zone) や皮質板 (cortical plate) で発現する遺伝子が顕著に発現しており、脳室帯や脳室下帯で発現する遺伝子は低下していた (B)。

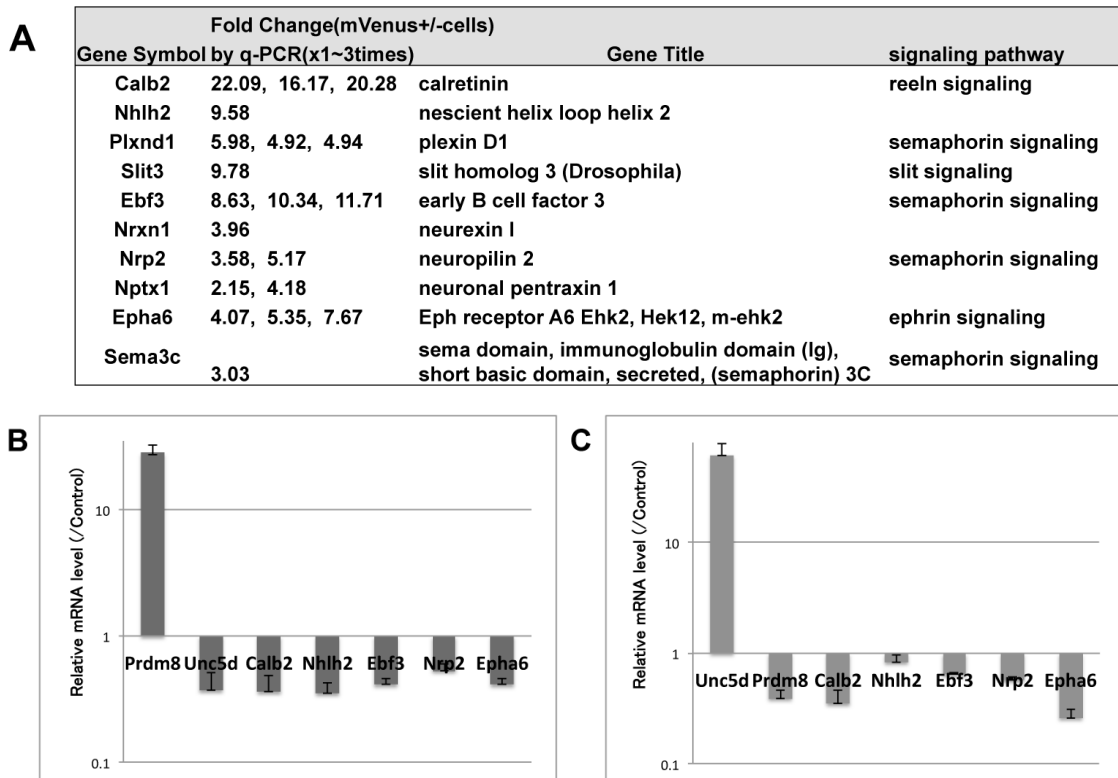


図 3-15: Prdm8 はガイダンス分子の発現を抑制する

mVenus 陽性細胞で高く発現する遺伝子として、複数のガイダンス分子が含まれており、胎齢 15.5 日目の中間帯中央部から上部にかけて強く発現する候補遺伝子として 10 遺伝子を選別した (A)。分散した大脳皮質の初培養細胞を用いて Prdm8 の過剰発現ベクターを遺伝子導入し、2 日後に回収した細胞の RNA を抽出し、mRNA の発現を調べたところ、Unc5d と、これらのガイダンス分子のいくつかの発現がどちらも抑制されていた (B)。また逆に、Unc5d の過剰発現によっても、Prdm8 とこれらの候補ガイダンス分子の一部の発現が抑制されていた (C)。

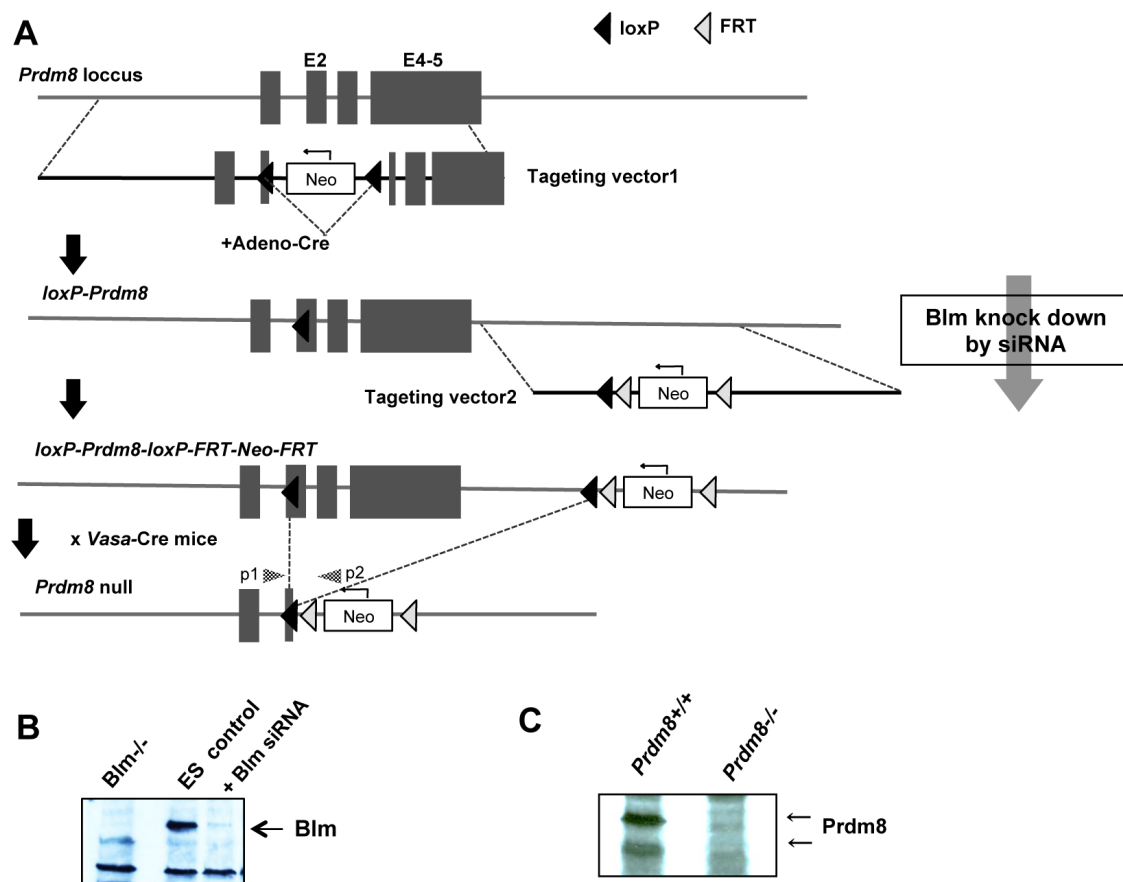


図 3-16: *Prdm8* 完全ノックアウトマウスの作製

Prdm8 完全ノックアウトマウス作製のストラテジー (A)。Exon2 の内部と Exon5 の下流に 2 回ターゲティングを行った。Exon5 の下流のターゲティングの際、相同組み替え効率を上げるために、ヘリカーゼの一種である *Blm* タンパク質を一過的にノックダウンした。*Blm* のノックダウン効率は、western blot で確認した (B)。*Prdm8* をコードする Exon2~Exon5 の領域を loxP 配列で挟んだ ES 細胞をマウスにインジェクションし、キメラマウスを得た。生殖細胞に遺伝子改変 ES 細胞が組み込まれたマウスと、生殖細胞で *Cre* を発現する *VASA-Cre* マウスを交配して、*Prdm8* の完全欠損マウスを得た。生後 13 日の *Prdm8* ノックアウトマウスの終脳で、*Prdm8* タンパク質の消失を確認した (C)。

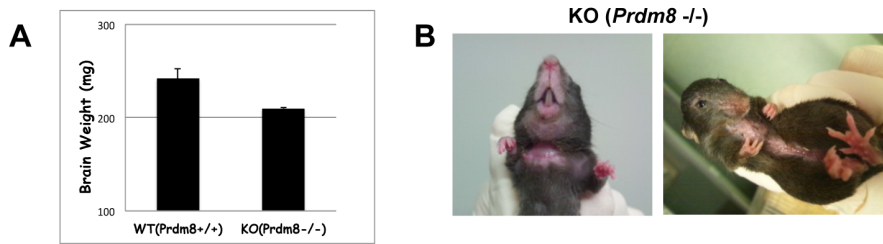


図 3-17: *Prdm8* ノックアウトマウスは、体が小さく、皮膚のただれ症状を呈する
 生後 5 日目の *Prdm8* ノックアウトマウスの脳重量を比較すると、野生型と比較して小さい傾
 向がみられた (A)。また、ノックアウトマウスは週齢を重ねると、一定の割合で皮膚のただ
 れ症状を示した (B)。

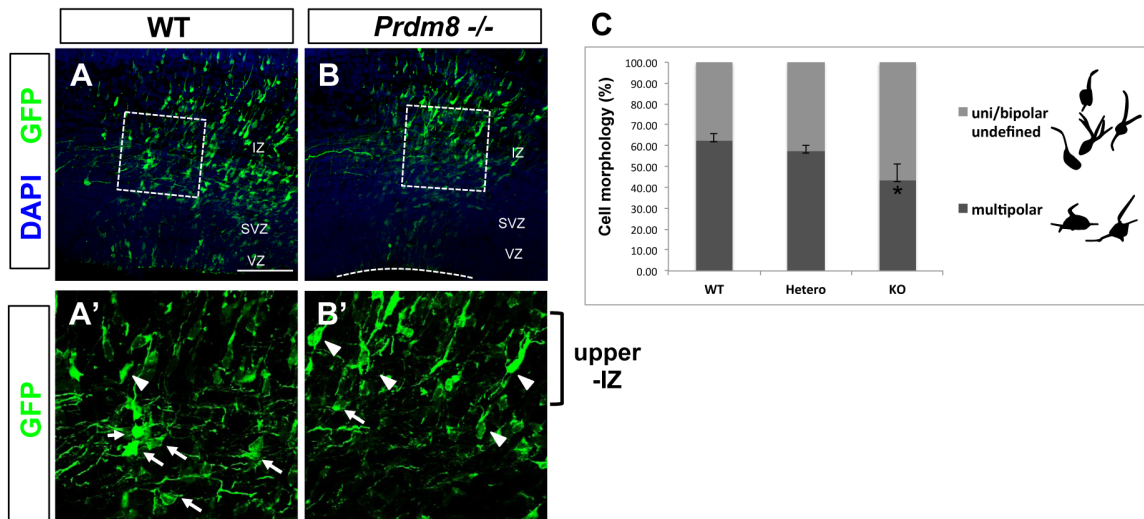


図 3-18: *Prdm8* ノックアウトマウスでは、細胞の移動と形態変化に異常がみられる
Prdm8 ノックアウトマウス的大脑皮質細胞移動と形態変化を調べるため、胎齢 13.5 日目のマ
 ウスに GFP 発現ベクターを遺伝子導入し、54 時間後に解析した (A, B)。*Prdm8* ノックア
 ウトマウスでは、野生型と比較して分化が進み、多極性形態細胞が減少した (A', B')。[MP]
 と [UP/ BP/ undifined] の割合を比較した結果、中間帯 (IZ) における [MP] の割合の顕
 著な減少が確認された (C)。* $p < 0.05$, 白線: 100 μ m

表 1. *Prdm8*-mVenus 陽性細胞で顕著に発現する遺伝子

Gene Symbol	Fold Change (mVenus+/-)	Gene Title	Genbank
<i>Hbb-y</i>	13.80	hemoglobin Y, beta-like embryonic chain	BC057014
<i>A930038C07Ri</i>	8.64	RIKEN cDNA A930038C07 gene	BC047154
<i>Calb2</i>	8.62	calbindin 2	BC017646
<i>Grp</i>	7.30	gastrin releasing peptide	BC024515
<i>Fam163a</i>	6.72	family with sequence similarity 163, member A	BC116972
<i>Ifi203</i>	6.37	interferon activated gene 203	AF022371
<i>Crym</i>	6.22	crystallin, mu	AF039391
<i>Rgs4</i>	5.48	regulator of G-protein signaling 4	DQ346660
<i>Crabp1</i>	4.98	cellular retinoic acid binding protein I	X15789
<i>Reln</i>	4.95	reelin	U24703
<i>Trp73</i>	4.65	transformation related protein 73	BC066045
<i>Gabra2</i>	4.44	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 2	M86567
<i>Rerg</i>	4.23	RAS-like, estrogen-regulated, growth-inhibitor	BC026463
<i>Nr4a3</i>	3.91	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	BC068150
<i>Nhlh2</i>	3.89	nescient helix loop helix 2	BC058413
<i>Slit3</i>	3.85	slit homolog 3 (Drosophila)	BC150780
<i>5330417C22Rik</i>	3.84	RIKEN cDNA 5330417C22 gene	BC051424
<i>Ppp2r2c</i>	3.82	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), gamma isoform	BC059811
<i>Rit2</i>	3.82	Ras-like without CAAX 2	BC018267
<i>S100a10</i>	3.76	S100 calcium binding protein A10 (calpactin)	BC025044
<i>Mab2111</i>	3.58	mab-21-like 1 (C. elegans)	AF228913
<i>Cacna2d2</i>	3.52	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2	BC158058
<i>Ebf3</i>	3.48	early B-cell factor 3	BC067018
<i>Car10</i>	3.42	carbonic anhydrase 10	AB080741
<i>Tuft1</i>	3.38	tuftelin 1	BC019213
<i>Mical2</i>	3.35	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2	AK220353
<i>Cpne4</i>	3.31	copine IV	BC043087
<i>Tacr3</i>	3.29	tachykinin receptor 3	BC066845
<i>St6galnac5</i>	3.26	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide	AB028840
<i>Epha6</i>	3.26	Eph receptor A6	U58332
<i>Hcn1</i>	3.23	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 1	AF028737
<i>Cryab Hspb2</i>	3.23	crystallin, alpha B heat shock protein 2	BC094033
<i>Olfml2b</i>	3.22	olfactomedin-like 2B	BC025654
<i>Rcan2</i>	3.21	regulator of calcineurin 2	BC049096
<i>Pcdh20</i>	3.18	protocadherin 20	BC079605
<i>Plxnd1</i>	3.12	plexin D1	AY688678
<i>Lhx5</i>	3.00	LIM homeobox protein 5	U61155
<i>Pde1a</i>	2.99	phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	BC090628
<i>Slc7a8</i>	2.99	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 8	BC059004
<i>B830028B13Ri</i>	2.97	RIKEN cDNA B830028B13 gene	BC158077
<i>Cacna2d3</i>	2.96	calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 3	CR457444
<i>Fam70a</i>	2.94	family with sequence similarity 70, member A	BC062956
<i>Nrp2</i>	2.94	neuropilin 2	AF483506
<i>Zfp385b</i>	2.92	zinc finger protein 385B	BC132352
<i>Pappa2</i>	2.84	pappalysin 2	BC104644
<i>Clstn2</i>	2.84	calsyntenin 2	BC063058
<i>Cck</i>	2.81	cholecystokinin	BC028487
<i>Stxbp5l</i>	2.81	syntaxin binding protein 5-like	AY542324
<i>Sphkap</i>	2.80	SPHK1 interactor, AKAP domain containing	BC069832
<i>Gabbr2</i>	2.78	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	AF095784
<i>Lhx1</i>	2.77	LIM homeobox protein 1	BC092374
<i>Chrna7</i>	2.77	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 7	L37663
<i>Mctp1</i>	2.77	multiple C2 domains, transmembrane 1	BC030005
<i>Mgat4c</i>	2.73	mannosyl (alpha-1,3)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme C	BC046987
<i>Nrip3</i>	2.73	nuclear receptor interacting protein 3	BC072641
<i>1810041L15Rik</i>	2.70	RIKEN cDNA 1810041L15 gene	BC062953
<i>Lhx9</i>	2.68	LIM homeobox protein 9	BC072623
<i>Ache</i>	2.66	acetylcholinesterase	BC046327
<i>Slc4a4</i>	2.63	solute carrier family 4 (anion exchanger), member 4	AF141934
<i>Nrxn1</i>	2.62	neurexin I	BC047146
<i>Shisa6</i>	2.62	shisa homolog 6 (Xenopus laevis)	NM207386
<i>Opcml</i>	2.60	opioid binding protein/cell adhesion molecule-like	BC076581
<i>Spock2</i>	2.58	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2	BC057324
<i>Dnajc6</i>	2.57	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6	BC060734
<i>Chrm3</i>	2.56	cholinergic receptor, muscarinic 3, cardiac	BC129892
<i>Fabp3</i>	2.55	fatty acid binding protein 3, muscle and heart	BC089542
<i>Timp3</i>	2.54	tissue inhibitor of metalloproteinase 3	BC014713
<i>Adora1</i>	2.52	adenosine A1 receptor	BC079624
<i>P2rx5</i>	2.50	purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 5	AF333331
<i>Sv2b</i>	2.49	synaptic vesicle glycoprotein 2 b	BC060224
<i>Fosl2</i>	2.49	fos-like antigen 2	BC065131
<i>Camk2b</i>	2.48	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta	BC080273
<i>Tbata</i>	2.48	thymus, brain and testes associated	AF257502
<i>Cdkn1a</i>	2.44	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	BC002043
<i>Prdm8</i>	2.43	PR domain containing 8	BC141020
<i>Barhl2</i>	2.43	BarH-like 2 (Drosophila)	BC078444
<i>Wbscr17</i>	2.43	Williams-Beuren syndrome chromosome region 17 homolog (human)	BC158110
<i>Zdhhc23</i>	2.42	zinc finger, DHHC domain containing 23	BC139052
<i>Edil3</i>	2.42	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	BC056386
<i>Sema3c</i>	2.40	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	BC066852

第四章 考察

本研究によって、発生期大脳皮質で時間的、空間的に極めて特異的な発現を示す PR ドメインタンパク質 Prdm8 が、多段階の複雑な分化過程をたどる多極性形態期において、多極性形態細胞の調節に寄与することで、正常な分化過程の推移に決定的な役割を果たし、これが大脳皮質の層形成に重要な役割を果たすことが発見された。多極性形態期の多段階の分化過程と層形成に関する一連の知見は本研究で初めて見出された現象であり、大脳皮質の神経分化を分子的に理解する上できわめて重要な実験結果であると考えられる。

4-1. Prdm8 の発生期大脳皮質における役割について

4-1-1. Prdm8 は発生期マウス大脳皮質の終期多極性形態細胞を調節する

Prdm8 の詳細な発現解析から、Prdm8 は胎齢 15 日前後のマウス大脳皮質において、中間帯の中央部から上部にかけての多極性形態細胞で特異的に発現することが明らかになった。さらには、Prdm8 のレポーターマウスを用いた詳細な発現解析から、Prdm8 の発現の強弱は、中間帯中央部で優先的に発現する Unc5d の発現の強弱と相補的であることが分かった。Unc5d は Netrin の受容体であり、Netrin は軸索の誘因・反発関わる軸索ガイダンス分子である (Yamagishi et al., 2011)。近年の研究で、多極性形態期には中間帯における位置と相関して、多段階の分化ステップが存在しており、それぞれの段階において、異なる分子マーカーを発現することが示され、Unc5d は後期多極性形態細胞を特徴づける分子マーカーとして報告されている (Miyoshi and Fishell, 2012)。本研究では、Unc5d の発現が減弱し、Prdm8 の発現が優勢になった中間帯上部の多極性形態細胞を、双極性細胞に変化する直前の段階と考え、「最終多極性形態期の細胞」として分類した。また、発現解析で明らかになった Prdm8 と Unc5d の関係性は、*in vitro* の培養細胞レベルでも明らかになり、Prdm8 と Unc5d の発現がお互いの発現を抑えていることが示された。軸索ガイダンス分子として働く Unc5d と、Prdm8 の発現のバランス

が、多極性形態期の後期から最終期、さらに双極性形態期への移行に重要な役割を果たすのかもしれない。

4-1-2. Prdm8 は最終多極性形態細胞の維持に働く

多極性移動により中間帯上部に到達し、最終多極性形態期を迎えた細胞は、多極性形態から双極性形態へと変化し、ロコモーションと呼ばれる移動様式によって、放射状線維と呼ばれる長い突起を足場として垂直方向に移動し、皮質板に侵入する。この多極性形態からロコモーションへの変換過程には多くの分子が関与することが報告されており、例えば、Cdk5 (Ohshima et al., 2007; Kawauchi et al., 2010)、FilaminA (Nagano et al., 2002)、LIS1 (Tsai et al., 2005)、Dcx (Bai et al., 2003) などのノックダウンおよび機能阻害が、この変換過程を阻害することが明らかになっている。本研究では、Prdm8 の過剰発現によって多極性形態細胞が維持される一方で、Prdm8 のノックダウンによって早期に双極性形態への変化が進む様子が観察されたことから、Prdm8 が最終多極性形態期の長さの調節と双極性形態細胞への変化のタイミングを決定付ける、新規の多極性形態期制御タンパク質である可能性が示唆された。

4-1-3. 多極性形態期が層形成に与える影響

本研究で、Prdm8 の胎齢 12.5 日目における過剰発現およびノックダウンによって、生後のニューロンの分化運命が変化することが明らかになった。特に、Prdm8 をノックダウンした場合、早い段階で細胞周期を離れ分化に向かう細胞が増加し、その結果下層に配置される細胞の割合が増加したが、それらの細胞は大脳皮質の層の位置に応じた分化運命を獲得できていなかった。

発生期に生み出されるニューロンは、生み出される時期によってその分化運命が異なり、各層のサブタイプのニューロンは、神経前駆細胞から時間依存的に産生されることが明らかになっている (Tan et al., 1998; Magavi et al., 2012)。しかしながら、大脳皮質ニューロンのサブタイプの決定には、神経幹細胞の時間的制御といった外因性(extrinsic)要因だけでなく、転写因子など

の内因性(intrinsic)要因によっても制御されうることから、異なる時期に誕生したニューロンが同じ層に配置されることもある。実際、同じ時期に生み出されたニューロンでも、中間帯での移動過程が阻害されることで、分化運命が変化することが報告されていることから(Miyoshi and Fishell, 2012)、多極性形態期における細胞の挙動が、大脳皮質の正常な層形成に重要な役割を果たすことが示唆される。本研究における *Prdm8* の過剰発現およびノックダウンによって引き起こされた最終分化運命の変化は、多極性形態期における適切なタイミングでの分化過程の進行が、ニューロンの正常な分化運命の決定にとって必須の現象である可能性を示している。

4-1-4. *Prdm8*-mVenus を用いた網羅的発現解析と新規の多極性形態期調節候補分子

近年、多くの転写因子が神経幹細胞から分化にむかう各ステップにおいて細胞内在性のプログラムを制御する分子スイッチとして重要な役割を果たすことが報告されている。これまでに、これらの分子の細胞内発現のダイナミックな変化を明らかにするための試みがなされており、例えばマイクロダイセクションによって大脳皮質の特定の領域を切り出して、転写因子の発現を調べるなどの方法や (Ayoub et al., 2011; Kang et al., 2011; Oeschger et al., 2011)、レポーターマウスの大脳皮質細胞を選別することで、発現遺伝子プロファイルを比較する方法が数多く報告されている (Okaty et al., 2009; Cameron et al., 2012)。本研究では、当研究室で作製した胎齢 15.5 日目の *Prdm8* レポーターマウス (*Prdm8*-mVenus) を利用し、mVenus 陽性および mVenus 陰性それぞれの細胞集団をソートし、発現を網羅的に比較解析することで、中間帯中央部から上部にかけて特異的な発現様式を示すと考えられる候補遺伝子の同定を試みた。多くの遺伝子が mVenus 陽性細胞で 2 倍以上の発現を示していたが、その中には、セマフォリン (semapholin)、エフリン (ephrin)、スリット (slit) シグナルといったガイダンス分子が含まれていた。ガイダンス分子は多様な細胞内機能を制御しており、細胞の移動や形態変化、突起伸張や軸索の誘導などの機能を担うことが報告されている。ガイダンス分子と多極性形態期との関連性についてはほとんど明確化されていないが、このようなガイダンス分子が複合的に働くことによって、多極性

形態細胞の特徴的かつ複雑な動き(突起を出し入れしながら横方向に柔軟に移動し)や、多段階の分化過程(多極性形態前期→後期→最終期)が制御されているのかもしれない。

また、現在のところ中間帯に位置する多極性形態細胞の分子マーカーとしては *NeuroD1* や *Unc5d* が知られているが、その他には中間帯に特異的に発現する分子マーカーはほとんどみつかっていない。本研究で網羅的な遺伝子解析から抽出された、これらのガイダンス分子を含む遺伝子群が、新たに多極性形態期の分子マーカーとして活用されることが期待される。

4-1-5. Prdm8 の転写複合体としての Bhlhb5

Prdm8 は転写抑制因子である *Bhlhb5* と複合体を形成し、多数の遺伝子の転写制御によって、生後の神経ネットワークの形成に寄与しており、また *Bhlhb5* のノックアウトマウスでは、*Prdm8* の発現が亢進することが報告されている(Ross et al., 2012)。当研究室で行った胎齢 15.5 日目のマウス終脳細胞の *Prdm8* の ChIP シークエンスの結果 (データ未掲載) と、Ross らの *Bhlhb5* の ChIP シークエンスの結果を比べると、確かに多くの遺伝子座において、*Prdm8* と *Bhlhb5* の結合ピークが同じ領域に出現していることが確認される。また当研究室で作製した *Prdm8* ノックアウトマウスの免疫染色から、生後の *Prdm8* ノックアウトマウスの第 IV 層近傍で *Bhlhb5* の発現亢進が確認されている (データ未掲載) ことから、*Prdm8* と *Bhlhb5* が転写複合体として機能しながらも、お互いの発現を抑制していると考えられる。しかし一方で、*Prdm8* と *Bhlhb5* の結合ピークは必ずしも一致する訳ではなく、それぞれ単体のみがピークを持つ遺伝子も多くある。*Prdm8* 抗体と *Bhlhb5* 抗体を用いた各ステージにおけるマウス大脳皮質の染色結果からも、*Prdm8* と *Bhlhb5* の発現は、胎仔期と生後いずれにおいても完全には一致していないことが確認されている。すなわち、*Prdm8* が *Bhlhb5* とは独立して、単体で、あるいは他の分子と複合体を形成することで、遺伝子発現を制御している可能性も考えられる。多極性形態期の制御に *Bhlhb5* が関与しているか否かは不明であるが、今後 *Bhlhb5* の過剰発現やノックダウン、あるいは *Prdm8* ノックアウトマウスに対して *Bhlhb5* のノックダウンを行うことで、これら 2 つの遺伝子

の働きや役割を、その関連性と共に明確にする必要がある。

4-1-6. *Prdm8* ノックアウトマウスの表現型

本研究では、*Prdm8* タンパク質をコードする領域を完全に消失させた、*Prdm8* 完全ノックアウトマウスを樹立した。*Prdm8* ノックアウトマウスは、神経前駆細胞では表現型はみられないが、post-mitotic ニューロンの移動と形態変化の正常な推移が阻害されていることが明らかになった。層構造の形成における表現型は比較的弱く、現段階の解析では大きな変化は確認されていないが、近年の研究で、*Dcx* や *LIS1* といった発生期ニューロンの多極性形態期の移動過程に影響を及ぼす遺伝子の変異が、生後のてんかんや精神遅延などの神経疾患発症の原因となりうることが報告されている(Bai et al., 2003; Tsai et al., 2005)。これは、発生期の細胞移動における異常の影響が、ニューロンの最終分化に微細な影響を与える結果(軸索の長さや投射経路、突起の数やニューロンそのものの数など)、大脳皮質神経組織の脆弱性が誘導されることに起因するのではないかと考えられる。

また、*Prdm8* ノックアウトマウスが生後、皮膚のただれ症状や運動反射異常を示すことが報告(Ross et al., 2012)されており、実際に、本研究で作製したノックアウトマウスでも、一定の割合で皮膚のただれ症状や運動反射異常が確認されている。しかしながら、当研究室で行った成体マウスの各組織 RNA を用いた発現解析から、*Prdm8* が皮膚や筋組織で発現していないことが明らかになっており、このことから、*Prdm8* ノックアウトマウスのこのような外的表現型は、神経組織や神経ネットワークにおける異常によって誘発されているのではないかと考えられる。さらに、*Prdm8* ノックアウトマウスは、胎仔期の大きさは野生型と比べて差はないが、出生後数日たつと体が顕著に小さく、そのまま衰弱死することもある。生後の成長異常の原因としては、成長ホルモンの異常や、摂食異常、嗅覚異常などが考えられる。今後 *Prdm8* ノックアウトマウスの行動解析を進める予定(理化学研究所・眞貝研究室で解析中)であり、一連の行動解析を検討することで、*Prdm8* ノックアウトマウスにみられる行動異常や表現型の原因を明らかにしてい

たい。

4-1-7. Prdm8 の機能性ドメイン

PR ドメインは元来ヒストンメチル化酵素である SET ドメインと高い相同性を持つことから、新規のヒストンメチル化酵素ではないかと考えられてきた (Huang et al., 1998)。しかしながら、PR ドメインファミリーの中には、ヒストンメチル化活性を持たないものも多く存在し、これらの多くは、ZF ドメインを介して他のタンパク質をリクルートし、転写制御因子として発生や細胞の分化を制御することが知られている (Hohenauer and Moore., 2012)。Prdm8 は PR ドメインと、3 つの ZF ドメインをもち、生殖細胞において、内在性のヒストンメチル化活性を持つということが報告されていたが、当研究室で行った細胞株に対するヒストンメチル化アッセイでは、内在性のメチル化活性は検出されなかったことから、Prdm8 が内在性のメチル化活性を持たずに、ZF を介して他の分子と結合することで、機能しているのではないかと推察される。当研究室では、これまでに PR ドメインを欠いた一部欠損型の Prdm8 を発現する変異マウス (*Prdm8 Δ PR*) を作製しており (博士論文 駒井, 2009)、今後は、本研究で作製した *Prdm8* 完全ノックアウトマウスと *Prdm8 Δ PR* マウスを用いて、表現型を比較検討していくことで、Prdm8 の機能性ドメインが明らかになることが期待される。

4-1-8. Prdm8 の更なる機能解析に必要なこと

本研究では、Prdm8 の機能を調べるために、胎齢 12.5 日目と 14.5 日目のマウス大脳皮質に CAG プロモーター制御下の Prdm8 発現ベクター (pCAG-Prdm8)、および shRNA を発現する Prdm8 ノックダウンベクター (pPrdm8sh) を遺伝子導入した。遺伝子導入はまず、脳室側の細胞集団に限って起こり、その後遺伝子導入された細胞が表層側に向かって移動する過程で遺伝子導入による影響を評価している。今回の実験では、Prdm8 は post-mitotic なニューロンに発現していることから、多極性形態期以外の時期の細胞に対する影響を含めた結果が得られている。すな

わち、Prdm8 の多極性形態期に対する影響を直接評価するために、今後は多極性形態で特異的に活性化される *NeuroD1* や *Unc5d* のプロモーター制御化で遺伝子を発現するベクターを活用することで、多極性形態期における機能のみを捉え、その働きをより明確化していく必要がある。

4-1-10. Prdm8 ノックアウトマウスの疾患モデルとしての可能性

ヒト *PRDM8* の変異が運動性ミオクロヌス（ラフォラ病）というてんかんの原因となることが報告されている (Turnbull et al., 2012)。これは *PRDM8* 遺伝子の変異により、異常なタンパク質の蓄積が生じることによって誘導される病態であることから、*Prdm8* ノックアウトマウスにおいても、このような変異タンパク質の蓄積がみられるかを今後調べていく必要がある。さらに、てんかんが引き起こされる原因のひとつとして、発生期の神経細胞移動の異常が挙げられており (Bai et al., 2003; Tsai et al., 2005)、*Prdm8* ノックアウトマウスでは神経の分化過程に異常がみられることから、*Prdm8* ノックアウトマウスがてんかん発症のモデルマウスとなりうるかもしれない。このことは、今後老齢のマウスを用いて行動異常や脳波を解析することで明らかになると考えられる。

4-2. 複数の PR ドメインタンパク質による多極性形態期の統括的な制御機構

発生期の脳皮質において、複数の PR ドメインタンパク質ファミリー (*Prdm8*、*Prdm16*、*Prdm12*) が、それぞれ時期特異的・領域特異的に発現することが示されている (Kinameri et al., 2009)。本研究において、*Prdm8* が多極性形態期を制御することが示されたが、発生期の脳皮質においては、上記の複数の PR ドメインタンパク質ファミリーが、それぞれのステップを制御し合うことで、多極性形態期の推移を統括制御しているのではないかと考えられる。

4-2-1. Prdm16 の働き

これまでに、*Prdm8* が多極性形態期の最終期に働きかけ、多極性形態の長さを調節することを

明らかにしてきたが、子宮内エレクトロポレーション法によって Prdm16 を過剰発現すると、興味深いことに NeuroD1 陽性の多極性形態細胞の発現が誘導されていることが明らかになった（データ未掲載）。このことから、脳室帯で発現することが報告されている Prdm16 が、前期多極性形態細胞の調節に重要な役割を果たす可能性があると考えられる。

4-2-2. Prdm12 の働き

加えて、Prdm8 と同じく、発生期の脳皮質で発現するとされる Prdm16 と Prdm12 も、この一連の多極性形態期の調節に関与しているのではないかと考え、子宮内エレクトロポレーション法によって Prdm12 を過剰発現した結果、Prdm12 の過剰発現によって後期多極性形態細胞の分子マーカーである Unc5d の発現が、顕著に抑えられることが明らかになった（データ未掲載）。このことから、Prdm12 も新たな多極性形態期の制御因子として働く可能性が示唆された。

4-2-3. 複数の PR ドメインタンパク質による統合的な多極性形態期の制御

これまで、同じ分子ファミリーに属する複数の分子が綿密に制御し合って、同じ細胞の分化過程を制御しているという報告は多くあり、例えば Hes1、3、5 はそれぞれが互いを、あるいは下流因子をバランスよく制御し合うことで、神経幹細胞の維持と分化過程の決定的な制御因子として働くことが知られている (Kageyama et al., 2008)。PR ドメインファミリーも、お互いを制御し、また下流因子を制御し合うことで、一連の複雑な多極性形態期の多段階の分化ステップを制御しているのかもしれない。今後は Prdm12 および Prdm16 の脳皮質における詳細な発現様式を調べることで、Prdm8-Prdm12-Prdm16 の関連性を明らかにし、多極性形態期における PR ドメインファミリーの重要性の解明を目指したい。

4-3. 本研究のまとめと今後の展望

本研究では、PR ドメインタンパク質である Prdm8 が、発生期において特徴的な発現様式を示

すことを見出した。また、Prdm8は中間帯における最終多極性形態細胞を維持し、双極性形態細胞への変化が遅延する結果、層構造の形成に影響を及ぼすことが明らかになった。(図4A)このように、発生期大脳皮質の多極性形態期において、Prdm8、Prdm16、さらにPrdm12を加えた複数のPRドメインタンパク質が、その下流因子を制御し合いながら統括的に働くことで、多段階の精密な分化過程の進行が調節されている可能性が示唆された(図4B)。

今回、Prdm8-mVenusを用いた網羅的解析と*in vitro*の解析から、複数のガイダンス分子がPrdm8の下流の候補因子として同定された。今後は、これらの下流候補因子が、Prdm8によって直接的に発現制御されているのか、また多極性形態期の維持や形態変化において、どのような役割を果たしているのかを明らかにしていく必要がある。そのために、下流候補因子の発現ベクターやノックダウンベクターを作製し、子宮内エレクトロポレーション法によってその影響を調べるのが先決である。

さらに、発生期の脳皮質で発現するPRドメインタンパク質、Prdm12とPrdm16も、新たな多極性形態期の制御因子としての可能性が示唆されたことから、免疫染色による詳細な発現解析を含めて、その機能解析が必要とされる。

今後は、Prdm8、Prdm16、Prdm12の過剰発現とノックダウンを組み合わせることで評価することや、トリプルノックアウトマウスを作製することで、これらの分子の複合的な機能、そして大脳皮質発生過程におけるPRドメインタンパク質の意義を明らかにしていくことを計画している。

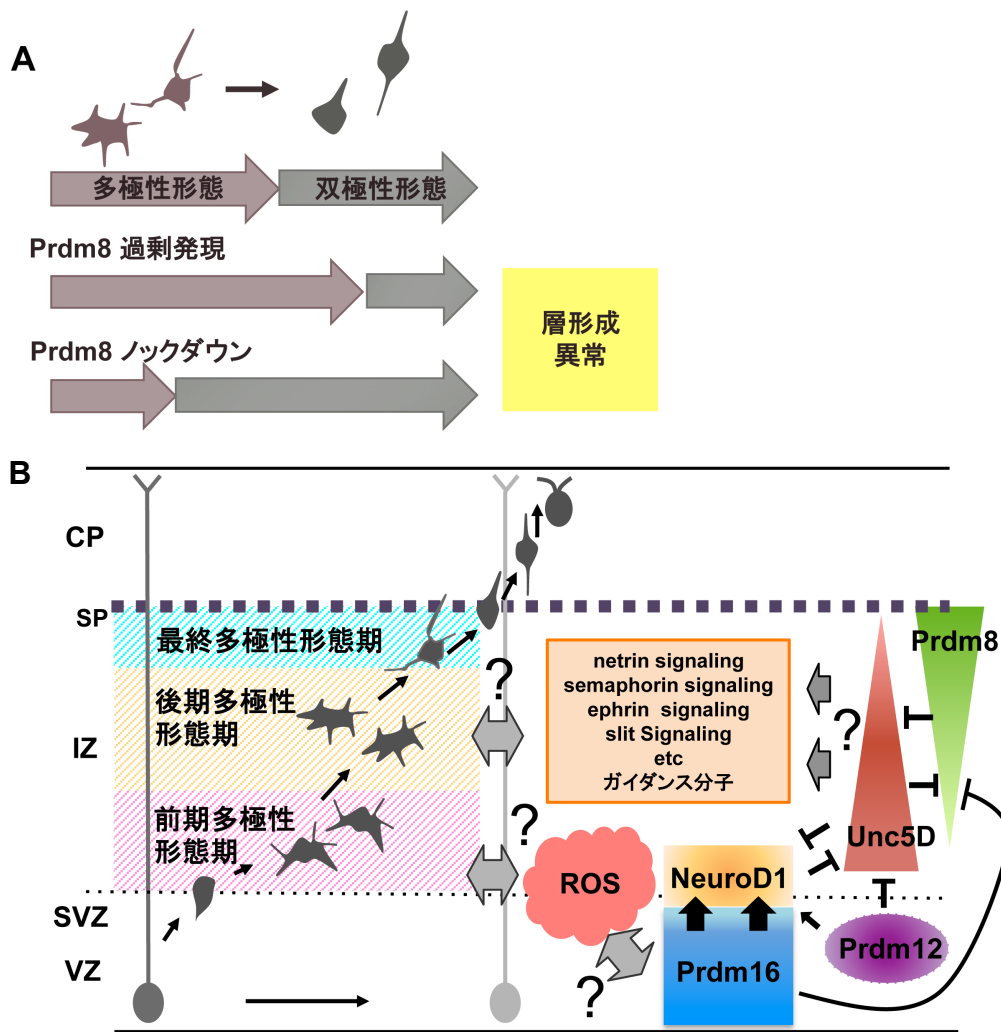


図 4: 本研究から見出された仮説とモデル図

本研究から、Prdm8 の正常な発現が、多極性形態期から双極性形態期にかけての推移や、正確な層構造の形成にとって必須であることが示唆された (A)。PR ドメインファミリーと大脳皮質発生過程の関連の仮説モデル図 (B)。Prdm8、Prdm16、Prdm12 の統括的な制御により、大脳皮質の多極性形態期の進行が調節されている。

引用文献

Aguilo, F., Avagyan, S., Labar, A., Sevilla, A., Lee, D. F., Kumar, P., Lemischka, I. R., Zhou, B. Y. and Snoeck, H. W. et al. (2011) *Blood* 117, 5057-5066

Alcamo, E.A., Chirivella, L., Dautzenberg, M., Dobрева, G., Farinas, I., Groschedl, R., and McConnell, S.K. (2008) *Neuron* 57, 364–377

Angevine, J.B.J., Jr., and Sidman, R.L. (1961) *Nature* 192, 766–768

Arlotta, P., Molyneaux, B.J., Chen, J., Inoue, J., Kominami, R., and Macklis, J.D. (2005) *Neuron* 45, 207–221

Ayoub AE, Oh S, Xie Y, Leng J, Cotney J, Dominguez MH, Noonan JP, Rakic P. (2011) *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 14950-5

Bai J, Ramos RL, Ackman JB, Thomas AM, Lee RV, LoTurco JJ. (2003) *Nat Neurosci* 6, 1277-83

Bard-Chapeau, E. A., Jeyakani, J., Kok, C. H., Muller, J., Chua, B. Q., Gunaratne, J., Batagov, A., Jenjaroenpun, P., Kuznetsov, V. A., Wei, C. L. (2012) *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 2168-2173

Bartholomew, C., Kilbey, A., Clark, A. M. and Walker, M. (1997) *Oncogene* 14, 569-577

Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., Coop, G. and de Massy, B. (2010) *Science* 327, 836-840

Bedogni F, Hodge RD, Elsen GE, Nelson BR, Daza RA, Beyer RP, Bammler TK, Rubenstein JL, Hevner RF. (2010) *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 13129-34

Blanchetot, C., and Boonstra, J. (2008) *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 18, 35-45

Brzezinski, J. A., Lamba, D. A. and Reh, T. A. (2010) *Development* 137, 619-629

Briknarova, K., Zhou, X., Satterthwait, A., Hoyt, D. W., Ely, K. R. and Huang, S. (2008) *Biochem Biophys Res Commun* 366, 807-813

Brown AD, Claybon AB, Bishop AJ. (2011) *Mol Cell Biol* 31, 3593-602

Burch, P.M., and Heintz, N.H. (2005) *Antioxid Redox Signal* 7, 741-751

Burkitt Wright, E. M., Spencer, H. L., Daly, S. B., Manson, F. D., Zeef, L. A., Urquhart, J., Zoppi, N., Bonshek, R., Tosounidis, I., Mohan, M. et al. (2011) *Am J Hum Genet* 88, 767-777

Buyse, I. M., Shao, G. and Huang, S. (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 4467-4471.

Cameron DA, Middleton FA, Chenn A, Olson EC. (2012) *HBMC Neurosci* 13, 90

Chasman DI, Schürks M, Anttila V, de Vries B, Schminke U, Launer LJ, Terwindt GM, van den Maagdenberg AM, Fendrich K, Völzke H, Ernst F, Griffiths LR, Buring JE, Kallela M, Freilinger T, Kubisch C, Ridker PM, Palotie A, Ferrari MD, Hoffmann W, Zee RY, Kurth T. (2011) *Nat Genet* 43, 695-8

Chiarugi, P., and Fiaschi, T. (2007) *Cell Signal* 19, 672–682

Chia, N. Y., Chan, Y. S., Feng, B., Lu, X., Orlov, Y. L., Moreau, D., Kumar, P., Yang, L., Jiang, J., Lau, M. S. et al. (2010) *Nature* 468, 316- 320

Chuikov, S., Levi, B.P., Smith, M.L., and Morrison, S.J. (2010) *Nat Cell Biol* 12, 999–1006

Cubelos B, Sebastián-Serrano A, Beccari L, Calcagnotto ME, Cisneros E, Kim S, Dopazo A, Alvarez-Dolado M, Redondo JM, Bovolenta P, Walsh CA, Nieto M. (2008) *Neuron* 66, 523-35

Cubelos B, Sebastián-Serrano A, Kim S, Redondo JM, Walsh C, Nieto M. (2008) *Dev Neurobiol.* 68, 917-25

Davis, C. A., Haberland, M., Arnold, M. A., Sutherland, L. B., McDonald, O. G., Richardson, J. A., Childs, G., Harris, S., Owens, G. K. and Olson, E. N. (2006) *Mol Cell Biol* 26, 2626-2636

Dehay C, Kennedy H. Cell-cycle control and cortical development. (2007) *Nat Rev Neurosci.* 8, 438-50

Delwel, R., Funabiki, T., Kreider, B. L., Morishita, K. and Ihle, J. N. (1993) *Mol Cell Biol* 13, 4291-4300

Desai, A.R., and McConnell, S.K. (2000) *Development* 127, 2863–2872

Dominguez MH, Ayoub AE, Rakic P.(2013) *Cereb Cortex* 23, 2632-43

Doody, G. M., Care, M. A., Burgoyne, N. J., Bradford, J. R., Bota, M., Bonifer, C., Westhead, D. R. and Tooze, R. M. (2011) *Nucleic Acids Res* 38, 5336-5350

Duan, Z., Person, R. E., Lee, H. H., Huang, S., Donadieu, J., Badolato, R., Grimes, H. L., Papayannopoulou, T. and Horwitz, M. S. (2007) *Mol Cell Biol* 27, 6889-6902

Endo K, Karim MR, Taniguchi H, Krejci A, Kinameri E, Siebert M, Ito K, Bray SJ, Moore AW. (2011) *Nat Neurosci* 15, 224-33

Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF. (2005) *J Neurosci* 25, 247-51

Fishell G, Hanashima C. (2008) *Neuron* 57, 333-8

Frantz, G.D., and McConnell, S.K. (1996) *Neuron* 17, 55–61

Funabiki, T., Kreider, B. L. and Ihle, J. N. (1994) *Oncogene* 9, 1575-1581

Gateva, V., Sandling, J. K., Hom, G., Taylor, K. E., Chung, S. A., Sun, X., Ortmann, W., Kosoy, R., Ferreira, R. C., Nordmark, G. et al. (2009) *Nat Genet* 41, 1228-1233

Georgala, P.A., Carr, C.B., and Price, D.J. (2011) *Dev Neurobiol* 71, 690–709

Götz M, Stoykova A, Gruss P. (1998) *Neuron* 21, 1031-44

Goyama, S., Yamamoto, G., Shimabe, M., Sato, T., Ichikawa, M., Ogawa, S., Chiba, S. and Kurokawa, M. (2008) *Cell Stem Cell* 3, 207- 220

Guillemot F, Molnár Z, Tarabykin V, Stoykova A. (2006) *Eur J Neurosci* 23, 857-68

Hanashima, C., Fernandes, M., Hebert, J.M., and Fishell, G. (2007) *J Neurosci* 27, 11103–11111

Hanashima C. (2013) *Cell Rep* 3, 931-45

Harper, J., Mould, A., Andrews, R. M., Bikoff, E. K. and Robertson, E. J. (2011) *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 10585- 10598

Hayashi, K., Yoshida, K. and Matsui, Y. (2005) *Nature* 438, 374-378

Hevner RF, Shi L, Justice N, Hsueh Y, Sheng M, Smiga S, Bulfone A, Goffinet AM, Campagnoni AT, Rubenstein JL. (2001) *Neuron* 29, 353-66

Hevner, R.F., Hodge, R.D., Daza, R.A., and Englund, C. (2006) *Neurosci Res* 55, 223–233

Hindley C, Ali F, McDowell G, Cheng K, Jones A, Guillemot F, Philpott A. (2012) *Development* 139, 1718-23

Hohenauer T. and Moore AW. (2012) *Development* 139, 2267-82

Huang, S., Shao, G. and Liu, L. (1998) *J Biol Chem* 273, 15933-15939

Huang, S. (2002) *Nat Rev Cancer* 2, 469-476

Hutton, S.R., and Pevny, L.H. (2011) *Dev Biol* 352, 40–47

Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. (2008) *Dev Growth Differ* 50 Suppl 1, S97-103

Kageyama R, Ohtsuka T, Shimojo H, Imayoshi I. (2009) *Curr Opin Cell Biol* 21, 733-40

Kähler AK, Djurovic S, Kulle B, Jönsson EG, Agartz I, Hall H, Opjordsmoen S, Jakobsen KD, Hansen T, Melle I, Werge T, Steen VM, Andreassen OA. (2008) *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B, 1089-100

Kajimura, S., Seale, P., Tomaru, T., Erdjument-Bromage, H., Cooper, M. P., Ruas, J. L., Chin, S., Tempst, P., Lazar, M. A. and Spiegelman, B. M. (2008) *Genes Dev* 22, 1397-1409

Kajimura, S., Seale, P., Kubota, K., Lunsford, E., Frangioni, J. V., Gygi, S. P. and Spiegelman, B. M. (2009) *Nature* 460, 1154-1158

Kang HJ, Kawasawa YI, Cheng F, Zhu Y, Xu X, Li M, Sousa AM, Pletikos M, Meyer KA, Sedmak G, Guannel T, Shin Y, Johnson MB, Krsnik Z, Mayer S, Fertuzinhos S, Umlauf S, Lisgo SN, Vortmeyer A, Weinberger DR, Mane S, Hyde TM, Huttner A, Reimers M, Kleinman JE, Sestan N. (2011) *Nature* 478, 483-9

Kato, K., Omori, Y., Onishi, A., Sato, S., Kondo, M. and Furukawa, T. (2010) *J Neurosci* 30, 6515-6526

Kawauchi T, Sekine K, Shikanai M, Chihama K, Tomita K, Kubo K, Nakajima K, Nabeshima Y, Hoshino M. (2010) *Neuron* 67, 588-602

Kim, K. C., Geng, L. and Huang, S. (2003) *Cancer Res* 63, 7619-7623

Kinameri, E., Inoue, T., Aruga, J., Imayoshi, I., Kageyama, R., Shimogori, T. and Moore, A. W. (2008) *PLoS ONE* 3, e3859

Komai, T., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T. and Shinkai, Y. (2009) *Gene Expr*

Patterns 9, 503-514

Kouzarides T. (2002) *Curr Opin Genet Dev* 12, 198-209

Kouzarides, T. (2007) *Cell* 128, 693- 705

Kumamoto T, Toma K, Gunadi, McKenna WL, Kasukawa T, Katzman S, Chen B,
Hanashima C. (2013) *Cell Rep* 3, 931-45

Kuo, T. C. and Calame, K. L. (2004) *J Immunol* 173, 5556-5563

Le Belle JE, Orozco NM, Paucar AA, Saxe JP, Mottahedeh J, Pyle AD, Wu H,
Kornblum HI. (2011) *Cell Stem Cell* 8, 59-71

Lee, S.K., and Pfaff, S.L. (2003) *Neuron* 38, 731–745

Leone, D.P., Srinivasan, K., Chen, B., Alcamo, E., and McConnell, S.K. (2008) *Curr Opin Neurobiol* 18, 28-35

Leslie, N.R. (2006) *Antioxid Redox Signal* 8, 1765–1774

Liu, J., Cao, L., Chen, J., Song, S., Lee, I.H., Quijano, C., Liu, H., Keyvanfar, K., Chen, H.,
Cao, L.Y., et al. (2009) *Nature* 459, 387–392

Liu X, Sun L, Torii M, Rakic P. (2012) *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 8280-8285

Ma Z, Swigut T, Valouev A, Rada-Iglesias A, Wysocka J. (2011) *Nat Struct Mol Biol* 18, 120-7

Madhavan, L., Ourednik, V., and Ourednik, J. (2006) *Stem Cells* 24, 2110–2119

Magavi S, Friedmann D, Banks G, Stolfi A, Lois C.(2012) *J Neurosci* 32, 4762-72

McConnell, S.K., and Kaznowski, C.E. (1991) *Science* 254, 282–285

Miyoshi G, Fishell G. (2012) *Neuron* 74, 1045-58

Mochizuki, N., Shimizu, S., Nagasawa, T., Tanaka, H., Taniwaki, M., Yokota, J. and Morishita, K. (2000) *Blood* 96, 3209-3214

Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Hirata, T., Hibi, M., and Macklis, J.D. (2005) *Neuron* 47, 817–831

Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. (2007) *Nat Rev Neurosci* 8, 427-37

Moore, A. W., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2002) *Science* 297, 1355- 1358

Moore, A. W., Roegiers, F., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2004) *Genes Dev* 18, 623-628

Morishita, K. (2007) *Hematol* 85, 279-286

Muncan, V., Heijmans, J., Krasinski, S. D., Buller, N. V., Wildenberg, M. E., Meisner, S., Radonjic, M., Stapleton, K. A., Lamers, W. H., Biemond, I. (2011) *Nat Commun* 2, 452

Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL. (2001) *Nat Neurosci* 4, 143-50

Nagano T, Yoneda T, Hatanaka Y, Kubota C, Murakami F, Sato M. (2002) *Nat Cell Biol* 4, 495-501

Nakajima K. (2007) *Neurochem Int* 51, 121-31

Nishikata, I., Sasaki, H., Iga, M., Tateno, Y., Imayoshi, S., Asou, N., Nakamura, T. and Morishita, K. (2003) *Blood* 102, 3323-3332

Nishikawa, N., Toyota, M., Suzuki, H., Honma, T., Fujikane, T., Ohmura, T., Nishidate, T., Ohe-Toyota, M., Maruyama, R., Sonoda, T. et al. (2007) *Cancer Res* 67, 9649-9657

Oeschger FM, Wang WZ, Lee S, García-Moreno F, Goffinet AM, Arbonés ML, Rakic S, Molnár Z. (2012) *Cereb Cortex* 22, 1343-59

Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S. C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A. et al. (2005) *Nature* 436, 207-213

Ohshima T, Hirasawa M, Tabata H, Mutoh T, Adachi T, Suzuki H, Saruta K, Iwasato T, Itohara S, Hashimoto M, Nakajima K, Ogawa M, Kulkarni AB, Mikoshiba K. (2007) *Development* 134, 2273-82

Ohtaka-Maruyama C, Hirai S, Miwa A, Heng JI, Shitara H, Ishii R, Taya C, Kawano H, Kasai M, Nakajima K, Okado H. (2013) *Cell Rep* 3, 458-471

Okaty BW, Miller MN, Sugino K, Hempel CM, Nelson SB. (2009) *J Neurosci* 29, 7040-52

Pinheiro I, Margueron R, Shukeir N, Eisold M, Fritsch C, Richter FM, Mittler G, Genoud C, Goyama S, Kurokawa M, Son J, Reinberg D, Lachner M, Jenuwein T. (2012) *Cell* 150, 948-60

Raychaudhuri, S., Thomson, B. P., Remmers, E. F., Eyre, S., Hinks, A., Guiducci, C., Catanese, J. J., Xie, G., Stahl, E. A., Chen, R. et al. (2009) *Nat Genet* 41, 1313-1318

Ross, S. E., McCord, A. E., Jung, C., Atan, D., Mok, S. I., Hemberg, M., Kim, T. K., Salogiannis, J., Hu, L., Cohen, S. et al. (2012) *Neuron* 73, 292-303

Saito T, Nakatsuji N. (2001) *Dev Biol* 24, 237-46

Schneider, R., Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (2002) *Trends Biochem Sci* 27, 396-402

Schotta G, Lachner M, Peters AH, Jenuwein T. (2004) *Novartis Found Symp* 259, 22-37

Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L. M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D. and Spiegelman, B. M. (2007) *Cell Metab* 6, 38-54

Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scime, A., Devarakonda, S., Conroe, H. M., Erdjument-Bromage, H. et al. (2008) *Nature* 454, 961-967

Seale, P., Kajimura, S. and Spiegelman, B. M. (2009) *Genes Dev* 23, 788-797

Seale, P., Conroe, H. M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S. and Spiegelman, B. M. (2011) *J Clin Invest* 121, 96-105

Sessa A, Mao CA, Hadjantonakis AK, Klein WH, Broccoli V. (2008) *Neuron* 60, 56-69

Shu, X. S., Geng, H., Li, L., Ying, J., Ma, C., Wang, Y., Poon, F. F., Wang, X., Ying, Y., Yeo, W. Srivastava G, Tsao SW, Yu J, Sung JJ, Huang S, Chan AT, Tao Q. (2011) *PLoS ONE* 6, e27346

Sims RJ 3rd, Nishioka K, Reinberg D. (2003) *Trends Genet* 19, 629-39

Soler Artigas, M., Loth, D. W., Wain, L. V., Gharib, S. A., Obeidat, M., Tang, W., Zhai, G., Zhao, J. H., Smith, A. V., Huffman, J. E. et al. (2011) *Nat Genet* 43, 1082-1090

Steele-Perkins, G., Fang, W., Yang, X. H., Van Gele, M., Carling, T., Gu, J., Buyse, I. M.,

Fletcher, J. A., Liu, J., Bronson, R. Chadwick RB, de la Chapelle A, Zhang X, Speleman F, Huang S. (2001) *Genes Dev* 15, 2250-2262

Sugitani, Y., Nakai, S., Minowa, O., Nishi, M., Jishage, K., Kawano, H., Mori, K., Ogawa, M., and Noda, T. (2002) *Genes Dev* 16, 1760–1765

Sun, X. J., Xu, P. F., Zhou, T., Hu, M., Fu, C. T., Zhang, Y., Jin, Y., Chen, Y., Chen, S. J., Huang, Q. H. Liu TX, Chen Z. (2008) *PLoS ONE* 3, e1499

Tabata H, Kanatani S, Nakajima K (2009) *Cerebral Cortex* 19, 2092-2105

Takemoto M, Hattori Y, Zhao H, Sato H, Tamada A, Sasaki S, Nakajima K, Yamamoto N. (2011) *Cereb Cortex* 21, 1925-34

Tan SS, Kalloniatis M, Sturm K, Tam PP, Reese BE, Faulkner-Jones B. (1998) *Neuron* 21, 295-304

Tsai JW, Chen Y, Kriegstein AR, Vallee RB. (2005) *J Cell Biol* 170, 935-45

Turnbull J, Girard JM, Lohi H, Chan EM, Wang P, Tiberia E, Omer S, Ahmed M, Bennett C, Chakrabarty A, Tyagi A, Liu Y, Pencea N, Zhao X, Scherer SW, Ackerley CA, Minassian BA. (2012) *Brain* 135, 2684-98

Verrotti A, Spalice A, Ursitti F, Papetti L, Mariani R, Castronovo A, Mastrangelo M, Iannetti

P. (2010) *Eur J Paediatr Neurol* 14, 1-12

von Hofsten, J., Elworthy, S., Gilchrist, M. J., Smith, J. C., Wardle, F. C. and Ingham, P. W.
(2008) *EMBO Rep* 9, 683-689

Walsh CA. (1999) *Neuron* 23, 19-29

Wu, Y., Ferguson, J. E., 3rd, Wang, H., Kelley, R., Ren, R., McDonough, H., Meeker, J.,
Charles, P. C., Wang, H. and Patterson, C. (2008) *J Mol Cell Cardiol* 44, 47-58

Yamagishi S, Hampel F, Hata K, Del Toro D, Schwark M, Kvachnina E, Bastmeyer M,
Yamashita T, Tarabykin V, Klein R, Egea J. (2011) *EMBO J* 30, 2920-33

Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K.,
Ohinata, Y. and Saitou, M. (2008) *Nat Genet* 40, 1016- 1022

Yang CM, Shinkai Y. (2013) *Cell Struct Funct* 38, 195-204

Yoneyama, M., Kawada, K., Gotoh, Y., Shiba, T., and Ogita, K. (2010) *Neurochem Int* 56,
740–746

駒井妙 (2009) 京都大学学位論文

謝辞

本研究は、同志社大学大学院・脳科学研究科・准教授の水谷健一博士、京都大学大学院・生命科学研究科・教授（現在は理化学研究所・主任研究員）の眞貝洋一博士、准教授の立花誠博士（現在は徳島大学疾患酵素学研究センター・教授）のご指導のもと行いました。水谷博士、眞貝博士、立花博士には、本研究を進めるにあたり、多大なご助言とご助力を、また技術的な指導を頂き、心から深く感謝申し上げます。また、本研究を行うにあたり同志社大学脳科学研究科・神経分化再生部門の皆様、理化学研究所・眞貝細胞記憶研究室の皆様、そして京都大学ウイルス研究所・ゲノム改変マウス領域の皆様には、様々な局面で多くのご助言とご協力を頂きました。心から感謝申し上げます。

京都大学生命科学研究科卒業（現在 Procter & Gamble 勤務）、駒井妙博士には、本研究で用いた多くの実験材料やマウスを頂き、また多くの研究へのご助言を頂きました。京都大学ウイルス研究所・マウス作製支援チーム技術職員の宮地均技術員、北野さつき技術員、竹田理恵技術員、また理化学研究所・眞貝細胞記憶研究室・特別技術員の福田幹子技術員、研究員の山田亜夕美博士には遺伝子改変マウスの樹立にあたり、多大なご協力頂きました。同志社大学脳科学研究科・技術補佐員の鈴木真理子技術員、同志社大学・生命医科学研究科・技術補佐員の松本美香技術員には FACS 解析およびマイクロアレイ解析において多くのご協力を頂きました。京都大学ウイルス研究所・生体応答学研究部門・助教の竹本経緯子博士、理化学研究所・眞貝細胞記憶研究室・研究員の加藤雅紀博士には、ChIP シークエンスの実験操作とデータ解析にあたり、多大なご協力とご助言および貴重なデータを提供して頂きました。京都大学ウイルス研究所・増殖制御分野・下條博美博士には、子宮内エレクトロポレーション法をご指導頂き、また本研究で用いた数多くのベクターを分与して頂きました。ここに深く感謝申し上げます。

理化学研究所の下向博士には、Flox-GFP 発現ベクターおよび Cre 発現ベクターを分与し

て頂きました。カリフォルニア大学・梶村真吾博士には、Prdm16 のノックダウンベクターを分与して頂きました。ニューヨーク大学・三好吾一博士には、NeuroD1 プロモーター mCherry 発現ベクターを頂きました。大阪大学大学院・医学研究科・環境生体機能学講座・教授の竹田潤二博士には、Blm のノックアウト ES 細胞を分与して頂きました。深く感謝申し上げます。

京都大学生命科学研究科教授の豊島文子博士、また准教授の千坂修博士には、筆者の副指導教員として建設的なご助言を頂きました。深く感謝申し上げます。また、京都大学・ウイルス研究所、京都大学・生命科学研究科で出会った学友にも心から感謝申し上げます。

最後に、研究に対する思いを理解し、精神的・経済的にも常にサポートしてくれた、祖父 好雄、父 俊士、母 孝子、姉 裕美子、姉 浩代に心から感謝致します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Mayuko Inoue, Takao Kuroda, Aya Honda, Mariko Suzuki-Komabayashi, Tae Komai, Youichi Shinkai, and Ken-ichi Mizutani

Prdm8 regulates the morphological transition at multipolar phase during neocortical development

PLOS ONE, 9, e86356, 2014