

糖脂質ガラクトシルセラミドのオリゴデンドロサイト
特異的な発現調節機構に関する研究

2014

岡原 京平

目次

序論	1
結果	
第一節 <i>CGT</i> 遺伝子のプロモーター活性を上昇させる転写因子の探索	4
第二節 <i>CGT</i> 遺伝子イントロン 1 中に存在する転写抑制配列の同定	5
第三節 <i>CGT</i> 遺伝子の転写抑制因子 <i>OLIG2</i> の同定	6
第四節 <i>NKX2.2</i> と <i>OLIG2</i> による内在性 <i>CGT</i> 遺伝子の発現制御に関する解析	7
第五節 <i>NKX2.2</i> の過剰発現による GalCer 量の変化の解析	7
第六節 発生段階のマウス脳における <i>Nkx2.2</i> および <i>Olig2</i> の発現変化の解析	8
第七節 <i>CGT</i> 遺伝子のエピジェネティックな発現制御機構の解析	9
考察と結論	20
実験方法	26
謝辞	34
参考文献	35

略語

CNP : 2'-3'-cyclic nucleotide 3' phosphohydrolase

MBP : myelin basic protein

MOG : myelin/oligodendrocyte glycoprotein

PLP : proteolipid protein

GalCer : galactosylceramide

SGalCer : sulfatide

GnT-IX : *N*-acetylglucosaminyltransferase IX

CGT : (human) ceramide galactosyltransferase

Cgt : (mouse / rat) ceramide galactosyltransferase

CST : (human) sulfotransferase

Cst : (mouse) sulfotransferase

OPC : oligodendrocyte precursor cell

CRE : cyclic AMP responsive element

bHLH : basic helix-loop-helix

BORIS : brother of the regulator of imprinted sites

ChIP : chromatin immunoprecipitation

EMSA : electromobility shift assay

LC-MS : liquid chromatography-mass spectrometry

HFA-GalCer : 2-hydroxylated fatty acid-GalCer

PDGFR α : platelet-derived growth factor receptor α

HexCer : hexosylceramide

MRM : multiple reaction monitoring

TLC : thin-layer chromatography

me3 : tri-methylation

Ac : acetylation

TSA : trichostatin A

Shh : sonic hedgehog

FA2H : fatty acid 2-hydroxylase

序論

タンパク質や脂質の糖鎖修飾は生体機能の維持において重要な役割を果たしている。例えば、脳において発現する糖タンパク質や糖脂質は、学習、記憶、神経可塑性など神経機能の維持に重要な役割を果たしていることが知られている (Kleene, R., et al. 2004, Rutishauser, U. 2008)。神経系はニューロンの他に、オリゴデンドロサイトやアストロサイトなどのグリア細胞で構成されている。特に、有髄神経においては、オリゴデンドロサイト (末梢神経ではシュワン細胞) の膜がニューロンの軸索に何重にも巻きついてミエリンという構造体を形成しており、これが絶縁体として働くことで跳躍伝導を可能にし、ニューロンの活動を支えている (Deber, C.M., et al. 1991)。このミエリンの主要構成成分として、2'-3'-cyclic nucleotide 3' phosphohydrolase (CNP)、myelin basic protein (MBP)、myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG)、proteolipid protein (PLP)などのタンパク質や、sphingomyelin、galactosylceramide (GalCer)、sulfatide (SGalCer) などの脂質が知られている。

近年、正常なミエリン機能の維持にタンパク質や脂質の糖修飾が重要な役割を持つことが明らかになってきた。例えば、糖タンパク質に関しては、脳特異的な糖転移酵素 *N*-acetylglucosaminyltransferase IX (GnT-IX) によってタンパク質上に生合成される分岐型 *O*-マンノース糖鎖がミエリンの障害を進行させることが当研究室において見出された (Kanekiyo, K., et al. 2013)。また糖脂質の場合には、ミエリンを構成する GalCer やその硫酸化体 SGalCer などの特異的な糖脂質がミエリンの機能維持に関わることが知られている (Jackman, N., et al. 2009)。GalCer は ceramide と UDP-galactose を基質として糖転移酵素 ceramide galactosyltransferase (CGT) によって生合成され、そこにさらに cerebroside sulfotransferase (CST) によって硫酸基が転移されると SGalCer が生合成される (Hirahara, Y., et al. 2000, Morell, P., et al. 1969)。GalCer や SGalCer は安定した構造のミエリン形成において重要な分子であり、*Cgt* 遺伝子をノックアウトしたマウスでは、オリゴデンドロサイトが増加するにも関わらず、オリゴデンドロサイトとニューロン軸索との結合が弱くなることによって脱ミエリンによる運動障害が現れることが報告されている (Bosio, A., et al. 1996, Coetzee, T., et al. 1996, Hirahara, Y., et al. 2004, Popko, B. 2000)。また *Cst* 遺伝子をノックアウトしたマウスでも同様のミエリン形成異常が見られる (Marcus, J., et al. 2006)。さらに、*Cgt* 遺伝子を欠損した加齢マウスの中枢神経で見られるミエリンの形態異常は、多発性硬化症などの脱ミエリン疾患における予後の悪さに関連する可能性が示唆されている (Bergamaschi, R. 2007, Shepherd, M.N., et al. 2012)。このように、GalCer や SGalCer は安定したミエリンを形成するために必要な分子である。一方、オリゴデンドロサイト特異的にラット *Cgt* 遺伝子を過剰発現する *Plp-Cgt* ノックインマウスでもミエリン形成オリゴデンドロサイトが減少することが報告されていることから (Zoller,

I., et al. 2005)、CGT の発現の有無のみならず、その発現量を適切に制御することが正常なミエリン形成にとって重要であることが示唆される。しかし、オリゴデンドロサイトにおいてどのような機構で CGT の発現が制御されているかを含めて、臓器や組織、細胞種特異的に糖鎖が発現する機構に関してはあまりわかっていない。そこで本研究では、CGT がオリゴデンドロサイト特異的に発現する機構の解明を目的とした。

GalCer は、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell, OPC) では発現していないが、その後成熟オリゴデンドロサイトに分化する時期になると高い発現を示すようになる (Marcus, J., et al. 2000)。GalCer の発現分布と同様に、CGT はミエリン形成を担うオリゴデンドロサイトやシュワン細胞で特異的に発現していることから (Schaeren-Wiemers, N., et al. 1995)、CGT 遺伝子の時間・空間特異的な制御が GalCer の量を決定する最も重要な因子の一つであると考えられる。以前の報告で、ヒト CGT 遺伝子のプロモーター領域中に、CGT 遺伝子の発現を促進する領域が存在することが明らかにされた (Tencomnao, T., et al. 2001)。さらに、この制御領域の中で CGT 遺伝子の転写活性化に重要な 2 つの DNA モチーフ (cyclic AMP responsive element (CRE) と GC-Box)、およびそれぞれのモチーフに結合する転写因子 (ATF-1/CREB-1 と Sp1/Sp3) が同定された (Tencomnao, T., et al. 2004)。しかしながら、これらの転写因子は広範な組織に発現しており、オリゴデンドロサイト特異的な CGT の発現機構を説明するための細胞種特異的な因子は同定されていない。

これまでのところ、組織特異的な糖転移酵素の発現機構に関して得られている知見はあまり多くない。しかし、当研究室および他のグループから、脳特異的な糖転移酵素 GnT-IX (Inamori, K., et al. 2003, Kaneko, M., et al. 2003) やいくつかのガングリオシド生合成酵素の発現がヒストン修飾によるエピジェネティック制御を受け、それがこれらの糖転移酵素の神経系特異的な発現において重要であることが示されている (Kizuka, Y., et al. 2011, Suzuki, Y., et al. 2011)。さらに、ニューロンにおいて *GnT-IX* プロモーター領域のクロマチンが活性化されると、脳特異的な basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子の NeuroD1 によって *GnT-IX* 遺伝子の転写が活性化されることなどが明らかになっている (Kizuka, Y., et al. 2011)。さらに近年、GalCer に硫酸基を転移して SGalCer を生合成する酵素 CST の精巣特異的なアイソフォームが、精巣特異的に発現する転写因子 brother of the regulator of imprinted sites (BORIS) によって制御されていることなども報告されている (Suzuki, T., et al. 2010)。これらの知見は、組織特異的な糖鎖の発現の背景にはその組織固有の糖鎖合成遺伝子の発現制御があり、さらにその制御の基盤となる特異的な転写因子やエピゲノム因子の存在を示唆する。

近年、オリゴデンドロサイトの分化に関係する転写調節に関して、まず OLIG1-OLIG 3 などの bHLH 型転写因子の発現によって神経幹細胞から OPC への分化が誘導され (Vetter, M. 2001)、その後 homeodomain 転写因子 NKX2.2 (Richardson, W.D., et al. 2006) や SOX ファミリ

一転写因子 SOX10 (Stolt, C.C., et al. 2002) などの発現によって成熟オリゴデンドロサイトへの分化が起こることが明らかになっている。CGT の発現と GalCer の量はオリゴデンドロサイトの成熟に伴って増大することから、CGT の発現はオリゴデンドロサイトの分化に関わる転写因子によって制御されている可能性がある。本研究では、このような転写因子に着目して、オリゴデンドロサイト特異的な CGT 遺伝子の発現を制御するメカニズムの解明を試みた。その結果、2つの転写因子 NKX2.2 と OLIG2 が、CGT 遺伝子の発現に対してそれぞれ促進的、抑制的に働くことを見出した。以下に得られた知見について詳述する。

結果

第一節 CGT 遺伝子のプロモーター活性を上昇させる転写因子の探索

これまでに、Tencomnao らによってヒト CGT 遺伝子プロモーター領域 (転写開始部位を+1 として、-554 から-63 番目のゲノム領域) に含まれる CRE 配列と GC-Box 配列が CGT 遺伝子の発現に不可欠であることが示されている (Tencomnao, T., et al. 2004)。この報告の中で、CRE 領域には転写因子 ATF-1/CREB-1 が、GC-Box には Sp1/Sp3 がそれぞれ結合することが *in vitro* の実験で示されていた。しかし、これらの転写因子は多くの組織で発現しており、これらの因子だけではオリゴデンドロサイト特異的な CGT 遺伝子の発現を説明できない。本研究では、CGT 遺伝子の発現に関わるオリゴデンドロサイト特異的な転写因子が存在すると仮定し、CGT 遺伝子のプロモーター活性を上昇させる転写因子を、レポーターアッセイを用いたスクリーニングによって探索した。

まず、ヒト CGT 遺伝子の転写開始部位の上流 1.9 kbp から、エキソン 1 とイントロン 1 の一部を含む下流 2.0 kbp まで、計 3.9 kbp のゲノム領域をクローニングし、プロモーターを持たないルシフェラーゼレポータープラスミドに組み込んだ (図 1A)。作製した CGT プロモーター-ルシフェラーゼプラスミド (pGV[-1940/+1960]) を、主にオリゴデンドロサイト系の細胞に発現する 6 つの候補転写因子 (OLIG1、OLIG2、OLIG3、NKX2.2、SOX10、ID2) の発現ベクターと、ヒトオリゴデンドログリオーマ (HOG) 細胞株 (Tencomnao, T., et al. 2001) 内に共導入し、ルシフェラーゼ活性を測定することで、CGT プロモーターを活性化する因子を同定することにした (図 1B)。pGV[-1940/+1960]を NKX2.2 の発現ベクターとコトランスフェクションしたときに CGT 遺伝子のプロモーターの活性が約 40 倍に上昇したことから、NKX2.2 が CGT 遺伝子の特異的な転写活性化因子であることが示唆された。

この結果を受け、CGT 遺伝子のプロモーター領域内で NKX2.2 に応答する制御領域の決定を試みた。以前に、Tencomnao ら (Tencomnao, T., et al. 2004) によりヒト CGT 遺伝子の 5'側領域に関して広範な解析が行われており、GC-Box (-74 から-66 までの領域)、および CRE (-504 から-497 までの領域) が転写に重要な配列として同定されている。そこで、この 2 つの領域は保持したまま、周囲の領域のみを様々な長さに欠失させたレポーターコンストラクトを作製し、NKX2.2 発現コンストラクトと共に HOG 細胞にトランスフェクションした (図 1C)。5'側の-1940 から-848 までの領域と 3'側の+1960 から+1248 までの領域をを同時に欠失させても、NKX2.2 による CGT プロモーターの活性化に影響は見られなかった。一方、+48 から+18 までの領域を欠失させると NKX2.2 による転写促進効果が減弱した。この結果から、NKX2.2 依存的な CGT 遺伝子の転写活性化には、+48 から+18 までの領域が必要であることが示され

た。そこで次に、この領域に NKX2.2 が結合するかどうかを検討した。まず NKX2.2 を過剰発現させた HEK293 細胞の核タンパク質抽出液 (図 1D) を用いてゲルシフトアッセイ (electromobility shift assay, EMSA) を行い、NKX2.2 と+48 から+18 までの DNA 断片との結合の有無を調べた。しかし、NKX2.2 依存的な DNA 断片の結合は見られなかった (図 1E)。そこで、次にクロマチン免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 法により NKX2.2 と内在性の *CGT* 遺伝子領域 (+48 から+18 まで) との結合を調べた。ゲルシフトアッセイでは直接 DNA プローブと NKX2.2 との結合を *in vitro* で検出するのに対して、ChIP アッセイでは生細胞中のクロマチンとの結合を調べるので、後者ではより生理的な条件下での結合の検出が期待できる。HOG 細胞における内在性の NKX2.2 の発現量が低く、ChIP アッセイによる検出が困難であったことから、HOG 細胞に NKX2.2 を過剰発現させ、その細胞から抽出したクロマチンを用いて ChIP アッセイを行った (図 1F)。その結果、この+48 から+18 までの領域を含むクロマチンと NKX2.2 が結合することが確認された。ゲルシフトアッセイでは直接的な結合を確認できなかったことを考えあわせると、NKX2.2 は、生細胞中では単独ではなく他の因子と複合体を形成してこの領域に結合している可能性が考えられる。

第二節 *CGT* 遺伝子イントロン 1 中に存在する転写抑制配列の同定

CGT 遺伝子のプロモーター領域における欠失コンストラクトの転写活性を調べる過程で、イントロン 1 中にある+1247 から+610 までの領域を欠失させるとプロモーター活性が劇的に上昇することを発見した (図 1C)。この予想外の結果は、*CGT* 遺伝子のプロモーター活性を抑制する別の転写因子が存在し、この領域に結合することを示唆している。この領域から転写抑制活性に関わる DNA 領域を絞り込むために、様々な長さの欠失コンストラクトを作製し、HOG 細胞に導入してルシフェラーゼアッセイを行った (図 2A)。その結果、+819 から+800 までの 20 bp の領域を欠失させると、転写抑制活性がほぼ無くなることがわかった。そこで、データベース (MatInspector) を用いてこの領域周辺にある転写因子結合モチーフを検索したところ、bHLH 型転写因子の結合コンセンサス配列である E-box (CANNTG) が+797 から+802 までに位置することがわかった。脳においては多くの bHLH 転写因子が E-box に結合して標的遺伝子の発現を調節することによって細胞分化の運命を決定している (Lee, J.E. 1997, Ross, S.E., et al. 2003)、今回発見した E-box 配列も *CGT* 遺伝子の転写抑制にとって重要である可能性が考えられた。そこで、3'領域が短く、プロモーター活性の高いプロモーターコンストラクト (pGV[-847/+106]) の 3'末端に、E-box (CATATG) を含む周辺領域 (+814 から+785 まで) の 30 bp の DNA 断片、もしくは変異 E-box (*TTTAGA*) を含む DNA 断片を連結し

たコンストラクトを作製し、プロモーター活性を測定した (図 2B)。E-box を組み込んだコンストラクトではプロモーター活性が期待通りに抑制され、変異 E-box を組み込んだものでは抑制は見られなかった。この結果は、この E-box 配列が *CGT* 遺伝子の転写抑制活性に必要であることを示している。そこで、神経系に発現する bHLH 転写因子の中で、オリゴデンドロサイト分化のマスターレギュレーターであり、かつ転写抑制活性を持つことが知られている OLIG に着目した (Novitch, B.G., et al. 2001)。OLIG 転写因子ファミリーには、OLIG1、OLIG2、OLIG3 の 3 種類がある。E-box 領域との結合を調べるために、これらの転写因子を発現させた HEK293 細胞の核タンパク質抽出液を調製し、E-box を含む 30 bp の DNA プローブ (+785 から+814 までの領域) と各 OLIG タンパク質との結合をゲルシフトアッセイによって評価した (図 2C)。対照として、ニューロン前駆細胞に発現する bHLH 転写因子 MASH1 を含む核タンパク質抽出液を用いた。その結果、OLIG2 と DNA の結合は検出されたが、他の bHLH 転写因子 (OLIG1、OLIG3、MASH1) の結合はほとんど見られなかった。また、アッセイ系に非標識の DNA プローブ (Competitor Wt) を標識 DNA プローブの 200 倍量 (モル比) 添加すると、OLIG2 と標識 DNA プローブの結合は完全に消失したが、変異 E-box を持つ非標識 DNA プローブ (Competitor mu) を添加しても強い結合阻害は見られなかった。さらに、このアッセイ系に抗 OLIG2 抗体を加えると、OLIG2-DNA 複合体バンドのスーパーシフトが見られた (図 2D)。これらの結果から、*CGT* 遺伝子のイントロン 1 には転写抑制活性を持つ E-box が存在し、このモチーフには転写因子 OLIG2 が結合することが明らかになった。

第三節 *CGT* 遺伝子の転写抑制因子 OLIG2 の同定

OLIG2 が *CGT* 遺伝子のイントロン 1 にある E-box 配列に結合することから、OLIG2 が *CGT* 遺伝子の転写を抑制する因子である可能性が考えられた。しかし、転写抑制配列を含む *CGT* 遺伝子のプロモーターコンストラクトと OLIG2 発現ベクターを HOG 細胞にトランスフェクションしても、元々のプロモーター活性が低いために OLIG2 による顕著な抑制効果を確認できなかった (図 3A)。そこで、OLIG2 を NKX2.2 と共に HOG 細胞に発現させ、NKX2.2 による *CGT* 遺伝子プロモーターの転写促進効果を OLIG2 が抑制するかどうかについて検討した。期待通りに、*CGT* 遺伝子のプロモーターコンストラクトと NKX2.2 発現ベクターのみをトランスフェクションした場合に比べて、OLIG2 をさらに共発現すると *CGT* 遺伝子のプロモーター活性は大きく低下した。この結果は、OLIG2 が *CGT* 遺伝子のプロモーター活性を抑制する因子であることを示唆する。また、トランスフェクションに用いた NKX2.2 のプラスミド量比を OLIG2 に対して上昇させると、それに伴って *CGT* 遺伝子のプロモーター活性も上昇し

た (図 3B)。この結果は、NKX2.2 の発現が相対的に高くなれば、OLIG2 の転写抑制効果を打ち消して、CGT 遺伝子の転写を活性化できることを示唆する。

以前の報告により、CGT 遺伝子の発現には CRE と GC-box に結合する因子が必要であることが示されている (Tencomnao, T., et al. 2004)。そこで、CRE または GC-box とそれらを認識する各転写因子の結合が NKX2.2 や OLIG2 の発現によって変化するかどうかを調べた。NKX2.2 もしくは OLIG2 を発現させた HOG 細胞の核タンパク質抽出液と、CRE または GC-box を含む DNA プローブとを混合してゲルシフトアッセイで調べた。CRE と GC-box に結合する各タンパク質のバンドは、NKX2.2 や OLIG2 を発現させてもほとんど変化しなかった (図 3C)。この結果は、CGT 遺伝子に対する NKX2.2 の転写促進効果と OLIG2 の転写抑制効果が、CRE や GC-box に結合する転写因子とは独立に働くことを示唆する。

第四節 NKX2.2 と OLIG2 による内在性 CGT 遺伝子の発現制御に関する解析

次に、これまでに明らかにしたレポータープロモーターに対する NKX2.2 と OLIG2 の転写の促進および抑制の効果が、内在性の CGT 遺伝子転写に対しても同様に見られるかどうかについて調べた。HOG 細胞に NKX2.2 を過剰発現させたところ、CGT mRNA の発現量が約 4 倍に上昇し、レポーターアッセイにより見出された NKX2.2 の効果が裏付けられた (図 4A)。さらに NKX2.2 と OLIG2 を共発現させた場合には、OLIG2 の共発現によって NKX2.2 の発現量そのものは変化しなかったが (図 4B)、NKX2.2 による転写促進効果が抑制された (図 4A)。

次に、NKX2.2 遺伝子をノックダウンしたときに CGT 遺伝子の発現が低下するかどうかについて検討した。しかし、HOG 細胞では、内在性の NKX2.2 遺伝子や CGT 遺伝子の発現が低いために、ノックダウンの効率やノックダウンによる CGT 発現量の変化を観察するのが困難であった。そこでまず、HOG 細胞を分化培地で培養し、オリゴデンドロサイト関連遺伝子の発現誘導を試みたところ (de Arriba Zerpa, G.A., et al. 2000)、NKX2.2 遺伝子の発現上昇とともに CGT 遺伝子の発現上昇も見られた。この分化誘導後の細胞で NKX2.2 遺伝子をノックダウンしたところ、CGT mRNA の発現が有意に低下した (図 4C)。これらの結果から、CGT 遺伝子の転写は抑制因子 OLIG2 と促進因子 NKX2.2 の制御下にあることが示された。

第五節 NKX2.2 の過剰発現による GalCer 量の変化の解析

第四節では、NKX2.2 と OLIG2 が内在性の CGT 遺伝子の発現を制御することを明らかにし

た。そこで次に、CGT の産物である GalCer の量がこれらの転写因子の発現によってどのように変化するのかについて解析した。NKX2.2 を過剰発現させた HOG 細胞の総脂質画分を抽出し、アルカリ処理によりグリセロ脂質を分解除去した。このサンプルをシリカゲルカラム液体クロマトグラフィー-三連四重極型質量分析 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS/MS) を用いた neutral loss scan (一定の分子量の中性イオンを脱離する分子のみを特異的に検出するモード) により解析し、ヘキソシルセラミドのみを特異的に検出した (図 5A)。その結果、NKX2.2 を過剰発現させた細胞では、Mock 細胞で見られたピーク 1,2 以外に、新たなピーク 3 が見られた。各標準品の LC 溶出時間と MS および MS/MS によるフラグメントイオンをもとに解析した結果 (図 5B)、ピーク 1 には主にグルコシルセラミド (GlcCer) が、ピーク 2 には GlcCer と GalCer が、そしてピーク 3 には 2 位が水酸化された脂肪酸を持つヒドロキシヘキソシルセラミド (2-hydroxylated fatty acid-hexosylceramide, HFA-HexCer) (図 5C) が含まれていることがわかった。多重反応モニタリング (multiple reaction monitoring, MRM; LC-MS/MS で特定の分子種を検出するモード) による定量解析を行ったところ、Mock 細胞ではヘキソシルセラミドのほぼ全てが GlcCer であったのに対して、NKX2.2 を発現させた HOG 細胞では GalCer と HFA-HexCer の割合が増加していた (図 5D)。

次に、標準品が手に入らず同定に至らなかった HFA-HexCer に含まれる糖が glucose、galactose のいずれであるかを決定するため、サンプルを glucocerebrosidase で消化して GlcCer と HFA-GlcCer を分解し、その産物をシリカゲル薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography, TLC) で展開し、オルシノール染色で糖を持つ成分を検出した (図 5E)。TLC と LC ではともにシリカゲルを用いた順相系で分離しているため、その溶出順序は類似しており、TLC で分離されたバンド 1, 2, 3 は LC のピーク 1, 2, 3 に相当する。バンド 1 と 2 は酵素消化後に大部分が消失するのに対して、バンド 3 は glucocerebrosidase 消化を経てもほとんど変化しなかった。したがって、バンド 3 に含まれる主な糖脂質は HFA-GlcCer ではなく HFA-GalCer であることが分かった。

第六節 発生段階のマウス脳における Nkx2.2 および Olig2 の発現変化の解析

近年の様々な報告により、OLIG2 陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) が、その後 NKX2.2 を発現することでミエリン形成オリゴデンドロサイトへと分化することがわかっている (Fu, H., et al. 2002, Kucenas, S., et al. 2008, Zhou, Q., et al. 2000)。これらの知見から、CGT 遺伝子の発現上昇が、オリゴデンドロサイト分化の過程で NKX2.2 の発現と連動している可能性が考えられる。この可能性について検討するため、オリゴデンドロサイトがまだほとん

ど見られない 1 週齢、およびオリゴデンドロサイトの分化が盛んに起こり始める 2 週齢のマウスの脳における *Nkx2.2*、*Olig2* および *Cgt* 遺伝子の発現量を測定した。それと同時に、OPC のマーカーとして血小板由来増殖因子受容体 α (*Pdgfra*) 遺伝子を、オリゴデンドロサイトのマーカーとしてミエリン塩基性タンパク質 (*Mbp*) 遺伝子の発現量をそれぞれ測定した (図 6A)。1 週齢マウスの脳に比べて、2 週齢マウスの脳では *Pdgfra* 遺伝子の発現にはあまり変化がなく、*Mbp* 遺伝子の発現が大きく上昇したことから、この期間に OPC の一部が分化してオリゴデンドロサイトが出現したことが確認された。この際に、*Nkx2.2* 遺伝子の発現は発生の進行に伴い大きく上昇したのに対して、*Olig2* 遺伝子の発現は変わらなかったことから、生体においてもオリゴデンドロサイトの分化の過程で NKX2.2 の転写促進効果が OLIG2 の転写抑制効果を上回ることによって *CGT* 遺伝子の発現が促進されるという仮説が支持される (図 6B)。

第七節 *CGT* 遺伝子のエピジェネティックな発現制御機構の解析

遺伝子の発現は、転写因子の結合による直接的な制御の他に、non-coding RNA、DNA メチル化、ヒストン修飾などのエピジェネティック制御を受けている (Bonasio, R., et al. 2010)。このような制御のうちで、ヒストン修飾に関しては、転写が活性化している遺伝子のプロモーター領域ではヒストン H3 の 4 番目のリジン残基のトリメチル化 (histone H3 Lys4 trimethylation, H3K4me3) や H3K9 のアセチル化 (histone H3 Lys9 acetylation, H3K9Ac) などの亢進によってユークロマチンが形成され、転写因子の DNA への結合が可能となる一方で、転写が抑制されているプロモーター領域では H3K9me や H3K27me3 などの亢進によってクロマチンが閉じた状態になることが知られている (Peterson, C.L., et al. 2004)。*CGT* 遺伝子は脳特異的に発現しており、肝臓などの他の臓器の多くでは発現が見られない (図 7A)。したがって、*CGT* 遺伝子のこのような組織特異的な発現に、ヒストンの翻訳後修飾によるエピジェネティック制御が関与している可能性が考えられた。この仮説を検証するため、マウスの脳と肝臓からクロマチンを抽出し、*Cgt* 遺伝子のプロモーター領域のヒストン修飾状態を ChIP アッセイによって解析した。転写活性化修飾である H3K9Ac のレベルは脳と肝臓の間ではほぼ同じであった (図 7B)。一方、転写抑制修飾である H3K27me3 のレベルは脳で有意に低かった。この結果は、*CGT* 遺伝子の発現制御には、ヒストンの翻訳後修飾のうちで、転写活性化修飾ではなく、転写抑制修飾の低下が寄与していることを示唆する。

一般に、ヒストンのアセチル化を亢進させると遺伝子の転写が活性化される (Peterson, C.L., et al. 2004)。このことから、*CGT* 遺伝子の転写もヒストンアセチル化によって促進されることが予想された。HOG 細胞よりも *CGT* 遺伝子を高発現しており (図 7C)、より成熟オリゴデ

ドロサイトに近い性質を持つと考えられるヒトオリゴデンドログリオーマ細胞株 KG-1-C 細胞をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 trichostatin A (TSA) (Yoshida, M., et al. 1990) で処理したところ、予想通りに *CGT* mRNA の発現が上昇した (図 7D)。さらに、HOG 細胞でも同様の結果が得られた (図 7E)。しかし、このときのヒストン修飾について解析したところ、意外なことに H3K9Ac のレベルにはほとんど変化が見られず、H3K27me3 のレベルが有意に低下していた (図 7F)。同様の現象は HOG 細胞でも見られた (図 7G)。TSA はヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であり、ヒストンアセチル化を亢進させることが期待されたので、*CGT* 遺伝子のプロモーター領域のヒストンメチル化の低下は予想外であった。このような結果の説明のひとつとして、TSA 処理によってメチル化を低下させるような遺伝子の発現が促進され、間接的に *CGT* 遺伝子のプロモーター領域のヒストンメチル化が低下し、*CGT* 遺伝子の転写が促進された可能性が考えられる。以上の結果から、ヒストンの翻訳後修飾というエピジェネティックな因子によっても *CGT* 遺伝子が制御されていることが明らかになった。さらに、ヒストンの翻訳後修飾のうちで、アセチル化の亢進ではなく転写抑制修飾の低下が *CGT* 遺伝子の発現制御に寄与している可能性が示唆された。

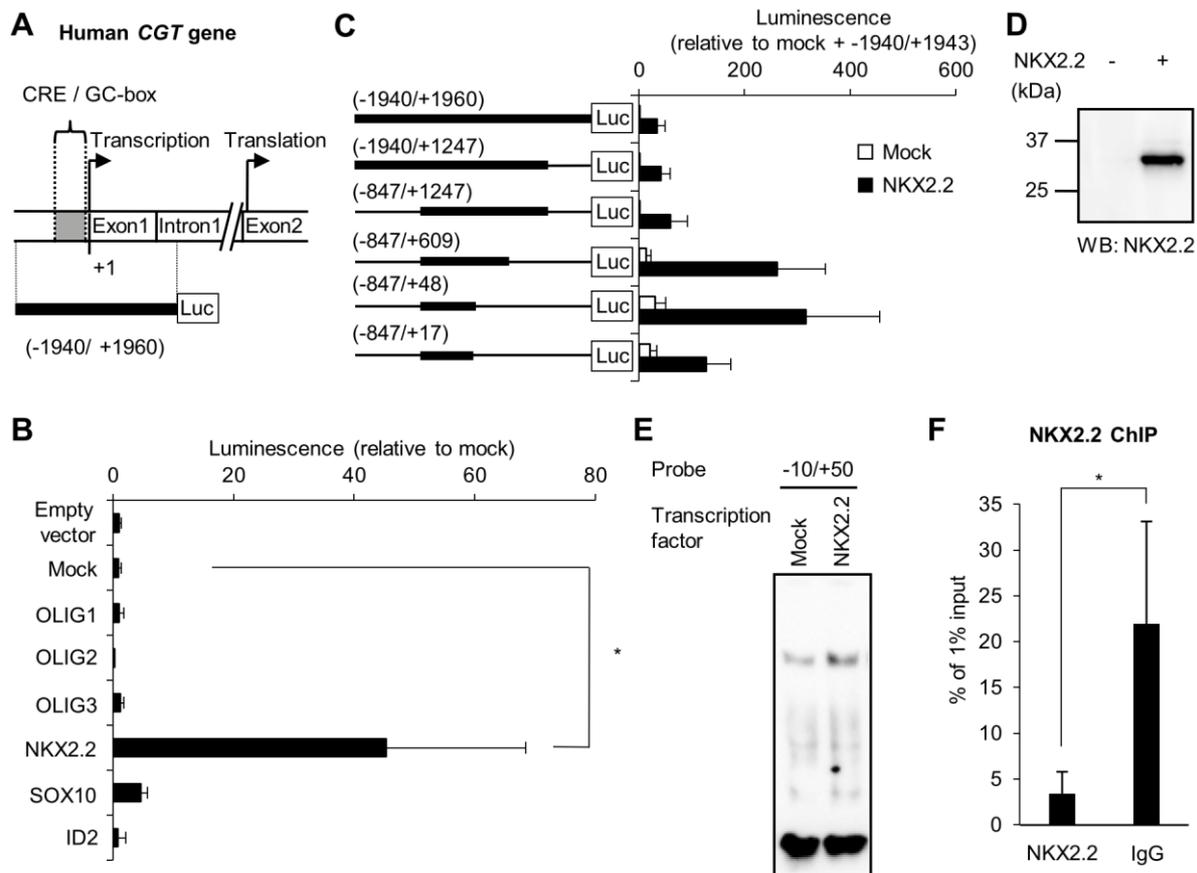


図1 NKX2.2は*CGT*遺伝子プロモーター活性を促進する

(A) クローニングしたゲノム領域。ヒト *CGT* 遺伝子の転写開始部位周辺 (CRE/GC-box を含む-1940 から+1960 までの領域) をクローニングし、ルシフェラーゼベクターに組み込んだ。(B) ルシフェラーゼベクター pGV[-1940/+1960]と各候補転写因子 (OLIG1、OLIG2、OLIG3、NKX2.2、SOX10、ID2)、または empty vector pcDNA6 (mock) を HOG 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。ルシフェラーゼによる発光強度は pGV[-1940/+1960]と pcDNA6 (mock) をトランスフェクションしたものに対する相対値で示した (n=3)。グラフは means \pm SD (*p<0.05 Student's *t*-test) で示した。(C) 様々な長さの *CGT* ゲノム DNA をルシフェラーゼベクターに組み込んだ。各欠失コンストラクトを HOG 細胞に mock ベクター、もしくは NKX2.2 発現ベクターと共にトランスフェクションし、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。ルシフェラーゼ活性は B と同様に示した (n=3)。(D) NKX2.2 を過剰発現させた HEK293 細胞の核タンパク質中の NKX2.2 発現量をウェスタンブロットで調べた。(E) NKX2.2 応答配列を含む DNA プローブ (-10 から+50 まで) への NKX2.2 の結合を EMSA で調べた。NKX2.2 を過剰発現させた HEK293 細胞の核タンパク質画分を EMSA に用いた。(F) 同定されたゲノム領域への NKX2.2 結合を ChIP アッセイで調べた。NKX2.2 を過剰発現させた HOG 細胞のクロマチンを抗 NKX2.2 抗体、もしくは normal rabbit IgG で免疫沈降した。沈降物中に含まれる、NKX2.2 応答配列を含むゲノム領域 (-23 から+54 まで) の存在量をリアルタイム PCR で定量した。値は 1% input に対する相対値で示した (n=4)。グラフは

means \pm SD (* $p < 0.05$ Student's *t*-test) で示した。

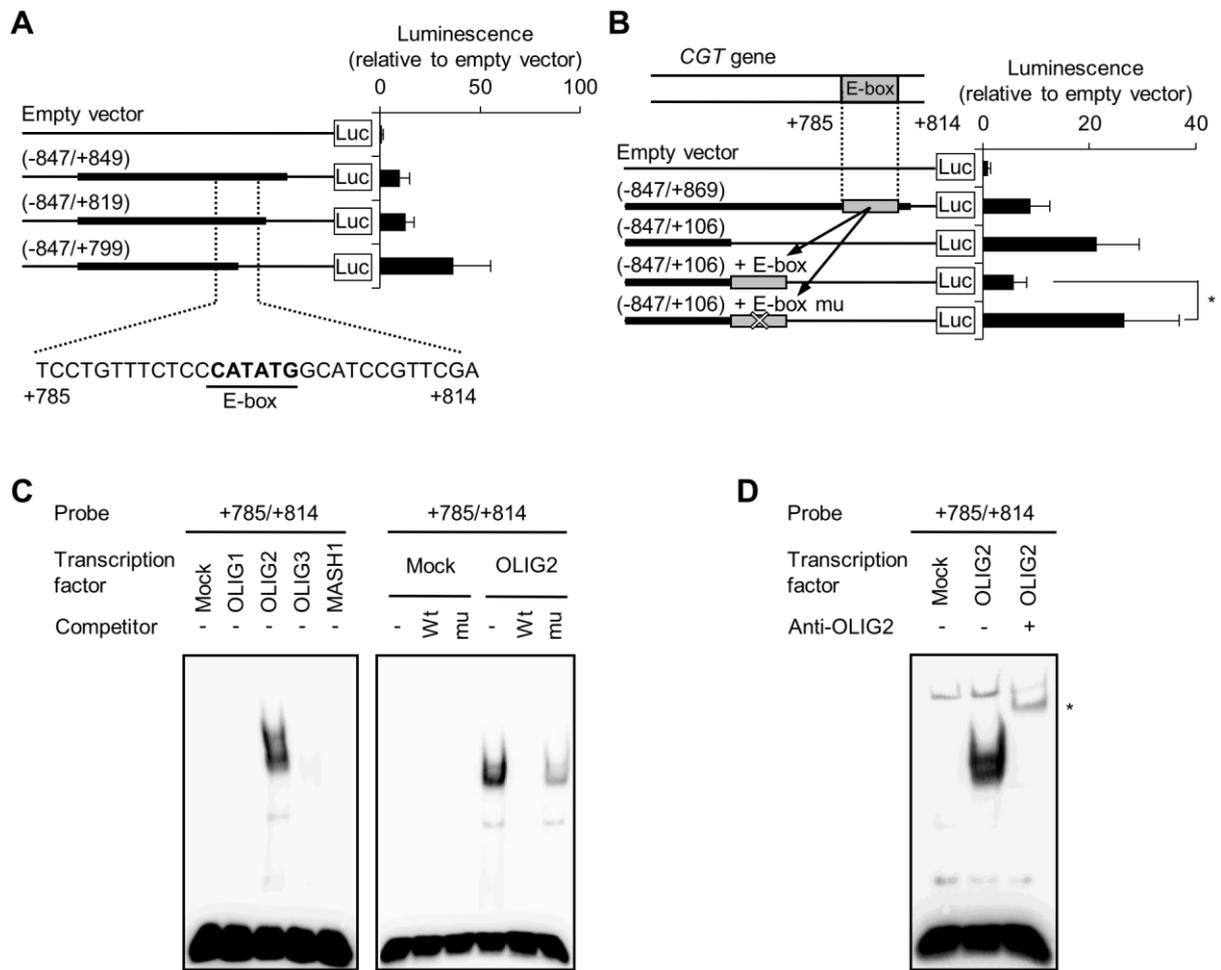


図2 イントロン1中のE-boxがCGT遺伝子の転写抑制に必要であり、このE-boxにはOLIG2が結合する

(A) 様々な長さのCGTゲノムDNAをルシフェラーゼベクターに組み込んだ。各欠失コンストラクトをHOG細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。ルシフェラーゼによる発光強度はempty vectorをトランスフェクションした細胞の発光強度に対する相対値で示した (n=3)。E-box周辺の+785から+814までの30bpの領域を下に示した。(B) オリジナルのE-box配列(CATATG)、もしくは変異E-box(TTTAGG)を含む+785から+814までのオリゴヌクレオチドをpGV[-847/+106]コンストラクトの3'末端に結合させた。そして、各コンストラクトのプロモーター活性をHOG細胞で測定した。ルシフェラーゼ活性はAと同様に示した (n=3)。グラフはmeans ± SD (*p<0.05 Student's t-test) で示した。(C) プローブ(+785/+814)に対するbHLH転写因子(OLIG1、OLIG2、OLIG3およびMASH1)の結合をEMSAで調べた。各転写因子をHEK293細胞で過剰発現させ、その核タンパク質画分をEMSAに用いた。非標識 competitorには(+785/814)プローブ(Wt)、もしくは変異E-boxプローブ(mu)を用いた。(D) OLIG2の(+785/+814)プローブへの結合を抗OLIG2抗体で確認した。OLIG2を過剰発現させたHEK293細胞の核タンパク質画分を抗OLIG2抗体と反応させてEMSAを行った。アスタリスクはスーパーシフトしたバンドの位置を示す。

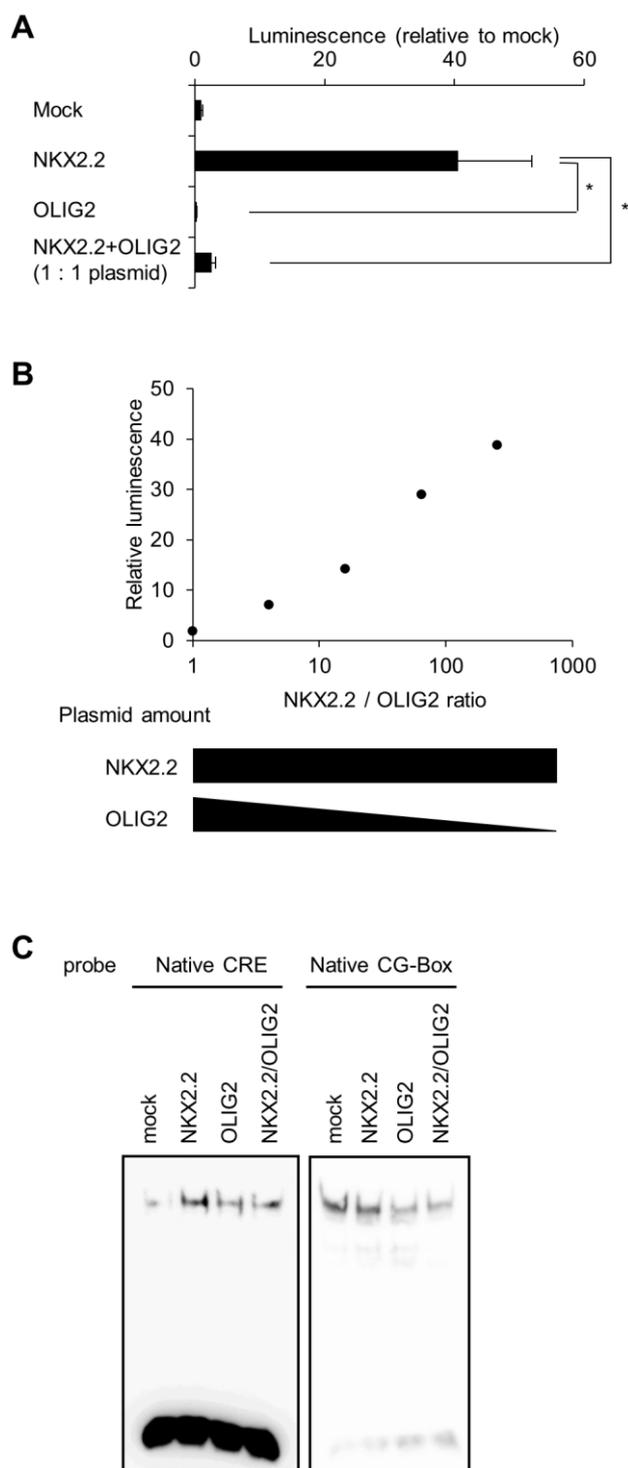


図3 OLIG2 は NKX2.2 で活性化された CGT プロモーター活性を抑制する

(A) ルシフェラーゼコンストラクト pGV[-847/+1247] を empty pcDNA6 (mock) 、NKX2.2 もしくは OLIG2 発現ベクター、または両方 (NKX2.2 + OLIG2、発現プラスミド比 1 : 1) と HOG 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った (n=3)。ルシフェラーゼによる発光強度は empty pcDNA6 (mock) をトランスフェクションした細胞の発光強度に対する相対値で示した。グラフは means \pm SD (*p<0.05 Student's *t*-test) で示した。(B)NKX2.2 と OLIG2 の比を変えて、ルシフェラーゼコンストラクト pGV[-847/+1247] と HOG 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った (n=1)。ルシフェラーゼによる発光強度は pGV[-847/+1247]と empty pcDNA6 ベクターをトランスフェクションした細胞の発光強度に対する相対値で示した。(C)HOG 細胞に NKX2.2、OLIG2 を発現させたときの、Native CRE、Native GC-box に結合するタンパク質 (Tencomnao, T., et al. 2004) の発現変化を調べた。NKX2.2 または OLIG2、もしくは両方を過剰発現させた HOG 細胞の核タンパク質画分を EMSA に用いた。

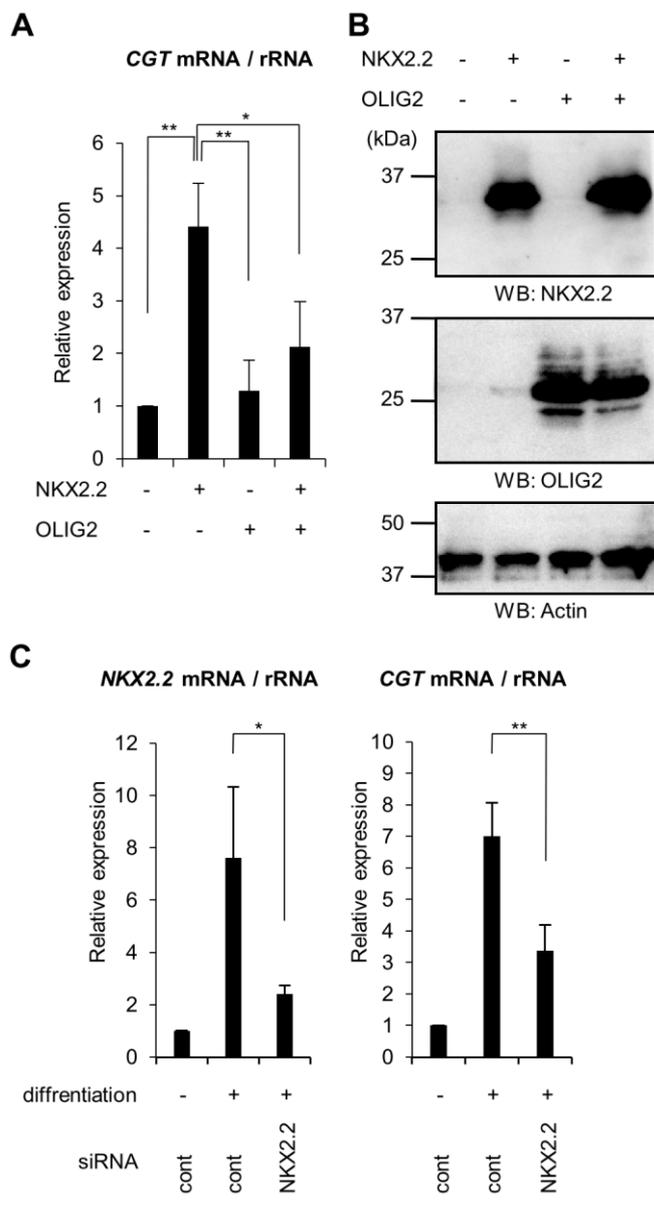


図4 NKX2.2 と OLIG2 は内在性 CGT 遺伝子の発現に対してそれぞれ促進的、抑制的に作用する

(A,B) NKX2.2 または OLIG2、もしくは両方を HOG 細胞に発現させた。CGT mRNA の発現量をリボソーム RNA で平均化し、mock 細胞に対する相対値として示した (n=3) (A)。細胞のライセート中の核タンパク質発現量を、抗 NKX2.2 (上)、抗 OLIG2 (中)、抗 actin (下) を用いてウェスタンブロットで確認した (B)。(C) HOG 細胞を分化培地で 4 日間培養し、その後 control siRNA (cont) または NKX2.2 siRNA (NKX2.2) で処理した。NKX2.2 と CGT の mRNA 発現量をリボソーム RNA で平均化し、control siRNA で処理した未分化 HOG 細胞に対する相対値で示した (n=3)。グラフは means \pm SD (*p<0.05、**p<0.01 Student's *t*-test) で示した。

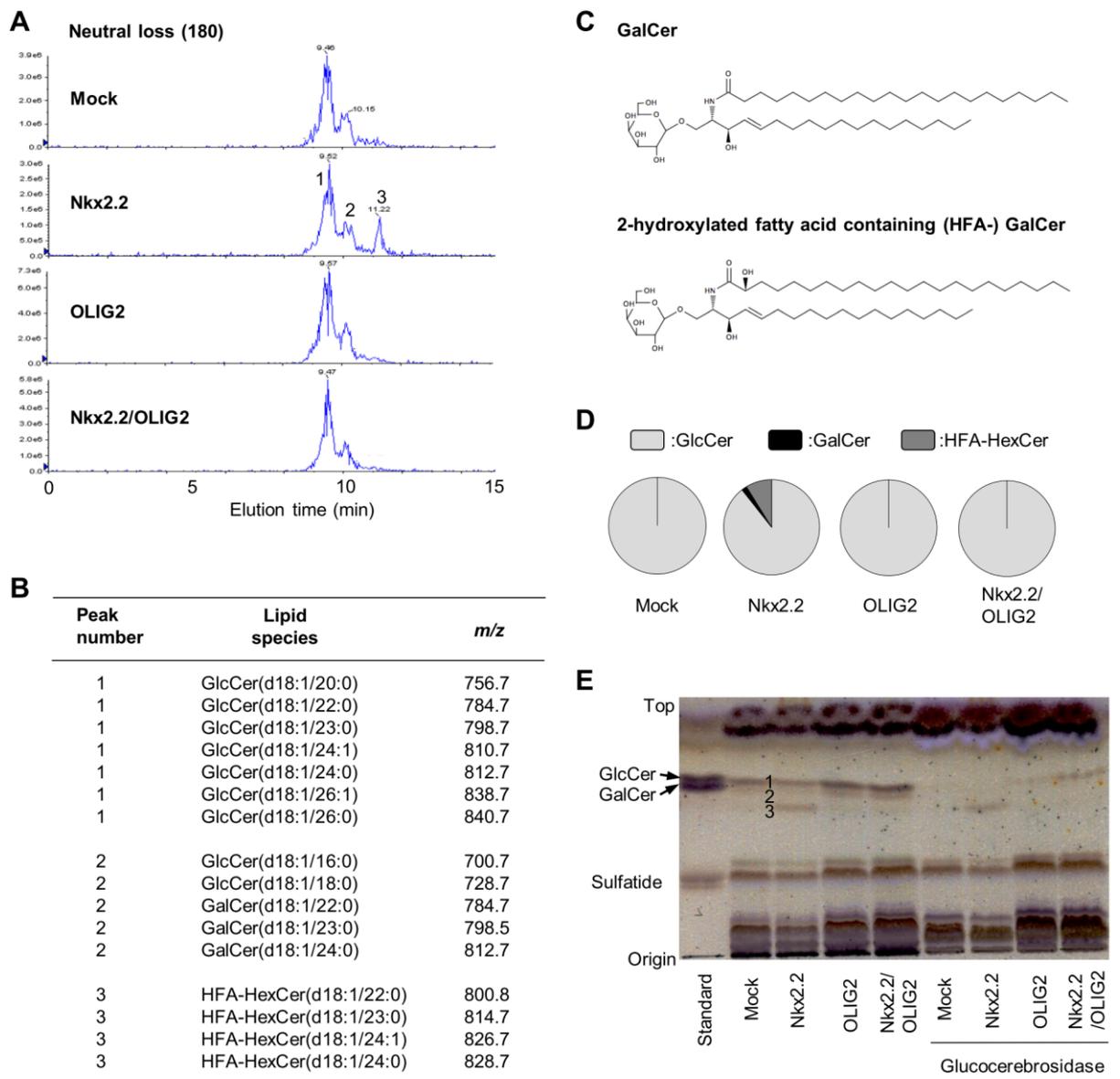


図5 NKX2.2によってCGT発現量が上昇したHOG細胞ではGalCer発現量が増加する

(A,B)NKX2.2またはOLIG2、もしくは両方を発現させたHOG細胞から総脂質画分を抽出し、アルカリ分解した。このサンプルをLCで分離し、neutral loss scanでヘキシシルセラミドを持つ分子のイオンを測定した(A)。さらに、各ピーク(1,2,3)に含まれる糖脂質の分子種をLCの溶出時間、MSおよびMS/MSで同定した(B)。(C)GalCer(d18:1/22:0)とHFA-GalCer(d18:1/22:0)の構造。(D)MRMの定量解析で得られた、全ヘキシシルセラミド中に占めるGlcCer、GalCer、HFA-HexCerの割合を円グラフに示した。(E)A,Bで用いたのと同じサンプルをglucocerebrosidaseで消化し、TLCで展開した後にオルシノール硫酸で発色させた。

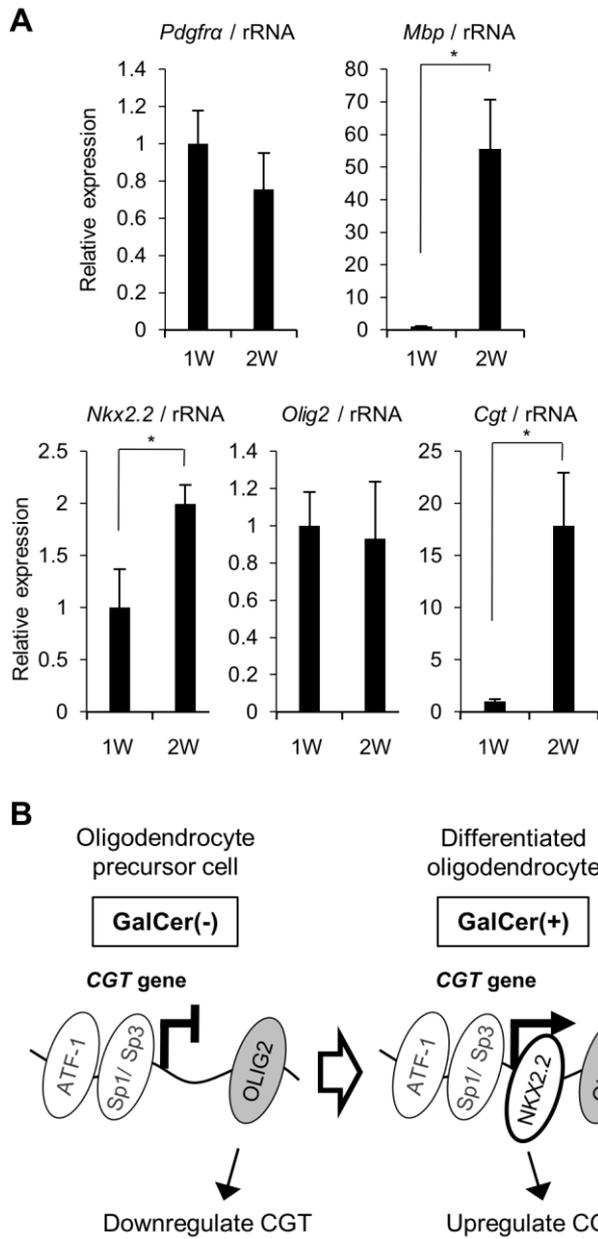


図6 マウスの脳の発生に伴って *Nkx2.2* の発現は上昇するが *Olig2* の発現は変化しない

(A) 全 RNA を 1 週齢と 2 週齢のマウスの脳から抽出し、リアルタイム PCR を行った。各遺伝子発現量をリボソーム RNA で平均化し、1 週齢マウスに対する相対値として示した (n=3)。グラフは means ± SD (*p<0.05 Student's *t*-test) で示した。(B) オリゴデンドロサイト分化時の *NKX2.2* と *OLIG2* による *CGT* 遺伝子発現制御機構の予想図。オリゴデンドロサイト前駆細胞では *OLIG2* により *CGT* 遺伝子の転写が抑制されているが、成熟オリゴデンドロサイトに分化する段階では *NKX2.2* の発現が上昇し、*OLIG2* の転写抑制効果を *NKX2.2* の転写活性化効果が上回ることで *CGT* 遺伝子の転写が起こる。

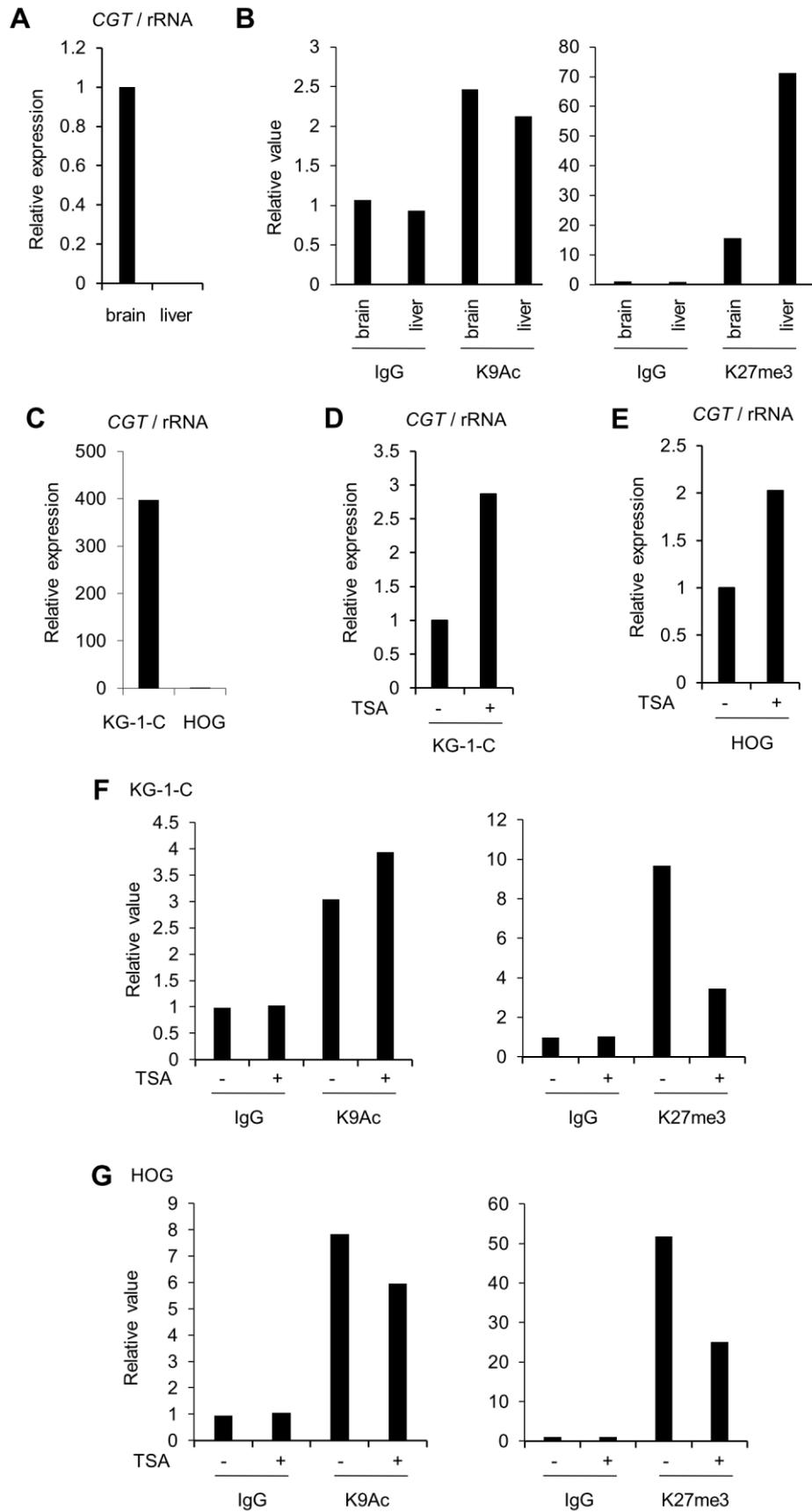


図 7 CGT mRNA 発現はヒストンのメチル化による制御を受ける (A) マウスの脳と肝臓から全 RNA を抽出し、*Cgt* mRNA の発現量をリアルタイム PCR で定量した。値はリボソーム RNA で平均化し、脳での値を 1 とした時の相対値で示した。(B) マウスの脳と肝臓からクロマチンを抽出し、抗 H3K9Ac、抗 H3K27me3 または normal rabbit IgG でクロマチン免疫沈降を行った。沈降物中に含まれる *Cgt* 遺伝子転写開始部位周辺 (-441 から-382 まで) の領域の存在量をリアルタイム PCR で定量した。値は脳、肝臓のクロマチンをそれぞれ normal rabbit IgG で免疫沈降したサンプルの平均値を 1 とした時の相対値で示した。(C) KG-1-C 細胞と HOG 細胞の全 RNA を抽出し、*CGT* mRNA をリアルタイム PCR で定量した。値はリボソーム RNA により平均化し、HOG 細胞を 1 とした時の相対値で示した。(D) KG-1-C 細胞を TSA 処理し、*CGT* mRNA の発現量をリアルタイム PCR で定量した。値は mock 細胞での発現量を 1 とした時の相対値で示した。(E) HOG 細胞を TSA 処理し、*CGT* mRNA の発現量をリアルタイム PCR で定量した。値は mock 細胞での発現量を 1 とした時の相対値で示した。(F) KG-1-C 細胞を TSA 処理し、抗 H3K9Ac、抗 H3K27me3 もしくは normal rabbit IgG を用いてクロマチン免疫沈降を行った。沈降物中に含まれる *CGT* 遺伝子転写開始部位周辺 (+1 から+202 まで) の領域の存在量をリアルタイム PCR で定量した。値は、mock、TSA 処理した細胞それぞれのクロマチンを normal rabbit IgG で免疫沈降したサンプルの平均値を 1 とした時の相対値で示した。(G) HOG 細胞を TSA 処理し、抗 H3K9Ac、抗 H3K27me3 もしくは normal rabbit IgG を用いてクロマチン免疫沈降を行った。沈降物中に含まれる *CGT* 遺伝子転写開始部位周辺の領域 (+1 から+202 まで) の存在量をリアルタイム PCR で定量した。値は F と同様に示した。

考察と結論

本研究では、オリゴデンドロサイト系列の転写因子 NKX2.2 と OLIG2 が、*CGT* 遺伝子の発現に関して反対の作用を持つことを示した。NKX2.2 が *CGT* 遺伝子の発現を促進するのに対して、OLIG2 がこの効果を打ち消す能力を持つという知見は、神経系の発生過程での時空間的な転写因子発現の観点から解釈することができる。GalCer を認識する O1 抗体を用いた分化時のオリゴデンドロサイトの解析によって、GalCer はオリゴデンドロサイト前駆細胞には発現していないが、さらに分化が進んだ未成熟オリゴデンドロサイトの段階では発現していることが報告されている (Bansal, R., et al. 1989)。胎児の中樞神経系では sonic hedgehog (Shh) によって神経上皮の腹側領域からオリゴデンドロサイト前駆細胞が生じ、その後灰白質領域に分散する (Miller, R.H. 1996)。OLIG1 と OLIG2 は運動ニューロンとオリゴデンドロサイト前駆細胞の出現に不可欠な因子であり (Takebayashi, H., et al. 2000, Zhou, Q., et al. 2002)、Shh によって制御される早期の OLIG1 と OLIG2 の発現は、オリゴデンドロサイト系列細胞の分化の開始を司っている (Lu, Q.R., et al. 2000, Zhou, Q., et al. 2000)。その後 OLIG2 陽性の未分化オリゴデンドロサイトにおいて NKX2.2 の発現が上昇する時期に、*CGT* などの成熟オリゴデンドロサイトマーカーの発現が始まる (Qi, Y., et al. 2001, Soula, C., et al. 2001)。すなわち、オリゴデンドロサイトの分化における NKX2.2 と GalCer の発現のタイミングと場所はほぼ同じであり、NKX2.2 が *CGT* 遺伝子のプロモーター領域に結合して転写を促進するという本研究の結論は妥当である。さらに後の、オリゴデンドロサイトがミエリンを形成する段階では、NKX2.2 陽性の細胞数が増加すると共に OLIG2 の発現が低下し始める (Cai, J., et al. 2010)。これらの知見を総合して考えると、本研究で明らかにした OLIG2 と NKX2.2 による *CGT* 遺伝子の転写制御は、発生過程での厳密な GalCer 発現制御の基盤となる重要な仕組みの一つであることが示唆される。つまり、*CGT* 遺伝子の発現は発生初期には OLIG2 の効果によって抑制されており、その後 NKX2.2 の発現が上昇して OLIG2 の転写抑制効果に打ち勝った時に *CGT* 遺伝子の発現が開始されると考えられる。本研究において、OLIG2 に対して NKX2.2 の発現比率が十分に高いときには *CGT* 遺伝子の転写活性が実際に高いことを確認している。

第一節では、*CGT* 遺伝子のプロモーター領域にある NKX2.2 結合領域を同定するとともに、HOG 細胞から抽出したクロマチンを用いた検討によって、NKX2.2 が細胞内でこの DNA 領域に結合することを示した。その一方で、ゲルシフトアッセイでは、NKX2.2 と同定した DNA 領域の結合は観察されなかった。さらに、いくつか報告されている NKX2.2 の結合コンセンサス配列 (Watada, H., et al. 2000, Wei, Q., et al. 2005) は、同定したこの領域には見られなかった。しかし、NKX2.2 はエピジェネティック制御因子の histone deacetylase-1 を介して *Sirt2* プロモーターに結合することが報告されているように (Ji, S., et al. 2011)、*CGT* プロモーターに

対しても他の転写因子を介して NKX2.2 が結合する可能性が考えられる。また、NKX2.2 を HEK293 などのオリゴデンドロサイト系以外の培養細胞で発現させたときには、*CGT* 遺伝子の発現上昇は見られなかった (図 8)。したがって、本研究で得られた知見のみでは *CGT* 遺伝子の発現制御機構を完全には説明することができない。NKX2.2 と OLIG2 に加えて、他の転写因子による制御やエピジェネティック制御などを考慮する必要がある (Ji, S., et al. 2011, Liu, J., et al. 2010)。

OLIG2 の *CGT* 遺伝子に対する転写抑制効果は非常に強く、OLIG2 と NKX2.2 をプラスミド量比 1:1 で HOG 細胞に発現させた場合には、NKX2.2 の *CGT* 遺伝子に対する転写促進効果がほぼ完全に抑制された。OLIG2 はオリゴデンドロサイト前駆細胞の出現を司り、その後のオリゴデンドロサイトへの分化の段階でも発現している。そして、*CGT* 遺伝子の発現は OLIG2 の発現が継続しているこの時期から始まるにもかかわらず、OLIG2 が *CGT* 遺伝子の転写を強力に抑制することは一見すると矛盾しているようにも思える。しかし、この現象はオリゴデンドロサイトにおいて GalCer 発現量が厳密に制御されている機構の一部であると考えることができる。GalCer は正常なミエリン形成に不可欠な分子であるが、その過剰発現が正常なミエリン形成を妨げることも知られている。例えば、オリゴデンドロサイト特異的にラット *Cgt* 遺伝子を過剰発現する *Plp-Cgt* ノックインマウスでは、ミエリン形成オリゴデンドロサイトが減少することが報告されている (Zoller, I., et al. 2005)。つまり、正常なミエリン形成を行う上では *CGT* 遺伝子の過剰な発現を防ぐ必要があり、OLIG2 の *CGT* 遺伝子に対する転写抑制効果はこれに寄与していると思われる。

今回発見した E-box 周辺の *CGT* 遺伝子の転写抑制領域を含むプロモーターコンストラクトは、OLIG2 を発現していない MCF7 細胞でも同様に強い転写抑制効果を持っていた (図 9A)。また、MCF7 細胞の核タンパク質抽出液中にはこの E-box 配列に結合するタンパク質が発現していた (図 9B)。このタンパク質の実体は不明であるが、*CGT* 遺伝子は脳などの一部の臓器に限って発現していることから、非オリゴデンドロサイト系の細胞においても、OLIG2 と類似の抑制作用を持つ bHLH 転写因子が E-box 領域を介して *CGT* 遺伝子の転写を抑制している可能性が考えられる。

第四節と第五節では、NKX2.2 と OLIG2 が内在性 *CGT* 遺伝子の発現に及ぼす効果について検討した。これらの転写因子が内在性の *CGT* 転写を制御することを複数回の実験によって確認したが、同じ実験条件で NKX2.2 を過剰発現させても *CGT* mRNA に変化が見られないこともあった。しかし、このように *CGT* mRNA が上昇しなかった実験においても、トランスフェクションした細胞で NKX2.2 が過剰発現していることはウェスタンブロットで確認している。

このような知見から、*CGT* 遺伝子の転写亢進は NKX2.2 だけで完全には説明できず、NKX2.2 の転写促進作用を助ける未同定の因子の存在が示唆される。また、NKX2.2 の過剰発現により

CGT mRNA が上昇したサンプルでも、産物である GalCer の増加が見られない場合もあった。この知見は、HOG 細胞内では、CGT の発現量に加えて、GalCer 量を制御する別の要因が存在することを示唆する。例えば、GlcCer 合成酵素と CGT はセラミドを同一の基質とすることから、HOG 細胞では GlcCer 合成酵素の発現量が高いために相対的に CGT の活性が低くなり、GalCer 合成の検出が難しくなっている可能性がある。実際に、オリゴデンドロサイトとは異なり、HOG 細胞では GalCer がほとんど見られない代わりに GlcCer が豊富に存在している。

第六節では、マウスの脳においては、オリゴデンドロサイトの成熟に伴って Nkx2.2 の発現が上昇するのに対して、Olig2 の発現は変化しないことを示した。また、マウスの脳では、1 週齢に比べて 2 週齢で Nkx2.2 遺伝子の発現量が 2 倍になり、Cgt 遺伝子の発現量は 15 倍以上に上がっていた。一方、NKX2.2 と OLIG2 の比を変えて HOG 細胞で発現させた時の CGT プロモーターの活性測定では、NKX2.2 が OLIG2 による転写抑制効果を上回ってプロモーター活性を 15 倍上昇させるためには、NKX2.2/OLIG2 比が 10 以上である必要があった。細胞レベルでのアッセイと *in vivo* での遺伝子発現を単純には比べられない点や、マウス脳にはオリゴデンドロサイト系以外にも様々な細胞が混在している点、さらにはマウス脳での週齢間の相対比較解析では遺伝子間の絶対的発現量を比べられない点を考慮しても、2 週齢マウスで Cgt 遺伝子の発現量が 15 倍に増えることを Nkx2.2 遺伝子の発現量が 2 倍になることだけで全て説明できるわけではない。CGT 遺伝子の発現には NKX2.2 と協調する他の因子の作用も必要かもしれない。また、Nkx2.2 遺伝子のノックアウトマウスでは、オリゴデンドロサイト前駆細胞からの成熟が遅延することでオリゴデンドロサイト細胞数が減少するものの、依然として一部のオリゴデンドロサイトは成熟してミエリンを形成することが知られており (Qi, Y., et al. 2001)、NKX2.2 は CGT 遺伝子の発現に重要な分子の一つではあるが、それだけで CGT 遺伝子の発現の全てを決定する分子ではないと考えられる。

第五節で、NKX2.2 を HOG 細胞で過剰発現させると、HFA-GalCer の含量が顕著に増大することを示した。HFA-GalCer 生合成の基質である HFA-Ceramide は、fatty acid 2-hydroxylase (FA2H) によって 2 位が水酸化された脂肪酸とスフィンゴシンから生合成される (Eckhardt, M., et al. 2005)。脳では、オリゴデンドロサイトの分化に伴って FA2H の発現が上昇し、HFA-GalCer の量が増加することが知られている (Alderson, N.L., et al. 2006)。FA2H が欠損し、脂肪酸が水酸化されていない GalCer のみを発現するマウスでは、ミエリンの形成は正常に行われるが加齢に伴って脱ミエリンを起こすことから、HFA-GalCer は長期的なミエリンの機能維持にとって重要な因子であると考えられる (Zoller, I., et al. 2008)。このような知見から、オリゴデンドロサイトへの分化を制御する転写因子 NKX2.2 の過剰発現によって、FA2H を含むオリゴデンドロサイト関連遺伝子の発現が上昇し、HFA-GalCer 量の増加につながったと考えられる。したがって、NKX2.2 は、CGT 遺伝子だけでなく、正常なミエリン形成に関わる複数の遺

伝子の制御に関与すると考えられる。今後は、NKX2.2 とこれらの遺伝子群の関係についてさらなる解析が必要である。

第七節では、マウスを用いて、*Cgt* 遺伝子を高発現している脳と、ほとんど発現していない肝臓との間でクロマチン修飾を比較した。その結果、*Cgt* 遺伝子の転写開始部位周辺では、活性化ヒストン修飾には差がないのに対して、抑制性ヒストン修飾が脳で有意に低いことが明らかになった。また、HOG 細胞や KG-1-C 細胞をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の TSA で処理すると *CGT* 遺伝子の発現が上昇するが、この際に H3K9Ac のレベルには変化が見られないのに対して、H3K27me3 のレベルは低下していた。このようなヒストン修飾の変化が *CGT* 遺伝子の発現にどのように関わるかは十分にはわかっていないが、今回得られた知見は *CGT* 遺伝子の発現がエピジェネティックな転写抑制因子による制御を受けていることを示唆する。このような知見から、*CGT* 遺伝子の発現は、転写因子とエピジェネティック制御によって通常は抑制されており、オリゴデンドロサイトの成熟に伴って特異的に抑制が解除されることが想定される。非オリゴデンドロサイト細胞での E-box 結合転写因子およびエピジェネティック制御を介する *CGT* 転写抑制機構を含めて、今後のさらなる解析が必要である。

CGT 遺伝子がオリゴデンドロサイト系列の 2 つの転写因子の拮抗する作用によって制御されるという本研究の知見は、ミエリンの正常な機能維持にとって不可欠な因子 GalCer の生合成の新たな調節機構を明らかにしたものであり、神経系の発生におけるミエリン形成過程を理解する上で重要な一歩であると考えられる。

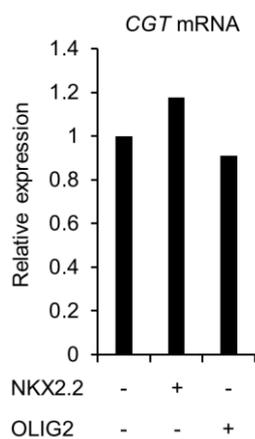


図 8 HEK293 細胞で NKX2.2、OLIG2 を発現させた際の CGT mRNA の発現変化

HEK293 細胞に NKX2.2 または OLIG2、もしくは両方を発現させ、CGT mRNA の発現量をリアルタイム PCR で定量した。値は mock 細胞の CGT 発現量を 1 とした時の相対値で示した。

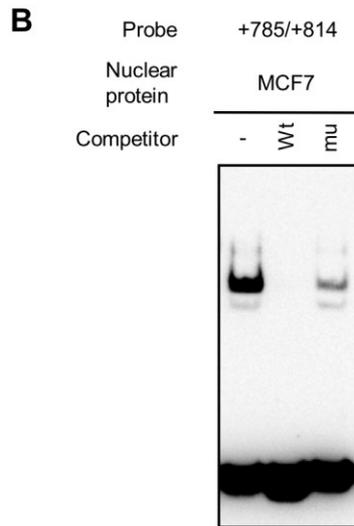
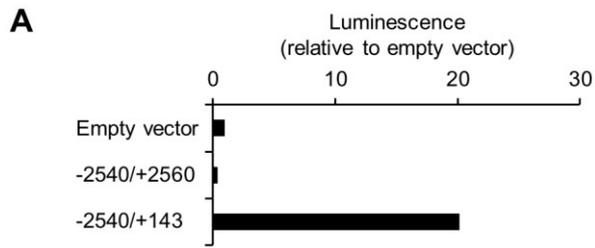


図9 MCF7細胞での E-box 領域の転写抑制効果

(A) *CGT* 転写開始部位前後の E-box を含むゲノム DNA 領域 (-2540/+2560)、または E-box を含まない領域 (-2540/+143) をクローニングしたルシフェラーゼベクター、または empty vector を MCF7 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。ルシフェラーゼによる発光強度は empty vector をトランスフェクションした細胞での発光を 1 とした時の相対値で示した。(B)プローブ (+785/+814) の MCF7 細胞の核タンパク質に対する結合を EMSA で調べた。非標識 competitor には (+785/814) プローブ (Wt)、もしくは変異 E-box プローブ (mu) を用いた。

実験方法

細胞培養

HOG、HeLa、KG-1-C、HEK293 および MCF7 細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium に 10% 牛胎児血清、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した培地中で培養した。

抗体

ウェスタンブロットには以下の抗体を用いた。Goat 抗 NKX2.2 (Santa CruzBiotechnology, c-15015)、mouse 抗 OLIG2 (Millipore, MABN50)、mouse 抗 actin (SIGMA, clone AC-40)。ChIP アッセイには、以下の抗体を用いた。Rabbit 抗 NKX2.2 (SIGMA, HPA003468)、rabbit 抗 H3K9Ac (Millipore, 07-352)、mouse 抗 H3K27me3 (abcam, ab6002)。

プラスミドコンストラクト

ヒト *CGT* 遺伝子プロモーター領域 (-1940 から+1960 まで)を、HeLa 細胞のゲノム DNA から -1940F、+1960R プライマー (表 1) を用いて PCR 法でクローニングした。クローニングしたゲノム DNA 断片を、表 1 に示した制限酵素で消化した後に pGV-B2 プラスミド (Toyo Ink) に組み込み、pGV[-1940/+1960]コンストラクトを作製した。様々な長さの欠失コンストラクトは、pGV[-1940/+1960]コンストラクトから表 1 に示したそれぞれに対応するプライマーを用いて増幅した DNA 断片を pGV-B2 プラスミドに組み込むことで作製した。pGV[-2540/+2560]、pGV[-2540/+143]は、-1940F、+2560R、+143R プライマーを用いて同様にクローニングし、作製した。pGV[-847/+106]+E-box と pGV[-847/+106]+E-box mu コンストラクトは、pGV[-847/+609]を *Sma*I で消化して得た断片に二本鎖合成 DNA 断片 (5'-TCCTGTTTCTCCCATATGGCATCCGTTCTGA -3' とその相補配列、5'-TCCTGTTTCTCCTTTAGAGCATCCGTTCTGA -3'とその相補配列)を組み込むことで作製した。それぞれの転写因子の cDNA は HEK293 細胞 (*NKX2.2*、*MASH1*、*ID2*、*SOX10*)もしくは KG-1-C 細胞 (*OLIG1*、*OLIG2*、*OLIG3*)の cDNA から、表 2 に示したプライマーを用いて PCR 法により増幅した。クローニングした各 DNA 断片は表 2 に示した制限酵素で消化した後に pcDNA6/myc-His C (Life Technologies) に組み込んだ。

ルシフェラーゼアッセイ

CGT プロモーター活性に対する転写因子の寄与を評価するために、*CGT* プロモーター領域を含む pGV ルシフェラーゼベクター (125 ng)、内部標準レポーターとして pRL-CMV プラスミ

ド (Toyo Ink, 12.5 ng)、各転写因子の発現ベクター (125 ng)の3つを、Lipofectamine 2000 (Life Technologies)を用いて細胞にトランスフェクションした。その24時間後、ルシフェラーゼ活性を PicaGene Dual SeaPansy Luminescence Kit (Toyo Ink) を用いて測定した。値は pRL-CMV ベクターからの Renilla ルシフェラーゼによる発光強度から得られたトランスフェクション効率で平均化した。転写抑制配列の決定には、様々な長さのプロモーター領域を含む各ルシフェラーゼベクター (125 ng)と、pRL-CMV プラスミド (12.5 ng)を細胞にトランスフェクションし、同様の方法で発光値を測定した。

クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ

ChIP アッセイは Kizuka らの方法に従って行った (Kizuka, Y., et al. 2011)。細胞 (15 cm 培養ディッシュ)の固定は、培養液中に最終濃度 1%になるようホルムアルデヒドを加えて 10 分静置して行い、その後最終濃度 125 mM になるようグリシンを添加して 5 分静置することによって架橋を停止した。脳、肝臓は、ミンスした組織を 1% ホルムアルデヒド /PBS 中に 10 分静置し、その後最終濃度 125 mM になるようグリシンを添加してからホモジェナイズした。固定した細胞からクロマチンを抽出し、SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP kit (Cell Signaling Technology)を用いて ChIP アッセイを行った。免疫沈降を行う前にクロマチンサンプル液の 1%を取り、input サンプルとした。DNA 量は input サンプルに対する相対値として表示した。

核タンパク質抽出

核タンパク質の抽出は Kizuka らの方法に従って行った (Kizuka, Y., et al. 2011)。核抽出物のタンパク質濃度を BCA アッセイキット (Thermo Scientific) を用いて測定し、1 μ g の核タンパク質を EMSA に用いた。

ゲルシフトアッセイ (EMSA)

NKX2.2 の結合を調べる DNA プローブには、-10/+50 のオリゴヌクレオチド (5'-CCCAGCCTGCAAGCCAACCGCGCTCAGCGGACGACTGGCCGGATCCCAACGCGCTGCCCC-3')を用いた。E-box 配列と結合する転写因子を調べる DNA プローブには、+785/+814 のオリゴヌクレオチド (5'-TCCTGTTTCTCCCATATGGCATCCGTTTCGA-3')を用いた。CRE の EMSA には (5'-TGGCAAAGGCAGATTCGTTCAG-3')のオリゴヌクレオチドを、GC-box の EMSA には (5'-GAAGAGTGGGCGGGGCCA-3')のオリゴヌクレオチドを用いた。各オリゴヌクレオチドを Biotin 3'-end DNA labeling kit (Thermo Scientific) を用いてビオチン化した。E-box 配列の EMSA に関して、未標識コンペティターとしてプローブと同じオリゴヌクレオチド、または

E-box を変異させたオリゴヌクレオチド (5'- TCCTGTTTCTCCTTTAGAGCATCCGTTCTGA -3') を用いた。ビオチン標識済み、および未標識のオリゴヌクレオチドを 10 mM Tris HCl (pH 7.5)、0.1 M NaCl、1 mM EDTA を含むバッファー中でそれぞれを相補的なオリゴヌクレオチドと混ぜ、95°C で 5 分間静置した。その後、混合液をゆっくりと室温まで冷やし、オリゴヌクレオチドをアニーリングさせた。EMSA は LightShift Chemiluminescent EMSA kit (Thermo Scientific) を用い、Kizuka らの方法に従って行った (Kizuka, Y., et al. 2011)。コンペティターは、核タンパク質と混合して静置する際に、ビオチン化したオリゴヌクレオチドに対して 200 倍のモル比で加えた。

データベース解析

転写因子結合部位の候補を検索するには MatInspector (<http://www.genomatix.de/>) を用いた。

細胞分化と遺伝子ノックダウン

HOG 細胞 (10 cm 培養ディッシュ) を分化培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium に 100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、5 mg/L insulin、30 nM triiodothyronine (T3)、30 nM sodium selenite、16.1 mg/L putrescine、1.25 g/L glucose を添加 ; (de Arriba Zerpa, G.A., et al. 2000)) 中で 2 日間培養した。その後新しい培地に交換してさらに 1 日培養した後、細胞を poly-L-lysine コートした 10 cm 培養ディッシュに継代した。それからさらに一晩培養した後、NKX2.2 に対する siRNA (QIAGEN, SI00659372, 200 pmol /培養ディッシュ) またはコントロール siRNA (QIAGEN, 1027280) を Lipofectamine 2000 (20 µl /培養ディッシュ)を用いて細胞に導入した。siRNA 導入 48 時間後に全 RNA を抽出し、遺伝子発現レベルを定量した。

全 RNA の抽出と逆転写

NKX2.2 または OLIG2 の発現ベクター (7.5 µg) を Lipofectamine 2000 を用いて 10 cm 培養ディッシュ中の HOG 細胞に導入した後、細胞を 48 時間培養した。その後、TRI REAGENT (Molecular Research Center) を用いて全 RNA を抽出した。逆転写は 1 µg の全 RNA から SuperScript III First-Strand Synthesis System (Life Technologies) と random hexamer を用いて行った。

リアルタイム PCR

定量的 PCR は ABI PRISM 7900HT (Life Technologies) を用いて行った。ヒト CGT mRNA とヒトゲノムの NKX2.2 結合領域、転写開始部位周辺領域の検出 (ChIP) には TaqMan MGB Probe

(Life Technologies)を用いた (表 3)。TaqMan Gene Expression Assay probes (Life Technologies)を用いて、ヒト *NKX2.2* (Hs00159616_m1)、マウス *Cgt* (Mm00495930_m1)、マウス *Nkx2.2* (Mm00839794_m1)、マウス *Olig2* (Mm01210556_m1)、マウス *Pdgfra* (Mm00440701_m1)、マウス *Mbp* (Mm01266402_m1) mRNA を定量した。リボソーム RNA の定量には TaqMan rRNA probe and control primers (Life Technologies) を用いた。各 mRNA の発現量は rRNA 発現量によって平均化した。

ウェスタンブロット

PBS 中でホモジェナイズした細胞、および核タンパク質抽出液のタンパク質濃度を、BCA アッセイキットを用いて測定した。タンパク質サンプル (10 µg) を 5-20 % SDS-PAGE で泳動分離した (Laemmli, U.K. 1970)。その後、ニトロセルロース膜へと転写し、TBS/0.1% Tween 20 に溶かしたスキムミルク (終濃度 5%) でブロッキングし、一次抗体と反応させてから horse eadish peroxidase 結合二次抗体を反応させた。Supersignal West Dura Extended (Thermo Scientific) を用いて得られた発光シグナルを ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare) で検出した。

糖脂質抽出

NKX2.2 または OLIG2 の発現ベクター (7.5 µg) を、Lipofectamine 2000 を用いて 15 cm 培養ディッシュ中の HOG 細胞に導入し、48 時間培養した。その後、ガラスチューブに細胞を回収し、2.2 mL クロロホルム (C) と 3.2 mL メタノール (M) で総脂質画分を抽出した。有機層を N₂ 気流下で蒸発させ、残渣を 2 mL 0.1 M KOH / C:M=2:1 に懸濁し、室温で 2 時間反応させてグリセロ脂質を加水分解した。その後 1M 酢酸で中和し、H₂O を 500 µL 加えてから下層の有機層を分取し、N₂ 気流下で溶媒を蒸発させた。

LC-ESI-MS/MS

LC-MS/MS 装置は、QTRAP4500 (三連四重極リニアイオントラップ質量分析計, AB-SCIEX) に LC (Eksigent) を接続したシステムを使用した。カラムは Atlantes Silica-HILIC (2.1 x 150 mm i.d., 3 µm, Waters) を使用した。移動相 (A) : 5 mM ギ酸アンモニウムを含むアセトニトリル : メタノール : ギ酸 (97:2:1) により平衡化した後、脂質混合物を注入した。分析温度は 40 °C、0.2 ml/分の流速で分析を実施し、試料は移動相 (B) : 20 mM ギ酸アンモニウムを含むメタノール : 水 : ギ酸 (89:9:1) のグラジエント溶出を行った。Neutral loss scan (分子イオン非依存的なスキャン) は MS/MS 測定により脱離した hexose (ニュートラルロス) を検出することにより hexose 化脂質の類縁化合物を選択的に検出した。次に HexCer の定量解析は、例えば HexCer (d18:1/12:0) の検出は m/z 644.6→264.4 の MRM により行い、その抽出マスクロマトグラムか

ら分離状態を評価した。GlcCer、GalCer (Avanti)、化学合成した hexose 化リン脂質を標準品として使用した。

TLC

HOG 細胞から抽出した糖脂質を glucocerebrosidase (Cerezyme; Genzyme)で消化し、HPTLC プレートで C/M/H₂O=40:12:1 の展開液で展開した。その後、オルシノール硫酸で発色した。

表 1 ルシフェラーゼレポーターコンストラクトの作成には以下のプライマーを用いた。

プライマー名	オリゴヌクレオチド配列 (5' →3')	位置	制限酵素
-2540 F	accacgcgtACATATGTCCAGAAAGTATGAGCCC	-2540	Mlu I
-1940 F	acccacgcgtTTTAATACCATACTCCACATTGGCT	-1940	Mlu I
-847 F	aaccacgcgtGACATGGCATTTTTGATTCCAACG	-847	Mlu I
+2560 R	cccgctagcAGTATCAAGCCTTTACTAAATATCG	+2560	Nhe I
+1960 R	ccccgctagcACGTTTTTGAACATGAAATTATCAG	+1960	Nhe I
+1247 R	ttttgctagcTCACCTCTTCTCTAATCCCGGGGGC	+1247	Nhe I
+609 R	ttttgctagcACTCACCTCAGGGAGCAAACAACGC	+609	Nhe I
+143 R	ttttgctagcATCACTCGCCTCTGACTGCGAGCGC	+143	Nhe I
+48 R	aaagctagcGGCAGCGCGTTGGGATCCGG	+48	Nhe I
+17 R	aaagctagcCTGAGCGCGTTGGCTTGCA	+17	Nhe I
+869 R	ttttgctagcGGCCTCTGGGCTCCGCGGTG	+869	Nhe I
+849 R	ttttgctagcCCCTCTGCCTTGAGCGCACA	+849	Nhe I
+819 R	ttttgctagcAACCTCGAACGGATGCCAT	+819	Nhe I
+799 R	ttttgctagcATGGGAGAAACAGGATCGCG	+799	Nhe I

小文字は制限酵素サイト用に付加した配列。

表 2 各 cDNA のクローニングには以下のプライマーを用いた。

プライマー名	オリゴヌクレオチド配列 (5' →3')	制限酵素
OLIG1 F	CACCatgtactatgcggttcca	(Eco RI)
OLIG1 R	tcactggagaattgcgct	(Eco RI)
OLIG2 F	aaaCTGCAGGCCACCatggactcggacgccagcctggtgt	Kpn I
OLIG2 R	tttGAATTCtacttggcgtcggaggtgagggcg	Eco RI
OLIG3 F	CACCatgaattctgattcgagctc	(Not I)
OLIG3 R	tcactgagcaagtcttgg	(Pml I)
NKX2.2 F	CACCatgctcgtgaccaacacaaa	(Eco RI)
NKX2.2 R	tcaccaagtcactgctggg	(Eco RI)
SOX10 F	CACCatggcggaggagcaggacct	(Eco RI)
SOX10 R	ttagggccgggacagtgtcg	(Eco RI)
ID2 F	aaaGCGGCCGCCACCatgaaagccttcagtcccgtgaggt	Not I
ID2 R	tttCTCGAGtcagccacacagtgttctgtca	Xho I

大文字は Kozak 配列、もしくは制限酵素サイトに付加した配列。

OLIG1、OLIG3、NKX2.2、SOX10 それぞれの PCR 産物は pCR4Blunt-TOPO (invitrogen) に組み込み、括弧に示した制限酵素で消化した。

表 3 リアルタイム PCR には、以下のプライマーとプローブを用いた。

プライマー名	オリゴヌクレオチド配列 (5' →3')
RT hCGT Forward primer	caaaccagccagcccactaccagaa
RT hCGT Reverse primer	ttcctagattctttggttgggtcc
hCGT mRNA TaqMan MGB Probe	tggtgctaataaacatggcttgtc
ChIP hCGT NKX2.2 site Forward primer	gctcgcgaaaagtcccagcctgcaa
ChIP hCGT NKX2.2 site Reverse primer	gcaaggggcagcgcgttgggatccg
ChIP hCGT NKX2.2 site TaqMan MGB Probe	caacctcgctcagcggacgactggc
ChIP mCGT transcription site Forward primer	caggtgcagcctcgcagcat
ChIP mCGT transcription site Reverse primer	ccaggacaccgatgcgcacg
ChIP mCGT transcription site TaqMan MGB Probe	tggcaggtgcagcctcgcagcatct
ChIP hCGT transcription site Forward primer	aagccaacctcgctcagcggacgac
ChIP hCGT transcription site Reverse primer	tgccctccgcacttggctcagcgg
ChIP hCGT transcription site TaqMan MGB Probe	aggcgcgtctgcatccatgccccag

謝辞

終わりに臨み、本研究の機会を与えてくださいました、理化学研究所システム糖鎖生物学研究グループ、谷口直之グループディレクターに感謝いたします。また、本研究の遂行にあたり直接ご指導いただきました、理化学研究所疾患糖鎖研究チーム、北爪しのぶ博士、木塚康彦博士に感謝いたします。また、糖脂質分析に関して協力、助言していただきました理化学研究所脳科学総合研究センター神経膜機能研究チーム、平林義雄チームリーダー、中嶋和紀博士、オリゴデンドロサイト前駆体細胞の分析に関して協力、助言していただきました理化学研究所脳科学総合研究センター分子精神科学研究チーム、吉川武男チームリーダー、前川素子博士、glucocerebrosidase (Cerezyme) を提供していただきました理化学研究所脳科学総合研究センター神経膜機能研究チーム、秋山央子博士、HOG 細胞を提供していただきました Georgia Health Sciences University、Robert K. Yu 博士に感謝いたします。また、指導教員としてお世話になりました京都大学名誉教授、小堤保則先生、京都大学大学院医学研究科、竹松弘先生、京都大学大学院薬学研究科、中山和久先生に感謝いたします。また、本研究は理化学研究所大学院生リサーチアソシエイト制度より支援を受けたもので、ここに感謝いたします。また、本論文は *Glycobiology* (2014, "Ceramide galactosyltransferase expression is regulated positively by Nkx2.2 and negatively by OLIG2" Oxford University Press, doi: 10.1093/glycob/cwu042) に掲載されたものをもとに、改稿・加筆して作成しました。

最後に、本研究にあたり様々なご協力をいただきました理化学研究所システム糖鎖生物学研究グループの皆様に感謝いたします。

参考文献

- Alderson, N.L., Maldonado, E.N., Kern, M.J., Bhat, N.R. and Hama, H. (2006) FA2H-dependent fatty acid 2-hydroxylation in postnatal mouse brain. *Journal of lipid research*, 47, 2772-2780.
- Bansal, R., Warrington, A.E., Gard, A.L., Ranscht, B. and Pfeiffer, S.E. (1989) Multiple and novel specificities of monoclonal antibodies O1, O4, and R-mAb used in the analysis of oligodendrocyte development. *Journal of neuroscience research*, 24, 548-557.
- Bergamaschi, R. (2007) Prognostic factors in multiple sclerosis. *International review of neurobiology*, 79, 423-447.
- Bonasio, R., Tu, S. and Reinberg, D. (2010) Molecular signals of epigenetic states. *Science*, 330, 612-616.
- Bosio, A., Binczek, E. and Stoffel, W. (1996) Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 13280-13285.
- Cai, J., Zhu, Q., Zheng, K., Li, H., Qi, Y., Cao, Q. and Qiu, M. (2010) Co-localization of Nkx6.2 and Nkx2.2 homeodomain proteins in differentiated myelinating oligodendrocytes. *Glia*, 58, 458-468.
- Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Suzuki, K. and Popko, B. (1996) Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell*, 86, 209-219.
- de Arriba Zerpa, G.A., Saleh, M.C., Fernandez, P.M., Guillou, F., Espinosa de los Monteros, A., de Vellis, J., Zakin, M.M. and Baron, B. (2000) Alternative splicing prevents transferrin secretion during differentiation of a human oligodendrocyte cell line. *Journal of neuroscience research*, 61, 388-395.
- Deber, C.M. and Reynolds, S.J. (1991) Central nervous system myelin: structure, function, and pathology. *Clinical biochemistry*, 24, 113-134.
- Eckhardt, M., Yaghoofam, A., Fewou, S.N., Zoller, I. and Gieselmann, V. (2005) A mammalian fatty acid hydroxylase responsible for the formation of alpha-hydroxylated galactosylceramide in myelin. *The Biochemical journal*, 388, 245-254.
- Fu, H., Qi, Y., Tan, M., Cai, J., Takebayashi, H., Nakafuku, M., Richardson, W. and Qiu, M. (2002) Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation. *Development*, 129, 681-693.
- Hirahara, Y., Bansal, R., Honke, K., Ikenaka, K. and Wada, Y. (2004) Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: development in sulfatide-null mice. *Glia*, 45, 269-277.
- Hirahara, Y., Tsuda, M., Wada, Y. and Honke, K. (2000) cDNA cloning, genomic cloning, and tissue-

specific regulation of mouse cerebroside sulfotransferase. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267, 1909-1917.

Inamori, K., Endo, T., Ide, Y., Fujii, S., Gu, J., Honke, K. and Taniguchi, N. (2003) Molecular cloning and characterization of human GnT-IX, a novel beta1,6-N-acetylglucosaminyltransferase that is specifically expressed in the brain. *The Journal of biological chemistry*, 278, 43102-43109.

Jackman, N., Ishii, A. and Bansal, R. (2009) Oligodendrocyte development and myelin biogenesis: parsing out the roles of glycosphingolipids. *Physiology*, 24, 290-297.

Ji, S., Doucette, J.R. and Nazarali, A.J. (2011) Sirt2 is a novel in vivo downstream target of Nkx2.2 and enhances oligodendroglial cell differentiation. *Journal of molecular cell biology*, 3, 351-359.

Kanekiyo, K., Inamori, K., Kitazume, S., Sato, K., Maeda, J., Higuchi, M., Kizuka, Y., Korekane, H., Matsuo, I., Honke, K., et al. (2013) Loss of branched O-mannosyl glycans in astrocytes accelerates remyelination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33, 10037-10047.

Kaneko, M., Alvarez-Manilla, G., Kamar, M., Lee, I., Lee, J.K., Troupe, K., Zhang, W., Osawa, M. and Pierce, M. (2003) A novel beta(1,6)-N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-VB)(1). *FEBS letters*, 554, 515-519.

Kizuka, Y., Kitazume, S., Yoshida, M. and Taniguchi, N. (2011) Brain-specific expression of N-acetylglucosaminyltransferase IX (GnT-IX) is regulated by epigenetic histone modifications. *The Journal of biological chemistry*, 286, 31875-31884.

Kleene, R. and Schachner, M. (2004) Glycans and neural cell interactions. *Nature reviews. Neuroscience*, 5, 195-208.

Kucenas, S., Snell, H. and Appel, B. (2008) nkx2.2a promotes specification and differentiation of a myelinating subset of oligodendrocyte lineage cells in zebrafish. *Neuron glia biology*, 4, 71-81.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Lee, J.E. (1997) Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Current opinion in neurobiology*, 7, 13-20.

Liu, J., Sandoval, J., Doh, S.T., Cai, L., Lopez-Rodas, G. and Casaccia, P. (2010) Epigenetic modifiers are necessary but not sufficient for reprogramming non-myelinating cells into myelin gene-expressing cells. *PloS one*, 5, e13023.

Lu, Q.R., Yuk, D., Alberta, J.A., Zhu, Z., Pawlitzky, I., Chan, J., McMahon, A.P., Stiles, C.D. and Rowitch, D.H. (2000) Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron*, 25, 317-329.

Marcus, J., Dupree, J.L. and Popko, B. (2000) Effects of galactolipid elimination on oligodendrocyte development and myelination. *Glia*, 30, 319-328.

Marcus, J., Honigbaum, S., Shroff, S., Honke, K., Rosenbluth, J. and Dupree, J.L. (2006) Sulfatide is essential for the maintenance of CNS myelin and axon structure. *Glia*, 53, 372-381.

Miller, R.H. (1996) Oligodendrocyte origins. *Trends in neurosciences*, 19, 92-96.

Morell, P. and Radin, N.S. (1969) Synthesis of cerebroside by brain from uridine diphosphate galactose and ceramide containing hydroxy fatty acid. *Biochemistry*, 8, 506-512.

Novitsch, B.G., Chen, A.I. and Jessell, T.M. (2001) Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron*, 31, 773-789.

Peterson, C.L. and Laniel, M.A. (2004) Histones and histone modifications. *Current biology : CB*, 14, R546-551.

Popko, B. (2000) Myelin galactolipids: mediators of axon-glia interactions? *Glia*, 29, 149-153.

Qi, Y., Cai, J., Wu, Y., Wu, R., Lee, J., Fu, H., Rao, M., Sussel, L., Rubenstein, J. and Qiu, M. (2001) Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor. *Development*, 128, 2723-2733.

Richardson, W.D., Kessaris, N. and Pringle, N. (2006) Oligodendrocyte wars. *Nature reviews. Neuroscience*, 7, 11-18.

Ross, S.E., Greenberg, M.E. and Stiles, C.D. (2003) Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron*, 39, 13-25.

Rutishauser, U. (2008) Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nature reviews. Neuroscience*, 9, 26-35.

Schaeren-Wiemers, N., van der Bijl, P. and Schwab, M.E. (1995) The UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase: expression pattern in oligodendrocytes and Schwann cells during myelination and substrate preference for hydroxyceramide. *Journal of neurochemistry*, 65, 2267-2278.

Shepherd, M.N., Pomicter, A.D., Velazco, C.S., Henderson, S.C. and Dupree, J.L. (2012) Paranodal reorganization results in the depletion of transverse bands in the aged central nervous system. *Neurobiology of aging*, 33, 203 e213-224.

Soula, C., Danesin, C., Kan, P., Grob, M., Poncet, C. and Cochard, P. (2001) Distinct sites of origin of oligodendrocytes and somatic motoneurons in the chick spinal cord: oligodendrocytes arise from Nkx2.2-expressing progenitors by a Shh-dependent mechanism. *Development*, 128, 1369-1379.

Stolt, C.C., Rehberg, S., Ader, M., Lommes, P., Riethmacher, D., Schachner, M., Bartsch, U. and Wegner, M. (2002) Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes & development*, 16, 165-170.

Suzuki, T., Kosaka-Suzuki, N., Pack, S., Shin, D.M., Yoon, J., Abdullaev, Z., Pugacheva, E., Morse, H.C., 3rd, Loukinov, D. and Lobanenko, V. (2010) Expression of a testis-specific form of Gal3st1 (CST), a gene essential for spermatogenesis, is regulated by the CTCF paralogous gene BORIS. *Molecular and cellular biology*, 30, 2473-2484.

Suzuki, Y., Yanagisawa, M., Ariga, T. and Yu, R.K. (2011) Histone acetylation-mediated glycosyltransferase gene regulation in mouse brain during development. *Journal of neurochemistry*, 116, 874-880.

Takebayashi, H., Yoshida, S., Sugimori, M., Kosako, H., Kominami, R., Nakafuku, M. and Nabeshima, Y. (2000) Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3. *Mechanisms of development*, 99, 143-148.

Tencomnao, T., Kapitonov, D., Bieberich, E. and Yu, R.K. (2004) Transcriptional regulation of the human UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase (hCGT) gene expression: functional role of GC-box and CRE. *Glycoconjugate journal*, 20, 339-351.

Tencomnao, T., Yu, R.K. and Kapitonov, D. (2001) Characterization of the human UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase gene promoter. *Biochimica et biophysica acta*, 1517, 416-423.

Vetter, M. (2001) A turn of the helix: preventing the glial fate. *Neuron*, 29, 559-562.

Watada, H., Mirmira, R.G., Kalamaras, J. and German, M.S. (2000) Intramolecular control of transcriptional activity by the NK2-specific domain in NK-2 homeodomain proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 9443-9448.

Wei, Q., Miskimins, W.K. and Miskimins, R. (2005) Stage-specific expression of myelin basic protein in oligodendrocytes involves Nkx2.2-mediated repression that is relieved by the Sp1 transcription factor. *The Journal of biological chemistry*, 280, 16284-16294.

Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. and Beppu, T. (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *The Journal of biological chemistry*, 265, 17174-17179.

Zhou, Q. and Anderson, D.J. (2002) The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell*, 109, 61-73.

Zhou, Q., Wang, S. and Anderson, D.J. (2000) Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron*, 25, 331-343.

Zoller, I., Bussow, H., Gieselmann, V. and Eckhardt, M. (2005) Oligodendrocyte-specific ceramide galactosyltransferase (CGT) expression phenotypically rescues CGT-deficient mice and demonstrates that CGT activity does not limit brain galactosylceramide level. *Glia*, 52, 190-198.

Zoller, I., Meixner, M., Hartmann, D., Bussow, H., Meyer, R., Gieselmann, V. and Eckhardt, M. (2008) Absence of 2-hydroxylated sphingolipids is compatible with normal neural development but causes late-onset axon and myelin sheath degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28, 9741-9754.