

京都大学	博士（医学）	氏 名	Tan Siok-Lay
論文題目	Essential roles of the histone methyltransferase ESET in the epigenetic control of neural progenitor cells during development. (発生期神経前駆細胞のエピゲノムな制御におけるヒストンメチル基転移酵素 ESET の役割)		
(Dissertation Summary)			
During cortical development, neural progenitor cells (NPCs) give rise to various types of neurons, initially deep-layer neurons and then upper-layer neurons, and finally differentiate into astrocytes via changes in differentiation competency. These changes in competency are highly ordered and unidirectional, suggesting that a ‘clock’ is integrated in the differentiation system of NPCs to ensure that the cell composition and final size of the brain are characteristically similar among the members of a given species. Histone modifications are fast and reliable regulation of gene expression, but their significance in neural development has not been fully investigated. To understand the roles of histone modifications in the neural development, we focused on the histone H3 lysine-9 (H3K9) methyltransferase ESET, also known as Setdb1/KMT1E. Because it was previously shown that ablation of <i>ESET</i> leads to embryonic lethality before implantation, <i>ESET</i> conditional knock-out (cKO) mice were used to investigate the role of ESET in the brain development. <i>ESET</i> is highly expressed by NPCs at an early stage, but is down-regulated over time. In the <i>ESET</i> cKO brain, generation of early-born deep layer neurons was markedly impaired, while the generation of late-born upper layer neurons was not significantly affected. By contrast, the generation of astrocytes was significantly enhanced in the absence of <i>ESET</i>. In the <i>ESET</i> cKO mice, the global H3K9me3 mark in the chromatin was slightly reduced at E14.5 and E18.5. However, H3K9me3 is greatly demethylated in the promoter regions of <i>Sox9</i> and <i>IAP</i>, which are up-regulated in the cKO. Hence, the epigenetic functions of ESET in the nervous system are most likely localized. In addition to the regulation of neural genes, we found that ESET is important for repressing endogenous retroelements, including Intracisternal A-Particle (IAP). Among the up-regulated genes in the <i>ESET</i> cKO brain, many of them were associated with derepressed IAPs and other endogenous retroviruses. Particularly, genes near derepressed IAPs were strongly up-regulated in the <i>ESET</i> cKO brain. In conclusions, ESET appears to be very important for the maintenance of neural identity by suppressing non-neural gene expression and retrotransposition			

(論文内容の要旨) 大脳皮質の発生期で、神経前駆細胞(NPCs)は様々なタイプのニューロンを産生する。NPCs はその分化能を変化させつつ、初めに深層ニューロンを、続いて浅層ニューロンを産生し、最後にアストロサイトへと分化する。これらの分化能の変化は高度に秩序立てられ単一方向であることから、細胞の構成や最終的な脳の大きさの特徴付けるための‘時計’ がNPCs の分化機構を統御していることが示唆される。ヒストン修飾は速く確実な遺伝子発現制御だが、神経発生における重要性は十分に解析されていなかった。 神経発生におけるヒストン修飾の役割を理解するため、私たちはヒストン H3 の 9 番目のリジン残基(H3K9)のメチル化酵素 ESET (Setdb1/KMT1E)に着目した。ESET の欠失で着床前の胎生致死となることは既知であることから、脳の発生における <i>ESET</i> の役割を解析するために <i>ESET</i> コンディショナルノックアウト(cKO)マウスを用いた。 <i>ESET</i> は初期のNPCs で高発現するが、その発現量は経時的に減少し、ニューロンからアストロサイトへと分化運命が切り替わる時期に非常に低下する。<i>ESET</i>cKO マウスの脳で、初期に生じる深層ニューロンの産生は著しく損なわれたが、後期に生じる浅層ニューロンの産生は有意には影響されなかった。一方、アストロサイトの産生は <i>ESET</i> の欠失で有意に増進された。ゆえに <i>ESET</i> cKO マウスの脳で、アストロサイトの産生はニューロン、特に初期に生じるニューロンの産生期間の短縮を促進するといえる。 <i>ESET</i>cKO マウスで、クロマチンにおける大域的な H3K9me3 のマークは E14.5 及び E18.5 でわずかに減少したが、H3K9me2 のマークは影響されなかった。しかし H3K9me3 は cKO において発現増加される <i>Sox9</i> 及び <i>Intracisternal A-Particle (IAP)</i> のプロモーター領域で顕著に脱メチル化される。それゆえ、神経系での ESET のエピジェネティックな働きは大局的というよりもむしろ局所的である可能性が高い。 神経系遺伝子の制御に加え、私たちは ESET が体細胞組織で、IAP を含めた内在性のレトロエレメントの抑制に重要であることを発見した。<i>ESET</i>cKO マウスの脳で発現増加された遺伝子のうち、これらの多くが IAPs 及び他の内在性レトロエレメントの活性化と関連があった。特に、抑制された IAPs の近傍の遺伝子が <i>ESET</i>cKO マウスの脳で強く発現増加された。 結論として、ESET は、非神経系遺伝子発現及びレトロトランスポゾンの抑制により神経系の独自性の維持に非常に重要な働きをすると考えられる。
(論文審査の結果の要旨) 脳形成過程では、神経前駆細胞は経時的に分化能を変えて多様な細胞を生み出すが、その分化能制御機構に関しては未だ不明な点が多い。申請者は、神経前駆細胞の多様性形成機構を明らかにする目的で、エピジェネティック制御に関わるヒストンメチル基転移酵素 ESET を解析した。その結果、ESET の発現は、発生初期の神経前駆細胞では高レベルであるが、その後徐々に低下し、ニューロン形成期からアストロサイト形成期に移行する時期ではきわめて低かった。前脳特異的 ESET 欠損マウスを作製してマイクロアレー解析を行ったところ、ESET 欠損によってニューロン分化に関わる多くの遺伝子発現が低下しているのに対して、グリア細胞分化に関わる遺伝子発現が増加していることがわかった。また、内在性レトロトランスポゾンが活性化されて周囲の遺伝子発現も活性化され、脳に本来発現しない遺伝子群も強く発現していた。さらに、ESET 欠損によって、初期に分化するニューロンの形成が強く阻害されたが、後期に分化するニューロンの形成には大きな影響は見られなかった。しかし、アストロサイトの形成が正常よりも早く起こり、増加していた。以上から、ESET は徐々に発現低下することによって、ニューロン形成からアストロサイト形成への移行のタイミングを制御すると考えられた。 以上の研究は、脳形成過程における神経前駆細胞の分化能制御機構の解明に貢献し、神経科学研究分野の発展に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 2 4 年 1 0 月 2 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。