



**エピジェネティクス機構による神経幹細胞の分化制御**

1. はじめに

哺乳類の中樞神経系は、ニューロンとグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト）が密接に相互作用することで、その高度な情報処理機能を発揮している。それらの細胞種は、中樞神経系の発生段階で共通の神経幹細胞から分化・産生されるが、最近では従来再生しないと考えられてきた成体の中樞神経においても神経幹細胞が存在す

ることが明らかになっている<sup>1)</sup>。その神経幹細胞の分化制御機構は時空間的に厳密に制御されているが、その制御にはサイトカイン等の細胞外来性因子や転写因子のみならず、細胞内在性のプログラムとしてエピジェネティックな制御機構も携わっており、それぞれが協調的に働くことで神経幹細胞の運命決定がなされることが近年明らかにされつつある（図1）。エピジェネティックな制御機構とは、DNA配列変化を伴わずに遺伝情報の発現を制御するメカニズムである。この制御機構にはクロマチン構造因子であるDNAのメチル化修飾、ヒストンのアセチル化・メチル化等のタンパク質の翻訳後修飾、クロマチン再構築酵素群によるATP依存的なクロマチン構造変換、さらに non-coding RNA (ncRNA) による転写、翻訳後修飾などが含まれている。

哺乳類のゲノムでは5'-CpG-3'の2塩基配列のシトシンの5位炭素原子がメチル化修飾を受けることが知られている。遺伝子発現におけるDNAのメチル化の関与として、遺伝子プロモーター中のシトシンがメチル化されると遺伝子発現が抑制されることが知られている。この理由として主に、転写因子の結合配列中のCpG配列がメチル化された場合、転写因子のプロモーターへの結合が妨げられるこ

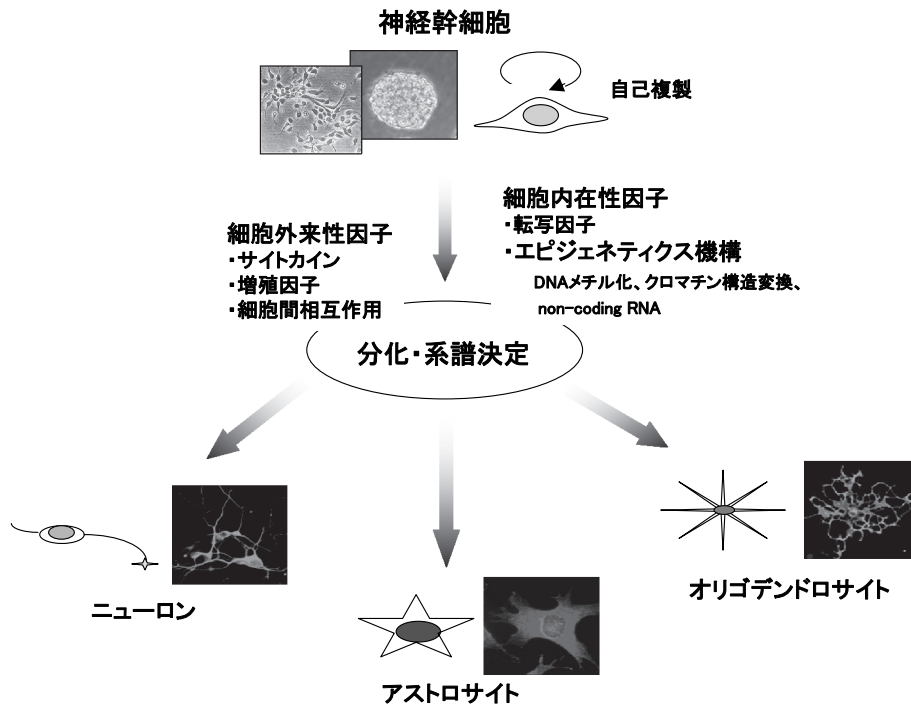


図1 神経幹細胞の分化制御  
神経幹細胞の各種細胞への分化は、サイトカインなどの細胞外来性因子や転写因子だけでなく、細胞内在性因子としてのエピジェネティクス機構によっても制御されている。

と、あるいはメチル化 DNA 結合タンパク質がメチル化された DNA 配列に結合し種々のリプレッサー因子と複合体を形成して遺伝子発現を抑制すること、という二つが考えられている。

クロマチン構造の最小単位はヌクレオソームで、ヒストン H2A, H2B, H3, H4 それぞれ 2 分子ずつからなる八量体の構造をとっており、DNA がその周りを左巻きに巻いている。このヒストンの N 末端は立体構造に乏しく、リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、ADP リボシル化、グリコシル化など様々なアミノ酸修飾を受け、クロマチン構造の変化に関与している。さらに、ATP 依存的にヌクレオソームの構造変換を引き起こす SWI/SNF (mating type switching/sucrose nonfermenting) 複合体などのクロマチン再構築酵素群が存在し、それらがヒストンタンパク質をスライドさせたり、ヒストンと DNA の凝集を防いだりすることにより、遺伝子の転写調節を行っている。

神経幹細胞の分化制御に、上述したような DNA メチル化、ヒストン修飾及びクロマチン再構築因子を介したクロマチン構造変換が必須であるという報告が多くなされてきた。本稿では、神経幹細胞からの各種細胞への分化を制御するエピジェネティクス機構について最近の報告をもとに紹介したい。

## 2. ニューロン分化を制御するエピジェネティクス

ヒストンアセチル化酵素 (histone acetyl transferase : HAT) は、ヒストン尾部にアセチル基を付加することで、ヒストンの陽電化を減少させ、陰電化に荷電している DNA との相互作用を弱めることでクロマチン構造を脱凝縮した状態にし、転写の活性化を促すと考えられている。反対にヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase : HDAC) はヒストン尾部のアセチル基を取り除き、これにより DNA とヒストンの親和性が強まることでクロマチン構造は閉じた状態になり、転写が抑制された状態になる。最近、抗てんかん薬として知られているバルプロ酸 (valproic acid : VPA) が、HDAC 阻害剤としての活性を有していることが報告された<sup>2)</sup>。成体ラット海馬由来の神経幹細胞培養系に VPA を添加すると、ヒストンアセチル化亢進とともに、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトへの分化抑制と、高効率なニューロン分化促進が観察された<sup>3)</sup>。さらに VPA で処理された細胞において、ニューロン分化を促進する転写因子 NeuroD の発現亢進が認められた。NeuroD の発現抑制は HDAC 酵素に依存していることが報告されており、VPA によるニューロン分化誘導は

NeuroD の発現が亢進されたためであると考えられた。生体内においても、ラットへの VPA 投与により、海馬に存在する神経幹細胞の増殖が抑制され、ニューロン分化が亢進された<sup>3)</sup>。このように、成体神経幹細胞のニューロンへの分化にヒストンのアセチル化が重要な役割を果たしていることが示されている。

さらに、神経幹細胞からニューロンへの分化過程において NRSF (neuron restrictive silencing factor, 別名 repressor for element-1 silencing transcription factor (REST)) といわれる転写抑制因子がヒストン脱アセチル化酵素、ヒストンメチル化酵素等のヒストン修飾因子やメチル化 DNA 結合タンパク質と協調してニューロン特異的遺伝子の発現をエピジェネティックに制御するメカニズムが報告されている<sup>4)</sup>。その中で、ニューロン特異的遺伝子の NRSF による制御には次の二つの機構が関与していることが明らかにされた。一つは NRSF がニューロン特異的遺伝子のプロモーター上の NRSE (neuron restrictive silencing element) といわれる配列部位に特異的に結合し、CoREST (co-repressor for REST) といわれるコリプレッサー、HDAC、メチル化 DNA 結合タンパク質である MeCP2 (methyl CpG binding protein 2) と複合体を形成することによるクロマチン構造変換を介した機構である (class I 遺伝子)。もう一つは、NRSF 複合体以外にメチル化 DNA 結合タンパク質である MeCP2 による制御を受ける機構である (class II 遺伝子)。ニューロン特異的遺伝子のプロモーター領域には NRSF 複合体が結合する NRSE 配列部位の他にメチル化された CpG 配列が存在し、この部位に MeCP2 が結合することで、神経幹細胞におけるニューロン特異的遺伝子の発現抑制を行うというものである。MeCP2 はニューロンが脱分化の際にリン酸化されメチル化 CpG 配列より解離することが知られている。このようなニューロン特異的遺伝子は NRSF 複合体がプロモーター領域から解離しただけでは顕著な発現は認めないが、ニューロンの脱分化後に顕著な発現上昇が認められるものであった。すなわち、MeCP2 により発現調節されるニューロン特異的遺伝子は神経活動に伴い発現する遺伝子であり、*in vivo* においてはニューロンの可塑性に関与するものと考えられている<sup>4)</sup>(図 2B)。

上述したように、クロマチンの状態はヒストンのアセチル化等の修飾だけでなく、クロマチン再構築酵素群によっても制御されている。それらの複合体は BRG/BRM (Brahma-related gene 1/Brahma) と呼ばれるタンパク質を中心として、他の多数のタンパク質 (BAF (Brg/Brm associated factor) ファミリー) とともに 2MDa の巨大な複合体

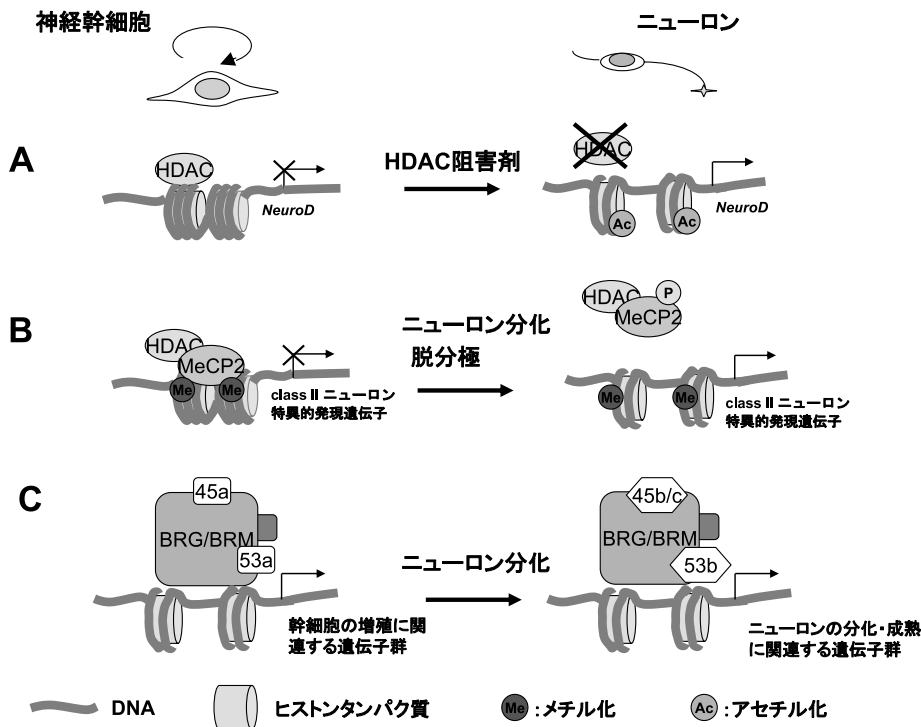


図2 ニューロン分化を制御するエピジェネティクス

(A)HDAC 阻害剤 (VPA) 投与は成体神経幹細胞において転写因子 *NeuroD* の発現を促し、ニューロン分化を誘導する。(B)MeCP2 はニューロン特異的遺伝子群の転写調節領域に結合し発現を抑制しているが、脱分極によりリン酸化を受けることでDNAより解離する。その結果、ニューロン特異的遺伝子群の発現に至る。(C)神経幹細胞においてはクロマチン再構築因子複合体中にはBAF45a及びBAF53aが存在し、神経幹細胞の増殖に関与しているが、ニューロン分化が誘導されると、それらはBAF45b/c及びBAF53bに置換され、ニューロンの分化や成熟に関する遺伝子の発現に関与するようになる。

を形成し、ATP 依存的にクロマチン構造を変換させることにより、遺伝子発現に関与している。最近、BRG/BRM 複合体中の構成タンパク質の置換が、神経幹細胞の分化に関与することが報告された<sup>5)</sup>(図2C)。その報告によると、それらの複合体のうち、BAF45aとBAF53aは神経幹細胞に豊富に存在し、神経幹細胞から分化したニューロンにおいては、BAF45b/cと53bに置換されていた。BAF45aとBAF53aの神経幹細胞における発現の減少は、神経幹細胞の増殖を減少させ、神経幹細胞へのそれらの強制発現はニューロン分化を抑制した。このことは、BAF45aとBAF53aは神経幹細胞の増殖とニューロンへの分化を抑制していることを示しており、神経幹細胞特異的に発現するヌクレオソーム再構築酵素複合体の構成要素の置換が、神経幹細胞のニューロン分化に重要な役割を果たしていることを示唆している。

ncRNAによる転写制御も神経幹細胞のニューロン分化

に寄与することが報告されている。Kuwabaraらは成体神経幹細胞からニューロンへの分化初期段階にNRSE配列をコードするsmRNA (small modulatory RNA) が発現し、これが通常は転写抑制因子として働くNRSFを転写活性化因子へと機能を変換させるスイッチとして働くことを明らかにした<sup>6)</sup>。また、成体ラット海馬由来神経幹細胞にNRSEをコードするdouble strand RNA (dsRNA) を発現させるとニューロンへと特異的に分化した。さらにこのような配列を持つdsRNAを発現させた場合にも、NRSFのニューロン特異的遺伝子プロモーター領域のNRSE配列への結合は維持されており、クロマチンリモデリング因子を含む転写活性化複合体を形成していた。また、NRSE配列を持つdsRNA及びdsDNAとNRSFとの結合活性を比較したところ、前者のほうがより強くNRSFと結合することが明らかになった。すなわち、神経幹細胞からニューロンへと分化開始する時点でNRSEをコードしたsmRNAが

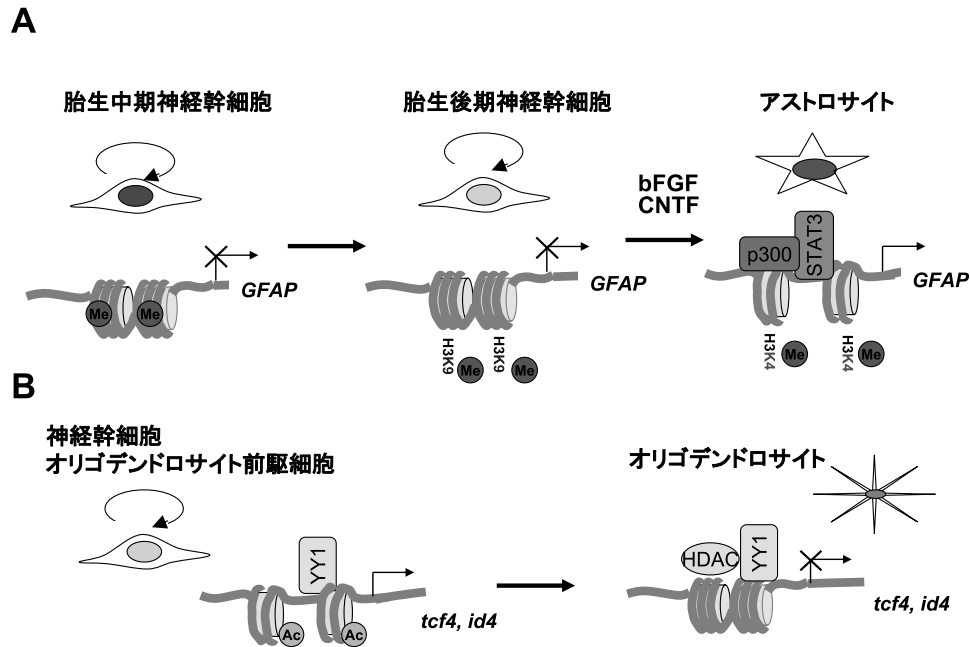


図3 アstrocyte, オリゴデンドロcyte分化に關するエpiジェネティクス

(A) 発生段階依存的なAstrocyte特異的の遺伝子 *gfap* の転写調節領域におけるDNAメチル化変化とクロマチン構造変換. *gfap* 転写調節領域は発生段階に依存してDNAのメチル化が変化する. また, サイトカイン等の刺激により, クロマチンの構造変換が生じる. (B) 神経幹細胞またはオリゴデンドロcyte前駆細胞においては転写因子 TCF4, ID4 が発現しており, それらがオリゴデンドロcyte特異的の遺伝子の発現を抑制することでオリゴデンドロcyteの分化を抑制している. しかし, オリゴデンドロcyteへの分化に伴い YY1 がHDAC依存的に *tcf4*, *id4* の遺伝子発現を抑制することで, オリゴデンドロcyte特異的の遺伝子の発現が誘導され, オリゴデンドロcyteの分化・成熟に至る.

発現し, NRSF と相互作用することによって転写抑制因子から転写活性因子へとその機能を変換し, ニューロン特異的の遺伝子発現を誘導することでニューロン分化を促進するものと考えられた<sup>6)</sup>.

### 3. Astrocyte分化を制御するエpiジェネティクス

Astrocyteはグリア細胞の一種であり, ニューロンの支持, 保護, 血管からの栄養のニューロンへの伝達等に携わっている. 神経幹細胞のAstrocyte分化においてもクロマチン構造変換が深く関与していることが知られている. マウス中枢神経の発生過程において, 神経幹細胞は胎生中期には主にニューロンへと分化し, 胎生後期以降はニューロン分化よりもAstrocyteへの分化が優位になることが知られている<sup>7)</sup>. 我々は, この神経幹細胞の発生段階依存的なAstrocyte分化に, Astrocyte特異的の遺伝子の転写調節領域のDNAメチル化が関与していることを報告した<sup>7)</sup>(図3A). 胎生中期の神経幹細胞では, Astrocyte特異的の発現遺伝子 *gfap* (glial fibrillary acidic

protein)の転写調節領域が高頻度にメチル化されているが, 胎生後期になるとこの部位の脱メチル化が生じ, 転写因子 STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) の *gfap* 転写調節領域上の認識配列への結合が可能となる. 従って, サイトカインなどにより STAT3の活性化に応じて *gfap* を発現するAstrocyteへと分化が可能になる(図3A). また我々は, このような発生段階に伴った脱メチル化は *gfap* にのみ生じるわけではなく, *s100β* といわれる他のAstrocyte特異的の遺伝子のプロモーター領域にも同様な現象が観察されることを報告している<sup>8)</sup>. 加えて, Astrocyte分化におけるDNAのメチル化の重要性は, 維持型メチル化活性を有するDNAメチル基転移酵素 DNMT1 (DNA methyltransferase 1) の遺伝子欠損マウスを用いた解析からも明らかにされている<sup>9)</sup>. これらの報告は, DNAメチル化が発生段階依存的な神経幹細胞の多分化能獲得において重要な鍵となっていることを示している.

また, 胎生後期の神経幹細胞を用いた実験から, DNA

メチル化だけではなく、クロマチン構造変換もアストロサイト分化に寄与していることが報告されている<sup>10)</sup>(図3A)。その報告においては、胎生後期ラット由来の神経上皮細胞培養系に対しアストロサイト分化誘導性サイトカイン(ciliary neurotrophic factor: CNTFや leukemia inhibitory factor: LIF)を添加するとアストロサイト分化が誘導されるが、このとき同時にFGF2(fibroblast growth factor 2)を添加するとアストロサイト分化が相乗的に促進された。さらにFGF2は単独ではアストロサイトへの分化誘導能は持たないが、先にFGF2存在下で培養した後にCNTF刺激を行うと、FGF2非存在下で培養していた後に同様の刺激を行ったものと比較してアストロサイトへと分化する細胞が増加していた。このメカニズムとして、神経上皮細胞をFGF2存在下で培養すると*gfap*プロモーター領域のSTAT3結合配列近傍領域のヒストンH3の9番目のリジン残基(H3K9)が脱メチル化される一方で、H3の4番目のリジン残基(H3K4)がメチル化されてこの部位のクロマチン構造が脱凝縮した状態になり、CNTFにより活性化されたSTAT3が*gfap*プロモーター領域に結合しやすくなることが考えられた(図3A)。このように神経幹細胞のアストロサイトへの分化過程においては、前述のDNAのメチル化とともにヒストンのメチル化を介したクロマチンの構造変化が協調的に働き、アストロサイト分化シグナルに対する応答性を獲得することが可能になるものと考えられる。

また、上述のように、胎生後期の神経幹細胞はアストロサイトへの分化能を獲得しているが、もちろんニューロンへも分化することができる。胎生後期の神経幹細胞から産生されたニューロンにおいては、既に*gfap*の転写調節領域は脱メチル化されているが、それらのニューロンをアストロサイト誘導性サイトカインで刺激しても、*gfap*の発現は認められない<sup>11)</sup>。我々はこのニューロンにおけるアストロサイト特異的遺伝子の発現抑制、即ちニューロン分化可塑性制御に、ニューロン特異的に高発現するMeCP2が関与していることを示した<sup>11)</sup>。我々は、*gfap*のexon1領域のメチル化が胎生後期神経幹細胞やその細胞から分化したニューロンにおいても高頻度に保たれており、ニューロンにおいては、その領域にMeCP2が結合し、*gfap*の発現を抑制している可能性を示唆した。さらに、実際に神経幹細胞にMeCP2を異所的に高発現させると、アストロサイト誘導性のサイトカインで刺激した場合にも*gfap*の発現が抑制されることを示した。これらのことは、クロマチン構造変換を担うDNAメチル化とメチル化結合因子が神経系

細胞の分化の可塑性を制御する因子として機能していることを示す興味深い結果といえる。

#### 4. オリゴデンドロサイト分化を制御する エピジェネティクス

オリゴデンドロサイトは神経幹細胞から産生されるグリア細胞の一つであり、中枢神経系において、神経突起のミエリン形成に預かっている。最近、神経幹細胞からのオリゴデンドロサイトの分化にクロマチンの制御機構が関与していることが報告された。

上述したVPAやTSA(trichostatin A)などのヒストン脱アセチル化阻害剤を出生直後のマウスへ投与することにより、オリゴデンドロサイトの分化と成熟の阻害が観察されることが知られていた<sup>12)</sup>。また、培養したオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)への添加によっても同様に阻害されることも報告されていた<sup>13)</sup>。暫くそのメカニズムについては明らかにされていなかったが、最近、転写因子YY1(Yin Yang 1)がHDAC依存的にオリゴデンドロサイトの分化を制御しているという報告がなされた<sup>14)</sup>(図3B)。その報告によると、オリゴデンドロサイト特異的に*yy1*遺伝子を欠損させると、ミエリンタンパク質などオリゴデンドロサイト特異的に発現するタンパク質群の発現が観察されなくなり、さらに、培養したOPCにおいても*yy1*の欠損によりそれらの発現が認められなくなった。興味深いことに、培養した神経幹細胞において特異的に*yy1*を欠損させると、ニューロンやアストロサイトへの分化に影響はないが、オリゴデンドロサイトの分化のみが抑制された。その具体的なメカニズムとしては以下のようなものが提示されている。神経幹細胞が未分化状態においては、ID4(inhibitor of differentiation 4)やTCF4(T-cell factor 4)といった転写調節因子が発現しており、それらの因子がオリゴデンドロサイト特異的発現遺伝子を抑制している。しかし、液性因子などにより神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化を誘導した場合、YY1がHDAC依存的にそれらの因子の発現を抑制する。ところが、オリゴデンドロサイト分化誘導時にVPA等の添加によりHDACの機能が阻害されると、YY1はそれらの発現を抑制することができなくなる。従って、液性因子により神経幹細胞をオリゴデンドロサイトへと誘導した際にもID4及びTCF4の発現が抑制されることはなく、それらによりオリゴデンドロサイト特異的遺伝子群の発現が抑制され、結果としてオリゴデンドロサイトの分化が抑制されると報告している<sup>14)</sup>。このことは、転写因子YY1によるHDACを介したクロマ

チン構造変換がオリゴデンドロサイトの分化に寄与していることを示唆している。

## 5. 終わりに

本稿では紙面の都合上ごく少数しか紹介できなかったが、最近では、上述のようなエピジェネティクス制御による神経幹細胞分化に関する報告は数多くなされている。しかし、それらの報告は未だ部分的な解明が多く、神経幹細胞の時空間的な運命決定機構の全体像の把握には至っていないのが現状である。最近ではChIP on Chipなど細胞のゲノム上のクロマチン状態を網羅的に明らかにする手法や、それらから得られた膨大な情報を解析するシステムバイオロジーなどが発達してきている。それらの手法を用いた神経幹細胞分化におけるクロマチン動態の全体的な把握、同時に特異的発現遺伝子の網羅的解析が、神経幹細胞の運命決定機構の統合的理解には必要であろう。さらにそれらに加え、神経幹細胞をとりまく細胞外環境の解析を含めることにより、詳細な神経幹細胞の運命決定機構のメカニズムの解明がなされることが期待できる。そこから得られた知見をもとに、それぞれの時期、場所に適切な神経幹細胞を準備することが可能になれば、各症状・病状に合わせた適切な組織の移植が求められる再生医療に大きく貢献できると考えられる。

- 1) Gage, F.H. (2000) *Science*, **287**, 1433–1438.
- 2) Gottlicher, M. (2004) *Ann. Hematol.*, **83 Suppl 1**, S91–92.
- 3) Hsieh, J., Nakashima, K., Kuwabara, T., Mejia, E., & Gage, F. H. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 16659–16664.
- 4) Ballas, N., Grunseich, C., Lu, D.D., Speh, J.C., & Mandel, G. (2005) *Cell*, **121**, 645–657.
- 5) Lessard, J., Wu, J.I., Ranish, J.A., Wan, M., Winslow, M.M., Staahl, B.T., Wu, H., Aebersold, R., Graef, I.A., & Crabtree, G.R. (2007) *Neuron*, **55**, 201–215.
- 6) Kuwabara, T., Hsieh, J., Nakashima, K., Taira, K., & Gage, F. H. (2004) *Cell*, **116**, 779–793.
- 7) Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa, M., Fujita, N., Nakao, M., & Taga T. (2001) *Dev. Cell*, **1**, 749–758.
- 8) Namihira, M., Nakashima, K., & Taga, T. (2004) *FEBS Lett.*, **572**, 184–188.
- 9) Fan, G., Martinowich, K., Chin, M.H., He, F., Fouse, S.D., Hutton, L., Hattori, D., Ge, W., Shen, Y., Wu, H., ten Hoeve, J., Shuai, K., & Sun, Y.E. (2005) *Development*, **132**, 3345–3356.
- 10) Song, M.R. & Ghosh, A. (2004) *Nat. Neurosci.*, **7**, 229–235.
- 11) Setoguchi, H., Namihira, M., Kohyama, J., Asano, H., Sanosaka, T., & Nakashima, K. (2006) *J. Neurosci. Res.*, **84**, 969–979.
- 12) Shen, S., Li, J., & Casaccia-Bonnel, P. (2005) *J. Cell Biol.*, **169**, 577–589.
- 13) Marin-Husstege, M., Muggironi, M., Liu, A., & Casaccia-

- Bonnefil, P. (2002) *J. Neurosci.*, **22**, 10333–10345.
- 14) He, Y., Dupree, J., Wang, J., Sandoval, J., Li, J., Liu, H., Shi, Y., Nave, K.A., & Casaccia-Bonnel, P. (2007) *Neuron*, **55**, 217–230.

波平 昌一, 中島 欽一  
(奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科  
分子神経分化制御学講座)

Epigenetic regulation of neural stem cell fate specification  
Masakazu Namihira and Kinichi Nakashima (Laboratory of  
Molecular Neuroscience, Graduate School of Biological Sciences,  
Nara Institute of Science and Technology, 8916-5  
Takayama-cho, Ikoma, Nara 630-0101, Japan)

## リゾリン脂質アシル転移酵素と血小板活性化因子 (PAF) 生合成酵素

### 1. はじめに

すべての生物は細胞からなり、それは生体膜で囲まれている。この生体膜は2種類の非対称性を持っている。一つは膜の内側と外側を構成するグリセロリン脂質の非対称性分布である。細胞膜外側には、ホスファチジルコリン(PC)、スフィンゴミエリンなどが多く、内側にはホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)が多い。当初、細胞内(主に小胞体)で作られたグリセロリン脂質はスクランブラーゼによってランダムに配置している。その後、行き先である膜に到達するとフリッパーゼやフロッパーゼにより特定の脂質が反転し非対称性分布を示す。他にもグリセロリン脂質にはホスファチジン酸(PA)、ホスファチジルグリセロール(PG)、ホスファチジルイノシトール(PI)など数種類が存在する。もう一つの非対称性はこれらグリセロリン脂質の脂肪酸組成にある。グリセロール骨格のsn-1位には主に飽和脂肪酸あるいはオレイン酸、2位には多価不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)がエステル結合している。この脂肪酸種はグリセロリン脂質の極性基や細胞種により多様な組成比を示し、膜の柔軟性や生理活性脂質産生に大きく関与している。

1950年代にリン脂質生合成について2種類の経路が報告された。まずはケネディー経路<sup>1)</sup>と言われるde novo合成系であり、解糖系で得られるグリセロール3-リン酸か