

氏 名 石野 雄吾

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1462 号

学位授与の日付 平成 23 年 9 月 30 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 The roles of Bre1, a histone H2B ubiquitin ligase, in the  
neural precursor cell proliferation and differentiation

論文審査委員 主 査 教授 箕越 靖彦  
教授 池中 一裕  
教授 深田 正紀  
教授 中島 欽一

（奈良先端科学技術大学院大学）

## 論文内容の要旨

Major three types of cells in the mammalian central nervous system, neurons, oligodendrocytes and astrocytes, are derived from undifferentiated multipotent neural stem cells (NSCs) during the development under the control of several extrinsic signaling pathways. Serial and simultaneous activation of FGF signaling, canonical Notch signaling, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, JAK-STAT signaling and so on are critical for the proper production and arrangement of massive amount of neurons and glia. However, accumulating evidence shows that identifying those extrinsic signaling pathways is not sufficient to understand molecular mechanisms regulating the proliferation and differentiation of neural precursor cells in the embryonic brain, and that cell intrinsic programs play essential roles in defining the cell responsiveness to extrinsic cues. Recently, epigenetic regulations, such as DNA methylation and histone modification, draw much attention because they may determine the cell fate during development.

One of histone modifications, histone ubiquitylation is also known to be involved in the regulation of gene expression. For example, mono-ubiquitylation of histone H2B that is mediated by an E3 ubiquitin ligase, Bre1, leads to a change of chromatin state. The structure of Bre1 homologues is conserved in diverse organisms, which consists of three coiled-coil domains and a RING (really interesting new gene) finger domain, one of E3 signature motifs. Although there are several reports showing that Bre1 is an important factor for cell proliferation and fate determination, function of Bre1 and H2B mono-ubiquitylation in neural stem cells and in neural development remains to be investigated.

First, the author analyzed the expression pattern of *Bre1* in embryonic mouse brains and revealed that *Bre1* was homogeneously expressed in the forebrain at E10.5 and E12.5. In later stages of the development, *Bre1* mRNA, detected by *in situ* hybridization, is enriched in the ventricular zone/subventricular zone (VZ/SVZ), where neural stem and progenitor cells are abundantly present. In addition, double staining for *Bre1* mRNA by *in situ* hybridization and BrdU by immunostaining showed the colocalization of *Bre1* mRNA and BrdU in cells in the VZ/SVZ, suggesting that *Bre1* was strongly expressed in dividing neural stem/progenitor cells.

Next, he conducted Bre1 loss-of-function experiments both *in vitro* and *in vivo*, in which he employed an shRNA-mediated RNA interference strategy. To analyze the Bre1 function in neural stem cells, he examined the effect of *Bre1* knockdown on the proliferation and self-renewal of neural stem cells derived from the ganglionic eminence of E14.5 mouse brains and found that expression of Bre1-shRNAs in neurosphere cells resulted in the suppression of cell proliferation and downregulation of PCNA, a proliferation marker protein. Then, he investigated *in vivo* roles of Bre1 in neural precursor cells in the developing mouse brain by *in utero* electroporation at E13.5 using knockdown plasmids, which express Bre1-shRNAs under the mouse U6 promoter and GFP under the human PGK promoter. He found that the knockdown of *Bre1* led to the decreased number of EdU

incorporating dividing cells at E14.5. In addition, although *Bre1* knockdown did not have significant effect on the population of Pax6 positive apical progenitor cells, the number of Tbr2 positive basal progenitor cells was significantly reduced in Bre1-shRNA-transfected brains. Furthermore, he found that the knockdown of *Bre1* resulted in a remarkable decrease of GFP<sup>+</sup> cells that migrated from the VZ/SVZ into CP as compared to control brains that received Luc-shRNA at E16.5. On the contrary, significantly more GFP<sup>+</sup> cells remained in the VZ/SVZ after the electroporation of Bre1-shRNAs than that of Luc-shRNA. At P0, however, most Bre1-shRNA expressing cells migrated out from VZ/SVZ and reached outer cortical plate, although the distribution of these cells was slightly different from that of Luc-shRNA expressing cells. Additionally, he found that Bre1 knockdown led to a significant increase of Tbr2 positive cells in the intermediate zone at E16.5. These results suggested that Bre1 modulate the migration and differentiation of neural precursor cells during development.

Finally, he analyzed Nestin-Bre1-EGFP transgenic mouse embryos, in which *Bre1* is over-expressed in neural precursor cells, and found that the proliferation of neural precursors was decreased.

Taken together, his study suggests that histone H2B mono-ubiquitylation and subsequent H3 tri-methylation by Bre1 plays important roles in the proliferation, maintenance and differentiation of neural stem and progenitor cells in the developing brain.

## 博士論文の審査結果の要旨

発生期における哺乳類の脳では、神経幹細胞の分化運命は発生段階依存的に高度に制御されている。これまでに分化運命を決定する様々な因子が同定されてきた。しかしながら、それらの因子の存在のみでは特定の細胞種への分化誘導が出来ないことが分かっており、細胞内在的な変化が重要であることがわかっている。近年、エピジェネティックな遺伝子の発現調節が注目を集めており、本研究ではエピジェネティック因子の一つである histone H2B ubiquitin ligase、Brel に着目して、発生期の神経幹細胞・前駆細胞における機能の解明を目指した。

*In situ* hybridization による発現解析から、発生期のマウス脳においては Brel が広範囲に分布していることがわかった。なかでも、発生の中期以降からは神経前駆細胞でより強い発現が認められた。また、Brel が分裂細胞においても強く発現していることを見出した。

本研究では主に Brel の機能喪失実験により機能解析を行った。Brel ノックアウトマウスは早期に胎生致死となり中枢神経系の解析が困難であったため、Brel-shRNA の発現系によるノックダウン実験を用いて *in vitro*、*in vivo* 両面でマウスを用いて解析を行った。

*In vitro* での解析では、Neurosphere 法を用いて Brel をノックダウンした時の細胞増殖に及ぼす影響を解析した。Brel をノックダウンした後に継代操作によって neurosphere 形成能を調べると、コントロールと比較して Brel のノックダウンによって有意に細胞増殖が抑制された。これには分裂細胞のマーカーである PCNA 発現レベルの低下を伴っていた。

*In vivo* での解析では、*in utero* electroporation によりマウス胎児脳へ shRNA の導入を行いノックダウンによる影響を解析した。EdU の取り込みによって分裂細胞を評価したところ、*in vivo* においても Brel のノックダウンによって細胞分裂が抑制された。また、神経前駆細胞の産生を見ると、Pax6 陽性の細胞からより分化の進んだ Tbr2 陽性細胞への移行が抑制されていた。さらに Brel をノックダウンした結果、神経細胞の移動に遅れが生じることも明らかとなった。これらのことは、Brel のノックダウンによって細胞分化の進行が妨げられたことを示唆する。

また、神経幹細胞マーカーである Nestin プロモーターの下で Brel を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、Brel の過剰発現による影響を解析した。E14.5 の脳を用いて解析したところ、Brel の過剰発現によっても細胞分裂が異常になり、脳組織の構造が乱れることがわかった。

以上のノックダウンおよび過剰発現系の解析から、発生期の脳においては適切なレベルで Brel が発現することによって細胞分裂や分化が調節されることが示唆された。

本研究は、これまでに報告のない Brel の脳における機能に着目し、Brel が発生期の神経前駆細胞において細胞分裂や細胞分化の調節を行うことを初めて明らかにしたものであり、博士論文に値すると審査委員全員一致で判断した。