

動物発生過程におけるPrdm遺伝子群の発現と機能に関する研究

江口, りえこ

<https://doi.org/10.15017/1500526>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（システム生命科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

動物発生過程における Prdm 遺伝子群の発現と機能に関する研究

江口 りえこ

2015

目次	i
略語表	ii
要旨	iii
第1章 序論	1
第2章 <i>Xenopus laevis</i> 初期胚におけるPrdm遺伝子群の発現と機能解析	9
2-1 緒論	10
2-2 材料および方法	12
2-3 結果	21
2-4 考察	61
第3章 マウスにおけるPrdm遺伝子群の発現と機能解析	65
3-1 緒論	66
3-2 材料および方法	67
3-3 結果	74
3-4 考察	109
第4章 結論	114
謝辞	117
参考文献	118

略語表

ADP	Adenosine diphosphate
AGPC	Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform
ATCC	American type culture collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	complementary DNA
DMSO	Dimehyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
Gfap	Glial fibrillary acidic protein
GNAT	GCN5-related N-acetyltransferase
HATs	Histone acetyltransferase
HDAC	Histone deacetylase
KATs	lysine acetyltransferase
Mll	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
MO	Morpholino oligonucleotide
MYST	MOZ, Ybf/Sas3, Sas2 and Tip60
Ncam	Neural cell adhesion molecule
p300/CBP	CREB-binding protein
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PR	PRDI-BF1 and RIZ
PRMT	Protein arginine N-methyltransferase
RA	Retinoic acid
RACE	Rapid amplification of cDNA
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SET	Su(var)3-9, Enhancer of zest(EZ), Trithorax(TRX)
SMART	Simple modular architecture research tool
SUMO	Small ubiquitin-related(like) modifier
WISH	Whole mount <i>in situ</i> hybridization
α -MEM	alpha Modified Eagle Minimum Essential Medium

要旨

多細胞生物の複雑な体は、1つの受精卵が分裂と増殖を繰り返し、様々な細胞へと分化することで形作られる。この細胞の分化過程においてゲノムDNA配列は変化しないため、遺伝子の発現レベルでの制御が重要である。近年、DNA配列の変化を伴わない遺伝子発現制御システムとしてエピジェネティック制御系が見出され、再生医療研究などの実用分野においては、エピジェネティック制御系のリプログラミングが重要な課題となっている。エピジェネティック制御の分子機構として、DNAのメチル化やヒストンタンパク質の化学修飾、例えば、リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化およびADPリボシル化などが知られている。また、細胞分化過程では、分化した個々の細胞内の遺伝子発現状態が細胞分裂を経ても維持される細胞記憶機構が研究課題とされ、その機構の1つとしてヒストンタンパク質のメチル化修飾が注目されている。本論文では、メチル化修飾タンパク質をコードするPrdm遺伝子群に着目し、それらの遺伝子発現と機能を解析した。

メチル化修飾を担う酵素には、アルギニン残基特異的なPRMT (Protein arginine N-methyltransferase) と、リシン残基特異的なSET (Su(var)3-9, Enhancer of zest(EZ), Trithorax(TRX)) の2つのタンパク質ファミリーが存在する。このうち、SETタンパク質は転写調節因子SUV39Hタンパク質に見出されたメチル基転移活性ドメインであるSETドメインを持つタンパク質であり、脊椎動物において60種類ほどが同定されている。また、ヒストンメチル化修飾活性に加えて、他のヒストン修飾タンパク質と相互作用する活性を有し、様々な機能を持つことが報告されている。Prdmタンパク質はSETタンパク質に属し、SETドメインと相同なアミノ酸配列を有するPR (PRDI-BF1

and RIZ) ドメインに加えて、DNA 結合活性を有する zinc finger ドメインを持つことを特徴とするタンパク質である。そのため Prdm タンパク質は特異的な DNA 配列に結合し、その結合領域のクロマチン構造を変化させる機能を持つと推定されている。現在までに、ヒトで 16 種類、マウスで 15 種類の Prdm 遺伝子が同定されているが、詳細な機能解析は数種類の Prdm 遺伝子のみで行われているに過ぎない。よって、本論文では細胞分化過程や胚発生における Prdm 遺伝子群の機能を明らかにすることを目的とした。まず、アフリカツメガエル初期胚における Prdm 遺伝子群の発現を解析し、次に、マウス胚性腫瘍細胞株 P19 (P19 細胞) を用いて神経細胞分化過程における Prdm 遺伝子群の発現と機能を解析した。アフリカツメガエル初期胚は受精以降の全過程が母体外で進行し、発生途中の胚は他の脊椎動物卵よりサイズが大きく操作が容易であるため、受精から器官形成過程における初期発生の研究が特に進み、形態形成のモデルとしてその分子メカニズムの解明に大きく貢献している。一方、P19 細胞は多能性を有した細胞株であり、ES 細胞に比べ高効率で神経や筋肉細胞への分化誘導が可能なモデル幹細胞である。

まず、アフリカツメガエル初期胚を用いて、初期発生過程における Prdm 遺伝子群の発現を半定量 PCR 法によって解析した。その結果、アフリカツメガエルが保持するすべての Prdm 遺伝子 15 種類が初期発生過程において発現していることが判明した。このうち、Prdm1, 2, 4, 9, 11 および 15 遺伝子は母性成分として発現しており、受精直後から発生に関わることが明らかとなった。さらに、Whole mount *in situ* hybridization 法によって、発現組織の解析を行ったところ、すべての Prdm 遺伝子が様々な発生ステージで組織特異的に発現しており、各組織の分化や形成過程で機能していることが示唆された。特に、脊髄や目、耳、前脳、中脳、後脳、脳室などの神経組織において Prdm

遺伝子の発現は顕著であり、アフリカツメガエル初期胚の神経発生において Prdm 遺伝子は重要な機能を有する可能性が示された。

次に、神経細胞分化における Prdm 遺伝子の機能解析を行うために、P19 細胞の分化過程における Prdm 遺伝子群の発現を解析した。P19 細胞は、レチノイン酸 (RA) 曝露により神経細胞へ、ジメチルスルホキシド (DMSO) 曝露により心筋・骨格筋へ分化誘導可能な幹細胞である。RA 曝露によって神経細胞分化誘導後、経時的な遺伝子発現変化を DNA チップによって網羅的に解析した結果、Prdm8, 12 および 13 遺伝子の発現が分化誘導 4 日目に一過的に誘導されることが明らかとなった。分化誘導 4 日目は神経細胞分化が開始する時期とされており、Prdm8, 12 および 13 遺伝子は未分化細胞から神経細胞へ分化する初期反応に関与していることが示唆された。また、DMSO 曝露による心筋・骨格筋分化誘導過程における発現を解析したところ、Prdm6 遺伝子の発現が一過的に誘導されたことから、Prdm6 遺伝子は心筋・骨格筋分化に関与する可能性が判明した。

さらに、P19 細胞の細胞分化過程における Prdm13 遺伝子の機能を解明するために、Prdm13 遺伝子の過剰発現による神経細胞分化への影響を解析した。Prdm13 発現プラスミドを P19 細胞に導入し、Prdm13 過剰発現後の P19 細胞の状態を経時的に解析した。P19 細胞は、ニューロンとグリア細胞の 2 種類の神経細胞に分化するため、ニューロンマーカーとして Ncam と、グリア細胞マーカーとして Gfap の発現を分化の指標とし、定量 PCR によって解析した。その結果、Prdm13 の過剰発現は Ncam の発現を誘導し、ニューロン分化を引き起こすことが判明した。一方、グリア細胞分化は Prdm13 過剰発現のみでは誘導されないことが示唆された。これらの結果から、P19 細胞の神経細胞分化過程において Prdm13 はニューロン分化を特異的に誘導する機能を

持つことが明らかとなった。

以上、本論文では、アフリカツメガエル初期胚と神経細胞分化解析のモデル系であるマウス P19 細胞を用いて、メチル化タンパク質をコードする Prdm 遺伝子の発現と機能解析を行い、細胞分化、特に神経細胞分化過程において、Prdm 遺伝子が重要な機能を持つことを明らかにした。本論文の成果は、動物の発生過程における細胞分化の分子機構解明に重要な知見をもたらし、さらに、再生医療の進展に寄与することが期待される。

第 1 章

序論

われわれヒトを含む高等生物の複雑な体は、受精卵というたった1つの細胞が分裂と増殖を繰り返し、多様な細胞へと分化することによって形作られる。一部の例外を除き、あらゆる細胞が同一の遺伝情報を持ち、個々の細胞の特性は、発現する遺伝子を制御することにより決定される。転写レベルの発現制御機構の1つとして、塩基配列の変化を伴わない発現制御が注目されている。これをエピジェネティック制御という。近年、エピジェネティック制御は発生や細胞分化、がん細胞制御など様々な細胞イベントに重要な役割を担うことが明らかとなってきた。エピジェネティック制御の分子機構として、DNAのメチル化とヒストンタンパク質の化学修飾、例えば、リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、SUMO化およびADPリボシル化などが知られている。

クロマチン高次構造の変化は、エピジェネティック制御において非常に重要な分子機構と考えられている。高次構造は、細胞周期を通じて凝集したままのヘテロクロマチンと、それに対するユークロマチンという主に2つの状態に分類される。ユークロマチンには転写活性状態あるいは転写準備状態にある遺伝子が多く存在するのに対し、ヘテロクロマチンは概して転写が不活性な遺伝子を含む領域によって構成されている。一方、ヌクレオソームを構成するコアヒストン（ヒストンH2A、ヒストンH2B、ヒストンH3、ヒストンH4）は、N末端側の塩基性アミノ酸に富んだドメイン（ヒストンテール）とC末端側の球状のドメインからなっている。C末端ドメインはヒストンオクタマー形成に必要であり、ヒストンテールはアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化といった様々な化学修飾を受け（Figure 1-1）、クロマチンの構造やその構造を制御する因子の結合あるいは修飾に影響を与えることにより、ゲノムDNAの収納状態、遺伝情報の発現、細胞周期に重要な影響を

及ぼす (Verdone et al. 2006)。

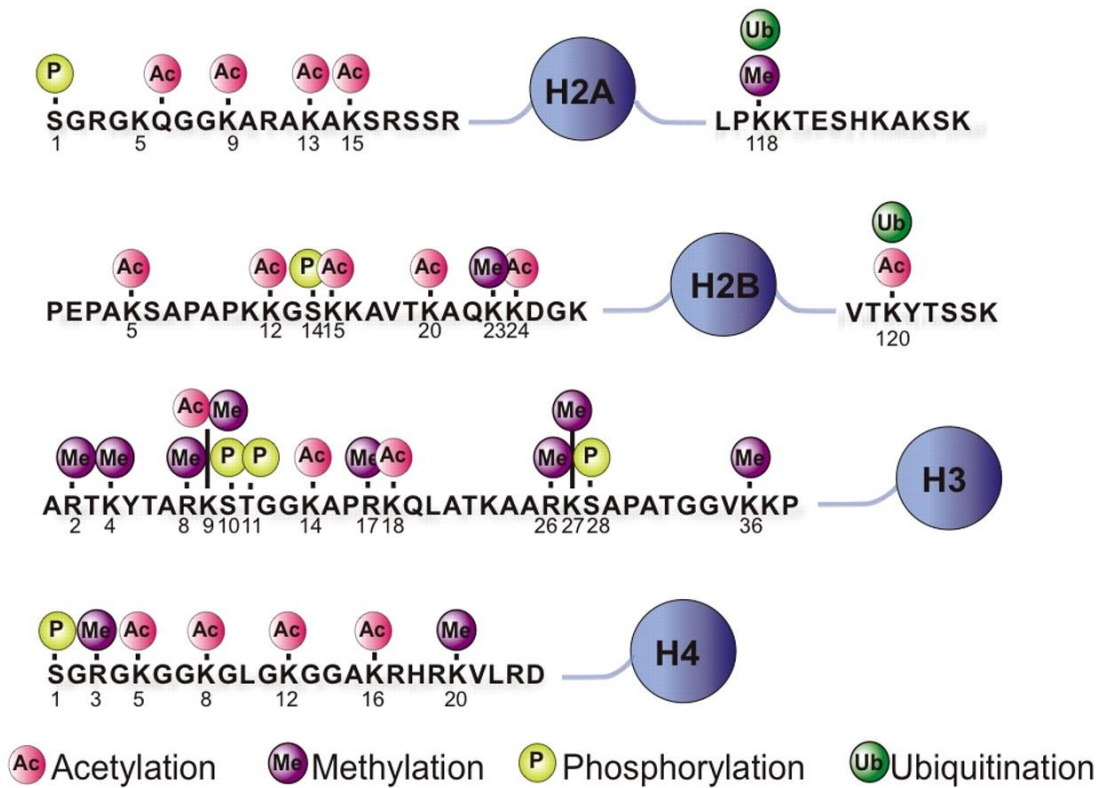


Figure 1-1. ヒストンテールにおける化学修飾の例 (Kato et al. 2010)

ヒストンのアセチル化は遺伝子の発現状態とよく関連しており、クロマチンの状態変化に応じてすばやく遺伝子発現を促進する非常にダイナミックな化学修飾としてよく研究されている。アセチル化修飾は、ヒストンアセチル基転移酵素 (HATs, Histone acetyltransferase) およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC, Histone deacetylase) によって触媒される。HATs は GNAT (GCN5-related N-acetyltransferase), MYST (MOZ, Ybf/Sas3, Sas2 and Tip60), P300/CBP (CREB-binding protein) など 5つのファミリーに分類されていたが、最近では新しいファミリーとして Camello ファミリーの報告もある

(Karmodiya et al. 2014)。また、多くの HATs がヒストンタンパク質以外のタンパク質のリシン残基をアセチル化するため、KATs (lysine acetyltransferase) とも呼ばれている (Kuo et al. 2014)。一方、HDAC も配列ホモロジーや細胞内局在などによって、クラス 1, クラス 2a, クラス 2b, クラス 3 およびクラス 4 という 5 つのクラスに分類されている (Wang et al. 2014)。HATs および HDAC はそれぞれ転写の活性化および不活性化を担うと考えられているが、Esa1p のように転写サイレンシングを担う HATs や、筋萎縮に関与する FoxO 転写因子を活性化する HDAC もある (Clarke et al. 2006; Beharry et al. 2014)。

エピジェネティックな細胞記憶の観点においては、メチル化修飾が特に重要であるとされている。細胞記憶とは、個々の細胞が持つ遺伝子発現の差異が細胞分裂を経ても維持されることである。同一の遺伝情報を持つ細胞が、長期間にわたってそれぞれ固有の形質を維持することは、ゲノムの塩基配列には規定されない。つまり、エピジェネティック制御が重要となる。その中でも、エネルギー的に安定で細胞記憶の媒体として適しているヒストンのリシン残基のメチル化は、X 染色体の不活性化やヘテロクロマチン形成、DNA メチル化修飾の制御など、エピジェネティックな遺伝子発現制御の様々な局面において重要な役割を持つと考えられている。また、ヒストンのメチル化修飾は修飾される残基の位置により、異なる機能を発揮する。リシン残基にはモノ、ジ、トリという 3 つのメチル基付加修飾状態があり、それぞれ違う機能を持っている。また、アルギニン残基のグアニジル基は 2 ヶ所でメチル基付加修飾を受けるが、2 番目に転移されるメチル基には対称に入る場合と非対称の位置に入る場合の 2 通りがあり、この場合にもそれぞれ異なる機能に関わっている (Figure 1-2)。メチル化修飾を担う酵素には、アルギニン残基特異的に修飾する PRMT タンパク質と、リシン残基特異的に修飾する SET

タンパク質が存在する。

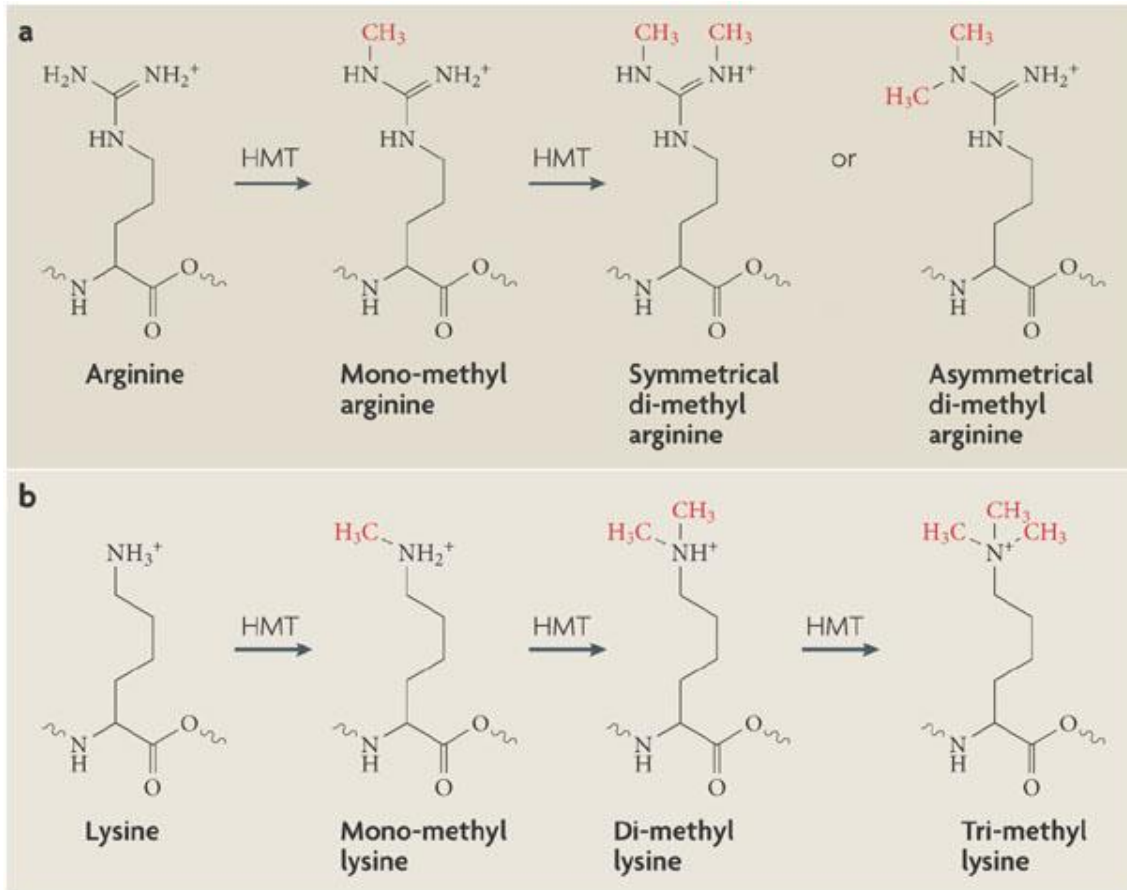


Figure 1-2. アルギニン残基 (a) およびリシン残基 (b) のメチル化修飾 (Klose et al. 2007)

ヒストンメチル基転移酵素の存在は SUV39H の研究により初めて発見された (Rea et al. 2000)。SUV39H はショウジョウバエの位置効果の抑制タンパク質 SU(VAR)3-9 および分裂酵母のサイレンシング因子 CLR4 の相同タンパク質であり、Chromo (Chromatin organization modifier) ドメインと SET ドメインから構成されている。Chromo ドメインは、クロマチン上へのタンパク質複合体の集合に関与する多くのタンパク質で見出される、30~70 アミノ酸残基

からなるモジュールとして定義される。一方、SET ドメインはヒストン H3 の 9 番目のリシン残基を特異的にメチル化修飾する触媒モチーフとして、2000 年、Jenuwein らによって発見されている。現在までに、SET ドメインを持つタンパク質は哺乳類で 60 種類ほどが同定されている。

本研究で注目した Prdm 遺伝子は N 末端側に PR ドメインを持ち、また、zinc finger ドメインの数や位置によって特徴づけられている (Figure 1-3)。PR ドメインは SET ドメインと 20~30% の割合で共通したアミノ酸残基を持っていることから、SET タンパク質群のサブファミリーとして位置づけられている (Derunes et al. 2005; Fumasoni et al. 2007)。現在までにヒトで 16 種類、マウスで 15 種類の Prdm 遺伝子が同定されており、様々な研究グループによって解析が進められている。SET ドメインを持つ SET タンパク質については、ヒストンメチル基転移酵素としての役割、例えば、ヒストン H3K27 をトリメチル化し転写サイレンシングに関与する Ezh2 や、ヒストン H3K4 をメチル化する Smyd2 がある (Cao et al. 2002; Abu-Farha et al. 2007)。また、マウスの褐色脂肪細胞と骨格筋分化のスイッチングにはたらく Prdm16 や、ショウジョウバエ嗅覚神経細胞の種類を決定する転写因子 hamlet の機能も報告されている (Seale et al. 2008; Moore et al. 2002)。Prdm タンパク質は SET タンパク質と同様に、メチル基転移酵素として直接メチル化修飾を担い (Prdm2, Kim et al. 2003; Prdm3, Pinheiro et al. 2012; Prdm6, Wu et al. 2008; Prdm8, Eom et al. 2009; Prdm9, Hayashi et al. 2005; Prdm16, Pinheiro et al. 2012)、他のクロマチン修飾関連因子との相互作用も多数報告されている。例えば Prdm1 は、マウス生殖細胞において、アルギニン残基をメチル化する PRMT5 と協調して H2 および H4 の 3 番目のアルギニン残基をジメチル化する (Ancelin et al. 2006)。Prdm6 はクラス 1 脱アセチル化酵素やヒストンメチル基転移酵素 G9a とともに、マ

ウス平滑筋のエピジェネティックレギュレータとして作用する (Davis et al. 2006)。このように、Prdm 遺伝子は細胞や組織レベルでの解析は進んでいる。しかし、個体全体での報告は少なく、詳細に解析されているものは限られているのが現状である。

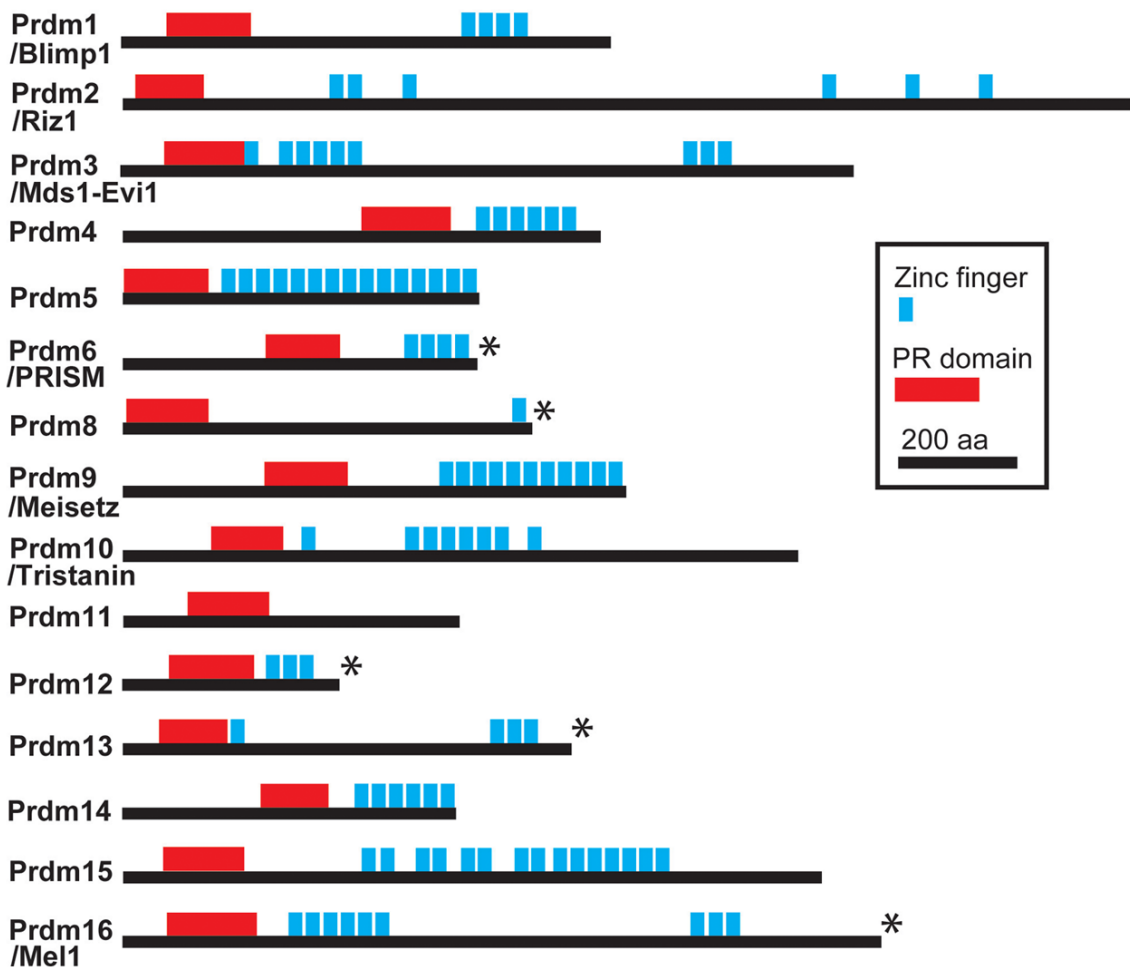


Figure 1-3. マウス Prdm タンパク質のドメイン構造 (Kinameri et al. 2008)

本研究では、胚発生や細胞分化過程における Prdm 遺伝子群の関与を明らかにすることを目的とし、アフリカツメガエル *X. laevis* 初期胚および P19 細胞を用いて、Prdm 遺伝子の発現と機能を解析した。*X. laevis* は四倍体であるためゲノム解読が難航しているが、近縁種であるネッタイツメガエル *X. tropicalis* は 2010 年にゲノム配列が決定している。また、受精以降の全過程が母体外で進行し、発生途中の胚は丈夫で実験的に操作しやすいことから、受精から器官形成過程における初期発生の研究が特に進み、形態形成のモデルとして分子メカニズムの解明に大きく貢献している。一方、マウスはデータベースが充実しており、今回用いた P19 細胞は多能性を有した細胞株であり、ES 細胞に比べ高効率で神経および筋細胞への分化誘導が可能である。

本研究において、*X. laevis* 初期胚を用いた Prdm 遺伝子の発現組織解析では、すべての Prdm 遺伝子が様々な発生ステージで組織特異的に発現することが明らかとなった。またその発現は神経組織において顕著であり、Prdm 遺伝子が *X. laevis* 初期胚の神経発生において重要な機能を持つ可能性が示された。一方、P19 細胞を用い、神経細胞分化と心筋・骨格筋分化における経時的な発現変動を解析した結果、それぞれの分化過程で一部の Prdm 遺伝子が特異的な発現パターンを示すことが明らかとなった。また、神経細胞分化における Prdm13 の機能について解析を行ったところ、Prdm13 はニューロン分化を特異的に誘導する機能を持つことが明らかとなった。

今回明らかにした個体全体や細胞における Prdm 遺伝子の時間的・空間的な遺伝子発現は、今後 Prdm 遺伝子がマウスやヒトの生命現象にどのように関与するのかを解明するため、また、エピジェネティック制御が細胞分化や発生に重要であることを裏付けるための糸口となるだろう。

第 2 章

Xenopus laevis 初期胚における Prdm 遺伝子群の発現と機能解析

2-1 緒論

多細胞生物の発生過程では、1つの受精卵が細胞分裂と細胞分化を繰り返しながら様々な機能を持つ細胞となり、高次生命活動を行う体制が成立する。この細胞の分化過程においてゲノム DNA 配列は変化しないため、遺伝子の発現レベルでの制御が重要である。近年、DNA 配列の変化を伴わない遺伝子発現制御システムとしてエピジェネティック制御系が見出され、再生医療研究などにおいて、エピジェネティック制御系のリプログラミングが重要な課題となっている。エピジェネティック制御の分子機構として、DNA のメチル化やヒストンタンパク質の化学修飾、例えば、リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、SUMO 化および ADP リボシル化などが知られている。細胞分化過程では分化した個々の細胞内の遺伝子発現状態が細胞分裂を経ても維持される細胞記憶機構が研究課題とされ、その機構の1つとしてヒストンタンパク質のメチル化修飾が注目されている。本論文では、メチル化修飾タンパク質をコードする Prdm 遺伝子群に着目し、遺伝子発現と機能を解析した。

メチル化修飾を担う酵素には、アルギニン残基特異的な PRMT とリシン残基特異的な SET の2つのタンパク質ファミリーが存在する。このうち、SET タンパク質は転写調節因子 SUV39H タンパク質に見出されたメチル基転移活性ドメインである SET ドメインを持つタンパク質であり、脊椎動物において60種類ほどが同定されている。また、ヒストンメチル化修飾活性に加えて、他のヒストン修飾タンパク質と相互作用する活性を有し、様々な機能を持つことが報告されている (Ancelin et al. 2006; Divis et al. 2006)。Prdm タンパク質は SET タンパク質に属するが、SET ドメインと相同なアミノ酸配列を有す

る PR ドメインに加えて、DNA 結合活性を有する zinc finger ドメインを持つことを特徴とするタンパク質であり、特異的な DNA 配列に結合し、結合領域のクロマチン構造を変化させる機能を持つと推定されている。現在までに、ヒトで 16 種類、マウスで 15 種類の Prdm 遺伝子が同定されているが、詳細な機能解析は数種類の Prdm 遺伝子のみである。そこで、本章では胚発生における Prdm 遺伝子群の関与を明らかにすることを目的とし、*X. laevis* 初期胚における発現と機能を解析した。

X. laevis 初期胚は受精以降の全過程が母体外で進行し、発生途中の胚は他の脊椎動物卵よりサイズが大きく顕微操作し易いため、受精から器官形成過程における初期発生の研究が特に進み、さらに、遺伝子の強制発現や機能阻害実験は、mRNA や MO を直接受精卵に注入することで容易に行うことができるため、初期発生の形態形成のモデルとして分子メカニズムの解明に大きく貢献している。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 実験材料

Xenopus laevis

X. laevis は南アフリカ原産のピパ科クセノプス属の一種である。卵は他の脊椎動物に比べてサイズが大きく顕微操作等が容易であること、また、発生の進行が速く同調性が良いことから、発生学の研究に汎用されている。

2-2-2. 実験方法

(1) 胚の媒精と培養

性成熟した *X. laevis* 雌の背側に 300 unit のゴナトロピン®3000 (日本薬局方注射用ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン, 武田薬品工業株式会社) を皮下注射し、排卵まで約 12 時間、21°C で飼育した。雌から採取した未受精卵を 0.5×De boer's 氏液 (1×De boer's 氏液 : 0.11M NaCl, 1.3mM KCl, 0.44mM CaCl₂, pH 7.2 adjusted with NaHCO₃) で洗浄後、雄から摘出した精巣と混合し、媒精した。その後、脱ゼリー液 (2.5% チオグリコール酸, pH 8.0) に浸し、0.1×Steinberg's 液 (1×Steinberg's 液 : 58mM NaCl, 0.67mM KCl, 0.34mM Ca(NO₃)₂, 0.85mM MgSO₄, 5mM Tris-HCl(pH 7.4)) で洗浄し、終濃度 50μg/mL のゲンタマイシン (ナカライテスク) を加えた同溶液内で培養した。初期胚の発生段階は Nieuwkoop&Faber (1994) の定めたステージに従い判断した。

(2) RNA 抽出

AGPC 法 (Chomczynski P et al. 1987) に基づき total RNA を抽出した。胚に 1%SDS-TRIzol®試薬 (Life Technologies) を加え、VORTEX-GENIE-2 を用いてホモジナイズし、1/5 倍量のクロロホルムを加え、15,000rpm で遠心した。遠心後に得られた水層に、再び水層と等量のクロロホルムを加え、遠心した。得られた水層に 3/5 倍量以上のエタノールを加え、RNeasy® (QIAGEN) カラムに供した。カラムを洗浄後、RNase フリーの水で溶出し、total RNA を回収した。アガロースゲル電気泳動および吸光度測定により、RNA の濃度および純度を確認した。

(3) 逆転写反応

抽出した total RNA 1 μ g を鋳型とし、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®) のマニュアルに従い cDNA を合成した。プライマーはランダムプライマーを用いた。

(4) 半定量 PCR

逆転写反応で得られた cDNA を用いて PCR 反応を行い、電気泳動でバンドを確認した。コントロールとして *X. laevis* の ornithine decarboxylase (Odc) を用いた。プライマー配列は Table 2-1 に記載している。なお、*X. laevis* で同定されていない遺伝子については、*X. tropicalis* の配列を参考に縮合プライマーを設計し、PCR を行った。

Table 2-1. 半定量 PCR および WISH プローブ用プライマー配列

Gene name	Nucleotide sequences (5' - 3')	Polymerase
Prdm1	F: ATGAAAATGGATATGGAAGGAATTGATATG R: CTGAATTGGTGAATGCATCAGATAATTCTG	SP6
Prdm2	F: ATGTGGGAGGTATACTACCCAAACCTTGGATGGATG R: AAATATTTTCTTACAGTATTTACAGGGATGCATCTC	SP6
Prdm3	F: ATGCCAGACCAGCGNACTTTNATGTCAGCAATHGARAAYATG R: GTGNAGGGATTCCCTGATCAGANAGNGANAGCATCAT	T7
Prdm4	F: AGTGATAGTCACGAGCTGGACGCTGCGATTACTATG R: GGAGCTGAAGGAGTGAGAGCACATTGAGCA	SP6
Prdm5	F: GTGGATGAAGGTATAGACAACAGRTTRATGTGG R: CTCACATGTGAAGGGGCGCTTTTCTGAATGNGTDATCATRTG	SP6
Prdm6	F: GAGCCTAGTAAGTCAAGCTGGATGAGRTAYGTNCGNTG R: CATCCTCTGATGTCTGACTCAGCTGGGTNGCYTNGNTRAA	T7
Prdm8	F: AAGGACAACAGAGAGTTGGAGCCTCGNAAYACNATG R: CATTGCATATTCCTTTTTGTGGTNGAYCTCAT	SP6
Prdm9	F: CAGATGTCTGCAGGAGTCTTGT R: TGTGAACTGTTCTCCCACTC	SP6
Prdm10	F: TGTAAGTGGATGATGTTTGTACGNCCNGCNCA R: GAATCCCATCATAACACACNCGGCAYTTRACAT	SP6
Prdm11	F: ATGCACCCGGAAAAGACGGAGGAAATGTGCAGRAAYATG R: ATCGAACACTTGACACGCCTTNACRAACAT	SP6
Prdm12	F: ATGATGGGCTCGGTGCTG R: CAGCTGTGAGTAGGCGCT	SP6

F, forward primer; R, reverse primer

Table 2-1. 半定量 PCR および WISH プローブ用プライマー配列 (続き)

Gene name	Nucleotide sequences (5' - 3')	Polymerase
Prdm13	F: GGAGAGGAGCGNTACATCTGTTGGTAYTGYTGG R: CTCGCTTGCTATCTCAGANAGCTGRTGRCTRTRGCAT	T7
Prdm14	F: ATGAACATACTNGCCACTCCNCAYGARATG R: GTGGACCCTCATGTGCTTGTTTCAGGCTNGANGAYTGNGA	SP6
Prdm15	F: GCTGCTGAACCTGAAAAAGACCTGAACCCNAGYTCNTCN R: CCGGTGATGCTCCAGCATTACATCCCTCCTRARAANAGYTT	SP6
Prdm16	F: CCTCTTCTTAAAAGCCCTTTGAACCATAACACGNGARGCNAAR R: AATGGCCGACATCTGTGGGTGAAAAAGNAGNGGNGANGG	SP6
Odc	F: GCGGGCAAAGGAGCTTAATG R: TAACGCCAGAATCTGCTGGG	

F, forward primer; R, reverse primer

Y : C, T	R : A, G	H : A, C, T	D : A, G, T	N : A, C, G, T
----------	----------	-------------	-------------	----------------

(5) 大腸菌の形質転換と培養

プラスミド DNA を *E. coli* DH5a コンピテントセルに形質転換させた後 (Molecular Cloning, 2001)、終濃度 200 μ g/mL の Ampicillin (和光純薬工業株式会社) を添加した LB (polypeptone 10g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 10g/L, agar 15g/L) プレートにスプレッドして 37°C で一晩培養した。目的の遺伝子断片を含むプラスミド DNA を保持したシングルコロニーを、終濃度 200 μ g/mL の Ampicillin を添加した 2 \times YT 培地 (polypepton 16g/L, yeast extract 10g/L, NaCl 5g/L) に植菌し、37°C で一晩培養して大腸菌培養液を得た。

(6) プラスミド DNA 抽出

アルカリ-SDS 法によってプラスミド DNA を抽出および精製した (Molecular Cloning, 2001)。DNA 溶液に 5M Guanidine-HCl を加えて、QIAprep column (QIAGEN) に移して遠心分離し、50 μ L の glass beads を加えた glass filter に DNA を吸着させた。以降の操作は QIAprep[®] Miniprep Handbook に従った。

(7) *X. laevis* Prdm12 および Prdm13 遺伝子のクローニング

X. laevis 初期胚から抽出した total RNA を鋳型とし、SuperScript[®] III First-Strand Synthesis System (Life Technologies) を用いて cDNA を合成した。pCS2-SBXS ベクターにマルチクローニングサイト中の制限酵素配列を用いて (Prdm12, BamHI-EcoRI; Prdm13, EcoRI-XhoI) クローニングした。なお、Prdm13 は発現組織解析に用いたプローブ配列の一部をクエリーとして、Xenopus Laevis Version 6.0 および 7.1 (Xenbase) 上で BLAST 検索し、全長のクローニングを行った。クローニングに用いたプライマー配列は Table 2-2 に示す通りである。

Table 2-2. Prdm12 および Prdm13 のクローニング用プライマー配列

Gene name	Nucleotide sequences (5' - 3')
Prdm12	F: CTAGGATCCATGATGGGCTCGGTGCTGCCG R: TCGGAATTCTCACAGCACCATGGTTGGA
Prdm13	F: GCGAATTCATGCATTGCAACAGGGCTCT R: CGCTCGAGTTAGGGTTCCTTGCTGCTTC
F, forward primer; R, reverse primer	

(8) Whole mount *in situ* hybridization (WISH)

X. laevis 初期胚から抽出した total RNA を鋳型とし、SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Life Technologies) を用いて cDNA を合成した。次に、Table 2-1 に示すプライマーを用いて増幅した各 PCR 産物を pGEM-T Vector (Promega) に TA クローニング後、定法に従い処理し、digoxigenin (DIG)-UTP 存在下で T7 RNA ポリメラーゼもしくは SP6 RNA ポリメラーゼを用いて合成したアンチセンス RNA (プローブ) を用いて標的遺伝子にハイブリダイゼーションさせた。合成したプローブは、組織への浸透を高めるため、アルカリ加水分解により 100~300base の長さに断片化した。

各発生ステージの初期胚を MEMFA (0.1M MOPS, 2mM EGTA, 1mM Magnesium Sulfate, 10% Formaldehyde Buffer) で固定し、75%, 50%, 25%メタノールで段階的に再水和した。胚へのプローブの浸透を良くするため 10µg/mL Protease K (ナカライテスク) 処理後、0.1M triethanolamine に浸し、無水酢酸を加えることでアセチル化し、プローブの非特異的吸着を防いだ。ハイブリダイゼーションバッファー (50% formamide, 5×Saline Sodium Citrate,

1mg/mL torula RNA, 100 μ g/mL heparin (Sigma-Aldrich), 1 \times Denhardt's, 0.1% Tween20 (ナカライテスク), 0.1% CHAPS (同仁堂), 10mM EDTA) で数回前処理した後、60 $^{\circ}$ Cで一晩、プローブをハイブリダイゼーションさせた。2 \times Saline Sodium Citrate で洗浄後、バックグラウンドを抑える目的で RNase 処理を行った。0.2 \times Saline Sodium Citrate で洗浄後、2% Blocking Reagent (Roche) および 2% ヤギ血清でブロッキングし、Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments (Roche) で抗体反応を行った。MAB (100mM maleic acid, 150mM NaCl (pH7.5)) で1時間~一晩かけて5回以上洗浄し、AP バッファー (100mM Tris (pH9.5), 50mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.1% Tween20, 2mM levamisol) に数回浸した。アルカリフォスファターゼ基質 BM purple (Roche) を用いて発色させ、脱色液 (1% H₂O₂, 5% formamide, 0.5 \times Saline Sodium Citrate) で脱色した後、BB/BA (2:1 benzyl benzoate/benzyl alcohol) で胚を透明化し観察した。

(9) Antisense morpholino oligonucleotide (MO)

Prdm12 MO はタンパク質翻訳阻害を目的として、mRNA の 5-キャップ部位から開始コドンの約 25 塩基下流までを標的とし、Gene Tools, LLC (<http://www.gene-tools.com/>) で設計した。一方、Prdm13 MO は mRNA のスプライシングを阻害する目的で第 2 エクソンと第 2 イントロンのスプライシングジャンクションを標的とし、Prdm13a および Prdm13b それぞれについて Gene Tools, LLC で設計した。MO 配列は Table 2-3 に示す通りである。なお、ポジティブコントロールとして β -catenin を使用した。

胚へのインジェクションの際には、下準備として 2.5% チオグリコール酸液を用いて脱ゼリーを行った後、0.1 \times Steinberg's 液で 7, 8 回丁寧に洗浄した。その後、MBSH-5% Ficoll (88mM NaCl, 1mM KCl, 0.82mM MgSO₄, 2.4mM

NaHCO₃, 10mM HEPES (pH7.6), 0.33mM Ca(NO₃)₂, 0.41mM CaCl₂) に 5 分間浸した。ガラス管 (ナリシゲ G-1, 1×90mm) から作製した針を用いてインジェクションを行った。1~2 時間 MBSH-5% Ficoll でインキュベートした後、0.1×Steinberg's 液に交換し、終濃度 50 μg/mL のゲンタマイシン (ナカライテスク) を加えた同液中で培養した。

Table 2-3. Prdm12 および Prdm13 の MO 配列

Gene name	Nucleotide sequences (5' - 3')
Prdm12	GCAGCACCGAGCCCATCATTAATTC
s32494	TATATCTGATTTACCAGGAGGCCAG <u>Ggtacaaatctattgtctctt</u> tactt
Prdm13	AGAGACAATAGATTTGTACCTGGCC
s49847	TATATCCGATTTACCAGGAGGCCAG <u>Ggtacaactctctcctctctt</u> tatt
	AGGAGAGAGTTGTACCTGGCCTCCT

配列の上段下線部分は標的とした配列、大文字は第 2 エクソン領域、小文字は第 2 インtron領域を示す。下段は MO 配列である。

(10) mRNA 合成

Prdm12 および Prdm13 はともに pCS2-SBXS ベクターにクローニング後、NotI で制限酵素処理し、mMESSAGE mMACHINE Kit (Ambion) のマニュアルに従い、SP6 RNA ポリメラーゼを用いて mRNA を合成した。

(11) タンパク質ドメイン解析

解析には Pfam (Protein Family Database, <http://pfam.xfam.org/>) を用いた。
Prdm1, 2, 4, 9, 12, 13 は *X. laevis* の配列を、Prdm3, 5, 6, 8, 10, 11, 14, 15, 16
は *X. tropicalis* の配列をクエリーとし、得られた解析結果をもとに Prdm タン
パク質のドメイン構造について考察した。

2-3. 結果

2-3-1. 初期発生過程における Prdm 遺伝子群の発現パターン

(1) 時間的な遺伝子発現パターン

まず、初期胚から抽出した total RNA を用いて、半定量 PCR により *X. laevis* の 15 種類すべての Prdm 遺伝子について、時間的な発現解析を行った (Figure 2-1)。サンプルとして用いたステージは、6-7, 10-10.5, 12.5, 16-17, 19-20, 23-24, 26-27, 29/30-31, 34-35 および 37 の計 10 ステージである。なお、ポジティブコントロールとして Odc を用いた。1%アガロースゲルを用いた電気泳動解析の結果、Prdm1, 2, 4, 9 は発生初期から一定に発現し、Prdm3, 11, 13, 16 は発生が進むにつれ発現量が増加していた。さらに、Prdm1, 2, 4, 9, 11, 15 は Stage 6-7 の胞胚期から発現していたため、母性由来の mRNA の存在が示唆された。

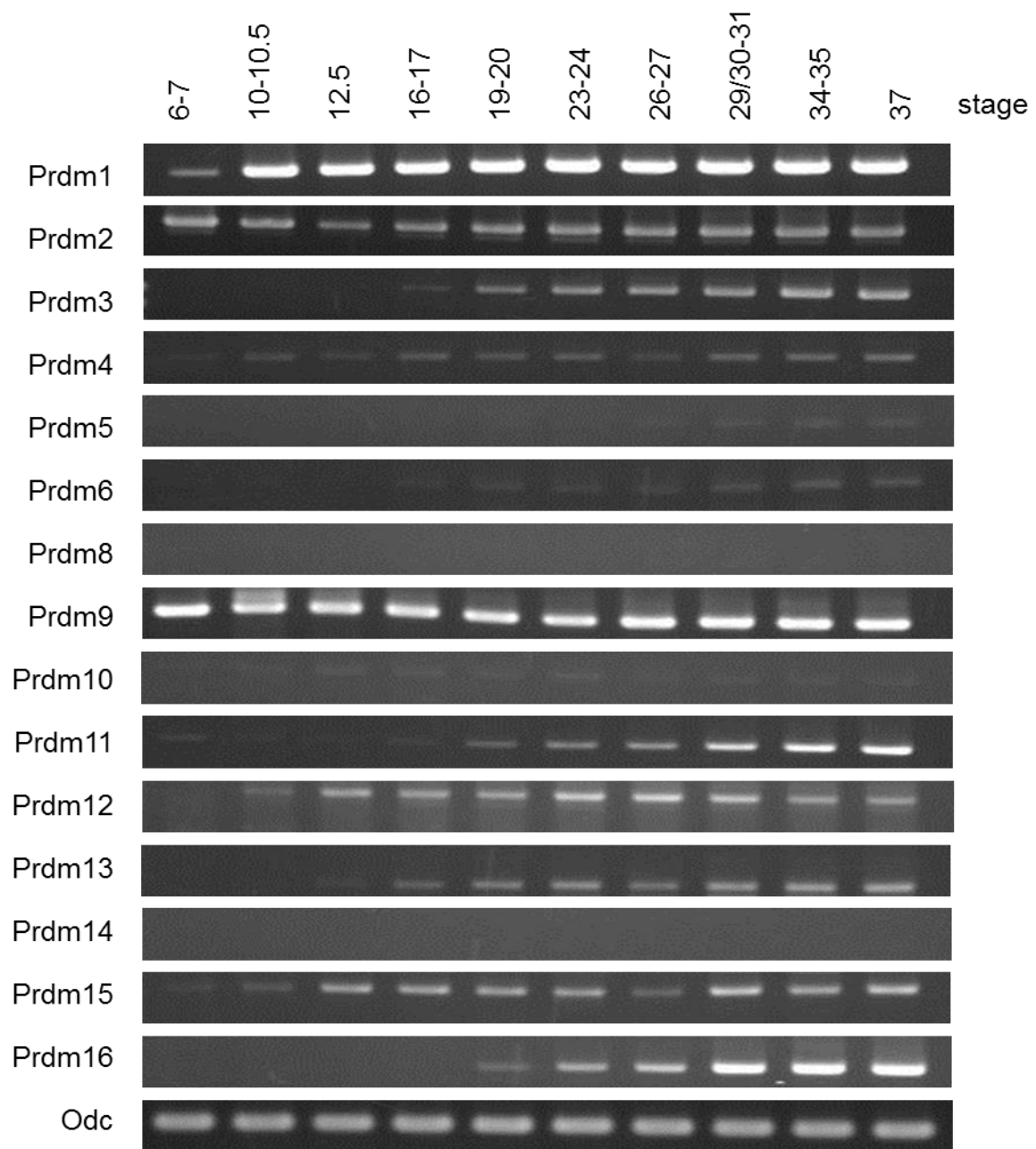


Figure 2-1. *X. laevis* 初期胚における Prdm 遺伝子群の時間的な発現パターン

(2) 空間的な遺伝子発現パターン

初期胚における Prdm 遺伝子群の発現領域を調べるため、各遺伝子の mRNA 配列の一部を用いてプローブを合成し、WISH を行った。今回明らかになったそれぞれの遺伝子の発現時期および発現領域に加え、これまでに報告されている機能情報について以下に示す。

Prdm1 : PR domain containing 1, with ZNF domain

Stage 10.5 から動物極全体で発現し始め、Stage 21 あたりからは鰓、体節で発現していた。Stage 26 では目や耳でも発現し、以降も発現が維持された。Stage 37/38 では、内胚葉全体でも発現が認められた (Figure 2-2)。

Prdm1 は B 細胞の終末分化にはたらく Blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1) としても知られている (Shaffer et al. 2002)。また、マウスでは胚発生や多数の成体細胞系列の分化に重要であることが報告されている (Bikoff et al. 2009)。さらに、ヒストンメチル基転移酵素として知られる G9a とともに複合体を形成し、ヒストン H3K9 のメチル化を行うことで転写のサイレンシングを引き起こすことが報告されている (Gyory et al. 2004)。ツメガエルでは、前側内部中胚葉の細胞運命、頭部の誘導に重要であることが明らかとなっている (de Souza et al. 1999)。

Prdm2 : PR domain containing 2, with ZNF domain[provisional]

Stage 13 では胚全体で発現しており、発生が進むにつれ発現領域が目と脊索に限定されることが明らかとなった。Stage 37/38 では目を含む頭部全体と脊索で強く発現していた (Figure 2-3)。

Prdm2 は RIZ (Rb⁵-interacting zinc finger gene) としても知られ、ヒトでは第 1 染色体短腕の 36 番目に位置し、PR ドメインを持つ RIZ1 と、選択的スプライシングを受けた PR ドメインをもたない RIZ2 が転写される。乳がんや神経芽細胞腫、肺がんの細胞を用いた発現解析および強制発現による機能解析から、RIZ1 ががん抑制に重要であることが明らかとなっている (He et al. 1998)。また、RIZ の遺伝的多型が肺がんの遺伝子マーカーとして利用できることが示唆されている (Yoon et al. 2007)。

Prdm3 (mecom) : MDS1 and EVI1 complex locus

Stage 13 では脊索、さらに Stage 21 では鰓や腎臓で発現しており、発生が進むにつれ、終脳、中脳、脳室、目、鼻を含む頭部全体での発現が強くなっていった。Stage 40 では脊索での発現も観察された (Figure 2-4)。

Prdm3 は、ヒストン H3K9 を特異的にモノメチル化するヒストンメチル基転移酵素である。Prdm3 は Prdm16 とともにヒストン H3K9 をモノメチル化し、SUV39H による核内の H3K9 トリメチル化によって、ヘテロクロマチンが強く形成される (Pinheiro et al. 2012)。

Prdm4 : PR domain containing 4

Stage 19 から 24 までは胚全体で発現しており、Stage 27 になると、その発現は目と脊索に限定され、さらに発生が進んだ Stage 31 では鰓、鼻、間脳、中脳、脳室で発現していた。また、Stage 39 では頭部全体、脊索で強く発現していた (Figure 2-5)。

Prdm4 ははじめ、ニューロトロフィン受容体 p75 の結合タンパク質 SC1 (Schwann cell factor 1) として同定された (Chittka et al. 1999)。SC1 はマウス

の発達過程の大脳皮質で強く発現し、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC とともに細胞周期を制御する。また、タンパク質アルギニンメチル化酵素 PRMT5 とともに神経幹細胞の増殖能力を制御している (Chittka et al. 2012)。

Prdm5 : PR domain containing 5

Stage 13 では胚全体で発現しているが、発生が進むと脊索での発現に限定されることが明らかとなった。Stage 29/30 ではさらに鼻での発現が観察された (Figure 2-6)。

Prdm5 は、マウス ES 細胞において CTCF や TFIIC の複合体と相互作用することで、クロマチン機構に関与することが報告されている (Galli et al. 2013)。また、ゼブラフィッシュの早期発達段階において、wnt/ β -catenin 経路および PCP 経路を負に制御している (Meani et al. 2009)。

Prdm6 : PR domain containing 6

Stage 17 から 21 までは脊索で発現しており、Stage 26 では菱脳で発現が観察された。Stage 29/30 では脳室、脊索での発現が明確になり、Stage 39 では目を含む頭部全体と脊索で発現が強くなった (Figure 2-7)。

Prdm6 は、平滑筋で特異的に発現することから PRISM (PR domain in smooth muscle) とも呼ばれる。特に、マウス胚発生時期の心臓流出路、大動脈で強く発現し、ヒストン脱アセチル化酵素やヒストンメチル基転移酵素 G9a との相互作用により転写抑制に寄与すること、また、平滑筋の分化を抑制し増殖を維持する、エピジェネティックレギュレータとしての機能が報告されている (Davis et al. 2006)。さらに、有糸分裂後の神経細胞でも発現が認められている (Kinameri et al. 2008)。

Prdm8 : PR domain containing 8

Stage 10 から 13 では動物極上部で発現し、Stage 23 から 27 では脊索で発現が観察された。Stage 31 では、中脳や菱脳でも発現が観られ、Stage 39 では胚全体で発現することが明らかとなった (Figure 2-8)。

マウスにおける Prdm8 の発現は、網膜、脊髄、終脳の発達において時空間的にしっかりと制御されており (Komai et al. 2009)、新皮質発達において多極性形態期終末の形態形成に関与する (Inoue et al. 2014)。Prdm8 は、ヒストン H3K9 を特異的にメチル化し、ステロイドホルモン産生マーカー遺伝子 p450c17c や LHR の発現を抑制することによってマウス精巢の発達を制御することが明らかとなっている (Eom et al. 2009)。また、転写因子 Bhlhb5 とリプレッサー複合体を形成し、Cadherin-11 を制御することにより神経回路集合体の一部を維持する (Ross et al. 2012)。ツメガエルでは、Prdm13 とともに神経板で発現していることが報告されている (Hanotel et al. 2014)。

Prdm9 : PR domain containing 9

Stage 23 までは発現が観られず、Stage 25 になると脊索、Stage 31 では目や耳で発現が観察された。Stage 32 では中脳での発現が強くなり、Stage 39 では頭部全体で強く発現し、脊索での発現は観察されなかった (Figure 2-9)。

Prdm9 は、Meisetz (meiosis-induced factor containing a PR/SET domain and zinc-finger motif) としても知られ、マウス胎児のメス生殖腺において、減数分裂期に入った生殖細胞、出生後のオスの精巢で発現することが明らかとなっている (Hayashi et al. 2005)。また、ヒストン H3K4 のトリメチル化活性を持ち、メチル化活性依存的な転写活性を持つ。

Prdm10 : PR domain containing 10

Stage 26 までは発現が観察されず、Stage 31 で目、鰓、間脳、中脳、脳室で発現が観られた (Figure 2-10)。

Prdm10 はマウス胚 E8.5 において、中胚葉や神経堤細胞で発現し、E13.5 になると、中胚葉由来の体節、神経堤細胞由来の顔骨格で発現がみられ、これは E16.5 と発生ステージが進行しても、また成体においても発現が維持される (Park et al. 2009)。

Prdm11 : PR domain containing 11

Stage 25 までは発現が観察されず、Stage 27 では脊髄や脊索で発現し始め、Stage 29/30 では目でも発現が観られた。Stage 39 では頭部全体と脊髄で強く発現していた (Figure 2-11)。

Prdm11 は、マウス造血幹細胞の自己複製、維持および機能を制御する Prdm3 や Prdm16 と同様の発現パターンを示すが、これら 2 つの遺伝子と比較し、造血前駆細胞の直接的な制御は行わない (Thoren et al. 2013)。また、Prdm11 は、他の Prdm 遺伝子が持つ zinc finger ドメインをもたない (Fumasoni et al. 2007)。

Prdm12 : PR domain containing 12

Stage 13 では神経堤で発現し、Stage 21 になると脊髄でも発現が観られた。Stage 24 からは中脳、耳、前腎、鼻、前脳での発現が観察された (Figure 2-12)。

Prdm12 は、ヒストン H3K9 を特異的にメチル化する G9a をリクルートし、神経発生に関与すること、また、P19 細胞において、p27 を介し、細胞周期の G1 期を制御することによって細胞増殖を抑制することが明らかとなって

いる (Yang et al. 2013)。E9.5 のマウス胎児では脊髄、前脳、中脳で発現しており、E10.5 になるとさらにその発現が強くなる。また、前脳 p1, p3 領域, Sonic hedgehog を発現し p2 と p3 の境界領域である Zli (zona limitans intrathalamica) 領域に近接して発現する (Kinameri et al. 2008)。

Prdm13 : PR domain containing 13

Stage 13 から 21 では神経堤や脊髄で発現していた。Stage 26 からは脊髄とともに目や後脳での発現が観られ、Stage 40 では頭部全体、鰓で強く発現していた (Figure 2-13)。

Prdm13 は、ヒストンメチル基転移酵素としての活性を持ち、グルタミン酸作動性ニューロン特異的に発現する Tlx3 を誘導する Neurog2 の発現を抑制することによって、グルタミン酸作動性ニューロンへの分化を抑制することが明らかとなっている (Hanotel et al. 2014)。ツメガエルの Prdm13 は Stage 13 から発現し、主に神経板、後脳、脊髄、網膜で発現することが報告されている (Hanotel et al. 2014)。

Prdm14 : PR domain containing 14

Stage 13 では脊髄で発現し、Stage 23 では咽頭嚢で発現が観られた。Stage 27 では脊索でも発現しており、Stage 37/38 では目や終脳で強く発現していた (Figure 2-14)。

Prdm14 は他の Prdm よりもよく研究されている遺伝子である。マウス胚では E3.5 胚盤胞の内部細胞塊でわずかに発現し、E5.5 で消失する (Yamaji et al. 2008)。また雌雄両方の胚において E13.5~E14.5 まで始原生殖細胞特異的に発現し続け、Prdm1 とともに始原生殖細胞の転写制御に重要であることが報

告されている。ヒトでは OCT4, SOX2, KLF4 のような転写因子とともに繊維芽細胞のリプログラミング効率を高め、ヒト ES 細胞の維持や多能性の再取得に重要な転写因子である (Chia et al. 2010)。また、iPS 細胞のリプログラミング開始において、ヒストン H3 の 27 番目のリシンをトリメチル化する複合体 PRC2 をリクルートし、上皮間葉転換のエンハンサー ZEB1 の発現を抑制する (Chan et al. 2013)。

Prdm15 : PR domain containing 15

Stage 12 では動物極で発現し、Stage 21 において脳領域で発現が観察された。Stage 28 からは目や鰓、終脳、脳室で発現していた (Figure 2-15)。

Prdm15 は、ヒトの 21 番染色体の長腕に位置し (Shibuya et al. 2005)、パークット型 B 細胞リンパ腫で高く発現している (Giallourakis et al. 2013)。現時点では発現解析のみで詳しい機能については報告がない。

Prdm16 : PR domain containing 16

Stage 25 までは発現が観られず、Stage 26 において嗅板や咽頭嚢に発現が観られた。Stage 31 では鰓でも発現し始め、Stage 39 では頭部全体で強く発現し、腎臓でも発現が観られた (Figure 2-16)。

Prdm16 は、ヒストン H3K9 を特異的にモノメチル化するヒストンメチル基転移酵素である。Prdm16 は Prdm3 とともにヒストン H3K9 をモノメチル化し、SUV39H による核内の H3K9 トリメチル化によって、ヘテロクロマチンを強固に形成する (Pinheiro et al. 2012)。また、褐色脂肪細胞と骨格筋分化のスイッチングに重要な制御因子と報告があったが (Seale et al. 2008)、その後の研究により、褐色脂肪細胞の発達にはそれほど重要でないと考えられている

(Harms et al. 2014)。

Prdm4, 6, 8, 10, 12, 13 および 16 に関しては、マウス胎児の神経組織で発現していることが報告されており、これらの Prdm 遺伝子がツメガエルの神経組織でも機能することが示唆された。また、Prdm9 の目、耳、中脳、Prdm11 の脊髄、Prdm15 の目、終脳、脳室での発現はこれまでに報告がなかったが、今回の研究によりツメガエル初期胚の神経組織で機能する新規の Prdm 遺伝子として同定した。

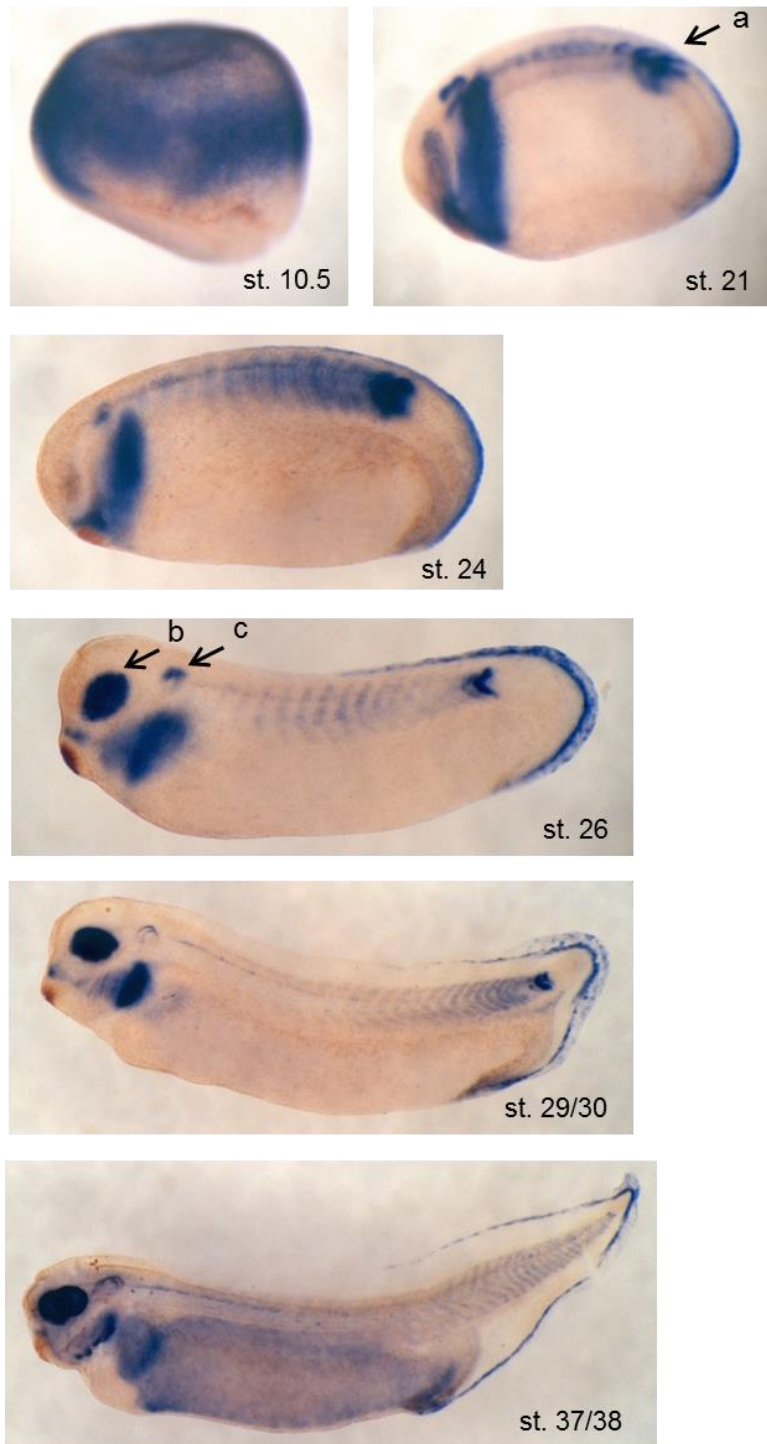


Figure 2-2. *X. laevis* 初期胚における Prdm1 の空間的発現パターン
 (a) 体節, (b) 目, (c) 耳



Figure 2-3. *X. laevis* 初期胚における Prdm2 の空間的発現パターン
 (a) 目, (b) 脊索



Figure 2-4. *X. laevis* 初期胚における Prdm3 の空間的発現パターン
 (a) 脊索, (b) 鰓, (c) 腎臓, (d) 終脳, (e) 中脳, (f) 脳室

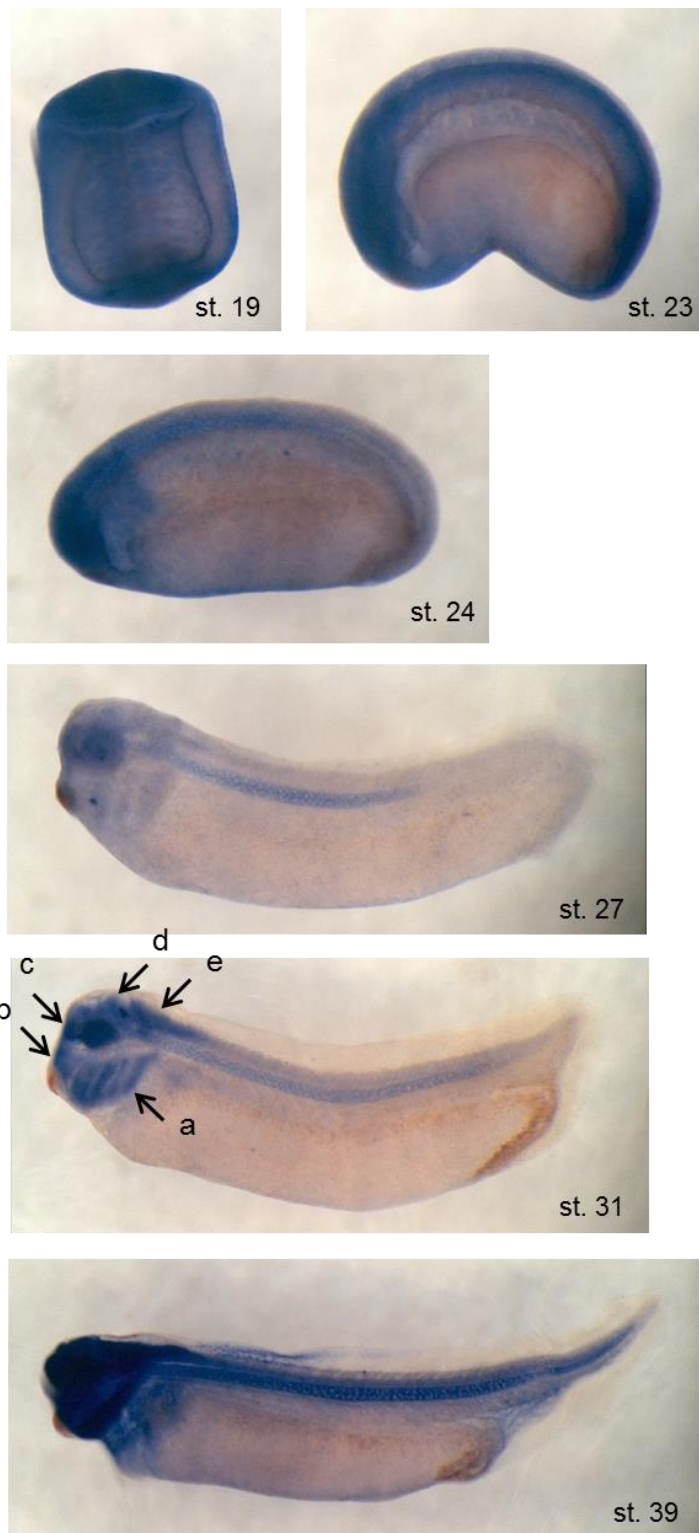


Figure 2-5. *X. laevis* 初期胚における Prdm4 の空間的発現パターン
 (a) 鰓, (b) 鼻, (c) 間脳, (d) 中脳, (e) 脳室

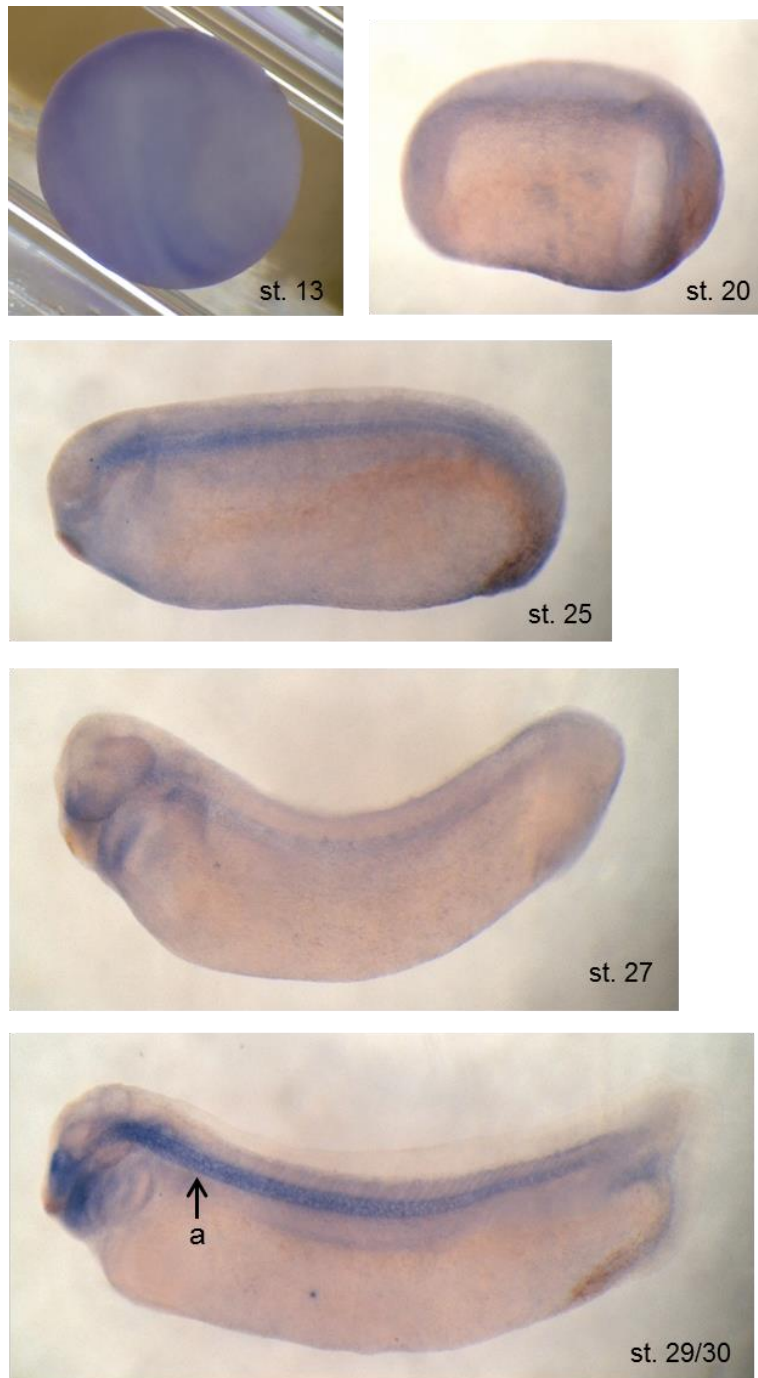


Figure 2-6. *X. laevis* 初期胚における Prdm5 の空間的発現パターン

(a) 脊索

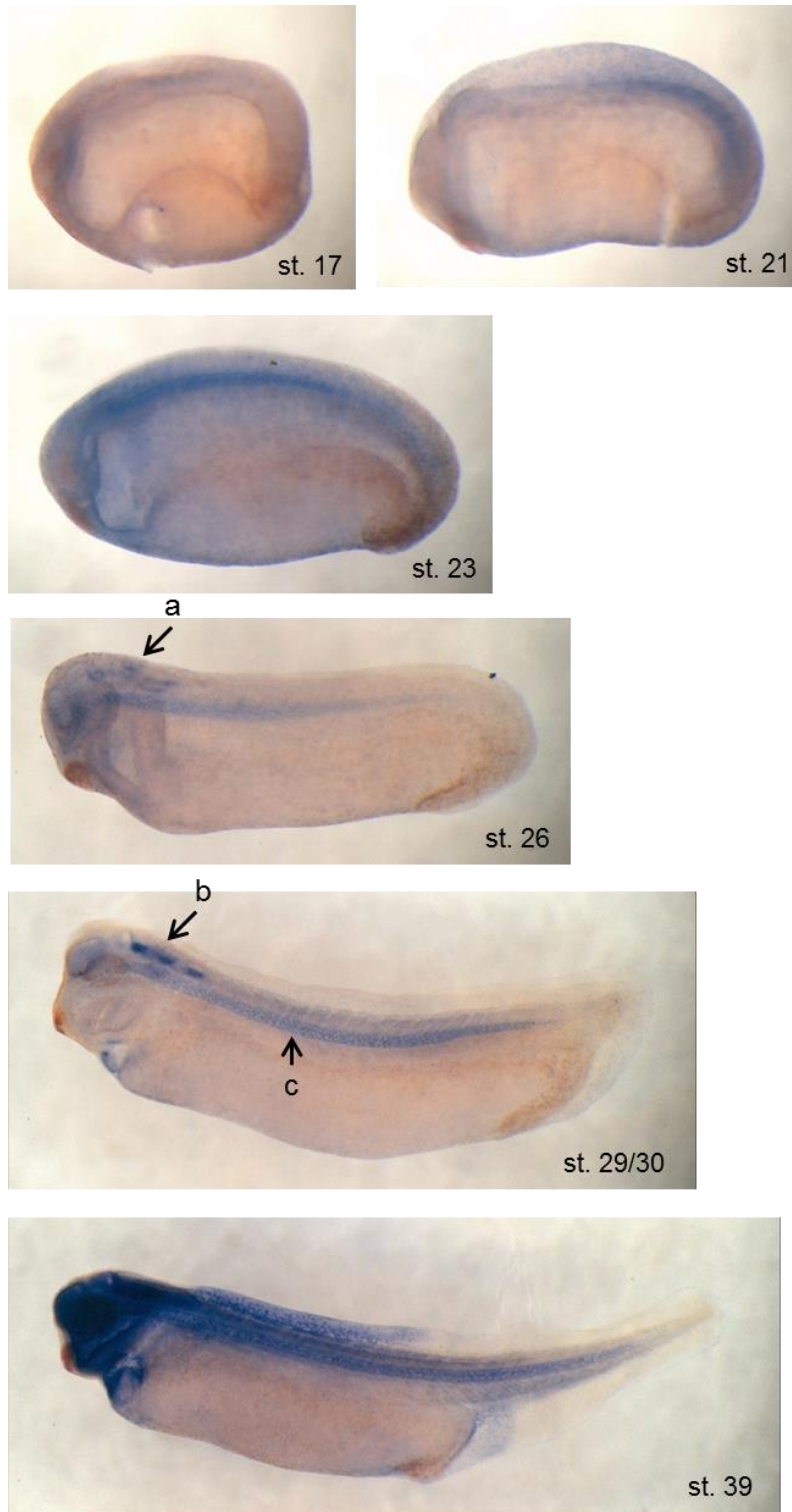


Figure 2-7. *X. laevis* 初期胚における Prdm6 の空間的発現パターン
 (a) 菱脳, (b) 脳室, (c) 脊索

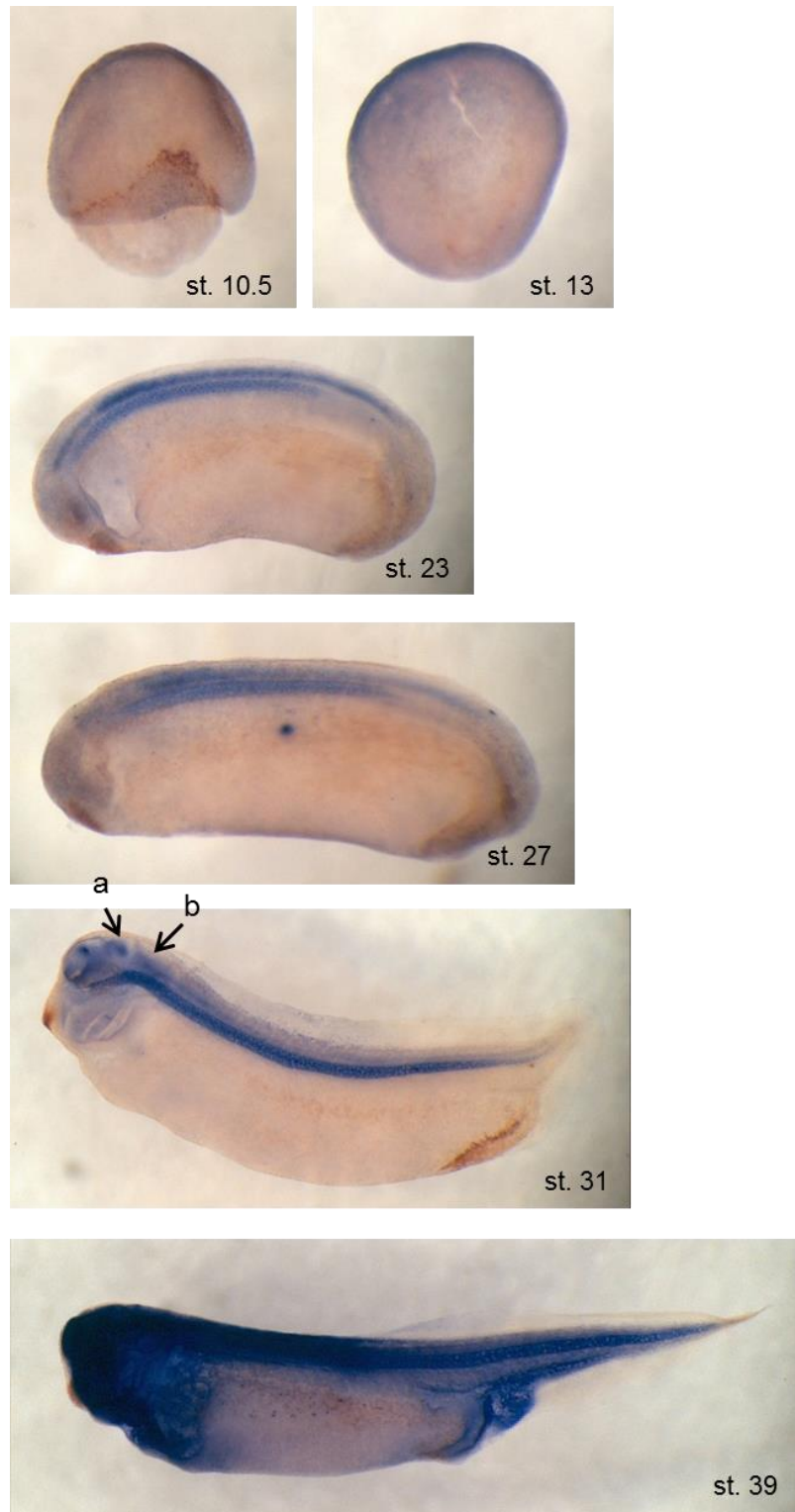


Figure 2-8. *X. laevis* 初期胚における Prdm8 の空間的発現パターン
 (a) 中脳, (b) 菱脳

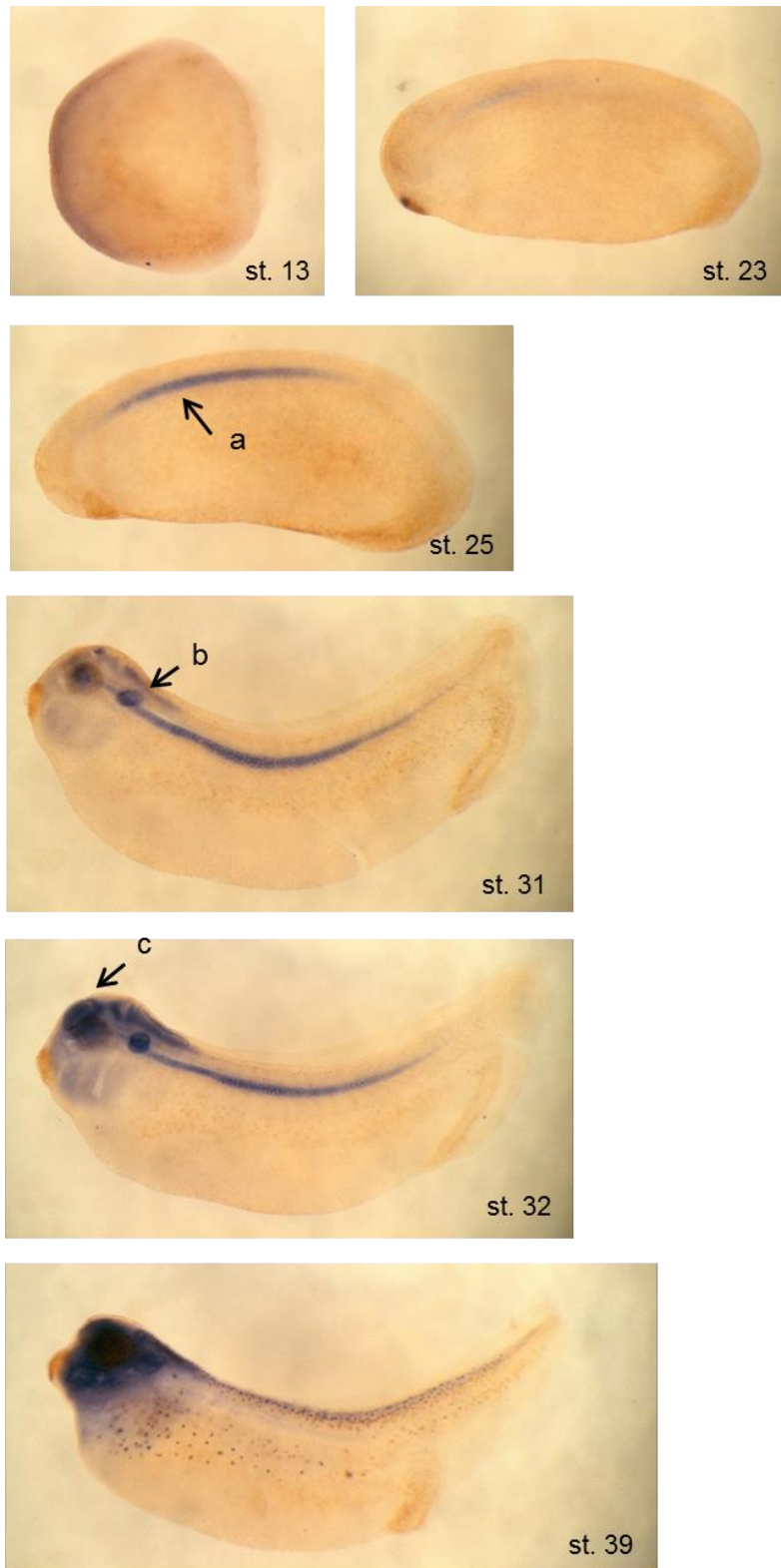


Figure 2-9. *X. laevis* 初期胚における Prdm9 の空間的発現パターン
 (a) 脊索, (b) 耳, (c) 中脳



Figure 2-10. *X. laevis* 初期胚における Prdm10 の空間的発現パターン
 (a) 鰓, (b) 間脳, (c) 中脳, (d) 脳室

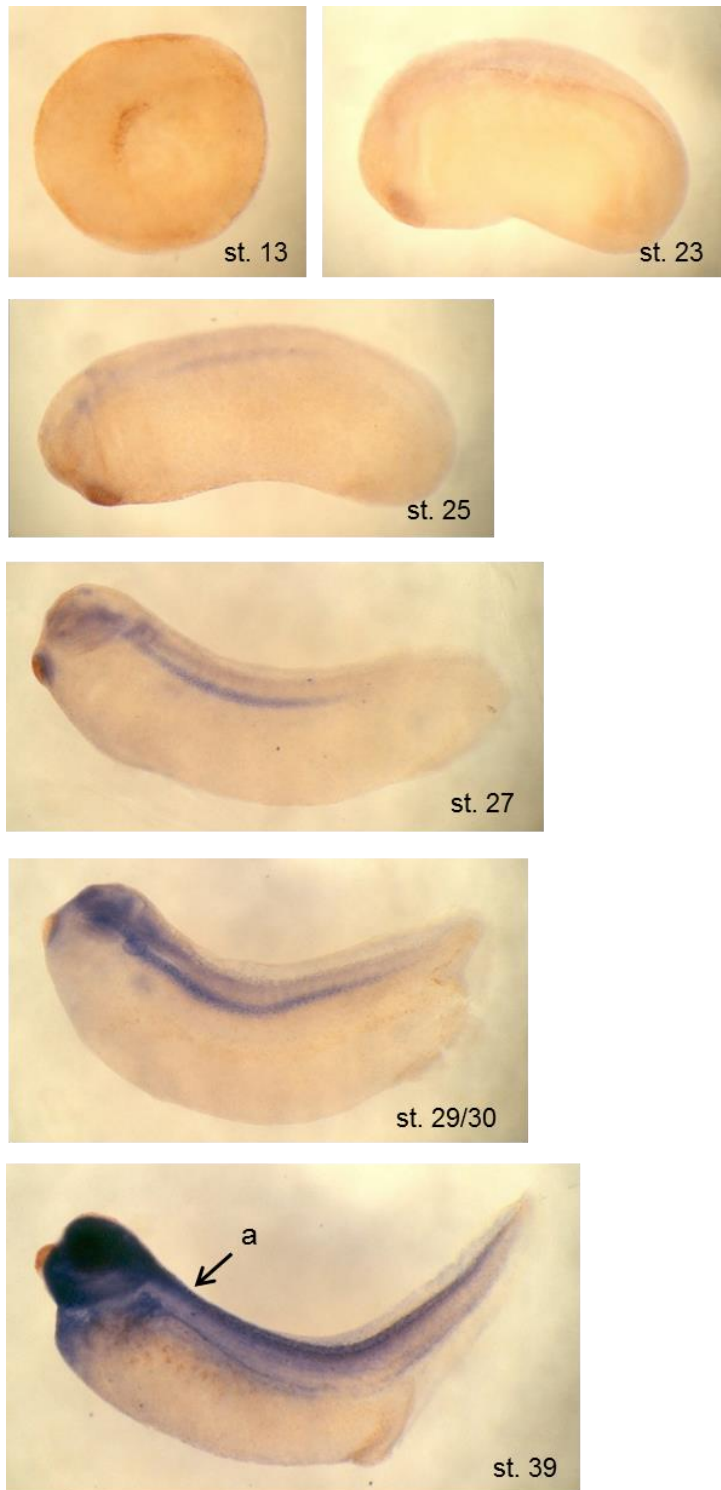


Figure 2-11. *X. laevis* 初期胚における Prdm11 の空間的発現パターン
(a) 脊髄

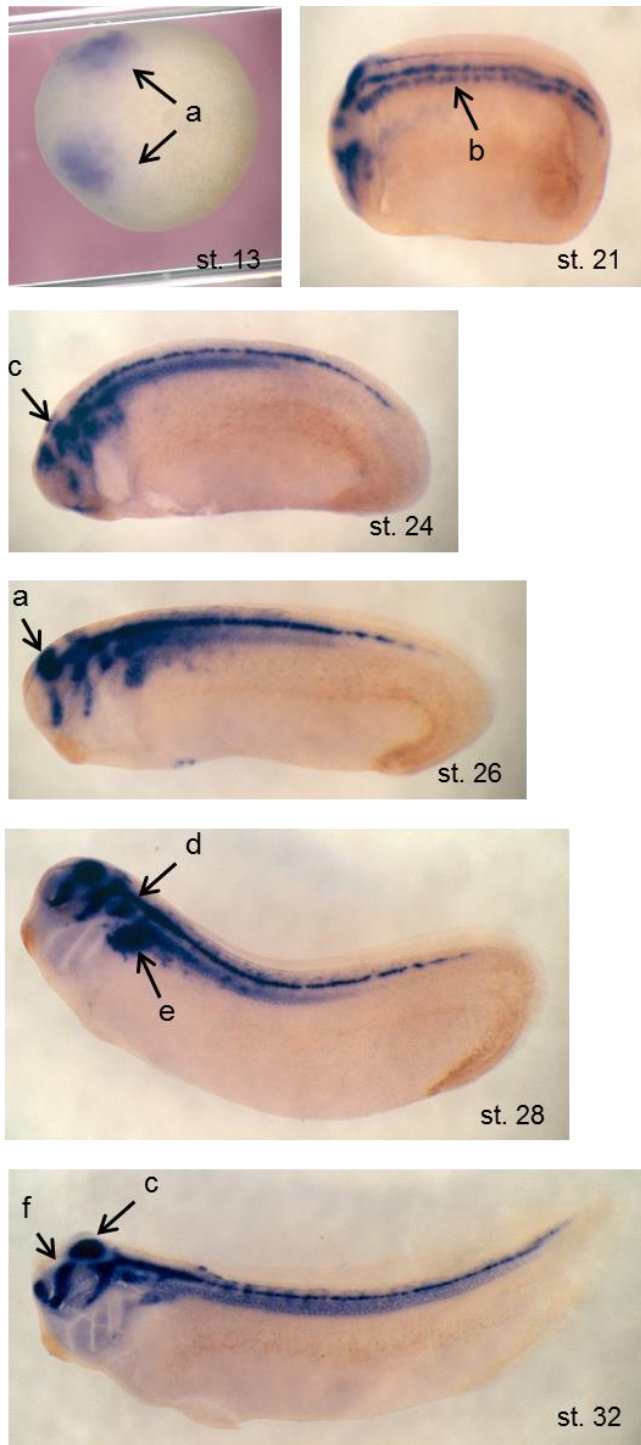


Figure 2-12. *X. laevis* 初期胚における Prdm12 の空間的発現パターン
 (a) 神経堤, (b) 脊髄, (c) 中脳, (d) 耳, (e) 前腎, (f) 前脳

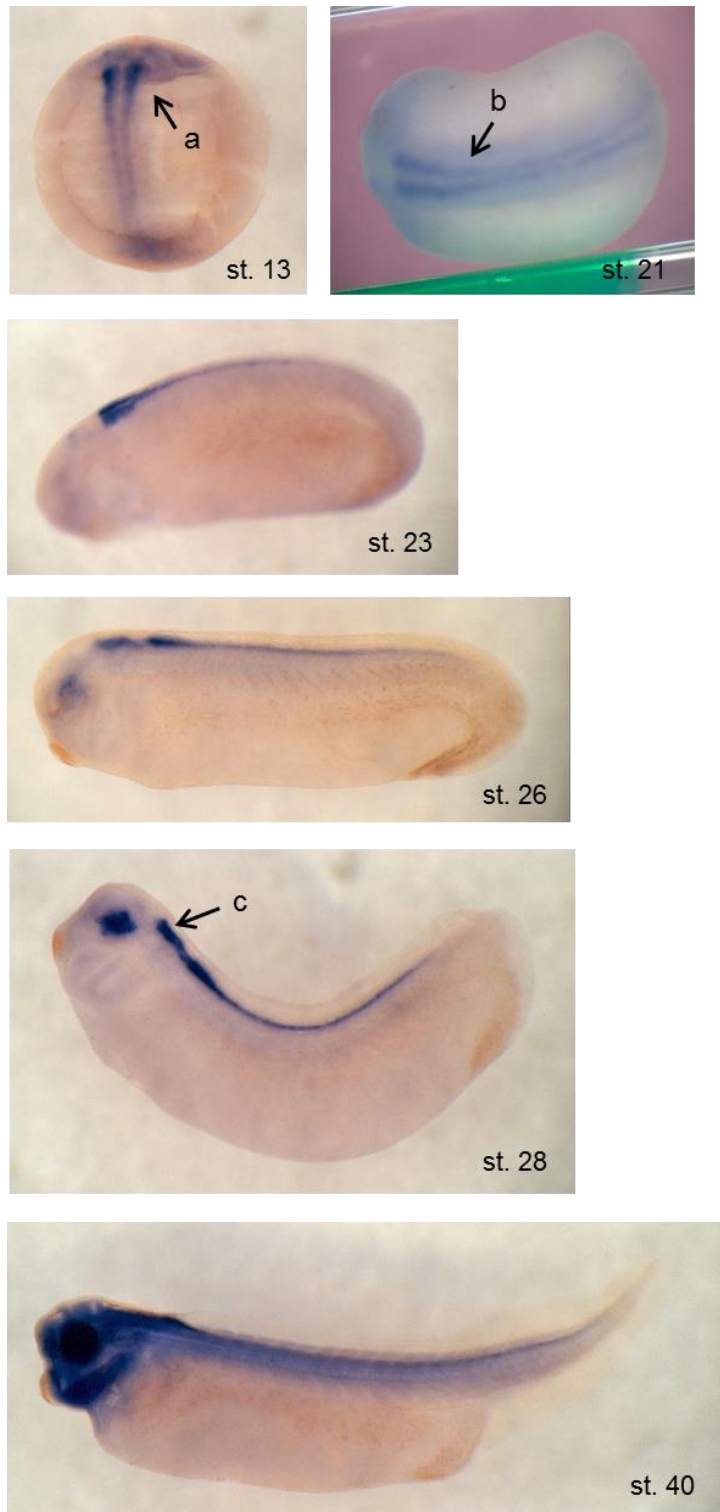


Figure 2-13. *X. laevis* 初期胚における Prdm13 の空間的発現パターン
 (a) 神経堤, (b) 脊髄, (c) 後脳

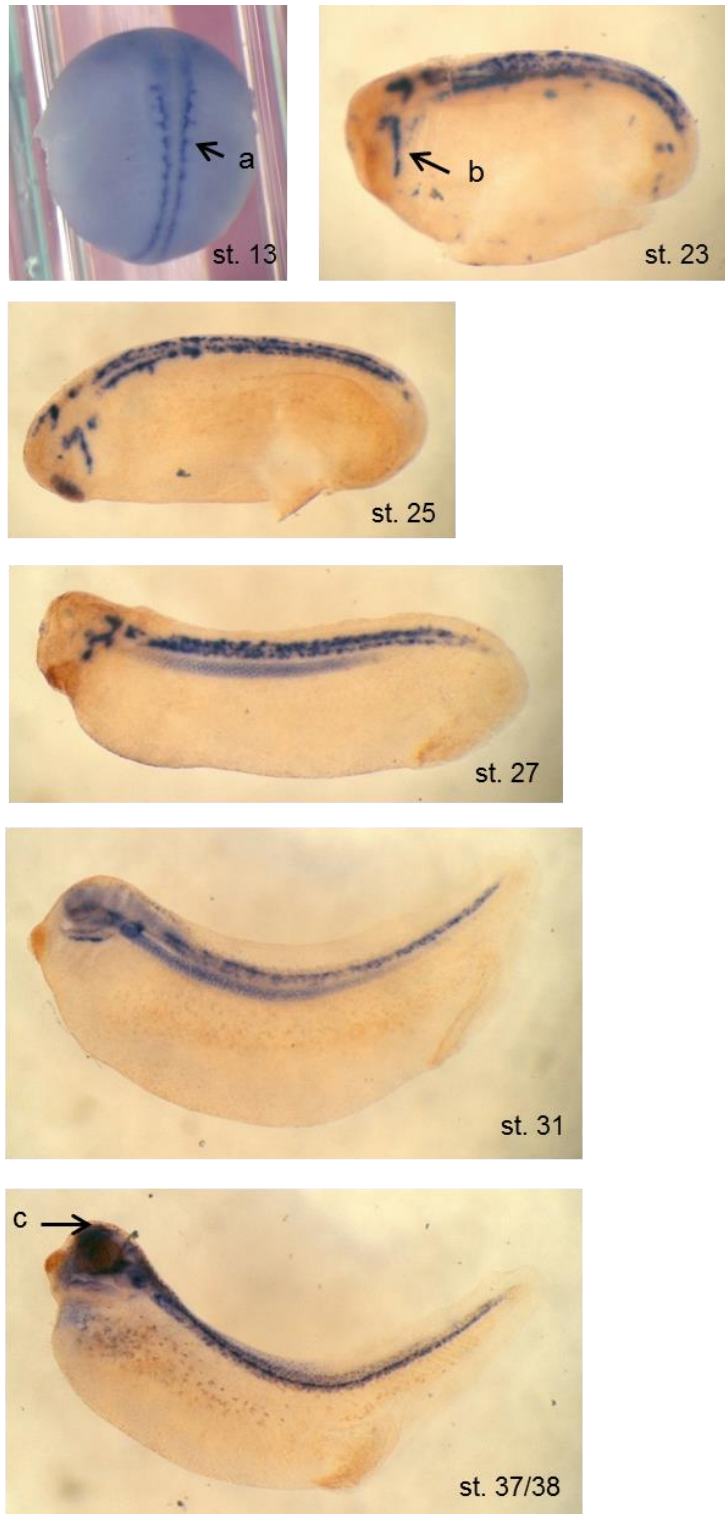


Figure 2-14. *X. laevis* 初期胚における Prdm14 の空間的発現パターン
 (a) 脊髄, (b) 咽頭嚢, (c) 終脳

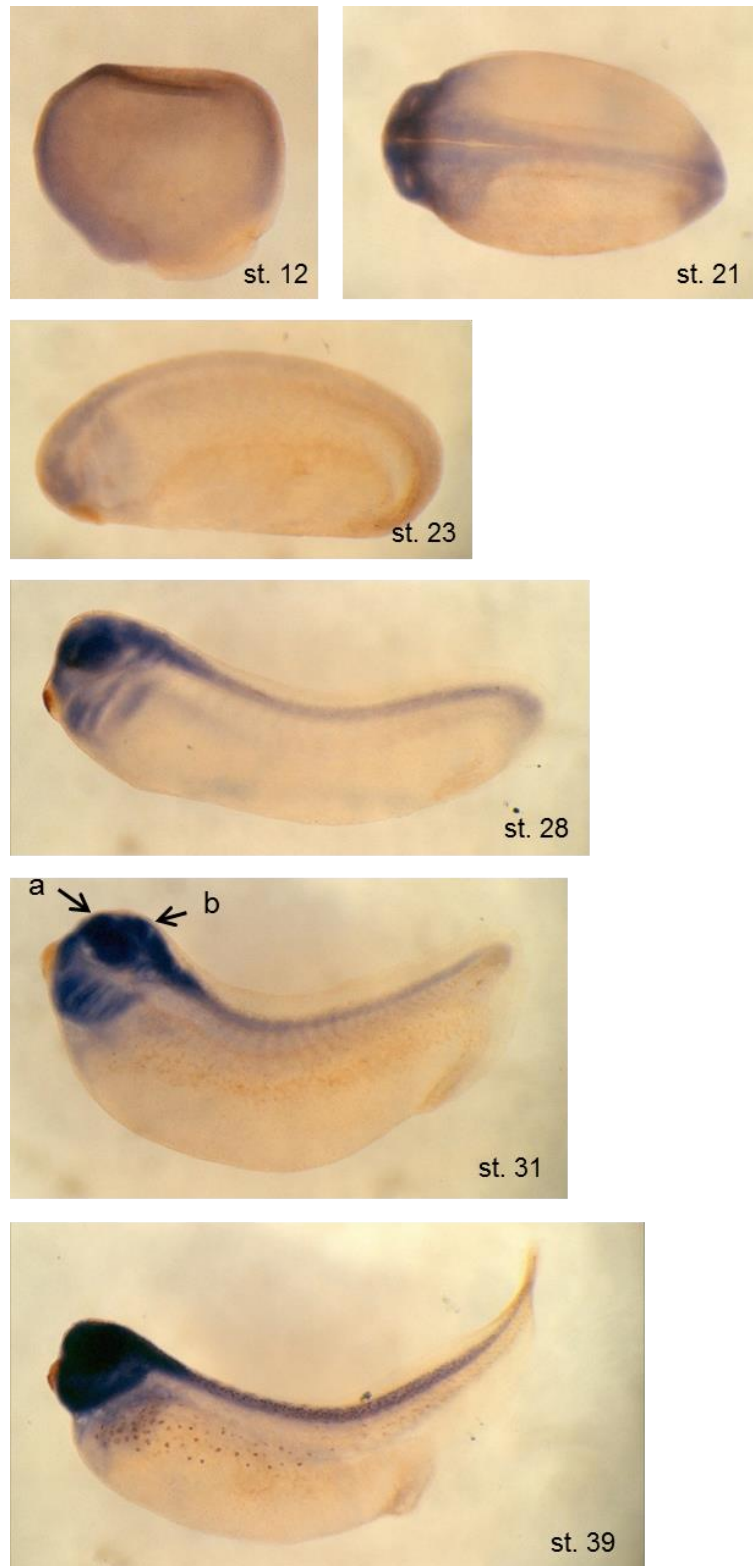


Figure 2-15. *X. laevis* 初期胚における Prdm15 の空間的発現パターン
 (a) 終脳, (b) 脳室

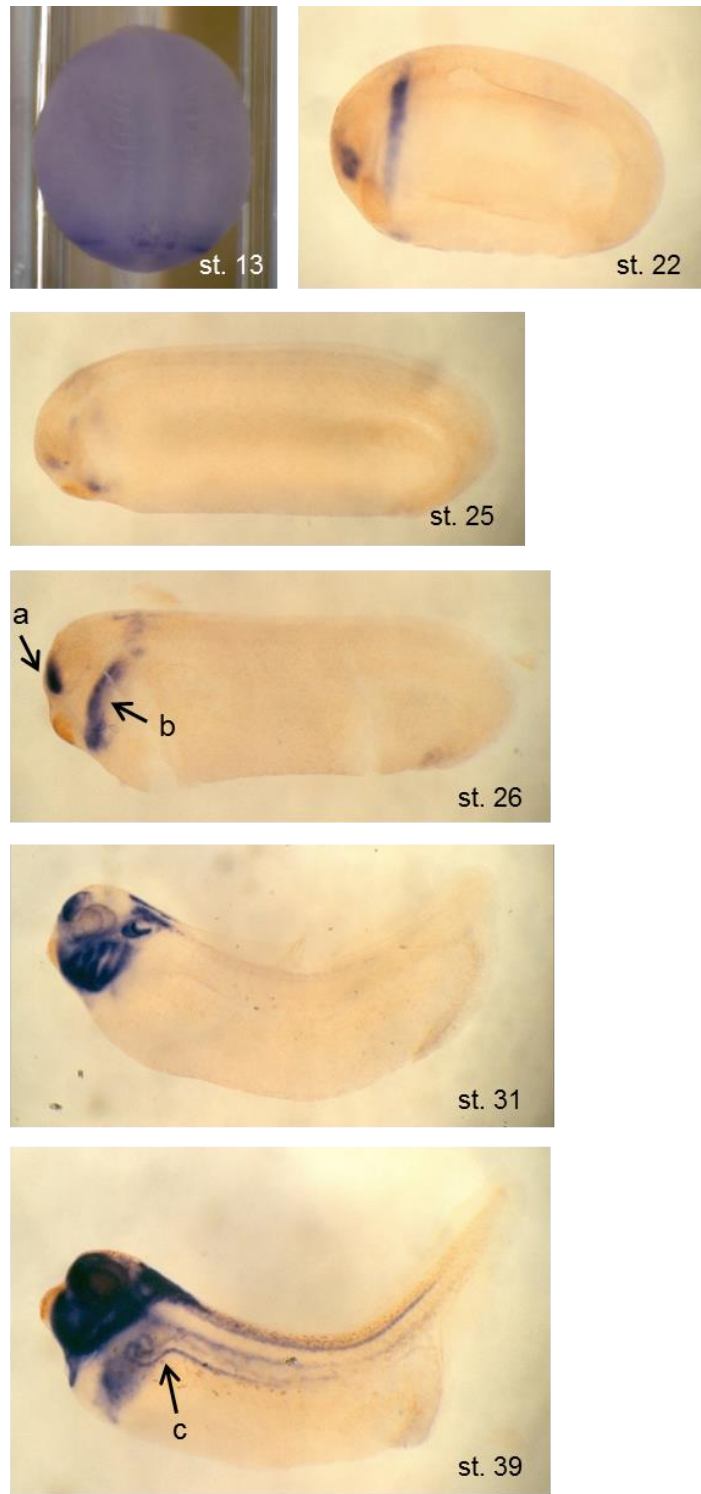


Figure 2-16. *X. laevis* 初期胚における Prdm16 の空間的発現パターン
 (a) 嗅板, (b) 咽頭嚢, (c) 腎臓

2-3-2. Prdm12 の機能解析

X. laevis 初期胚を用いた発現組織解析の結果、Prdm12 は発生初期から神経堤、脊髄、前脳、中脳、耳、鼻など主に神経領域で発現していることが明らかとなった (Figure 2-12)。これらの結果から、Prdm12 は *X. laevis* 初期胚の神経発生に重要な因子であることが示唆された。そこで、MO および mRNA を用いて初期胚における Prdm12 の機能解析を試みた。Prdm12 MO は、キャップ構造から開始コドンの約 25 塩基下流を標的配列とし、翻訳複合体の結合を阻害することでノックダウンによる機能阻害を試みた。

はじめに、2 細胞期の両割球に 0.9mM の MO を 9.2nL ずつインジェクションし、Stage 42 まで培養した後、ノックダウンによる影響を観察した。その結果、Prdm12 MO をインジェクションした胚では、コントロールと比較して目や軸の形成不全といった奇形が多く観られた (Figure 2-17)。この奇形が Prdm12 MO の影響によるものかを確かめるため、Prdm12 MO と Prdm12 mRNA を同時にインジェクションしてレスキュー実験を試みたが、奇形の改善には至らなかった (データ未記載)。以上の結果より、Prdm12 は *X. laevis* 初期胚の神経発生に関与する可能性が示された。その詳細な機能については今後さらに検証する必要がある。

control MO

Prdm12 MO

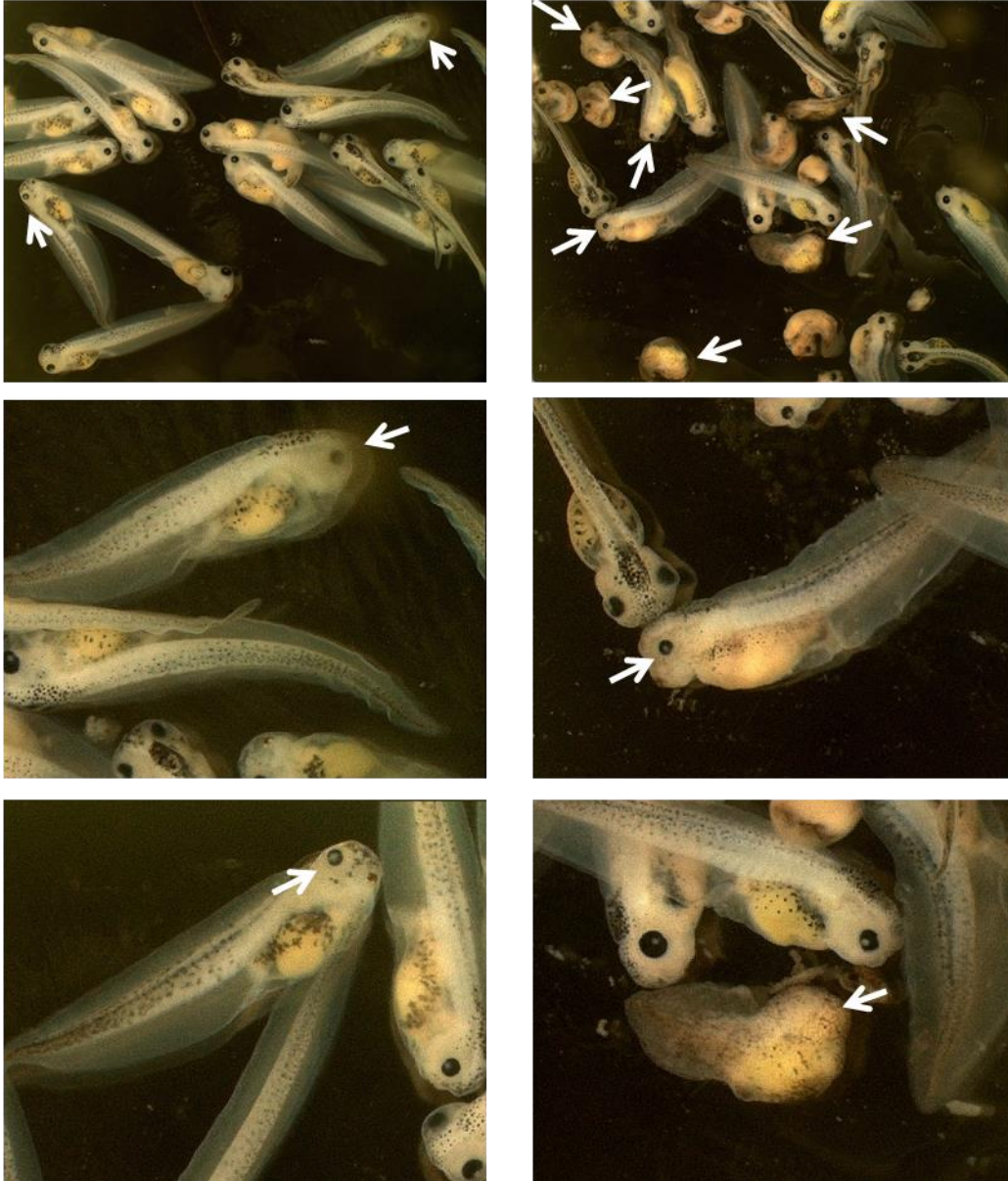


Figure 2-17. Prdm12 MO インジェクションによる初期胚への影響
図中の矢印は、目や軸の形成不全を呈した胚を示す。

2-3-3. Prdm13 のクローニングおよび機能解析

(1) *X. laevis* Prdm13 のクローニング

X. laevis の Prdm13 は同定されていないため、機能解析を行うにあたってまずクローニングを行った。はじめに、*X. laevis* 初期胚から抽出した mRNA 配列を鋳型として RACE 法によりクローニングを試みたが、PCR による増幅が認められなかったため、ゲノム DNA 配列を基に再度クローニングを試みた。

2-3-1 (2) の発現解析に用いた *X. laevis* Prdm13 配列をクエリーとして、ゲノムデータベース Xenopus Laevis Version 6.0 上で BLAST 検索を行った。その結果得られたゲノム配列の断片を 3 フレームでアミノ酸配列に変換し、*X. tropicalis* やマウスの Prdm13 アミノ酸配列と比較した。解析の結果、3 種の Prdm13 で共通するアミノ酸配列が検出され、その配列は第 2 エクソン～第 4 エクソンと予想された。*X. tropicalis* およびマウスの Prdm13 は 4 つのエクソンから構成されている。そこで、第 1 エクソン配列を決定するため、*X. tropicalis* とマウスで共通する第 1 エクソン配列の一部をクエリーとして、Xenla_6_0_Scaffolds (517838 sequences) 上で BLAST 検索を行った。その結果、Scaffold 44034 (1268 塩基) および Scaffold 32494 (1270008 塩基) のゲノム配列の断片が得られた。それぞれの配列を 3 フレームでアミノ酸配列に翻訳し、それらのアミノ酸配列中に第 1 エクソンおよびメチオニンをコードする ATG 配列を見出した。この ATG 配列上流と他 2 つの読み枠でも終止コドンが存在し、その手前にも ATG 配列がなかったため、この ATG 配列を *X. laevis* Prdm13 の開始コドンと判断した。

次に、ゲノム配列を基に設計した Table 2-4 に示すプライマーを用いて *X. laevis* の Prdm13 全長のクローニングを試みたところ、塩基配列および配列の

長さが異なる 2 つのクローンが得られた (Figure 2-18, 19)。本研究においては、この 2 つのクローンをそれぞれ Prdm13a および Prdm13b とした。Prdm13a のアミノ酸配列は、ヒト Prdm13 に 56%、マウス Prdm13 に 54%、*X. tropicalis* Prdm13 に 93% の相同性を持ち、一方、Prdm13b アミノ酸配列は、ヒト Prdm13 に 54%、マウス Prdm13 に 53%、*X. tropicalis* Prdm13 に 90% の相同性を持つことが明らかとなった。また、Prdm13a と Prdm13b は 91% の相同性を持つことがわかった。

Table 2-4. Prdm13 クローニングに用いたプライマー配列

Primer name	Nucleotide sequences (5' - 3')
s44034	F: GCAAAGCAGCGTCACTGTG F1: GCGCTGGCTTTAGCAAACG F2: GCTACCCTAGAACAAGTCG F3: CTGCCACAGAATGGATGGG
Genome	R1: GCTACCCTAGAACAAGTCG R2: CCCATCCATTCTGTGGCAG R3: GGAGTACCATACAGTGAGT R4: GCCTGTATAGTGCCGGTTA R5: GGTAATCATCTGTCCCACA
F, forward primer; R, reverse primer	

Prdm13a	1	ATGCATTGCAACAGGGCTCTGGCTGTCAGCACTCTGCGCCGA	CAACTGCAT	50
Prdm13b	1	ATGCATTGCAACAGGGCTCTGGCTGTCAGCACTCTGCGCCGA	CAACTGCAT	50
Prdm13a	51	CCCAGCCGGACTGCGACTTGGACCCATCATTGGCATCTTCAAAC	TGGGGA	100
Prdm13b	51	CCCAGCCGGTCTGCGACTTGGTCCCATTATTGGCATCTTCAAAC	TGGGGA	100
Prdm13a	101	AAGTATTGACAGATCGCAGGGAACCTGGACCCAAGAAAAAGGTGCGTTTT		150
Prdm13b	101	AATACTTGTCTGATCGCAGGGAACCTGGACCCAAGAAAAAGGTGCGTTTT		150
Prdm13a	151	ATGAGAGGGGAGCTGCTGGATGAGTCTGGGGTCCCGCCACAGAATGGAT		200
Prdm13b	151	GTGAGAGGGGAGCTGCTGGATGAGTCTGGGGTCCCGCCACAGAATGGAT		200
Prdm13a	201	GGGCTTAAATTCGTGCAGCCAGAAAATCATGAACAGAATCTAGAAGCTA		250
Prdm13b	201	GGGCTTAAATTCGTGCAGCCAGAAAATCATGAACAGAATCTAGAAGCTA		250
Prdm13a	251	TATCTGATTTACCAGGAGGCCAGATATATTACAGGACTCTCAGGGATSTG		300
Prdm13b	251	TATCTGATTTACCAGGAGGCCAGATATATTACAGGACTCTCAGGGATSTG		300
Prdm13a	301	CAGCCAGGAGGAAGAACTCACTGTTGGTACTCCAGTCCCTAGCGCACTG		350
Prdm13b	301	CAGCCAGGGGAAGAACTCACTGTTGGTACTCCAGTCCCTAGCGCACTG		350
Prdm13a	351	GTTGACATCTCTACTACGCCACTCCGACCATGATGAAAAAGGAGAGG		400
Prdm13b	351	GTTGACATCTCTACTACGCCACTCCGACCATGATGAAAAAGGAGAGG		400
Prdm13a	401	AGCGCTACATCTGCTGGTATGCTGGAGAACATTTAAATCCCTAACACC		450
Prdm13b	401	AGCGCTACATCTGCTGGTATGCTGGAGAACATTTAAATCCCTAACACC		450
Prdm13a	451	CTAAAAGCCACGTTCTTTTCACTGCGCCCTTAAACAACAGCAGGGGTT		500
Prdm13b	451	CTAAAAGCCACGTTCTTTTCACTGCACCCTTAAACAACAGCAGGGGTT		500
Prdm13a	501	CTGCATAACGATCAGGTTAGAAGCTCTGAATCCTTTTCCGCATCAACCCA		550
Prdm13b	501	CTGCATAACGATCAGGTTAGAAGCTCTGAATCCTTTTCTGCCTCCCCA		550
Prdm13a	551	AAATCTCAGAAGGAGTGTCCAAACACGGCTCCCCCTATGAGGACCAACCCC		600
Prdm13b	551	AAATCTCAGAAGGAGTGTCCAAATCCGGCTCCCCCTCTCAGGACCAACCCC		600
Prdm13a	601	CAACTGGCCAACGGGTAAACAGGGACGCTATTAAAAGGGAGGCCTCTTT		650
Prdm13b	601	CACTGGCCAACGGGTAAACAGGGACGCTATTAAAAGGGAGGCCTCTTT		650
Prdm13a	651	ATCTCCAGTACTGAGCAAGCTGGGGTGATCAAGAAAGCTTTGGGCAAAG		700
Prdm13b	651	ATCTCCAGTACTGAGCAAGCTGGGGTGATCAAGAAAGCTTTGGGCAAAG		700
Prdm13a	701	AACAACAGGACAGAGCCTTGGATATGAGTGTGGGATCTACAAGAAACCAC		750
Prdm13b	701	GACAACAGGACAGAGCCTTGGATATGAGTGTGGGATCTACAAGAAACCAC		750
Prdm13a	751	AGCCAGTTTATTGGCATAGTGGGCAATGCAATGTGGAGGGAATGGCATGGC		800
Prdm13b	751	AGCCAGTTT-----ATTGCAATGTGGAGGGAATGGCATGAC		785
Prdm13a	801	ATTTTATCCAGGAATCAGGTCTGCTTTTAAACCAACTGGACTATCCAAAT		850
Prdm13b	786	ATTTTATCCAGGAATCAGGTCTGCTTTTAAACCAAGCTGGACTATCCAAAT		835
Prdm13a	851	TACCCCATACCGATTCAGTCAGAGAAAGATTCAAAGGCCACCAGCATAGGA		900
Prdm13b	836	TACCCCATACTGATTCAGTCAGAGAGGACTCAAAGGCCACCAGTATGGGA		885
Prdm13a	901	FTCAGCAAACATAATGGGGGTATCAAGCCTAGCCGCACAGGGAATGAATC		950
Prdm13b	886	FTCAGCAAACATAATGGGGGCTATCAAGCCTAGCCGCACAGGGAATGAATG		935

Figure 2-18. Prdm13a および Prdm13b のエクソン配列

青線は、両者の発現量の割合を調べるために用いた領域である (x13sca_1)。

```

Prdm13a 951 TCTGATCAGTAGCCACCAATCCAAATGTCTGTCTGGGAGATGGCTCCT 1000
Prdm13b 936 TCTGATCAGTAGCCACCAATCCAAATGTCTGTCTGGGAG---SCTCCT 982

Prdm13a 1001 CAGCATCTTGTCATGTGCCACTGGGATAAGGAGTTTCCCTATCTTATCC 1050
Prdm13b 983 CAGCATCTTGTCATGTGCCACTGGGATAAGGAGTTTCCCTAGCTCTATCC 1032

Prdm13a 1051 CATTGGAGGAAACATCAGCCTTCAAACATGTAGAAAGGGGTCCATGC 1100
Prdm13b 1033 CATTGGAGGAAACATCAGCCTTCAAACATGTAGAAAGGGGTCCATGC 1082

Prdm13a 1101 CAGCCTCTCCCCACCAGTCTCTACAGCCATATGCCTTCAGCAGGACATC 1150
Prdm13b 1083 CAGC-----SCTACATCATATGCCTTCAGCAGGACATC 1117

Prdm13a 1151 ACTTTGAGAGGTTCTCCATTCCTCATTGGAAGGCATCAAGTCATACTCC 1200
Prdm13b 1118 ACTTTGAGAGGTTCTCCATTCCTCATTGGAAGGCATCAAGTCATACTCA 1167

Prdm13a 1201 TCAGAATGTAATATCCCAGTCATGCCCTTCACTGTGTACAAAGGGAAGT 1250
Prdm13b 1168 TCAGAATGTAATATCCCAGTCATGCCCTTCACTGTGTACAAAGGGAAGT 1217

Prdm13a 1251 TCTTTACAGCACTCCATACATCCCTTCAAATTTCAATTCAGCAACCTCA 1300
Prdm13b 1218 TCTTTACAGCACTCCATACATCCCTTCAAATTTCAATTCAGCAACCTCA 1267

Prdm13a 1301 TTAAGTACCCTGAGTCAGTATCTTATTTAAATGCTGGGCCAGCTATTAAC 1350
Prdm13b 1268 TTAAGTACCCTGAGTCAGTATCTTATTTAAATGCTGGGCCAGCTATTAAC 1317

Prdm13a 1351 CCAGAGTTGGGCTCCATTGCCCTCAGCATAGACCGTGAGCTTGCCATGCA 1400
Prdm13b 1318 CCAGAGTTGGGCTCCATTGCCCTCAGCATAGACCGTGAGCTTGCCATGCA 1367

Prdm13a 1401 CAGCCATCAGCTTCTGAGATAGCAAGTGAGAAGGGCAGAGGGGCAGGA 1450
Prdm13b 1368 CAGCCATCAGCTTCTGAGATAGCAAGTGAGAAGGGCAGAGGGGCAGGA 1417

Prdm13a 1451 TAGAGAGTCTTGCAGGAGGGGCAGCACCTGGTACAAGCAAACCCAAGAAA 1500
Prdm13b 1418 TAGAGAGTCTTGCAGGAGGGGCAGCACCTGGTACAAGCAAACCCAAGAAA 1467

Prdm13a 1501 GGGCACCTTTGCCTTTACTGTGGCAAGTTTACTCTAGGAAATATGGCTT 1550
Prdm13b 1468 GGGCACCTTTGCCTTTACTGTGGCAAGTTTACTCTAGGAAATATGGCTT 1517

Prdm13a 1551 GAAAATCCACATGAGGACTCACACTGGCTACAAGCCTCTTAAATGTAAAG 1600
Prdm13b 1518 GAAAATCCACATGAGGACTCACACTGGCTACAAGCCTCTTAAATGTAAAG 1567

Prdm13a 1601 TTTGCCCTGAGGCCATTTGGGGACCAAGCAATCTCAACAAGCACATTCCG 1650
Prdm13b 1568 TTTGCCCTGAGGCCATTTGGGGACCAAGCAATCTCAACAAGCACATTCCG 1617

Prdm13a 1651 TTGCATGCAGAGGGCAACACTCCCTACCGCTGTGAGCACTGTGGCAAGGT 1700
Prdm13b 1618 TTGCATGCAGAGGGCAACACTCCCTACCGCTGTGAGCACTGTGGCAAGGT 1667

Prdm13a 1701 ATTGGTGCAGCGGCSAGATTTGGAGAGGCATGTGAAATCTTAGGCACCCCG 1750
Prdm13b 1668 ATTGGTGCAGCGGCSAGATTTGGAGAGGCATGTGAAATCTTAGGCACCCCG 1717

Prdm13a 1751 GCCAGACCATCAGCAGCAAGGAACAGGAGCAGCCGAGCCACCTTATTC 1800
Prdm13b 1718 GCCAGACCATCAGCAGCAAGGAACAGGAGCAGCCGAGCCACCTTATTC 1767

Prdm13a 1801 CAGGCAGATCCCAAGAGTGAAGCAATGACAGTGAAGTGGATGTGTGTT 1850
Prdm13b 1768 CAGGCAGATCCCAAGAGTGAAGCAATGACAGTGAAGTGGATGTGTGTT 1817

Prdm13a 1851 CACTGATGAACAAAGTGACCAGGAACTGGAAGCAGCAAGGAACCCATA 1899
Prdm13b 1818 CACTGATGAACAAAGTGACCAGGAACTGGAAGCAGCAAGGAACCCATA 1866

```

Figure 2-18. Prdm13a および Prdm13b のエクソン配列 (続き)

赤線は、両者の発現量の割合を調べるために用いた領域である (x13sca_2)。

Human	1	-----MH	2
Mouse	1	MPAHVTPRTE ^D ARRGAGPSSACGCSWF ^C HLRPV ^E EDPASPSVCLAAVAT ^M H	50
<i>tropicalis</i>	1	-----M	1
Prdm13a	1	-----M	1
Prdm13b	1	-----M	1
Human	3	GAARAPATSVSADCCIPAGLRLGPPVPGI ^F FKLGKYLSDRREP ^G PKKKV ^R MV	52
Mouse	51	GTSRTSATSVNADCCIPAGLRLGPPVPGI ^F FKLGKYLSDRREP ^G PKKKV ^R MV	100
<i>tropicalis</i>	2	HCNRALAVSIYADNCIPAGLRLGPII ^G IFKLGKYLSDRREP ^G PKKKV ^R FV	51
Prdm13a	2	HCNRALAVSIYADNCIPAGLRLGPII ^G IFKLGKYLSDRREP ^G PKKKV ^R FM	51
Prdm13b	2	HCNRALAVTI ^C AENCIPAGLRLGPII ^G IFKLGKYLSDRREP ^G PKKKV ^R FV	51
Human	53	RGELVDES ^G SGSPLEWIGLIRAARNSQEQTLEA ^I ADLPGGQIF ^Y RALRDVQ	102
Mouse	101	RGELVDES ^G SGSPLEWIGLIRAARNSQEQTLEA ^I ADLPGGQIF ^Y RALRDVQ	150
<i>tropicalis</i>	52	RG ^D LLDEAGGPATEW ^M GLIRAARNNQEQLLEA ^I SDLPGGQI ^Y YRTL ^R LDVQ	101
Prdm13a	52	RG ^E LLDES ^G SGPATEW ^M GLIRAARNN ^H EQNLEA ^I SDLPGGQI ^Y YRTL ^R LDVQ	101
Prdm13b	52	RG ^E LLDES ^G SGPATEW ^M GLV ^R AARNN ^H EQNLEA ^I SDLPGGQI ^Y YRTL ^R LDVQ	101
Human	103	PGEELTVWYSSNSLAQWF ^D IPTTATPTHDEKGEERYICWYCWRT ^F FRYPNSL	152
Mouse	151	PGEELTVWYSSNSLAQWF ^D IPTTATPTHDEKGEERYICWYCWRT ^F FRYPNSL	200
<i>tropicalis</i>	102	PGEELTVWYSSSLAQWF ^D I ^S TATPTHDEKGEERYICWYCWRT ^F KFPNTL	151
Prdm13a	102	PGEELTVWYSSSLAQW ^D I ^S TATPTHDEKGEERYICWYCWRT ^F KFPNTL	151
Prdm13b	102	PGEELTVWYSSSLA ^H WF ^D I ^S TATPTHDEKGEERYICWYCWRT ^F KFPNTL	151
Human	153	KAHLRFH ^C VFSGGGGAF ^L HEHAARQGA ^V PAA ^D GLGLSPK ^P PAPDFAAP	202
Mouse	201	KAHLRFH ^C VLSGGGGR ^A FL ^E QEAARPGAS ^P V ^A GLGLSPK ^P PTVPDLTAP	250
<i>tropicalis</i>	152	KAHV ^R FH ^C SLNS ^R G--FL ^H NDQ-----IR ^T S ^S S ^F S ^A SPK--I ^S E-G ^V S	190
Prdm13a	152	KAHV ^R FH ^C ALNS ^R G--FL ^H NDQ-----VR ^S S ^E S ^F S ^A SPK--I ^S E-G ^V S	190
Prdm13b	152	KAHV ^R FH ^C TLNS ^R G--F ^L HNDQ-----LR ^S S ^E S ^F S ^A SPK--I ^S E-G ^V S	190
Human	203	SQAGTLR ^P PLGPPP ^V QACGAREG ^I KREAS ^A PSATSPT ^P GK ^W GQPK ^K GK	252
Mouse	251	VQAIALR ^P QAPAAQLA ^Q ACGARE ^S IKREAS ^L APLATSPPP ^G K ^W TGTP ^K GK	300
<i>tropicalis</i>	191	NTAPPLRTN ^P ---QLANG-AS ^R DSIKREAS ^L SPVLS ^K LGVIK--KAL ^G K	233
Prdm13a	191	NTAPPLRTN ^P ---QLANG-LNRDAIKREAS ^L SPVLS ^K LGVIK--KAL ^G K	233
Prdm13b	191	NPAPPLRTN ^P ---HLANG-LNRDAV ^K REAS ^L SPVLS ^K LGVIK--KAL ^G K	233
Human	253	EQLDRALDMS--S ^A AR ^G QGH ^F L ^G IVGSSA ^E VSSLA ^F YPGV ^R SAFK ^P PAGL ^A	301
Mouse	301	EQPDRA-----HS ^Q FL ^G IVGSSGGSS ^L EFYPGV ^R SAFK ^P PAGL ^A	340
<i>tropicalis</i>	234	EH ^Q ERALDMSVGSTRN ^H SQ ^F IGIVGNACGGNG-MA ^F YPGI ^R SAFK ^P TGL ^S	282
Prdm13a	234	EQQDRALDMSVGSTRN ^H SQ ^F IGIVGSACGGNG-MA ^F YPGI ^R SAFK ^P TGL ^S	282
Prdm13b	234	GQQDRALDMSVGSTRN ^H SQ ^F I----ACGGNG-M ^T FYPGI ^R SAFK ^P PAGL ^S	277
Human	302	RAAAAA ^H S ^D PY ^R E ^E SSK ^Q GAGLALGRLLGG ^R ACGR ^P GS ^E NSAAGGAG	351
Mouse	341	RAAA--Q ^S D ^P Y ^R E ^E GGGK-GPGLALGRLLGG ^R ACGR ^P GS ^E -SPAGHHH	386
<i>tropicalis</i>	283	KLP--HT ^D S ^V RE ^D SKAT--SM ^G F ^S KLLGGI ^K P-SR ^P GS ^E ALISS ^H Q ^S K	325
Prdm13a	283	KLP--HT ^D S ^V RE ^D SKAT--SI ^G F ^S KLLGGI ^K P-SR ^T G ^N ESLISS ^H Q ^S K	325
Prdm13b	278	KLP--NT ^D S ^V RE ^D SKAT--SM ^G F ^S KLLGGI ^K P-SR ^T G ^N EVLISS ^H Q ^P K	320

Figure 2-19. ヒト、マウス、*X. tropicalis*, *X. laevis* の Prdm13 アミノ酸配列の比較

Human	352	HHHHHAAHHHHHPKCLLAGDPPPPPPGLPCSGALRGFPLLSVPPEEASA	401
Mouse	387	HHHHAHHHHHHHPKCLLAGEPPPA---GLPCGALRAFPLLAGHPPEEASA	433
tropicalis	326	CLSTEDGSSSILSCATGLRSGFPILLSHLEETSAFKHVERGVHANLSPTSTRY	375
Prdm13a	326	CLSGGDGSSSILSCATGLRSGFPILLSHLEETSAFKHVERGVHASLSPTSTRY	375
Prdm13b	321	CVSSG-GSSSILSCATGLRSGFPVLSHLEETSAFKHVERGVHA-----SRY	364
Human	402	FKHVERAPPAAAA--LFGARYAQLPPAPGLPLERCALPPLDPGGLKAYPG	449
Mouse	434	FKHVERAPPAAATTSLEFSARYAALP-APGLPVERCALQPLDGGSLKAYPG	482
tropicalis	376	NHMPsAGLHFERFSIPPFEGMKSYSSECNIPVMPFTVYNGELLYSTPYYP	425
Prdm13a	376	SHMPsAGLHFERFSIPPFEGIKSYSSECNIPVMPFTVYNGELLYSTPYYP	425
Prdm13b	365	NHMPsAGLHFERFSIPPFEGIKSYSSECNIPVMPFTVYNGELLYSTPYYP	414
Human	450	G----ECSHLPVMPAFTVYNGELLYGSPATTAYYPLKHLHFGGLLKYPES	495
Mouse	483	GGGGGECsPLPAVMPAFTVYSGDLLYGPPA--AYYPLKHLHFGGLLKYPES	530
tropicalis	426	FKFHFSNLIKYPESVSYFNAGPAINPELGSIASSIDRELAMHSHQLSEIA	475
Prdm13a	426	FKFHFSNLIKYPESVSYFNAGPAINPELGSIASSIDRELAMHSHQLSEIA	475
Prdm13b	415	FKFHFSNLIKYPESVSYLNAGPAINPGLGSIASSIDRELAMHSHQLSEIA	464
Human	496	ISYFSGPAAAA-----LSPAELGSLASIDREIAMHNQQQLSEMA	533
Mouse	531	ISYLSGPAAAAAATAAAAAAAAAAIGPAELGSLASIDREIAMHTQQQLSEMA	580
tropicalis	476	SEKGRGGRIEELAAAGAAAT-----	495
Prdm13a	476	SEKGRAGRIEELAGGAAPGT-----	495
Prdm13b	465	SEKGRVGRIEELAGGAAPGN-----	484
Human	534	AGKGRRLDSGTLPPAVAAAAGGTGGGGSGGSGAGKPKTGHLCCLYCGKLYS	583
Mouse	581	AGKSRRALDSGTLPPAVVAATGPGGGGGGGGSAAGKPKTGHLCCLYCGKLYS	630
tropicalis	496	-----GKPKKGHLCLYCGKLYS	512
Prdm13a	496	-----GKPKKGHLCLYCGKLYS	512
Prdm13b	485	-----GKPKKGHLCLYCGKLYS	501
Human	584	RKYGLKIHMRHTGYKPLKCKVCLRPFGDPSNLNKHIRLHAEGNTPYRCE	633
Mouse	631	RKYGLKIHMRHTGYKPLKCKVCLRPFGDPSNLNKHIRLHAEGNTPYRCE	680
tropicalis	513	RKYGLKIHMRHTGYKPLKCKVCLRPFGDPSNLNKHIRLHAEGNTPYRCE	562
Prdm13a	513	RKYGLKIHMRHTGYKPLKCKVCLRPFGDPSNLNKHIRLHAEGNTPYRCE	562
Prdm13b	502	RKYGLKIHMRHTGYKPLKCKVCLRPFGDPSNLNKHIRLHAEGNTPYRCE	551
Human	634	FCGKVLVRRRDLEHVKSRHPGQSLAKAGDGPGEFEGTTPPEPGDPKSD	683
Mouse	681	FCGKVLVRRRDLEHVKSRHPGQSLMAKAGDGPGEFESYALEPGDPKSED	730
tropicalis	563	HCGKVLVRRRDLEHVKSRHPGQTLSSKEQD--PAEQQYSQADPKSEDND	610
Prdm13a	563	HCGKVLVRRRDLEHVKSRHPGQTLSSKEQE--QTEPBYSQADPRSEDND	610
Prdm13b	552	HCGKVLVRRRDLEHVKSRHPKTLSSKEQE--HAEPBYSQADPRSEDND	599
Human	684	SDVDVCFDDEQSDPEVGGGGERDL	707
Mouse	731	SDVDVCFDDEQSDPEAGGRGHD	754
tropicalis	611	SEVDVCFDDEQSDPETGSSKEQ--	632
Prdm13a	611	SEVDVCFDDEQSDPETGSSKEP--	632
Prdm13b	600	SEVDVCFDDEQSDPETGSSKEP--	621

Figure 2-19. ヒト、マウス、*X. tropicalis*, *X. laevis* の Prdm13 アミノ酸配列の比較 (続き)

(2) Prdm13a および Prdm13b の発現解析

X. laevis は偽四倍体の生物であるため、元々同じ遺伝子であったものが進化の過程で重複し、塩基配列だけでなく発現時期や発現パターンが変化することがある。Prdm13a および Prdm13b が実際に *X. laevis* 初期胚で発現しているのか調べるため、それぞれの特異的な配列をもとにプライマーを設計し、半定量 PCR によって解析を行った (Table 2-5)。その結果、Prdm13a は発生初期から発現しており、発生が進むにつれ次第に発現量が増加していた (Figure 2-20)。一方、Prdm13b は stage 16-17 あたりからわずかに発現し、Prdm13a と同様に発生が進行するにつれ発現量が増加していた。なお、PCR で増幅された断片が Prdm13a および Prdm13b であることはシーケンス解析で確認した。

Table 2-5. 半定量 PCR 用プライマー配列

Primer name	Nucleotide sequences (5' - 3')
Prdm13a	F: GCATAGTGGGCAGTGCAT
	R: TAGCGACTGGTGGGGGAG
Prdm13b	F: CACCCCTCTTTCTACGTGTT
	R: GCTTTTAAACCAGCTGGACT

F, forward primer; R, reverse primer

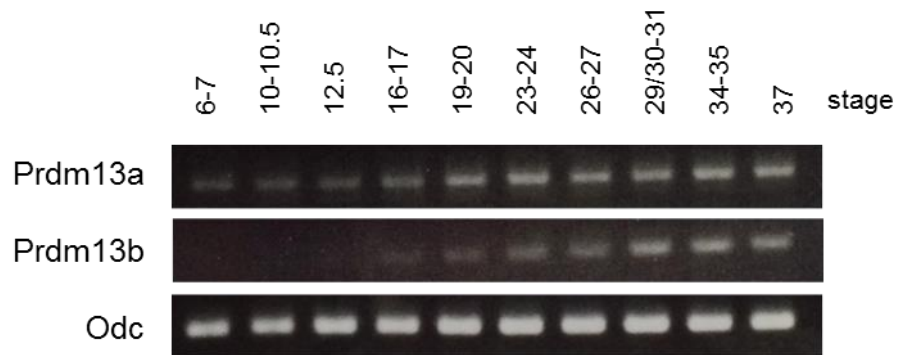


Figure 2-20. Prdm13a および Prdm13b の発現パターン

さらに、Prdm13a および Prdm13b の発現量の比を調べるため、両者の共通配列かつ増幅される断片の大きさに差が出るプライマーを2パターン設計し、半定量 PCR を行った (Figure 2-18, Table 2-6)。その結果、両者の発現量に大きな差はないことが明らかとなった (Figure 2-21)。なお、増幅された断片がゲノム DNA からの増幅でないことはシーケンス解析で確認した。

Table 2-6. Prdm13a および Prdm13b の発現量の比を調べるためのプライマー配列

Primer name	Nucleotide sequences (5' - 3')
x13sca_1	F: GATATGAGTGTGGGATCTA
	R: GGTAATTTGGATAGTCCAG
x13sca_2	F: CCATTTGGAGGAAACATCA
	R: CCTTCAAATGGAGGAATGG

F, forward primer; R, reverse primer

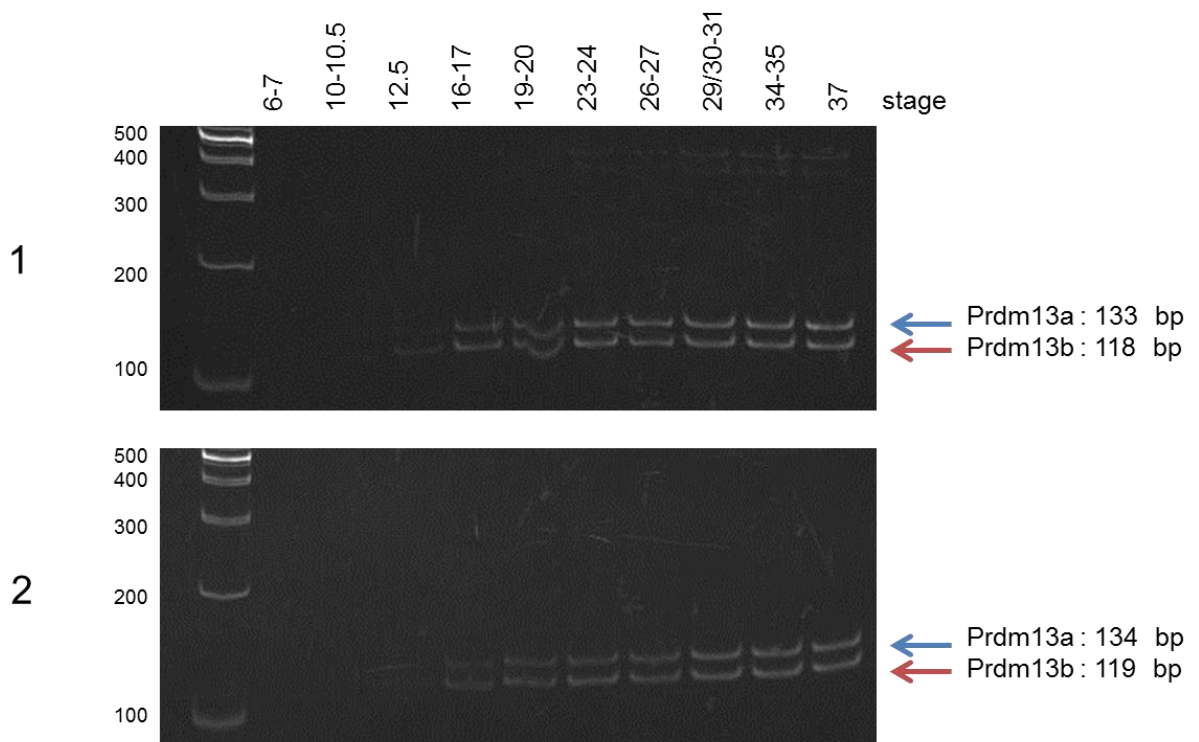


Figure 2-21. Prdm13a および Prdm13b の発現量の比

また、Table2-6 に示すプライマー x13sca1_F および x13sca2_R を用いて増幅した PCR 断片 (Prdm13a : 464 塩基, Prdm13b : 431 塩基) をクローニングし、WISH によって両者の空間的な発現パターンを比較した。WISH の結果、Prdm13a および Prdm13b ともに神経堤や脊髄、目、後脳で発現しており、両者の発現は部位、量ともに差は見られなかった (Figure 2-22)。

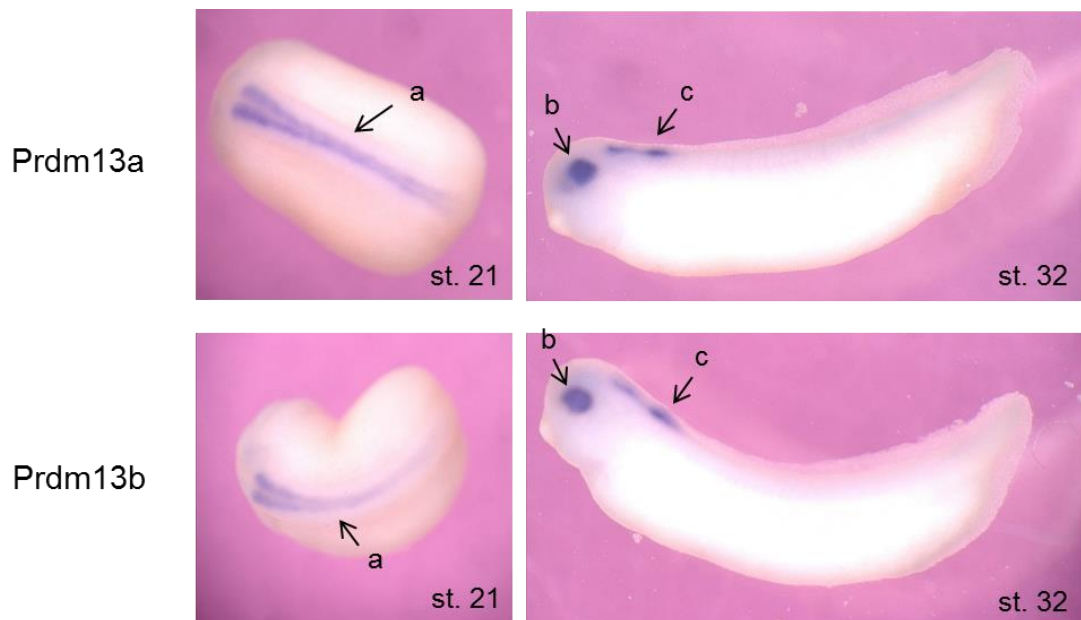


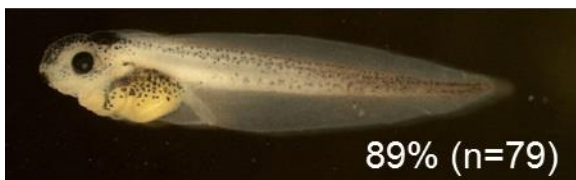
Figure 2-22. *X. laevis* 初期胚における Prdm13a および Prdm13b の空間的発現パターン
(a) 脊髄, (b) 目, (c) 後脳

(3) 機能解析

X. laevis 初期胚における発現解析の結果を受け、MO および mRNA を用いて初期胚における Prdm13 の機能解析を行った。Prdm13 MO は、第 2 エクソンと第 2 イントロンのスプライスジャンクションを標的とし、スプライシングを阻害することで機能解析を試みた。(Table 2-3)。本実験では Prdm13b について特異的な MO を設計し、Prdm13b について機能解析を行った。

まず、1 細胞期の胚に 0.5mM の Prdm13b MO を 9.2nL インジェクションし、Stage 42 まで培養後、ノックダウンによる影響を観察した。その結果、Prdm13b MO をインジェクションした胚では、コントロール胚と比較し、目や頭部全体および軸の形成不全が多く観察された (Figure 2-23)。また、観察した胚のうち 88% の胚がこのような奇形を呈した。この奇形が Prdm13b MO の影響によるものか調べるため、Prdm13b MO と Prdm13b mRNA を同時にインジェクションすることにより、レスキュー実験を行った。その結果、MO のみをインジェクションした胚と比較し、mRNA を同時にインジェクションした胚では、軸の形成不全が改善され、縮小傾向にあった頭部も通常の大きさほどまで改善されていた (Figure 2-24)。形態形成の異常は、mRNA のインジェクションにより、85% から 29% まで改善されていた。よって、頭部および軸の形成不全は Prdm13b MO によるものと考えられ、Prdm13b は頭部および軸の形成に重要な機能を持つことが示唆された。なお、Prdm13a については今後検証を行い、*X. laevis* 初期胚における機能を解析する必要がある。

control MO



Prdm13a MO

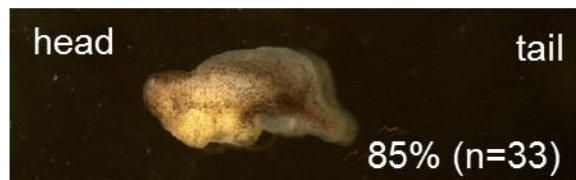


Figure 2-23. Prdm13b MO インジェクションによる初期胚への影響

Prdm13a MO

Prdm13a MO + Prdm13a mRNA

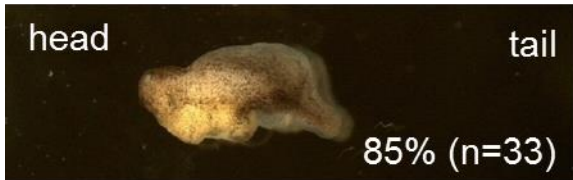


Figure 2-24. Prdm13b MO および Prdm13b mRNA 同時注入による初期胚への影響
図中の矢印は、Prdm13b mRNA 同時注入により奇形が改善されたものを示す。

2-4. 考察

2-4-1. *X. laevis* 初期発生における Prdm 遺伝子群の発現について

X. laevis 初期胚の発生過程における Prdm 遺伝子群の発現を半定量 PCR によって解析した結果、Prdm1, 2, 4, 9 は発生初期から発現が維持され、Prdm3, 11, 13, 16 は発生が進むにつれ発現量が増加した。さらに、Prdm1, 2, 4, 9, 11, 15 は stage 6-7 から発現していたことから、受精直後から発生に関わることが示唆された。

さらに、WISH 法を用い、*X. laevis* 初期胚の発生過程における Prdm 遺伝子の発現組織を解析したところ、Prdm 遺伝子は様々な発生ステージで組織特異的に発現しており、かつ、すべての Prdm 遺伝子が神経領域で発現することが明らかとなった。マウスでは Prdm6, 8, 12, 13 および 16 は胎児の中樞神経で時空間的に限定して発現することが報告されている (Kinameri et al. 2008)。Yang ら (2013) によれば、Prdm12 は P19 細胞の神経細胞分化過程において一過的に発現し、細胞増殖を抑制し、神経細胞分化を促進することが報告されている。また、Prdm13 は H3K9 および H3K27 のメチル化修飾を介し、マウスの興奮性ニューロンと抑制性ニューロンの分化のスイッチングにはたらくと考えられている (Chang et al. 2013)。その一方で、Prdm 遺伝子はマウスの神経領域とは異なる領域での発現が報告されている。例えば、Prdm9 はマウス胎児のメス生殖腺において減数分裂期に入った生殖細胞、出生後のオスの精巣で発現することが明らかとなっている (Hayashi et al. 2005)。Prdm11 は、マウス造血幹細胞の自己複製・維持・機能を制御する Prdm3 や Prdm16 と同様の発現パターンを示すが、2 つの遺伝子と比較し、造血前駆細胞の直接的な制御は行わない (Thoren et al. 2013)。Prdm15 は、ヒトのバーキット型

B 細胞リンパ腫で高く発現している (Giallourakis et al. 2013)。これらの報告から Prdm 遺伝子は神経領域以外にも様々な細胞分化において機能すると予想される。

2-4-2. *X. laevis* 初期発生における Prdm12 の機能について

WISH の結果より、Prdm12 が神経堤や脊髄、中脳など神経領域で発現しており、*X. laevis* 初期胚における神経発生への関与が示唆された。そこで、MO による Prdm12 のノックダウンを行い初期発生への影響を解析したところ、コントロールと比較し、目や軸の形成不全による奇形の胚が数多く観察された。その後行った Prdm12 mRNA を用いたレスキュー実験では奇形の改善は見られなかった。今後、組織形成への影響を調べるための指標となるマーカー遺伝子など、解析方法の検討を重ね、*X. laevis* 初期胚における Prdm12 の機能を明らかにする必要がある。

2-4-3. *X. laevis* 初期発生における Prdm13 の機能について

X. laevis Prdm13 のクローニングを行った結果、*X. laevis* Prdm13 は Prdm13a と Prdm13b、2つのホモログを持つことが明らかとなった。また、WISH の結果より、両タイプの Prdm13 は神経堤や脊髄、目、後脳といった神経領域で発現しており、*X. laevis* 初期胚における神経発生への関与が示唆された。そこで、Prdm13b のノックダウンを行い発生への影響を解析したところ、コントロールと比較し、目や軸の形成不全による奇形の胚が数多く観察された。そこで、Prdm13b mRNA を用いたレスキュー実験を行ったところ、軸の形成不全が改善され、頭部も通常の大きさほどまで改善されていた。よって、Prdm13b は *X. laevis* 初期胚の頭部および軸の形成に重要な機能を持つことが

示唆された。Prdm13a については今後検証を行うが、初期胚における発現組織解析の結果を踏まえると、Prdm13a も Prdm13b と同様の機能を持つことが予想される。

2-4-4. *Xenopus* における Prdm タンパク質のドメイン構造とその機能について

ヒトやマウスの Prdm タンパク質はすべて PR/SET ドメインを持っており、その機能も明らかになりつつある。そこで、Pfam データベースを用いて、ツメガエル Prdm タンパク質 15 種類についてドメイン構造解析を行い、これまでの報告と比較し機能の推測を試みた (Figure 2-25)。その結果、ツメガエル Prdm3, 6, 9, 10, 15 タンパク質には明確な PR/SET ドメインは認められなかった。PR/SET ドメインはメチル化活性を持つと考えられているが、Prdm10 や 15 ではメチル基転移酵素としての機能の報告が今のところない。よって、PR/SET ドメインが進化の過程で機能を失った可能性があり、ツメガエルでも同様の考察ができる。一方、メチル基転移酵素や他のヒストンタンパク質修飾因子と関連する Prdm3, 6, 9 (Pinheiro et al. 2012; Davis et al. 2006; Hayashi et al. 2005) は、ツメガエルにおいては、メチル基転移酵素とは異なる機能により神経領域の分化または維持に関与すると示唆された。また、Prdm3 は転写因子としてアクチベータプロテイン 1 ファミリーの 1 つ、FOS との相互作用により、細胞接着・増殖・コロニー形成といったがん末期のイベントに関与するとの報告もあり (Bard-Chapeau et al. 2012)、今回ツメガエルで明らかとなった遺伝子群は、メチル化活性というよりも、zinc finger ドメインを介し転写因子として機能する可能性も考えられる。

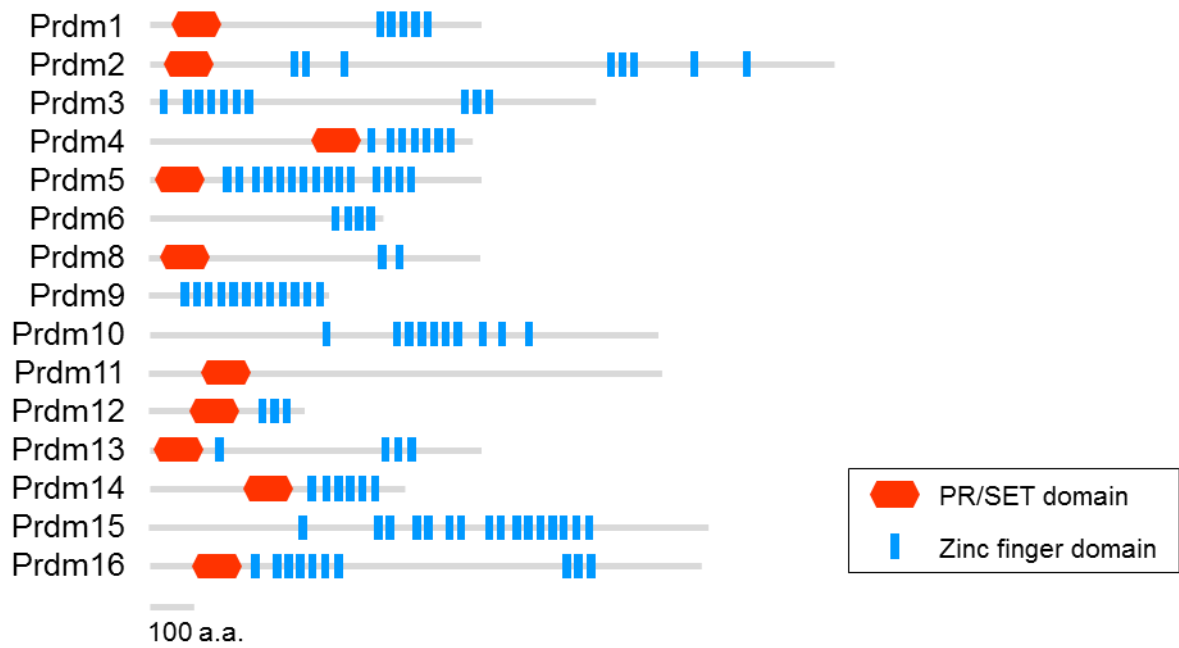


Figure 2-25. *X. laevis* Prdm1~16 のタンパク質のドメイン構造

第 3 章

マウスにおける Prdm 遺伝子群の発現と機能解析

3-1. 緒論

X. laevis 初期胚を用いた半定量 PCR および WISH による Prdm 遺伝子群の発現解析により、Prdm 遺伝子は組織特異的に発現することが明らかとなった。さらに、すべての Prdm 遺伝子が神経領域で発現していることから、神経細胞分化過程において重要な機能を担う可能性が示唆された。これまで、Prdm6, 8, 12, 13, 16 は、マウス胎児の神経組織における詳細な発現解析が行われ、これらの遺伝子がマウス胎児の中樞神経で時空間的に限定して発現すること (Kinameri et al. 2008) が報告されており、本論文の結果もこれに合致している。

そこで、第 3 章では、神経細胞分化のモデル細胞である P19 細胞を用いて、神経細胞分化過程における Prdm 遺伝子群の遺伝子発現と機能を解析した。P19 細胞は、RA 曝露により神経細胞へ、DMSO 曝露により心筋・骨格筋へ分化誘導可能な幹細胞である。また、培養細胞であるため、遺伝子導入などが容易であり、分子機構の解析に適した細胞である。

3-2. 材料および方法

3-2-1. 実験材料

マウス胚性腫瘍細胞株 P19

P19 細胞は C3H/He マウス精巣の腫瘍細胞から株化された (McBurney et al. 1982)。P19 細胞は、RA に曝露することによりニューロンとグリア細胞へ、また、DMSO に曝露することにより心筋・骨格筋へ分化誘導される多能性を有した細胞株である。

3-2-2. 実験方法

(1) 培養と継代

P19 細胞は、ATCC (American Type Culture Collection) から入手した (CRL-1825™)。37°C、CO₂ 濃度 5% 条件下、10% ウシ胎児血清 (Cell Culture Bioscience Lot No. 9B0148, GIBCO® Lot No. 1183828) を添加した α -MEM (Life technologies, Sigma-Aldrich) で培養を行った。継代は 80% コンフルエントを目安とした。

(2) RA による神経細胞分化誘導

細胞培養用の処理を施していないディッシュに 4×10^5 cells/mL になるよう細胞を播種し、終濃度 1 μ M の RA (Sigma-Aldrich) を添加して、4 日間浮遊培養を行った。RA 曝露によって死細胞が多数発生するため、2 日目に培地交換を行った。4 日後、形成された細胞塊を Trypsin-EDTA で処理して細胞を分離

させたのち、Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) でコーティングした細胞培養用ディッシュに播種した。コーティングディッシュは、適量の Poly-L-lysine を添加し、37°C で 30 分インキュベートしたのち、培地もしくは滅菌水でリンスし用いた。播種後、1 日おきに N-2 Supplement (Life technologies) を添加した Neurobasal® Medium (Life technologies) で培地交換を行った。

(3) DMSO による心筋・骨格筋分化誘導

細胞培養用の処理を施していないディッシュに 3.7×10^5 cells/5mL になるよう細胞を播種し、終濃度 1% の DMSO (Sigma-Aldrich) を添加して、4 日間浮遊培養を行った。DMSO によって死細胞が多数発生するため、2 日目に培地交換を行った。4 日後、形成された細胞塊を、0.1% gelatin でコーティングした細胞培養用ディッシュに播種した。コーティングディッシュは、0.1% gelatin を添加し、37°C で 30 分インキュベートし用いた。播種後、1 日おきに α -MEM (Life technologies, Sigma-Aldrich) で培地交換を行った。

(4) ハンギングドロップ法を用いた分化誘導

細胞懸濁液を 500 cells/20 μ L になるように調整し、RA もしくは DMSO を適量添加したのち、細胞培養処理を施していないディッシュの底に播種し、細胞塊を形成させた。2 日後、RA もしくは DMSO を添加した新しい培地を加え、さらに 2 日間、形成された細胞塊を浮遊培養した。細胞を播種してから 4 日後以降の操作は、3-2-2. (2) および (3) に準じて行った。

(5) RNA 抽出

AGPC 法 (Chomczynski P et al. 1987) に基づき RNA を抽出した。P19 細胞もしくはマウス胎児・成体の組織を 1%SDS-TRIzol®試薬 (Life Technologies) で懸濁し、1/5 倍量のクロロホルムを加え、遠心後に得られた水層に 3/5 倍量以上のエタノールを加え、RNeasy® (QIAGEN) カラムに供した。カラムを洗浄後、RNase フリーの水で溶出し、total RNA を回収した。アガロースゲル電気泳動および吸光度測定により、RNA の濃度および純度を確認した。

(6) 逆転写反応

抽出した total RNA 1 μ g を鋳型とし、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®) のマニュアルに従い cDNA を合成した。プライマーはランダムプライマーを用いた。

(7) 半定量 PCR および定量 PCR

半定量 PCR は 1%アガロースゲル電気泳動でバンドを確認した。定量 PCR は SYBR Premix EX TaqII (Takara) を用いて反応を行い、DNA の増幅を定量した。なお、測定には Applied Biosystems 社の 7500 real time PCR system を用いた。遺伝子発現量の変化は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) を内在性コントロールとした $\Delta\Delta$ Ct 法によって求めた。プライマー配列は Table 3-1 に記載した。

Table 3-1. 半定量および定量 PCR プライマー配列

Gene name	Nucleotide sequences (5' - 3')
Prdm1	F: TGGTGGAGAAGGAGATTCTAGC R: ACCTTTACAGGCACCAGAGGTA
Prdm2	F: CGTGTTCCCTTAAGTCTGCCTCT R: CAGATACACACACGGGACCTAA
Prdm3	F: CGACGTCCAGTGAGTCATTTAC R: GTCCATATTCCAAGTCCTGCTC
Prdm4	F: AGAAGCTGTAGGACATGGTGGT R: CTTACAGAGTTGGTGCTCATGG
Prdm5	F: GCAGAGACACCTGTTAATCCAC R: TGA CT CCTAAGCACTGAAGGTG
Prdm6	F: AGGCACTGTGGAGAACAGAATC R: GGAAGGGACGTTCAAGTTTTTC
Prdm8	F: GGTACGGGAAAGAACTGACTGA R: GCATCAGTGCTGTGAAGTCTCT
Prdm9	F: GATCCCTGTT CAGATCAGCTTC R: TCTGAGCTCTTCCACAGTTCTC
Prdm10	F: CAGGAACCAGAACTCACACCT R: CTTCCCACACTGCAGACACTTA
Prdm11	F: CCACCTCCTTTTGTCTAACTG R: TCATCCTGAGGAACTTACCTGC
Prdm12	F: TCAGGAGAGGTGCAGAAGCTAT R: CTCCCACATGAGGTTGTTGTT

F, forward primer; R, reverse primer

Table 3-1. 半定量および定量 PCR プライマー配列 (続き)

Gene name	Nucleotide sequences (5' - 3')
Prdm13	F: GCTCAGTGGTTTGACATCCCTACA R: TGAGGCTGTTAGGGTAGCGAAAG
Prdm14	F: CTTTCATTGCCAAAGGAGTGAG R: GAACCGAGCACAGTTGACATAG
Prdm15	F: ACTCCATCCTGACTGTGACCTT R: GGGTGTGATGGAGTTTACCAGT
Prdm16	F: TATGTATGAACCTGACCCGGAC R: AGGAATGTAGACAGGAGCCTCA
Gfap	F: GAGGAACTGAAACGTGTTG R: TCAATGTCTTCCCTACCTG
Ncam	F: CAAGTTGGAACCTCTGTGCGAA R: AACTGAACTCAGCTAGCCA
Tubulin 3	F: CCCAGCGGCAACTATGTAGG R: CCAGACCGAACACTGTCCA
Nestin	F: CCCTGAAGTCGAGGAGCTG R: CTGCTGCACCTCTAAGCGA
Oct3/4	F: GAGGGATTAAGCACAAC R: CAAAATGATGAGTGACAGAC
Gapdh	F: CCCCTTCATTGACCTCAACTAC R: AGACTCCACGACATACTCAGCA
G3pdh	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

F, forward primer; R, reverse primer

(8) 免疫染色

染色には、Poly-L-lysine (Sigma) でコーティングしたカバーガラス上で培養した細胞を用いた。PBS で洗浄後、4% Paraformaldehyde で 30 分間、細胞を固定した。その後、PBS-Glycine (10mM) で洗浄した。次に、PBS-Triton (0.1%) で膜透過性亢進処理し、PBS-Glycine (10mM) で洗浄した。3% BSA でブロッキング後、一次抗体反応を行った。洗浄後、二次抗体反応を行い、洗浄、封入し顕鏡した。これらすべての操作は室温で行った。

(9) DNA マイクロアレイ解析

DNA チップは Illumina 社の Sentrix® Beadchip Mouse WG-6_V1 および V2 を用いた。Illumina® TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion) のマニュアルに従い作製した aRNA をハイブリダイゼーションさせ、BeadArray Reader (Illumina®) を用いて蛍光強度を測定後、Beads Studio ソフトによって転写量を数値化し、遺伝子発現解析を行った。

さらに、Agilent Technologies 社の DNA チップ、Mouse Whole Genome Ver.2 も使用した。Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color のマニュアルに従い作製した aRNA をハイブリダイゼーションさせ、Sure Scan マイクロアレイスキャナを用いて蛍光強度を測定後、Feature extraction ソフトによって転写量を数値化し、遺伝子発現解析を行った。

(10) Prdm13 のクローニング

マウス成体脳から抽出した total RNA を鋳型とし、SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Life Technologies) を用いて cDNA を合成した。Table 3-2 に示すプライマーを用いて PCR で Prdm13 の全長を増幅させ、EF1

プロモーターの下流で発現可能な pNucScrIII ベクターに挿入した。

Table 3-2. Prdm13 クローニング用プライマー配列

Gene name	Nucleotide sequences (5' - 3')
Prdm13	F1: CCGGAATTCAATGCCCGCCCACGTCACTCC
	F2: CCGGAATTCACCCGCCACGTCACTCCGCG
	R: CCGTCTAGATTAGGAGTCGTGCTCGCCAC
F, forward primer; R, reverse primer	

(11) トランスフェクション

P19 細胞への過剰発現用ベクター導入には、FuGENE HD® Transfection Reagent (Promega) を用いた。室温で 15 分間、血清を減らした調製培地 Opti-MEM® I Reduced Serum Media (Life Technologies) 中でプラスミドベクターと FuGENE HD®の複合体を形成させ、細胞が入ったディッシュに添加した。RA による神経細胞分化誘導を行う数時間前にトランスフェクションを行い、その後は前述した方法に従い RA 曝露による神経細胞分化誘導を行った。

3-3. 結果

3-3-1. P19 細胞分化過程における Prdm 遺伝子群の発現パターン

(1) 神経細胞分化誘導

神経細胞分化誘導時の RA 濃度および細胞数は McBurney らの方法を参考に条件を検討した (McBurney et al. 1982)。RA は終濃度 0.5~1 μ M、細胞数は $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ cells/mL の間で検討した。検討の結果、 1×10^4 cells/mL では神経細胞分化を十分に誘導することはできなかったが、 5×10^4 cells/mL より細胞数が多ければ特に差はないことが明らかとなり、最終的に RA は終濃度 1 μ M、細胞数は 4×10^5 cells/mL の条件で以降の実験を行った。P19 細胞は通常、ディッシュに接着して増殖する。分化誘導の際は、細胞培養用の処理を施していないディッシュに細胞を播種し、RA を添加して浮遊培養を行った。1~2 日で細胞同士が接着し、Figure 3-1b に示すような細胞塊を形成した。このような細胞凝集は P19 細胞の神経細胞分化において重要な過程である (Wang et al. 2006)。4 日間浮遊培養を行った後、Poly-L-lysine コーティングを施した細胞培養用のディッシュに播種した。数日後、神経突起が伸び始め、近くの細胞と繋がる様子が観察できた (Figure 3-1c, d, e)。また、0 日目および RA 曝露後 1, 3, 5, 7 日目の計 5 ポイントの細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA を合成後、細胞分化マーカー遺伝子のプライマーを用いて PCR 反応による神経細胞分化誘導の評価を行った。神経系を構成するニューロン、グリア細胞のマーカー遺伝子として、それぞれ Ncam (Neural cell adhesion molecule) と Gfap (Glial fibrillary acidic protein) を用いて、神経細胞分化が誘導されているかを評価した (Figure 3-2a, b)。その結果、Gfap および Ncam

は分化誘導が進むにつれ発現量が増加し、RA 曝露により神経細胞分化が誘導されたことを確認した。また、未分化細胞マーカー遺伝子 Oct3/4 では、RA 曝露後、発現量が減少し P19 細胞が未分化状態から分化状態へと移行したことが示された (Figure 3-2c)。

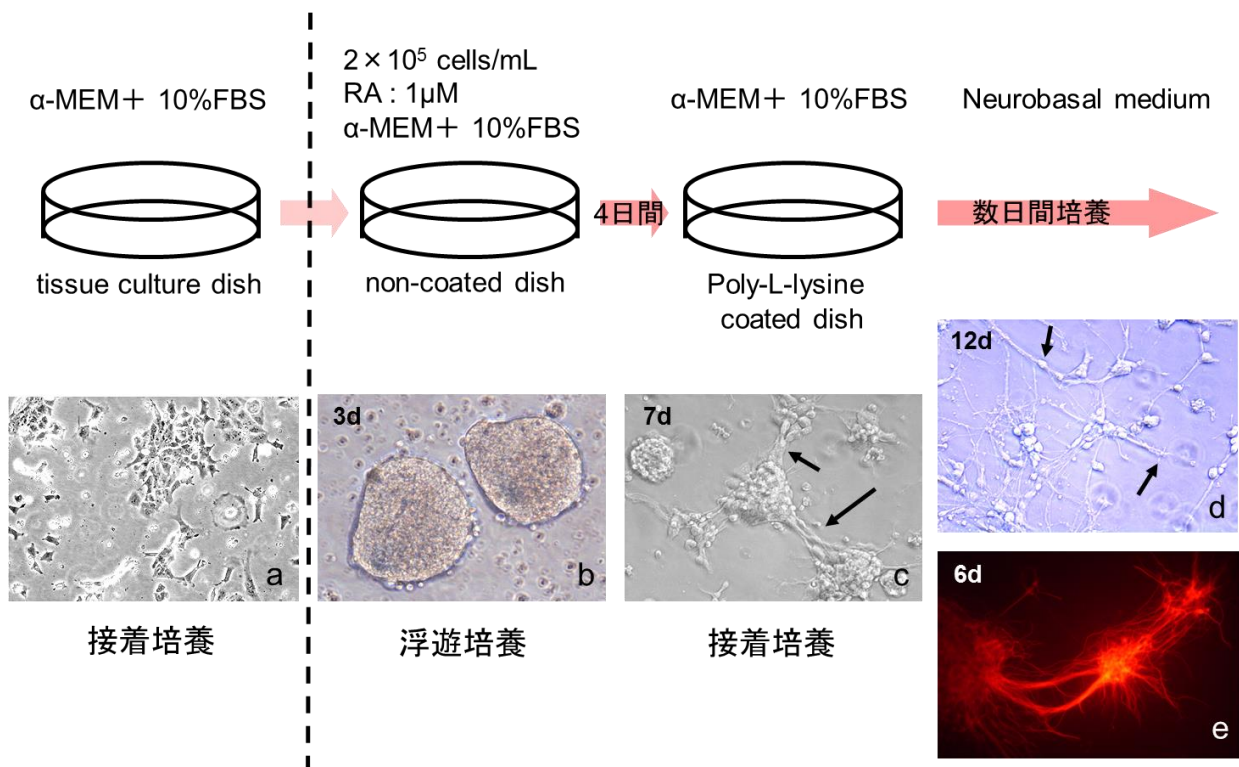


Figure 3-1. P19 細胞における神経細胞分化誘導時の様子

(a) 通常培養における P19 細胞の様子, (b) 誘導 3 日目, (c) 誘導 7 日目, (d) 誘導 12 日目, (e) 誘導 6 日目におけるニューロンマーカー遺伝子 β -tubulin III の局在
接着培養数日後には神経突起が伸び始め (c, d 矢印)、近くの細胞とつながる様子が観察された。

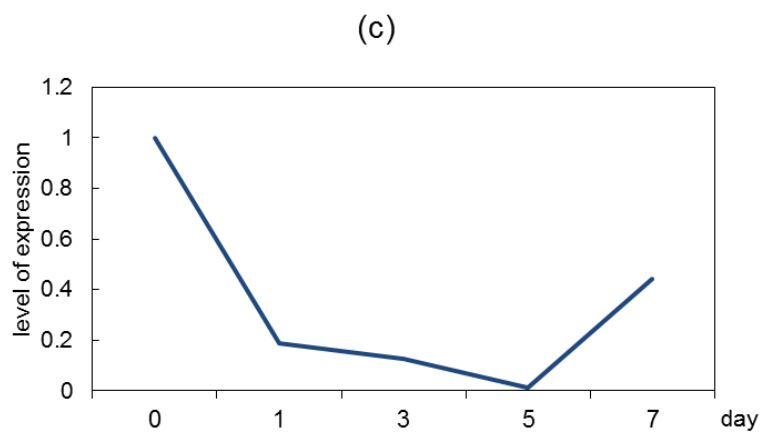
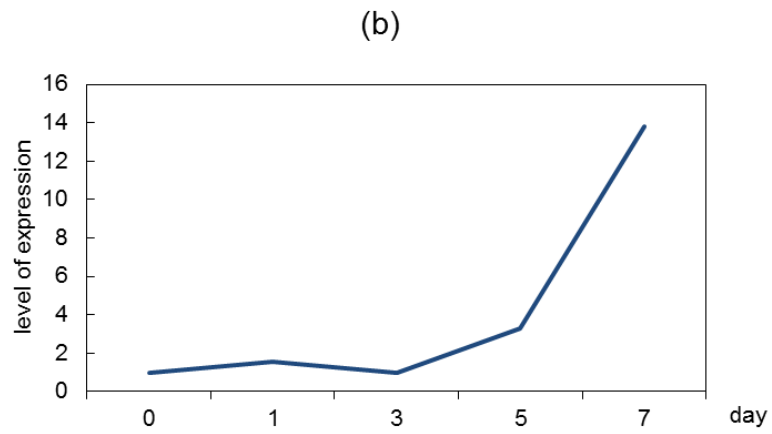
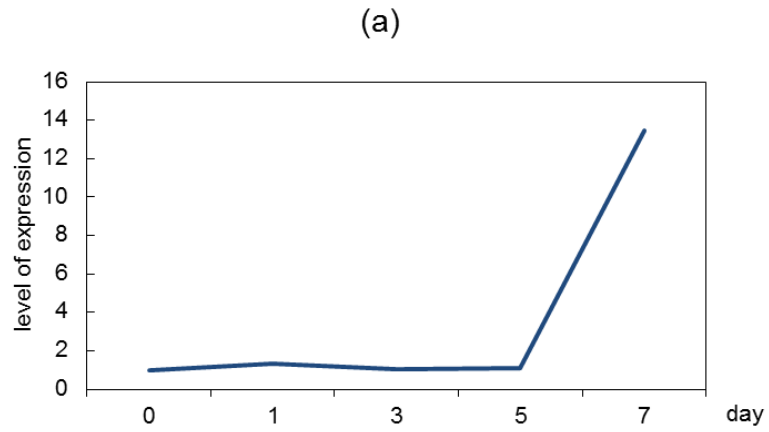


Figure 3-2. 細胞分化マーカーを用いた定量 PCR による発現解析
(a) Gfap, (b) Ncam, (c) Oct3/4

(2) 心筋・骨格筋分化誘導

心筋・骨格筋分化誘導も基本的な操作は神経細胞分化誘導と同様である。4日間の浮遊培養時に終濃度 1%になるよう DMSO を添加し、その後、接着培養を行った。接着培養を開始し 5 日後には細胞同士が同調し拍動する様子が観察された (Figure 3-3)。

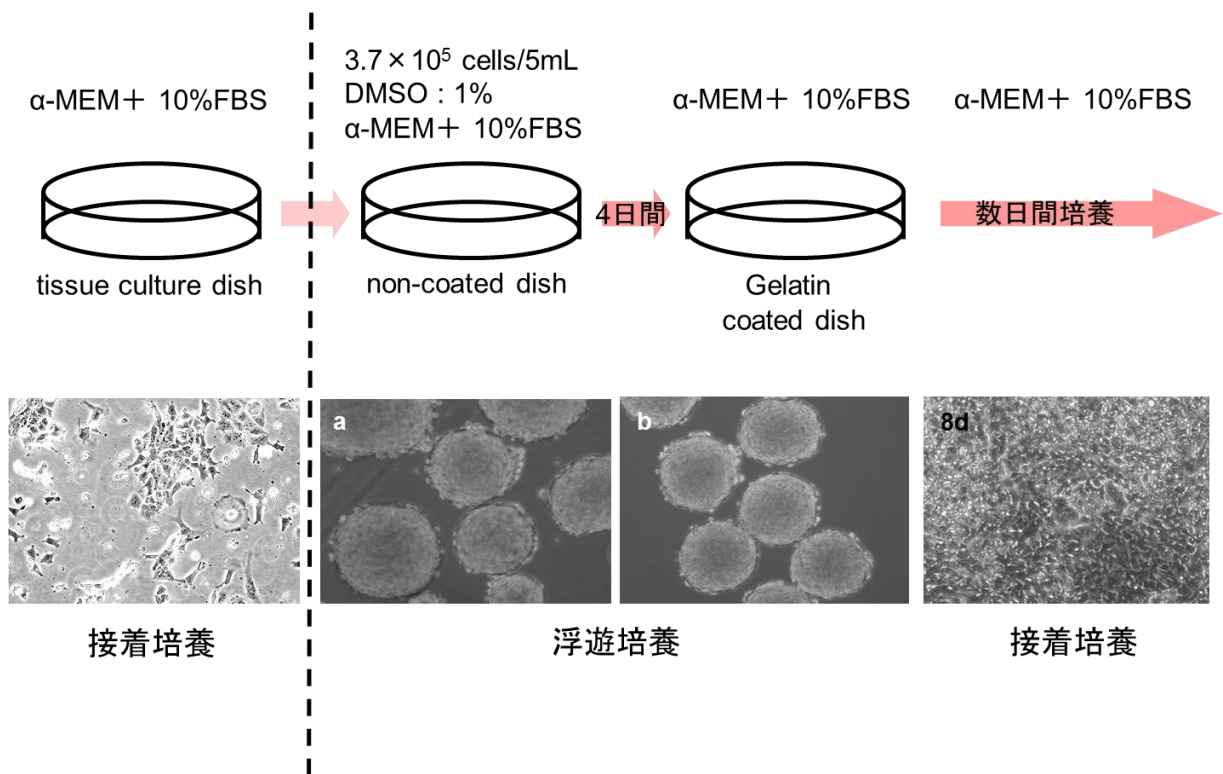


Figure 3-3. P19 細胞における心筋・骨格筋分化誘導時の様子

4 日後の浮遊培養から数日後には、心筋細胞の拍動が観察された。また、a は 1 日目から浮遊培養を行ったもの、b ははじめ 2 日間ハンギングドロップで浮遊培養を行ったものである。ハンギングドロップの形成には、1 つあたり 500 個の細胞を用いた。b では細胞塊の大きさを均一にすることができた。

(3) DNA チップを用いた網羅的な遺伝子発現解析-1

まず、Illumina 社製の DNA チップを用いて、P19 細胞の RA 曝露による神経細胞分化過程での遺伝子発現変動を解析した。Prdm 遺伝子群が属する SET 遺伝子群は哺乳類で 60 種類ほどが同定されているが、今回使用した Illumina 社製の DNA チップには Table 3-3 に示した 45 種類が搭載されており、他の SET 遺伝子群の解析はできなかった。

0 日目および RA 曝露後 1, 3, 6, 8, 10 日目の計 6 ポイントの細胞から total RNA を抽出し、標識後、DNA チップによる解析を行った。はじめに、細胞分化の指標となるマーカー遺伝子の発現を解析した。横軸は日数、縦軸は 0 日目を 1 とした発現量の変化を示している。神経系を構成するニューロン、グリア細胞のマーカー遺伝子として、それぞれ Ncam および Gfap を用いて、神経細胞分化が誘導されているかを評価した。その結果、Ncam の発現は 6 日目から検出され、培養時間に応じて増加しており、一方 Gfap は 10 日目において発現量の増加が検出された (Figure 3-4a)。以上の結果より、本実験において RA 曝露により P19 細胞の神経細胞分化誘導が行われていることがわかった。また、未分化細胞マーカーである Oct3/4 の発現量は、0 日目と比較し 1 日目においては 20%程度まで低下し、さらに時間経過とともに減少した (Figure 3-4b)。また、Oct3/4 と同様に未分化細胞マーカーである Nanog も時間経過とともに発現量が減少した。これは、多能性を持った細胞から神経細胞へと分化が進行していることを示している。しかし、8 日目あたりからわずかではあるが、Oct3/4 の発現量が増加していることもわかった。

Table 3-3. Illumina 社製の DNA チップに搭載された 45 の SET 遺伝子群

Gene name	Accession	Official name
Ash1l	NM_138679	ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila) (Ash1l)
Ehmt1	NM_001012518	euchromatic histone methyltransferase 1
Ehmt2	NM_145830	euchromatic histone lysine N-methyltransferase 2
Ezh1	NM_007970	enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila)
Ezh2	NM_001146689	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)
Kmt2d	NM_001033276	lysine (K)-specific methyltransferase 2D
LOC385389		similar to SET domain-containing protein
Mecom/Prdm3	NM_021442	MDS1 and EVI1 complex locus
Mecom/Prdm3	NM_007963	MDS1 and EVI1 complex locus (Mecom), transcript variant 1
Mll1	NM_001081049	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1
Mll3	NM_001081383	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3
Mll5	XM_901215	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5
Nsd1	NM_008739	nuclear receptor-binding SET-domain protein 1
Prdm1	NM_007548	PR domain containing 1, with ZNF domain
Prdm13	NM_001080771	PR domain containing 13
Prdm14	NM_001081209	PR domain containing 14
Prdm15	NM_144789	PR domain containing 15
Prdm16	NM_027504	PR domain containing 16
Prdm2	NM_001081355	PR domain containing 2, with ZNF domain
Prdm4	NM_181650	PR domain containing 4
Prdm5	NM_027547	PR domain containing 5
Prdm8	NM_029947	PR domain containing 8
Prdm9	NM_144809	PR domain containing 9

Table 3-3. Illumina 社製の DNA チップに搭載された 45 の SET 遺伝子群 (続き)

Gene name	Accession	Official name
Setd1a	NM_178029	SET domain containing 1A (Setd1a)
Setd3	NM_028262	SET domain containing 3
Setd4	NM_145482	SET domain containing 4
Setd5	NM_028385	SET domain containing 5
Setd7	NM_080793	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7
Setd7	NM_080793	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7
Setd8	NM_030241	SET domain containing (lysine methyltransferase) 8
Setdb1	NM_001163642	SET domain, bifurcated 1
Setdb2	NM_001081024	SET domain, bifurcated 2
Setmar	NM_178391	SET domain and mariner transposase fusion gene
Smyd1	NM_009762	SET and MYND domain containing 1
Smyd2	NM_026796	SET and MYND domain containing 2
Smyd3	NM_027188	SET and MYND domain containing 3
Smyd4	NM_177009	SET and MYND domain containing 4
Smyd5	NM_144918	SET and MYND domain containing 5
Suv39h1	NM_011514	suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)
Suv39h2	NM_022724	suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)
Suv420h1	NM_144871	suppressor of variegation 4-20 homolog 1 (Drosophila)
Suv420h2	NM_146177	suppressor of variegation 4-20 homolog 2 (Drosophila)
Wbp7/Mll2	NM_029274	WW domain binding protein 7
Whsc1	NM_001081102	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 (human)
Whsc1l1	NM_001081269	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (human)

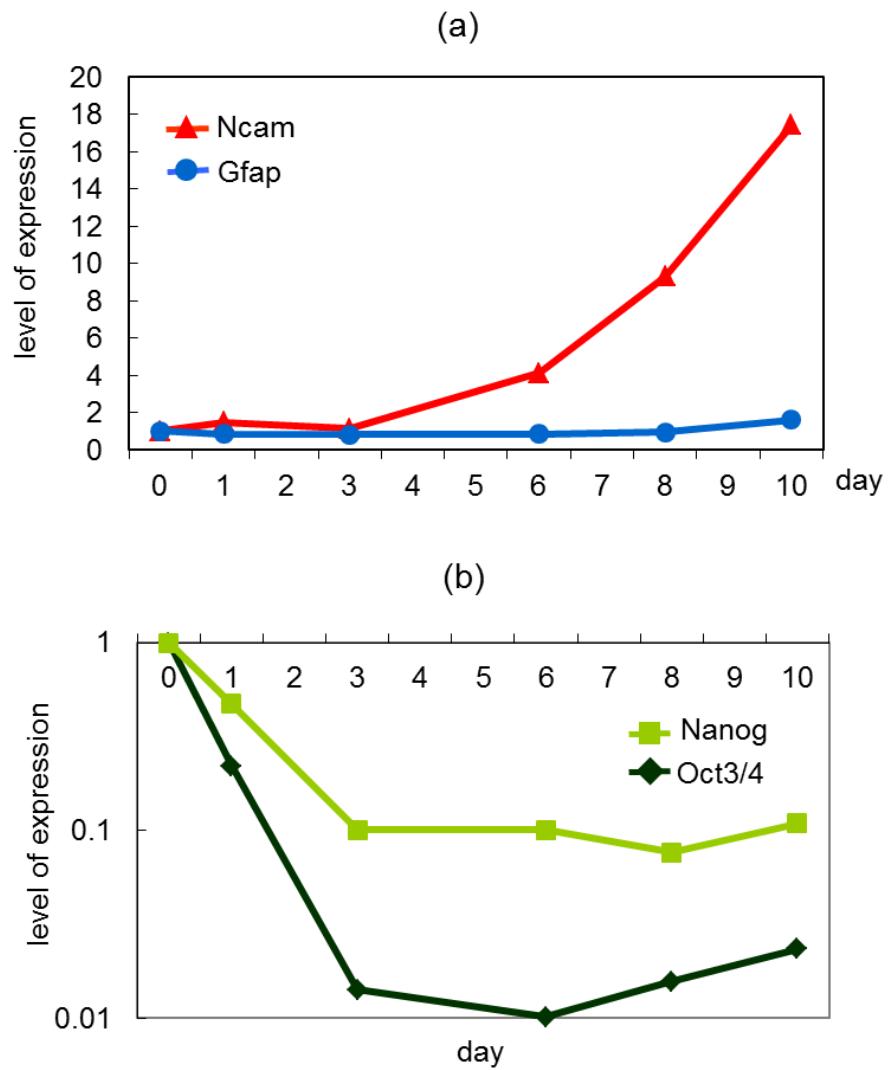


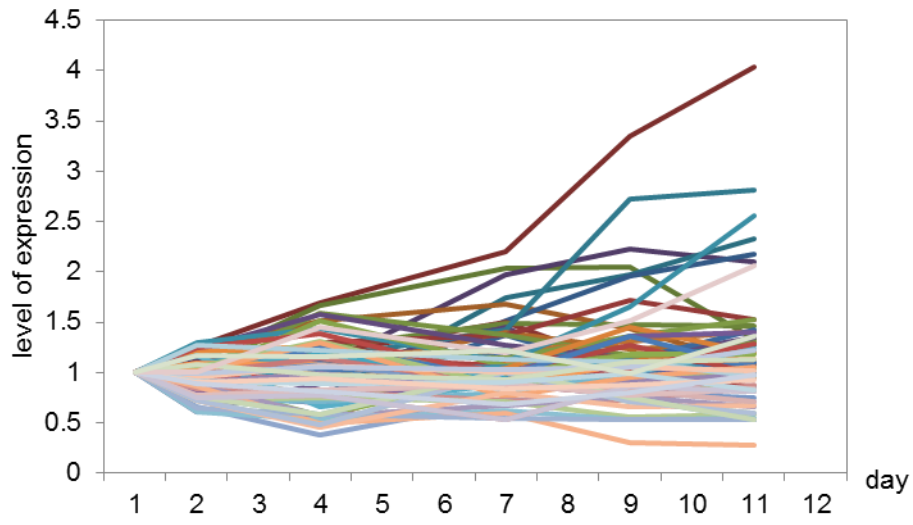
Figure 3-4. 細胞分化マーカー遺伝子を用いた発現解析

(a) 神経細胞マーカーNcam, Gfap の発現パターン, (b) 未分化細胞マーカーOct3/4, Nanog の発現パターン

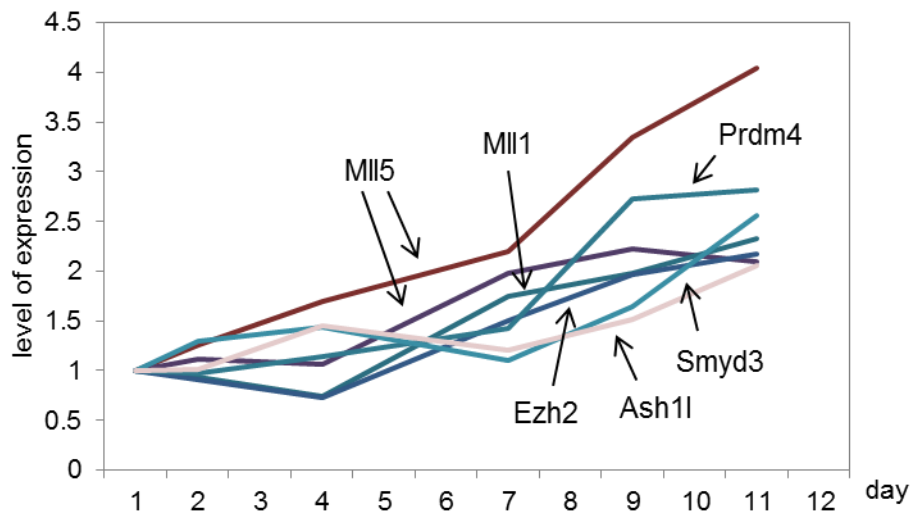
次に Table 3-3 に示した 45 種類の SET 遺伝子群の発現変動を解析した。45 遺伝子の大部分は、分化過程において大きな変化は見られなかったが、一部の遺伝子は神経細胞分化過程において発現変化することが明らかとなった (Figure 3-5a)。変化パターンは時間経過とともに 1. 増加するもの、2. 減少するもの、3. 一過的に増加しやがて減少するものの 3 パターンに分けることができた。Ash11, Ezh2, Mll1, Mll5, Prdm4 および Smyd3 が 1 のパターン (Figure 3-5b)、Smyd2 が 2 のパターン (Figure 3-5c) で発現量が変化していた。Mll1 および Mll5 は Mll (Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia) ファミリーに属する。ヒト Mll は白血病を引き起こす融合タンパク質の癌原遺伝子として知られている。マウス Mll1 は、胚において造血に関与しており、Mll1 欠損マウスは E10.5~12 の間に致死となる。また、ヒストン H3K4 のメチル基転移酵素として知られる Mll1 であるが、最近では出生後の神経分化に関与することや、ゼブラフィッシュの神経発生および脳腫瘍形成への関与も報告されている (Lim et al. 2009; Huang et al. 2014)。また、Mll5 は癌抑制因子として知られているが、ミエロイド分化や造血幹細胞の自己増殖に関与することや (Heuser et al. 2009)、様々な細胞周期ステージの調節因子としての関与も報告されている (Cheng et al. 2008)。Smyd3 はヒトの結腸、直腸、肝臓、乳癌で強く発現しており、癌原遺伝子 c-Met を発現制御することから、癌細胞増殖促進に関与する因子と示唆されている (Zou et al. 2009)。一方、発現量がしだいに減少した Smyd2 は筋細胞分化に関与することが報告されている (Kawamura et al. 2008)。これは P19 細胞が神経細胞へ分化したことにより、筋分化関連遺伝子の発現が抑制されたためと考えられる。3 の一過的な発現増加が認められた遺伝子は Prdm13 であり、かつ非常に大きく変動することが判明した (Figure 3-5d)。この遺伝子は Prdm 遺伝子の 1 つであり、マウス

胎児において神経領域で発現すること (Kinameri et al. 2008)、またヒストンメチル基転移酵素としての活性を持ち、グルタミン酸作動性ニューロン特異的に発現する Tlx3 を誘導する Neurog2 を抑制することによって、グルタミン酸作動性ニューロンへの分化を抑制することが明らかとなっている (Hanotel et al. 2014)。

(a)



(b)



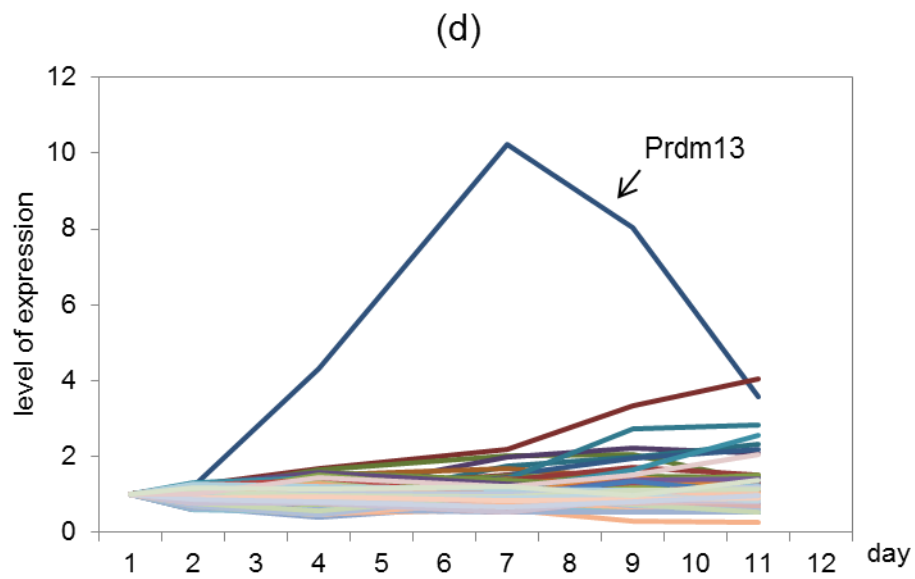
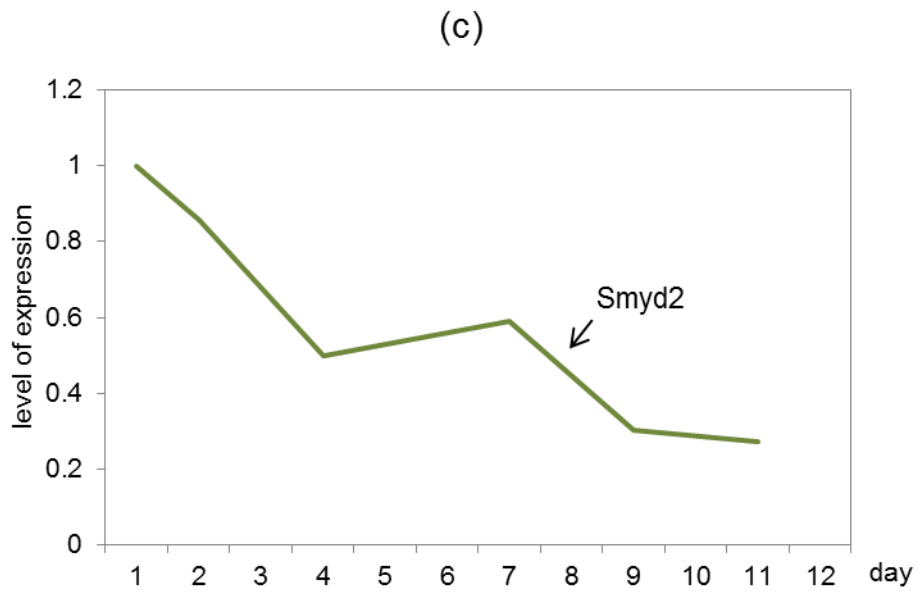


Figure 3-5. 発現量が約4倍以内で変化しているSET遺伝子の発現解析
 (a) SET遺伝子45種類の発現パターン, (b) 発現量が増加する遺伝子, (c) 減少する遺伝子, (d) Prdm13を含むSET遺伝子群45種類の発現パターン

(4) DNA チップを用いた網羅的な遺伝子発現解析-2

次に、Agilent 社製の DNA チップ、Mouse Whole Genome Ver.2 を使用し、P19 細胞の RA 曝露による神経細胞分化、DMSO 曝露による心筋・骨格筋分化、それぞれの過程における遺伝子発現変動を解析した。0 日目および RA 曝露後 2, 4, 6, 8, 10 日目の計 6 ポイント、0 日目および DMSO 曝露後 2, 4, 6, 8, 10, 12 日目の計 7 ポイントの細胞から total RNA を抽出し、標識後、DNA チップによる解析を行った。まず、アミノ酸ドメインデータベース SMART を用いて、SET ドメインを持つ遺伝子を解析したところ、重複したものを含め、71 の遺伝子が見つかった。そのうち、Mouse Whole Genome Ver.2 に搭載された遺伝子は 53 あり、これに含まれていなかった Prdm4, 10, 13 を加え、計 57 について解析を行った (Table 3-4)。なお、この 57 の中には遺伝子が重複しているものも含まれている。

Table 3-4. Agilent 社製の DNA チップに搭載された 57 の SET 遺伝子群

Gene name	Accession	Official name
Ash1l	NM_138679	ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila) (Ash1l)
Ehmt1	NM_001012518	euchromatic histone methyltransferase 1 (Ehmt1), transcript variant 1
Ehmt2	NM_145830	euchromatic histone lysine N-methyltransferase 2
Ehmt2	NM_145830	euchromatic histone lysine N-methyltransferase 2 (Ehmt2), transcript variant 1
Ezh1-201	ENSMUST00000107285	enhancer of zeste homolog 1
Ezh2	NM_007971	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila) (Ezh2), transcript variant 1
Kmt2a	NM_001081049	lysine (K)-specific methyltransferase 2A (Kmt2a)
Kmt2b	NM_029274	lysine (K)-specific methyltransferase 2B (Kmt2b), transcript variant 2
Kmt2c	NM_001081383	lysine (K)-specific methyltransferase 2C (Kmt2c)
Kmt2d	NM_001033276	lysine (K)-specific methyltransferase 2D
Kmt2e	NM_026984	lysine (K)-specific methyltransferase 2E
Mecom	AK052472	MDS1 and EVI1 complex locus
Mecom	NM_021442	MDS1 and EVI1 complex locus (Mecom), transcript variant 2
Mecom	NM_007963	MDS1 and EVI1 complex locus (Mecom), transcript variant 1
Nsd1	NM_008739	nuclear receptor-binding SET-domain protein 1 (Nsd1)
Prdm1	NM_007548	PR domain containing 1, with ZNF domain
Prdm10	NM_001080817	PR domain containing 10

Table 3-4. Agilent 社製の DNA チップに搭載された 57 の SET 遺伝子群 (続き)

Gene name	Accession	Official name
Prdm10	AK139221	PR domain containing 10
Prdm11	NM_001177536	PR domain containing 11
Prdm12	NM_001123362	PR domain containing 12
Prdm13	NM_001080771	PR domain containing 13
Prdm14	NM_001081209	PR domain containing 14 (Prdm14)
Prdm15	NM_144789	PR domain containing 15
Prdm16	NM_027504	PR domain containing 16
Prdm2	NM_001081355	PR domain containing 2, with ZNF domain
Prdm4	NM_181650	PR domain containing 4
Prdm5	NM_027547	PR domain containing 5
Prdm6	NM_001033281	PR domain containing 6
Prdm8	NM_029947	PR domain containing 8
Prdm9	NM_144809	PR domain containing 9
Prdm9-201	ENSMUST00000167994	PR domain containing 9
Setd1a	NM_178029	SET domain containing 1A (Setd1a)
Setd1b	NM_001040398	SET domain containing 1B (Setd1b)
Setd1b	AK141316	SET domain containing 1B
Setd2	NM_001081340	SET domain containing 2 (Setd2)
Setd5	NM_028385	SET domain containing 5
Setd6	NM_001035123	SET domain containing 6
Setd7	NM_080793	SET domain containing (lysine methyltransferase) 7
Setd8	NM_030241	SET domain containing (lysine methyltransferase) 8
Setd8	NM_030241	SET domain containing (lysine methyltransferase) 8
Setdb1	NM_001163641	SET domain, bifurcated 1 (Setdb1), transcript variant 1

Table 3-4. Agilent 社製の DNA チップに搭載された 57 の SET 遺伝子群 (続き)

Gene name	Accession	Official name
Setdb2	NM_001081024	SET domain, bifurcated 2
Setmar	NM_001276356	SET domain without mariner transposase fusion (Setmar), transcript variant 2
Smyd1	NM_009762	SET and MYND domain containing 1 (Smyd1), transcript variant 2
Smyd2	NM_026796	SET and MYND domain containing 2
Smyd3	NM_027188	SET and MYND domain containing 3
Smyd4	BF458734	SET and MYND domain containing 4
Smyd4	NM_001102611	SET and MYND domain containing 4
Smyd5	NM_144918	SET and MYND domain containing 5
Suv39h1	NM_011514	suppressor of variegation 3-9 homolog 1
Suv39h2	NM_022724	suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)
Suv420h1	NM_001167885	suppressor of variegation 4-20 homolog 1 (Drosophila) (Suv420h1), transcript variant 1
Suv420h1	NM_001167884	suppressor of variegation 4-20 homolog 1 (Drosophila) (Suv420h1), transcript variant
Suv420h2	NM_146177	suppressor of variegation 4-20 homolog 2 (Drosophila) (Suv420h2), transcript variant 1
Whsc1-001	ENSMUST00000075812	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1
Whsc111	NM_001001735	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (human) (Whsc111), transcript variant 1
Whsc111	NM_001081269	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1 (human) (Whsc111), transcript variant 2

まず、神経および心筋・骨格筋分化過程において、15種類すべての Prdm 遺伝子を抽出し、発現を解析した。横軸は日数、縦軸は0日目を1とした発現量の変化を示している。神経細胞分化過程では、2日目に Prdm6, 16 が、4日目に Prdm8, 12, 13 が、0日目と比較し50倍以上発現量が上昇していることが明らかとなった (Figure 3-6a)。また、発現変動が4倍以内の範囲で細かく解析すると、2日目で Prdm3 が、4日目で先ほどとはまた別プローブの Prdm12b が一過的に上昇していた。Prdm15 は、2日目以降は恒常的に発現していた (Figure 3-6b)。

一方、心筋・骨格筋分化過程では、4日目に Prdm6 が一過的に発現増加していた (Figure 3-7)。また、Prdm12, 13, 16 は6日目で一過的に発現増加していた。Prdm8 は2日目と8日目の両方で発現量が一過的に増加していた。

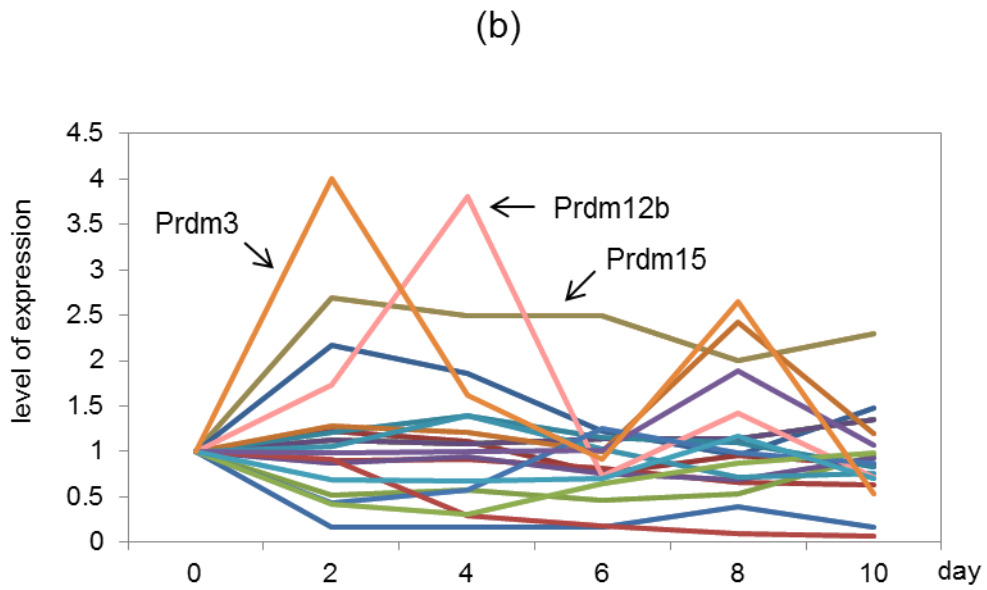
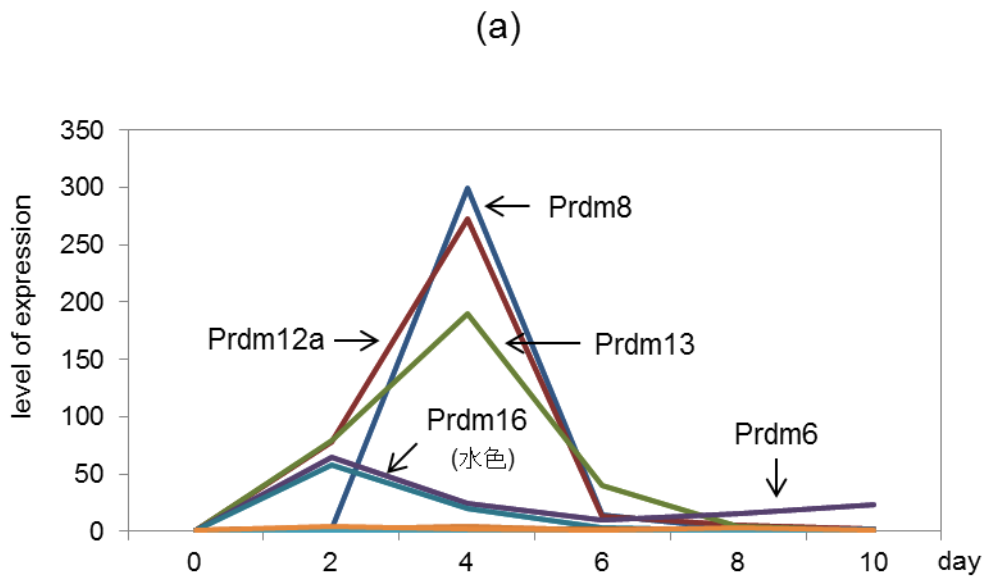


Figure 3-6. 神経細胞分化過程における Prdm 遺伝子群の発現変動

(a) 発現量が 50 倍以上で変動した Prdm 遺伝子群, (b) 4 倍以内で変動した Prdm 遺伝子群

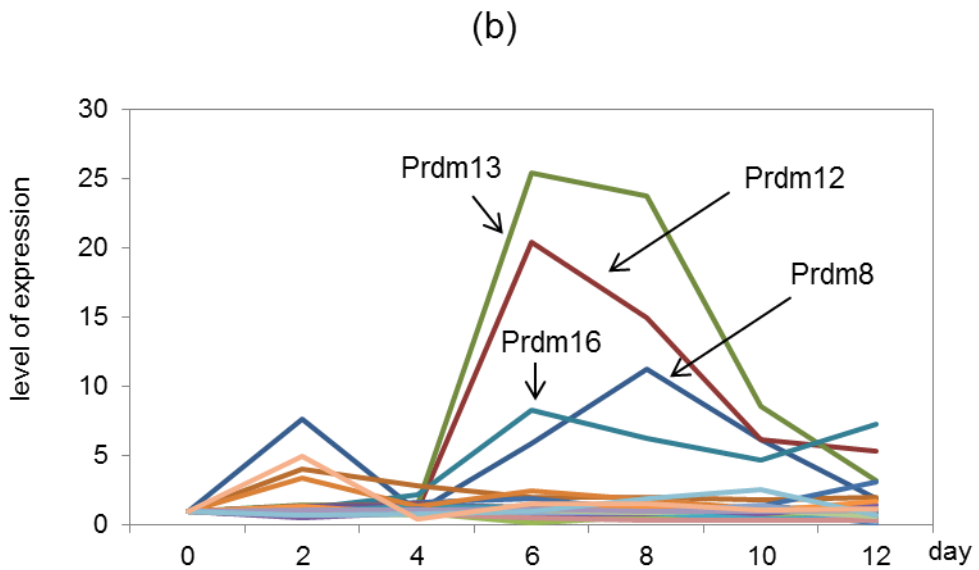
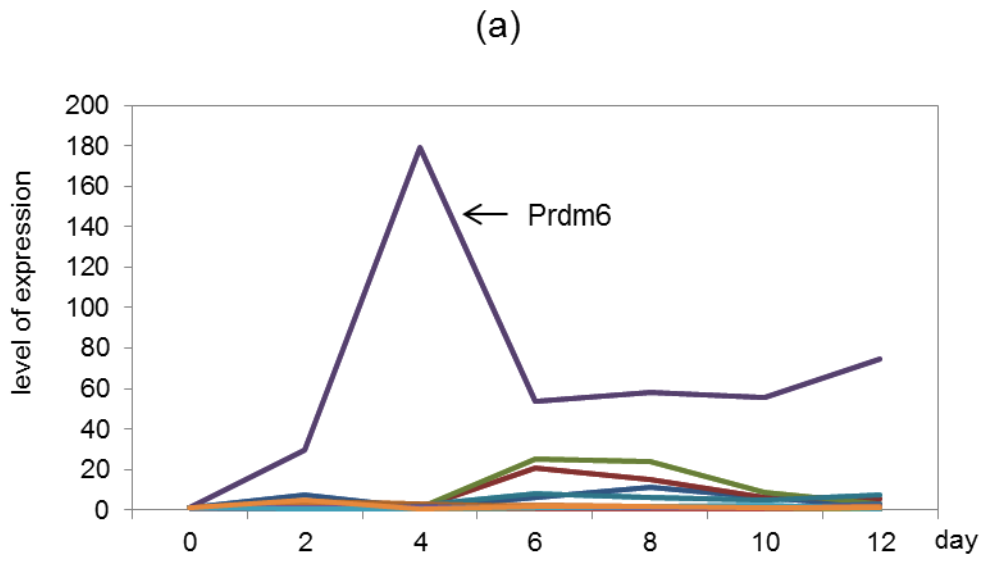


Figure 3-7. 心筋・骨格筋分化過程における Prdm 遺伝子群の発現変動
 (a) Prdm6 の発現パターン, (b) 25 倍以内で変動した Prdm 遺伝子群

次に、神経細胞分化過程における SET 遺伝子群について解析したところ、Prdm 遺伝子群のみの解析によって明らかとなった、Prdm8, 12, 13 の遺伝子発現が最も顕著であり、その他の SET 遺伝子群の発現は大きく変化していなかった (Figure 3-8)。

一方、心筋・骨格筋分化過程について解析したところ、神経細胞分化過程での結果と同様に Prdm 遺伝子で検出されたダイナミックな発現変化を示す SET 遺伝子は検出されなかった (Figure 3-9a, b)。しかし、発現変化 25 倍以内の範囲で解析すると、誘導後 2 日目において Prdm2, 3, 15 および Setd1b の発現量が一過的に増加していた (Figure 3-9c)。これは DMSO 曝露により誘導されたものと考えられる。

以上の結果から、Prdm 遺伝子は P19 細胞の神経細胞分化および心筋・骨格筋分化過程において機能することが示唆された。

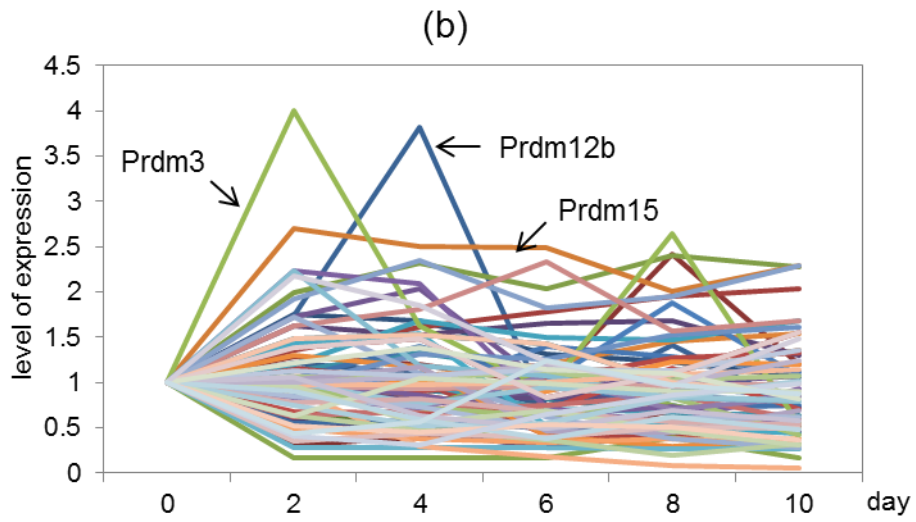
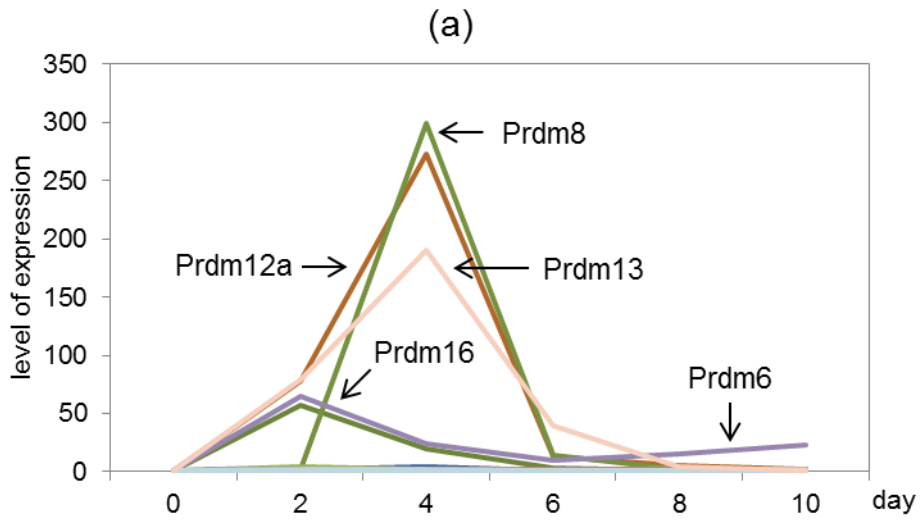


Figure 3-8. 神経細胞分化過程における SET 遺伝子群の発現変動

(a) 発現量が 50 倍以上で変動した SET 遺伝子群, (b) 4 倍以内で変動した SET 遺伝子群

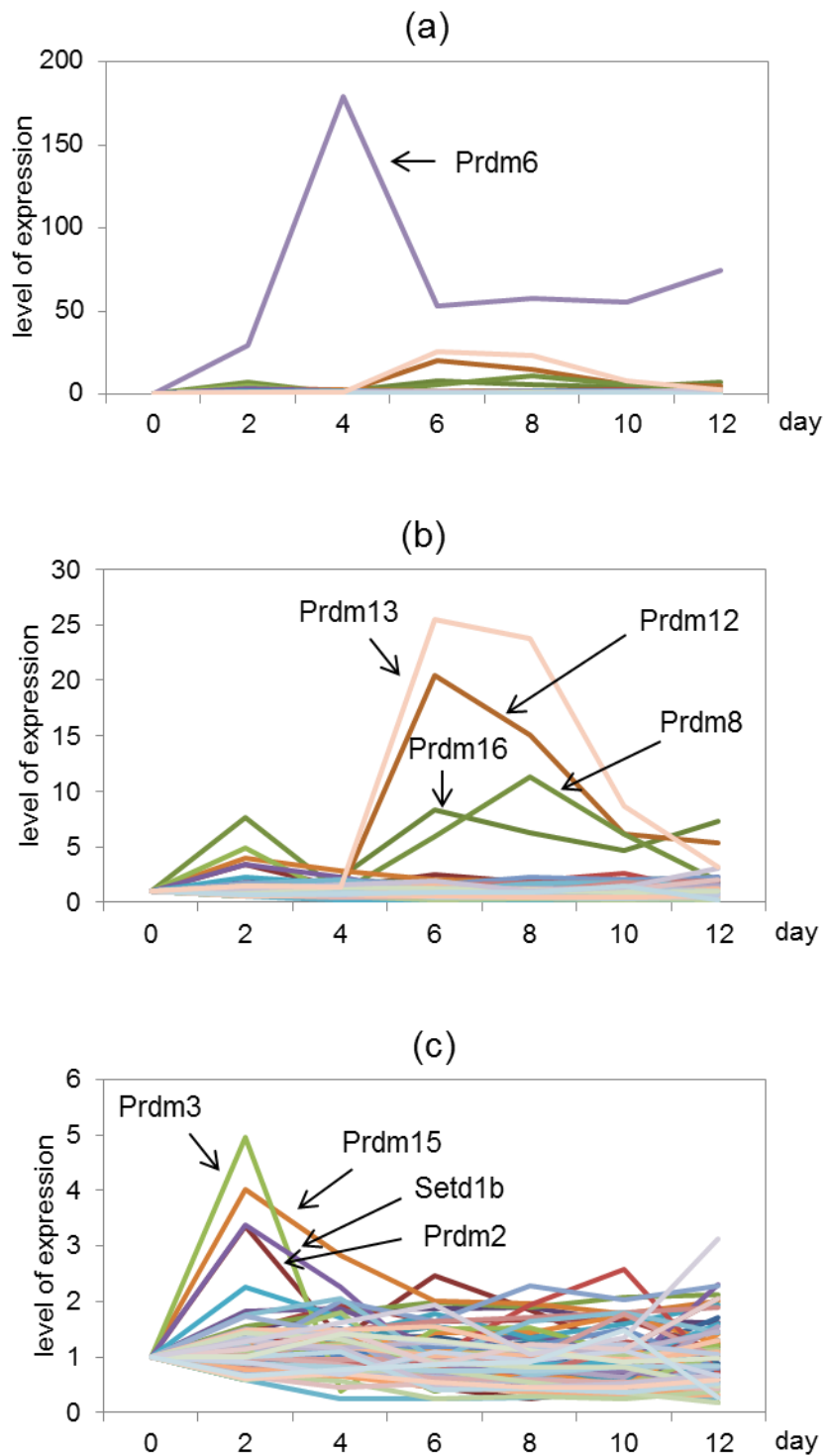


Figure 3-9.心筋・骨格筋分化過程における SET 遺伝子群の発現変動

(a) Prdm6 の発現パターン, (b) 25 倍以内で変動した SET 遺伝子群, (c) 5 倍以内で変動した SET 遺伝子群

(5) 神経細胞分化過程における半定量 PCR による発現解析

半定量 PCR によって神経細胞分化過程における神経細胞マーカー遺伝子群の発現量を電気泳動で確認した (Figure 3-10)。0 日目および RA 曝露後 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9 日目の計 8 ポイントの細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA を合成後、PCR 反応を行った。その結果、Gfap および Ncam は DNA チップの結果と同様、時間経過とともに発現量が増加していた。また、神経系に広く発現する Tubulin 3 も時間経過に伴い発現量が増加する傾向にあった。神経幹細胞や神経前駆細胞のマーカー遺伝子である Nestin は、神経細胞分化が進むにつれ発現量が減少する。今回の解析結果では、分化誘導 3 日目にかけて発現量が増加し、その後わずかに減少するという発現変動がみられた。また、未分化細胞マーカーである Oct3/4 は、DNA チップを用いた遺伝子発現解析の結果と同様、分化誘導 2 日目で急激に発現量が減少した。

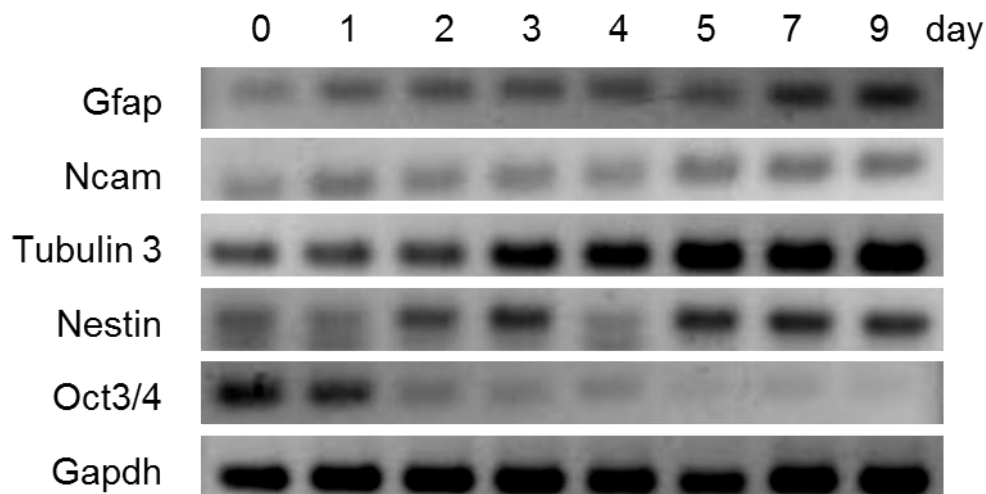


Figure 3-10. 神経細胞マーカーを用いた半定量 PCR による発現解析

次に、神経細胞分化過程における Prdm 遺伝子群の発現解析を行った (Figure 3-11)。その結果、Prdm1, 3, 11 は RA 曝露により初めて発現が検出され、Prdm2, 15 は誘導に伴い発現量が減少することが明らかとなった。また、Prdm3, 8, 11 は一過的な発現量の増加が検出された。

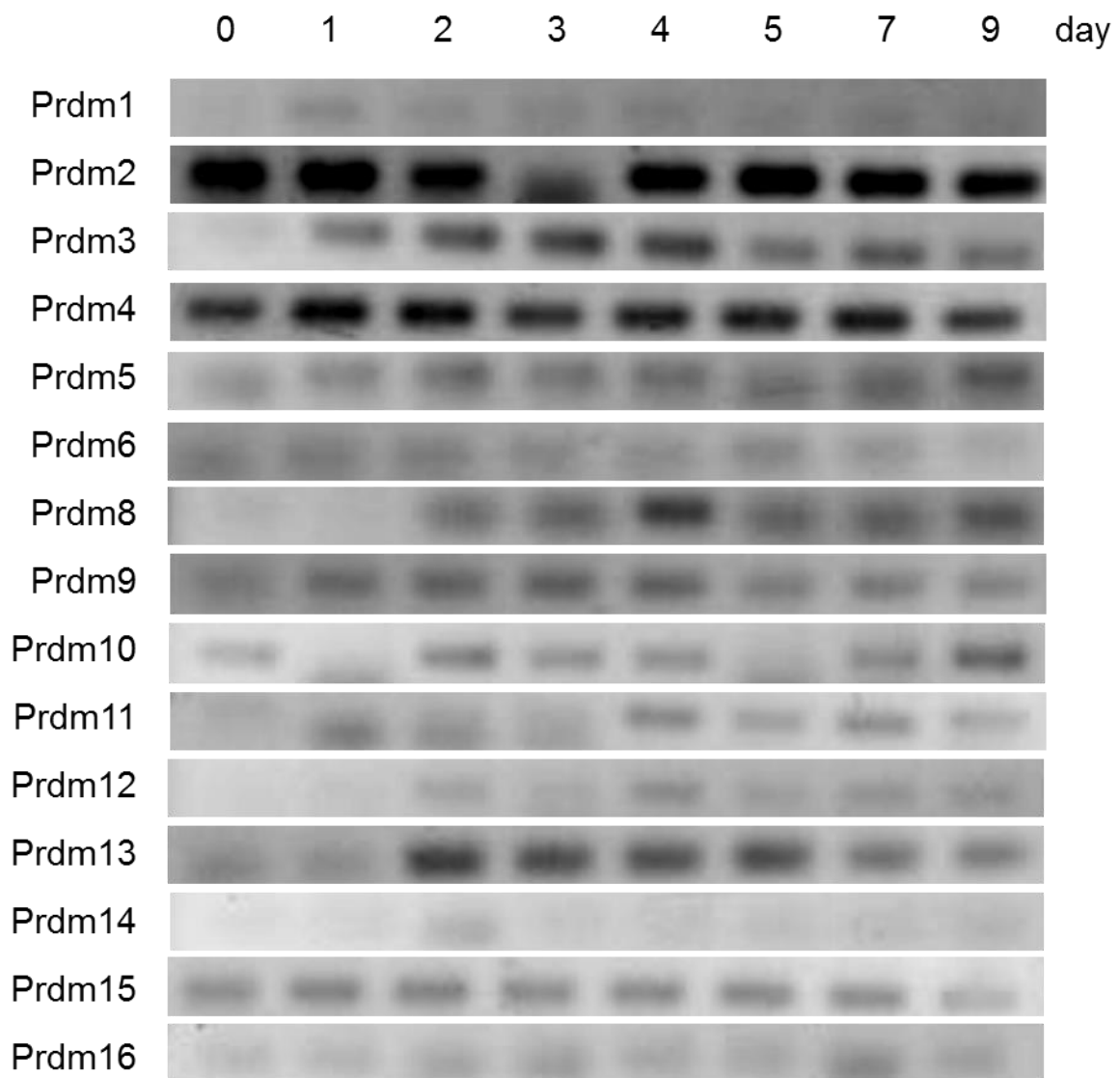


Figure 3-11. 半定量 PCR を用いた神経細胞分化過程における Prdm1~16 の発現解析

以上、神経細胞分化過程における Prdm 遺伝子群の発現について、Illumina 社および Agilent 社の DNA チップを用いて解析を行った結果、Prdm13 は Illumina 社、Agilent 社ともに一過的な発現パターンを示しており、それは半定量 PCR 解析によっても確認された。また、Agilent 社のチップを用いた発現解析で Prdm13 と同様の発現変動を示した Prdm8 および 12 は、Illumina 社のチップを用いた解析ではそれらの発現は検出されなかったが、半定量 PCR による発現解析では再現されており、Prdm8 および 12 も Prdm13 と同様に、P19 細胞の神経細胞分化に関与していることが示唆された。また、SET 遺伝子群全体について見てみると、Illumina 社のチップを用いた解析では Ash11 や Ezh2, Mll1, Mll5, Smyd3 など分化が進むにつれ発現量が上昇した遺伝子が検出されたが、Agilent 社のチップを用いた解析では発現量は変化していなかった。

3-3-2. マウス胎児および成体の各組織における Prdm 遺伝子群の発現

半定量および定量 PCR を用いて、マウス胎児および成体の各組織における Prdm 遺伝子群の発現解析を行った (Figure 3-12,13)。解析に用いた組織は、心臓、脳、皮膚、肺、肝臓、腎臓および腸の 7 種類である。解析の結果、Prdm10, 14, 16 のように、どの組織においてもほとんど発現していない遺伝子もあったが、特定の組織で強く発現する遺伝子もあった。例えば、Prdm2 は肝臓、Prdm3, 5 は肺と腎臓、Prdm6, 11 は肺で強く発現していた。ほとんどの Prdm 遺伝子が成体よりも胎児期の組織で強く発現しており、胚発生に重要であることが示唆された。

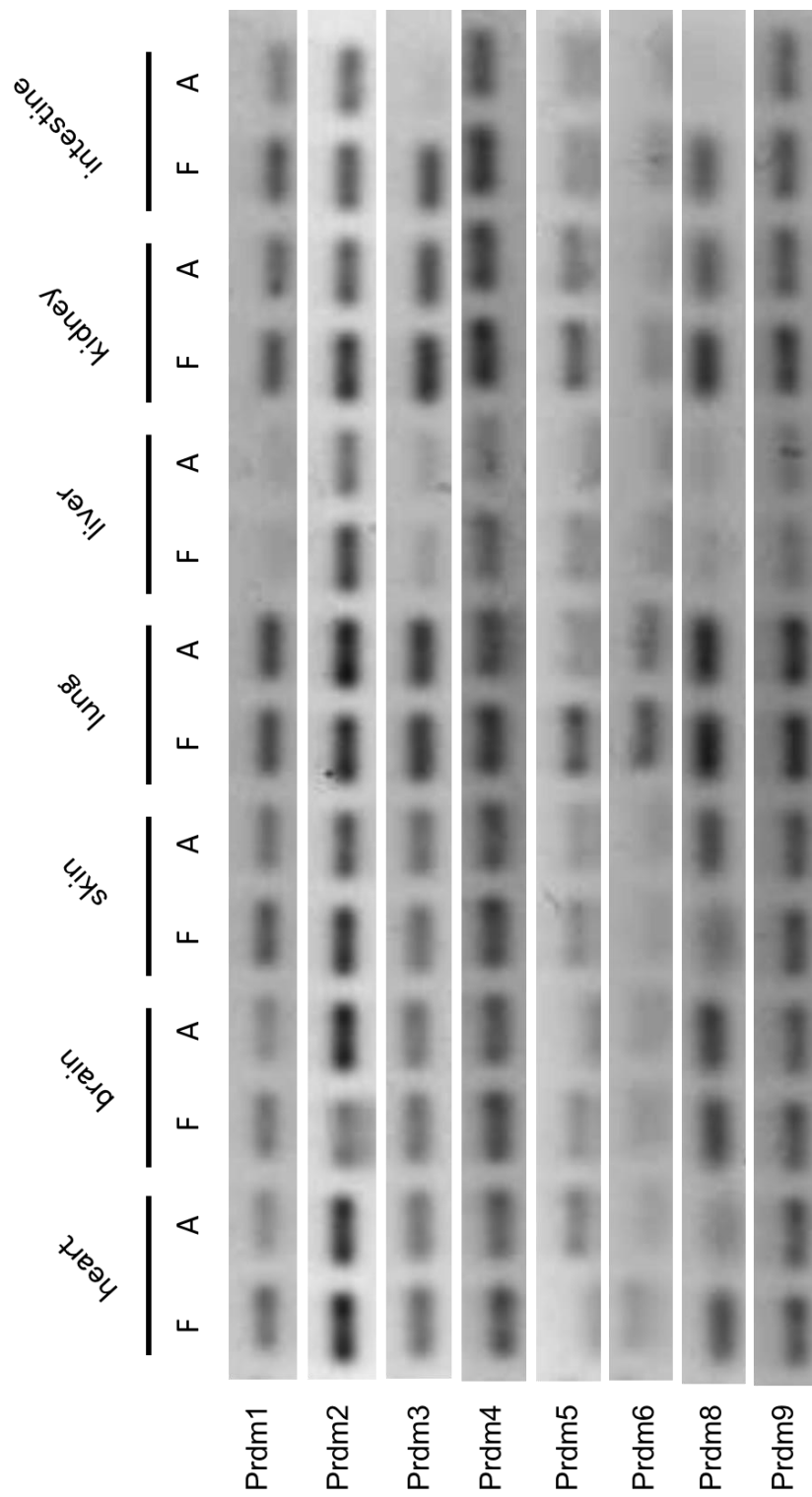


Figure 3-12. 半定量 PCR を用いたマウス胎児および成体の各組織における Prdm1～16 の発現解析
 F, fetus; A, adult

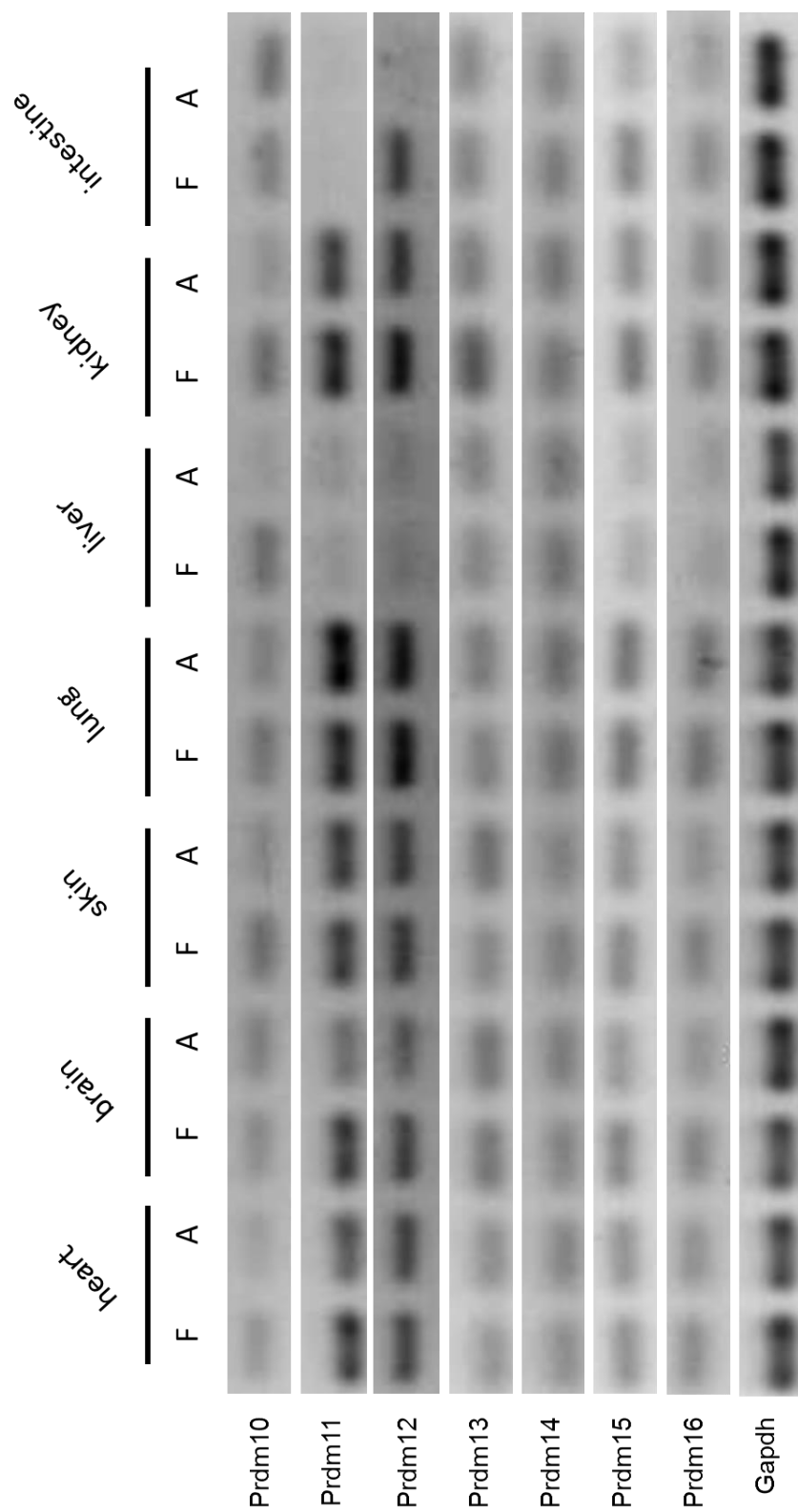


Figure 3-12. 半定量 PCR を用いたマウス胎児および成体の各組織における Prdm1～16 の発現解析 (続き)
 F, fetus; A, adult

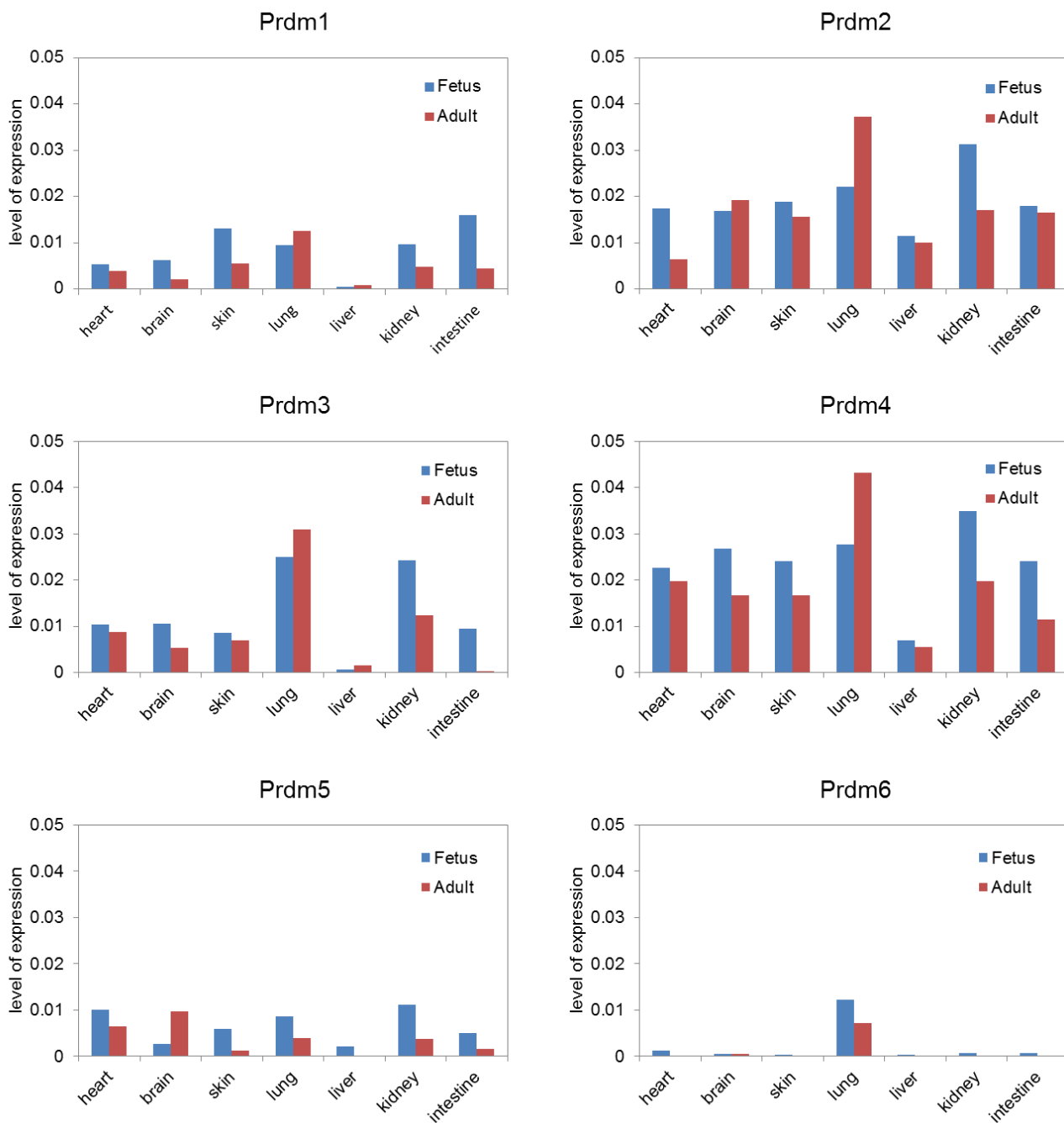


Figure 3-13. 定量 PCR を用いたマウス胎児および成体の各組織における Prdm1~16 の発現解析

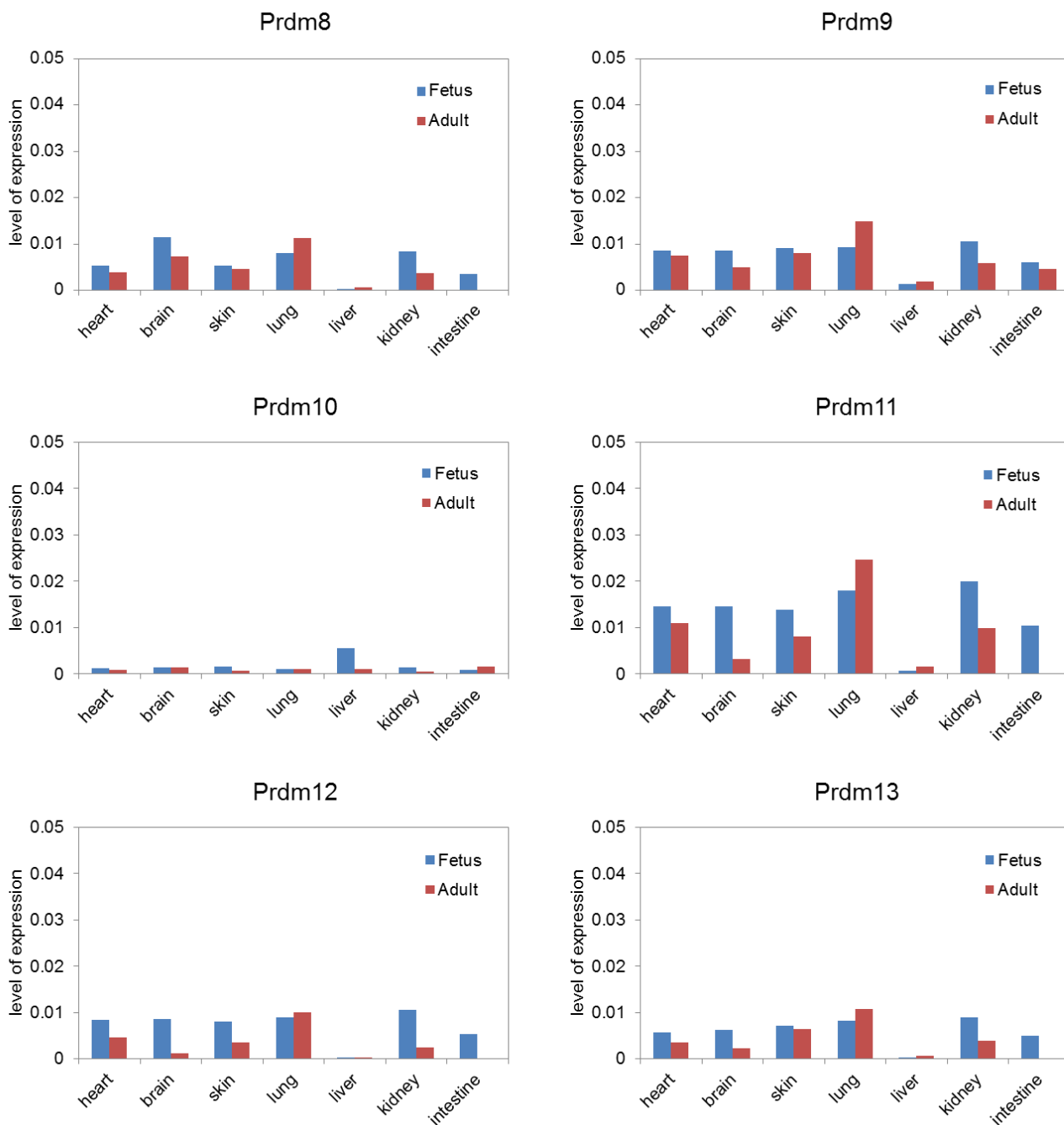


Figure 3-13. 定量 PCR を用いたマウス胎児および成体の各組織における Prdm1~16 の発現解析 (続き)

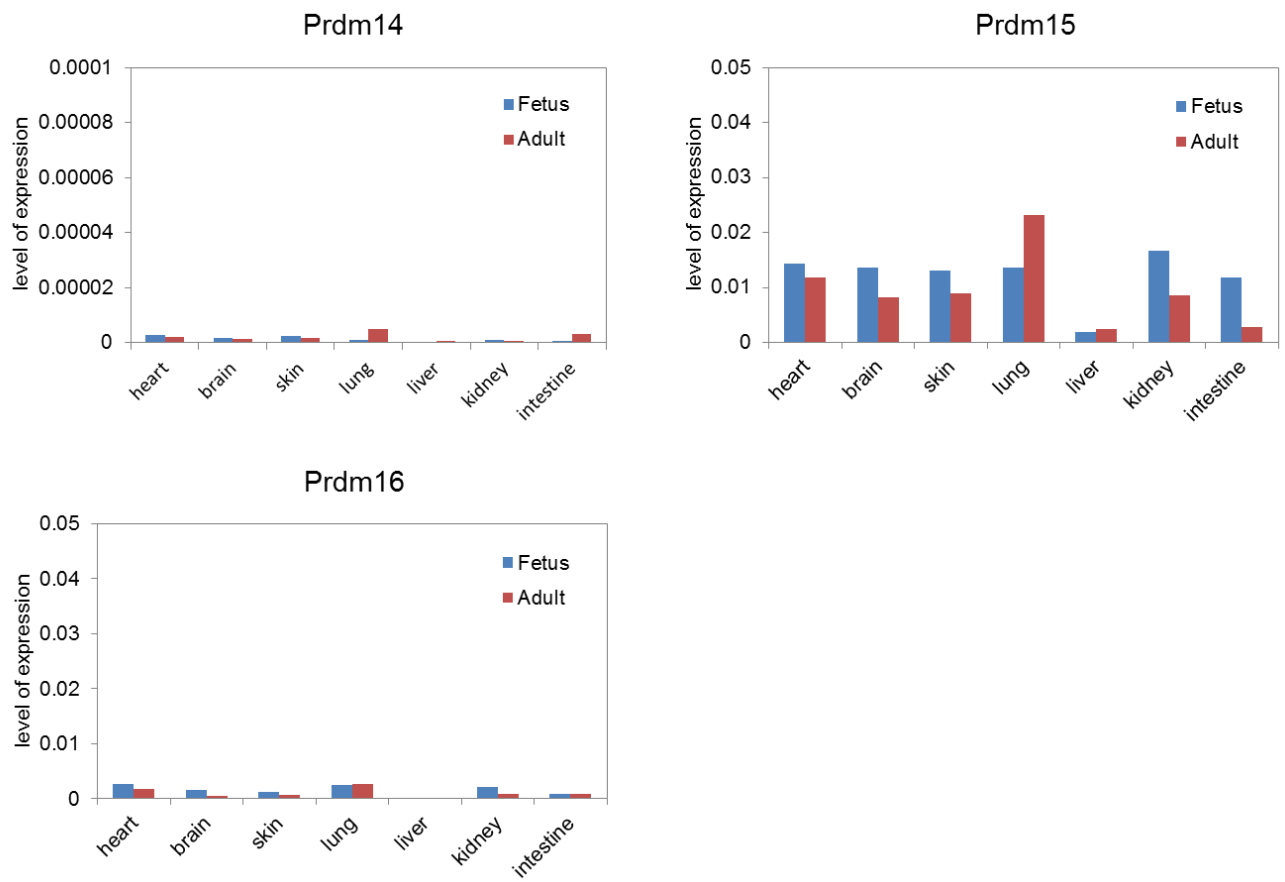


Figure 3-13. 定量 PCR を用いたマウス胎児および成体の各組織における Prdm1~16 の発現解析 (続き)

3-3-3. P19 細胞における Prdm13 の機能解析

DNA チップを用いた遺伝子発現解析の結果より、神経細胞分化過程において Prdm13 が興味深い発現パターンを示していたことから、P19 細胞の神経細胞分化過程において Prdm13 の関与が示唆された。そこで、P19 細胞の神経細胞分化過程において Prdm13 を過剰発現させ、神経細胞分化にどのような影響があるのか調べることにより機能解析を試みた。はじめに、Prdm13 の過剰発現用コンストラクトとして、Prdm13 を P19 細胞の total RNA から RT-PCR によって増幅し、EF1 プロモータの下流で過剰発現可能な pNucScrIII プラスミドベクター中に挿入した。P19 細胞へのプラスミド DNA 導入条件は、様々なトランスフェクション試薬を検討した結果 (データ未記載)、導入効率と生存率の観点から、Promega 社の FuGENE HD® Transfection Reagent を用いたリポフェクション法が最適と判断し、使用した。なお、P19 細胞へのプラスミド DNA 導入効率は 30~40%であった。作製したプラスミド DNA をリポフェクション法によって P19 細胞に導入後、種々の条件で培養を行い、定量 PCR によるマーカー遺伝子の経時的な発現解析や細胞の形態観察によって神経細胞分化状態を検討した。培養条件は、無処理 (non)、RA 曝露のみ (RA)、Prdm13 過剰発現 (Prdm13)、Prdm13 を過剰発現しさらに RA を曝露 (Prdm13+RA) の計 4 条件であり、0, 1, 3, 5 および 7 日目の 5 ポイントでサンプリングを行った。Figure 3-14d に Prdm13 過剰発現後の Prdm13 mRNA の発現量を示した。RA 曝露により、前述と同様、5 日目をピークとした Prdm13 の発現が検出された。一方、Prdm13 過剰発現条件では、1 日目において Prdm13 の発現が検出された。これは、導入したプラスミド DNA からの Prdm13 発現を示していると考えられるが、この発現は 3 日目には検出されず、導入したプラスミド DNA が消失した可能性がある。よって、プラスミド DNA 導入に

よる Prdm13 の過剰発現は一過的な短時間の Prdm13 発現状態を作り出したことになる。さらに、プラスミド DNA 導入後、RA を曝露した細胞でも 1 日目での Prdm13 の発現が認められ、さらに RA による誘導と考えられる Prdm13 の発現が 3~5 日目でも検出された。これらより、Prdm13 のプラスミド DNA 導入による過剰発現が起きていると考えられる。

各培養条件における神経細胞分化状態を解析した結果を Figure 3-14a, b, c に示した。ニューロンマーカー遺伝子 Ncam の発現をみると、RA 曝露によって、曝露後 5 日目にわずかに検出され、7 日目には発現が大きく上昇していた。一方、プラスミド DNA 導入細胞では、RA 曝露なしの細胞においても Ncam の発現が検出され、さらにその発現は 5 日目においても顕著に検出された。この結果は、プラスミド DNA 導入によって RA 曝露がなくても神経細胞分化が引き起こされたことを示している。また、それぞれの条件における細胞の様子を観察したところ、プラスミド DNA 導入細胞において、5 日目に神経突起の伸長が確認できた (Figure 3-15)。さらに、グリア細胞マーカー遺伝子 Gfap の発現状態を解析したところ、Gfap の発現はプラスミド DNA の導入には依存しておらず、グリア細胞分化は RA 曝露のみに依存して誘導されることが示唆された。

以上、Prdm13 過剰発現実験の結果より、Prdm13 はニューロン分化に機能する遺伝子であることが明らかとなった。一方、Gfap を誘導しないことから、グリア細胞分化には直接的な関与はせず、グリア細胞分化を誘導する転写因子との相互作用により間接的にグリア細胞分化に関与することが示唆された。

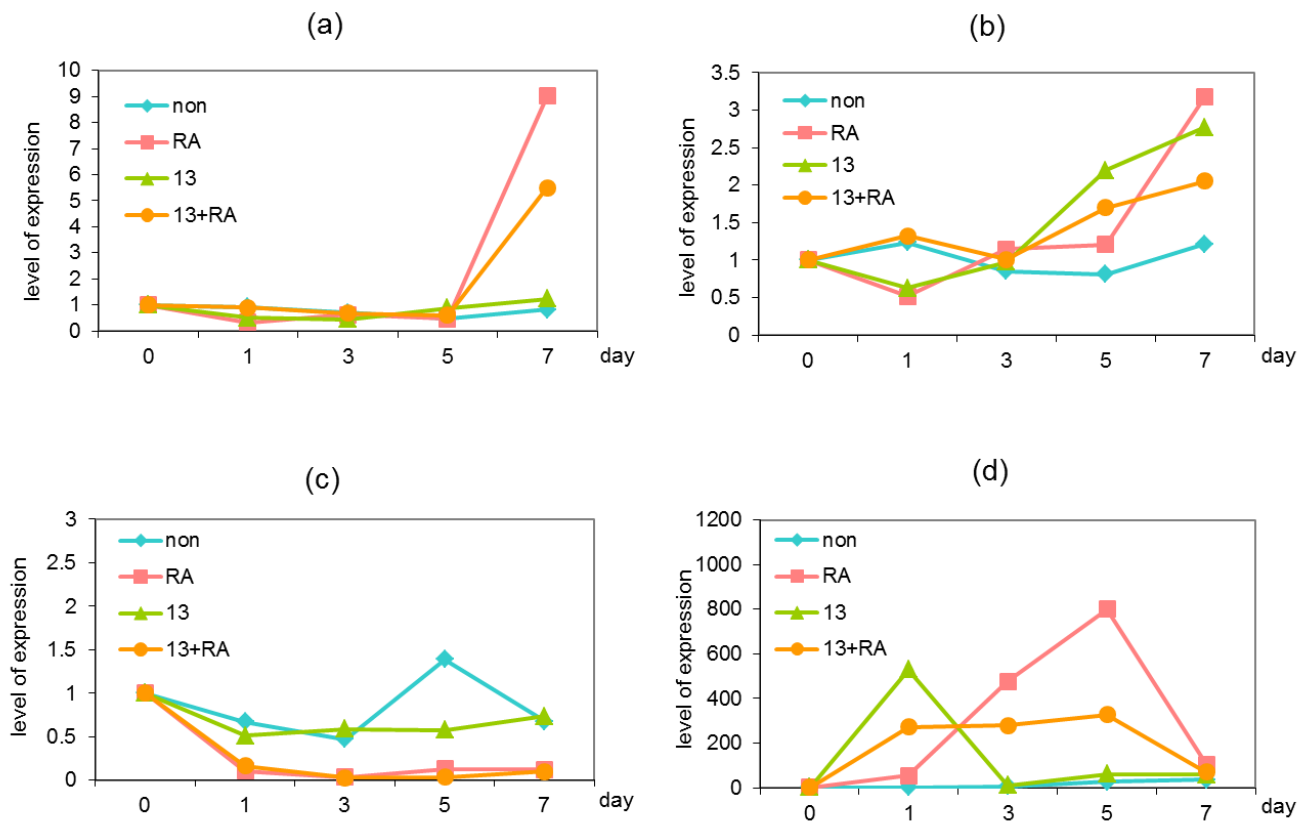


Figure 3-14. Prdm13 過剰発現による神経細胞分化への影響
 (a) Gfap, (b) Ncam, (c) Oct3/4, (d) Prdm13

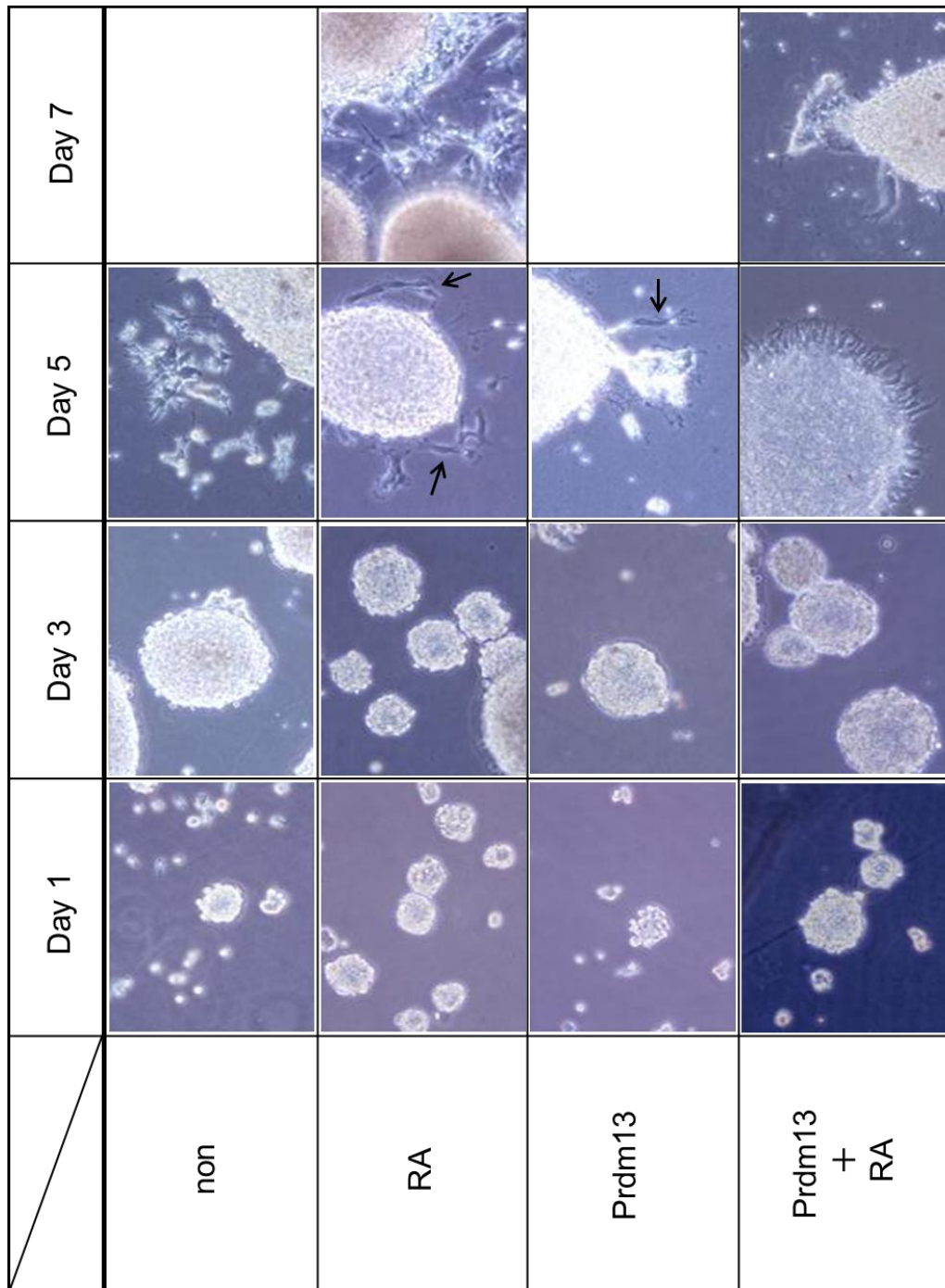


Figure 3-15. Prdm13 過剰発現による P19 細胞の様子
矢印は神経突起の伸長を示している。

3-4. 考察

3-4-1. P19 細胞分化における Prdm を含む SET 遺伝子群および各種分化マーカー遺伝子群の発現について

DNA チップを用いて、P19 細胞分化過程における Prdm を含む SET 遺伝子群の発現解析を行った。その結果、Illumina 社製の DNA チップを用いた発現解析では、Prdm13 が特徴的な発現パターンを示すことが明らかとなった。ほとんどの遺伝子が 0 日目と比較し約 4 倍以内で発現変化する中、Prdm13 は 6 日目において 10 倍以上に発現量が増加した。P19 細胞において 6 日目とは細胞がディッシュ表面に接着し、神経突起を伸ばし始める時期である。また、6 日目以降、発現量が増加する Ncam や Gfap と反対に、発現量が減少することから、Prdm13 は神経細胞分化初期において重要なシグナル因子である可能性がある。

Prdm13 以外に発現量の変化がみられた遺伝子として、Ash11, Ezh2, Mll1, Mll5, Prdm4, Smyd3 および Smyd2 があった。マウスの出生後の神経分化に関与する Mll1 (Lim et al. 2009) や、ミエロイド分化や造血幹細胞の自己増殖に関与する Mll5 (Heuser et al. 2009) など、発現量が増加していた遺伝子には、発生や神経に関与するものが含まれていた。一方、発現量が減少した遺伝子として Smyd2 がある。Smyd2 は筋分化関与の他、がん抑制遺伝子 p53 の 370 および 372 番目のリシン残基をメチル化し、p53 遺伝子の活性と抑制を担うことが明らかとなっている (Huang et al. 2006)。p53 はメチル化修飾を受ける数少ない非ヒストンタンパク質として非常に興味深い。

また、DNA チップおよび定量 PCR による発現解析の際、未分化細胞マーカーとして用いた Oct3/4 および神経幹細胞マーカー Nestin の発現変動につい

て、興味深い現象がみられた。通常、Oct3/4をはじめとする未分化維持に関与する転写因子は、細胞分化が進むにつれ発現量の減少がみられる。しかし、今回行った発現解析では、神経細胞分化過程後半において、わずかではあるが発現量が増加する傾向にあった。これは、神経細胞に分化できなかった P19 細胞の一部が増殖したためかもしれない。一方、Nestin は、神経細胞分化が進むにつれ発現量が減少するが、今回の解析では 3 日目に向け増加し、その後わずかに減少するという変化パターンがみられた。P19 細胞は本来、神経細胞に分化可能な外胚葉系の集団であると同時に、心筋や骨格筋にもなりうる中胚葉系の集団でもある。よって、P19 細胞は RA 曝露による分化誘導初期では、外胚葉および中胚葉両方の特徴を持った細胞であり、誘導が進むにつれ、外胚葉から神経幹細胞へと分化が進んだため、このような発現パターンを示したと考えられる。そして分化誘導後期は、神経幹細胞がニューロンやグリア細胞へと分化したことにより、Nestin の発現量が減少したものと予想される。

3-4-2. P19 細胞における Prdm13 の機能について

P19 細胞の神経細胞分化への関与が示唆された Prdm13 について、過剰発現用コンストラクトを作製し、神経細胞分化への影響を調べた。マーカー遺伝子を用いた PCR 解析の結果、プラスミド DNA 導入細胞では、Ncam は RA 曝露なしの細胞においても発現が検出され、その発現は RA 曝露のみの細胞と比較し、早い時期（5 日目）に起きていた。これはプラスミド DNA 導入による Prdm13 の発現が 1 日目の早い時期に起きたことに起因する可能性がある。一方、Gfap の発現状態はプラスミド DNA の導入には依存せず、RA 曝露によってのみ誘導されることから、Prdm13 はグリア細胞分化には直接関与しない

可能性がある。

過剰発現によって示唆された Prdm13 の神経細胞分化への関与を証明するには機能阻害実験が必要である。本研究において、siRNA を用いたノックダウンを試みてきた。詳細は省略するが、P19 細胞への siRNA 導入手法などの条件を検討し、Prdm13 siRNA (QIAGEN) を導入し、RA による神経細胞分化誘導を行ったが、5日目に発現上昇する Prdm13 の効果的な分解は認められず、本手法によるノックダウン実験は現時点では成功していない。今後、誘導プロモータ下での siRNA 発現コンストラクトを組み込んだ安定株の作製や、TALEN を利用したノックアウト細胞の作製により Prdm13 の機能を解明する必要がある。

ニューロンおよびグリア細胞は、共通の前駆細胞から分化する。この前駆細胞ははじめ、自己増殖を繰り返して細胞数を増やす。やがて非対称分裂を行い、1つの幹細胞と1つのニューロン前駆細胞をつくりだす。前者はさらに分裂を繰り返すが、後者はニューロンへと分化する。さらに発生段階が進むとグリア前駆細胞がつくられるようになる。このような神経発生の増殖および分化のバランスを支える分子として Notch が知られている。Notch はリガンドである Delta によって活性化され、Hes の転写を活性化する。Hes はニューロン分化に促進的にはたらく bHLH 型転写因子群の転写活性を阻害することで神経幹細胞の維持に機能している。ニューロンへの分化を促進する bHLH 型転写因子には、Ascl1, Atoh1, Atoh3, Neurogenin2 などがあり、いずれも神経幹細胞からニューロンへの分化を促進し、グリア細胞への分化抑制作用も持っている。また、これら bHLH 型転写因子群は、HD 型転写因子との組み合わせによりニューロンのサブタイプを規定している (Ross et al. 2003)。一方、グリア細胞への分化は LIF (leukemia inhibitory factor) が JAK/STAT 経

路を介して STAT3 をリン酸化し、これが核内へ移動して STAT3-p300 複合体を形成し、Gfap プロモータに結合して転写を活性化することによって促進される。また、神経幹細胞維持にはたらく Notch/Hes 経路が STAT3 を活性化し、グリア細胞への分化を促進することも明らかとなっている (Kamakura et al. 2004)。

Prdm13 プラスミド DNA 導入による過剰発現実験から得られた結果および現在明らかとなっている神経細胞分化機構の知見を基に、神経細胞分化への Prdm13 の役割についていくつかの可能性が考えられた。プラスミド DNA 導入による過剰発現の結果では、プラスミド DNA 導入依存的にニューロンマーカーである Ncam の発現が上昇したことから、Prdm13 がニューロン分化促進にのみ関与しているのではないかと考えられる。しかし、ニューロンおよびグリア細胞が共通の前駆細胞から分化することや、ニューロン分化を促進しグリア細胞分化を抑制する bHLH 型転写因子の存在から、Prdm13 もニューロン分化促進だけでなく、グリア細胞分化抑制に関与することが推測される。また、Prdm は DNA に結合する zinc finger ドメインを持つことから、ニューロン分化もしくはグリア細胞分化を制御する転写因子として、神経細胞分化に関与している可能性が考えられる。さらに、通常の RA 曝露による神経細胞分化誘導において Prdm13 が示した発現パターンは、5 日目もしくは 6 日目にピークを迎え、時間経過とともに発現量が減少する (Figure 3-4d, 3-5a, 3-11d)。Prdm13 が転写因子としてはたらくならば、一過的に発現量が上昇することでその先に続くニューロンやグリア細胞分化の制御をどのように維持しているのだろうか。Prdm13 は、直接ニューロンやグリア細胞をコードする遺伝子の転写因子としてはたらくのではなく、神経細胞分化に直接作用する他の因子を制御するマスター遺伝子の可能性も考えられる。Chang や

Hanotel らは、bHLH 型転写因子の 1 つ、Ptf1a が維持する GABA 作動性ニューロンとグルタミン酸作動性ニューロンのバランスに、Prdm13 が転写抑制因子として関与すると報告しており (Chang et al. 2013; Hanotel et al. 2014)、本研究における Prdm13 が神経細胞分化に間接的に機能するという仮説は、P19 細胞分化の場合にも当てはまるかもしれない。

第 5 章

結論

本研究は、ヒストンメチル化タンパク質である Prdm 遺伝子が動物の細胞分化や胚発生において、どのように発現し機能するか明らかにすることを目的として研究を行った。Prdm タンパク質はメチル基転移活性を有する SET ドメインと相同なアミノ酸配列を有する PR ドメインに加え、DNA 結合活性を有する zinc finger ドメインを持つことを特徴とするタンパク質である。ヒトでは 16 種類、マウスでは 15 種類の Prdm 遺伝子が同定されているが、詳細に機能解析されている遺伝子は数種類である。そこで本研究において、*X. laevis* 初期胚における胚発生での Prdm 遺伝子の発現を網羅的に解析し、その結果をふまえ、神経細胞に分化誘導可能な P19 細胞を用いて Prdm 遺伝子の発現および機能について解析を行った。

第 2 章では、まず、半定量 PCR によって *X. laevis* 初期胚の各発生ステージにおける Prdm 遺伝子群の発現解析を行った。その結果、*X. laevis* が持つすべての Prdm 遺伝子 15 種類が初期発生過程で発現しており、Prdm1, 2, 4, 9, 11, 15 は、母性由来として発現していたため、受精直後から発生に関わることが明らかとなった。さらに、WISH によって Prdm 遺伝子の発現組織を解析したところ、すべての遺伝子が様々な発生ステージで組織特異的に発現しており、組織形成の過程で機能していることが示唆された。特に、脊髄や目、耳、前脳、中脳、後脳、脳室など神経組織において Prdm 遺伝子の発現は顕著であり、*X. laevis* 初期胚の神経発生において Prdm 遺伝子は重要な機能を持つ可能性が示唆された。

第 3 章では、さらに詳細な解析を行うため、多能性を有する細胞株、P19 細胞を用いて神経および筋細胞分化における解析を行った。P19 細胞は RA 曝露により神経細胞へ、DMSO 曝露により心筋・骨格筋へ分化誘導が可能な細胞である。そこで、P19 細胞が再現するマウスの細胞分化過程における Prdm

遺伝子群の発現を解析するため、DNA チップを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、神経細胞分化誘導後 4 日目に Prdm8, 12, 13 の発現が一過的に誘導されることが明らかとなった。誘導後 4 日目は神経細胞分化が開始する時期とされており、Prdm8, 12, 13 は神経細胞分化の開始時にトリガーとして作用することが示唆された。一方で、心筋・骨格筋誘導後には Prdm6 の発現が一過的に誘導され、Prdm6 が心筋・骨格筋分化の開始時にトリガーとして作用する可能性も示された。さらに、P19 細胞の神経細胞分化における Prdm13 の機能を解明するため、Prdm13 遺伝子を過剰発現させ、神経細胞分化への影響を解析した。その結果、Prdm13 過剰発現はニューロン分化を特異的に誘導する機能を持つことが明らかとなった。

以上、本論文では、*X. laevis* 初期胚とマウス P19 細胞の細胞分化系を用いて、ヒストンメチル化タンパク質 Prdm の発現と機能解明を行い、細胞分化、特に神経細胞分化過程において Prdm 遺伝子が重要な機能を持つことを明らかにした。本論文の成果は、発生過程における細胞分化の分子機構解明に重要な知見をもたらし、エピジェネティック制御が細胞分化や発生に重要であることを裏付けるものである。最近、再生医療やクロマチン修飾関連因子をターゲットとした創薬研究などの実用分野においては、エピジェネティック制御のリプログラミングが重要な課題となっている。日本の死亡原因のトップであるがんをはじめとする様々な疾患の発生機序や老化にもエピジェネティック制御が関わるということが明らかとなっており、受精卵の誕生から老化のメカニズム、医療分野に至る様々な場面において、エピジェネティック制御機構のさらなる解明が求められている。

謝辞

本論文は、著者が九州大学大学院 システム生命科学府 システム生命科学専攻在学中、生命情報解析学研究室において行った研究である。

本研究を行うにあたり、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました、久原哲教授、田代康介准教授に深甚な謝意を申し上げます。思うように研究が進まず、何度も学位取得を諦めそうになった時、その度に見放さず、優しく励まし導いてくださったことは、感謝できません。研究者として、人生の先輩として先生方が教えてくださったたくさんのことを、これからの人生の糧とし、九州大学の名に恥じぬよう精進していきたいと思えます。

日々の研究に必要な基礎知識に関する御指導、研究を行うための環境を整えてくださった牟田滋助教授に深く感謝致します。

本論文を御精読頂きました片倉喜範准教授に心から謝意を申し上げます。

本研究室配属以前から現在まで、多岐にわたりご支援を賜りました宮崎寿美氏、安田香央里氏、榎本亜紀子氏、原会美氏に厚く御礼申し上げます。

本研究におけるアフリカツメガエルを用いた実験、および DNA チップ解析について多くのご支援を頂きました新井しのぶ氏、古賀隆将氏、富安由紀氏に厚く御礼申し上げます。

井上麻美氏、宮田有英氏をはじめ、わたしの研究生生活を助けてくださった生命情報解析学研究室の皆様、同期の皆様、そして友人の皆様に深く感謝致します。

最後に、長い間、自分の納得がいくような学生生活を送れるよう辛抱強く支援し、温かく見守ってくれた両親に感謝の意を表し、謝辞と致します。

参考文献

Abu-Farha M, Lambert JP, Al-Madhoun AS, Elisma F, Skerjanc IS, Figeys D (2008) The tale of two domains: Proteomics and genomics analysis of SMYD2, a new histone methyltransferase. *Mol Cell Proteomics* 7(3):560-572

Ancelin K, Lange UC, Hajkova P, Schneider R, Bannister AJ, Kouzarides T, Surani MA (2006) Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. *Nat Cell Biol* 8(6):623-630

Bard-Chapeau EA, Jeyakani J, Kok CH, Muller J, Chua BQ, Gunaratne J, Batagov A, Jenjaroenpun P, Kuznetsov VA, Wei CL, D'Andrea RJ, Bourque G, Jenkins NA, Copeland NG (2012) Ectopic viral integration site 1 (EVI1) regulates multiple cellular processes important for cancer and is a synergistic partner for FOS protein in invasive tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(6):2168-73

Beharry AW, Sandesara PB, Roberts BM, Ferreira LF, Senf SM, Judge AR (2014) HDAC1 activates FoxO and is both sufficient and required for skeletal muscle atrophy. *J Cell Sci* 127(Pt 7):1441-1453

Bikoff EK, Morgan MA, Robertson EJ (2009) An expanding job description for Blimp-1/PRDM1. *Curr Opin Genet Dev* 19:379-385

Brun ME, Gasca S, Girard C, Bouton K, De Massy B, De Sario A (2006) Characterization and expression analysis during embryo development of the mouse ortholog of MLL3. *Gene* 371:25-33

Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298(5595):1039-1043

Chang JC, Meredith DM, Mayer PR, Borromeo MD, Lai HC, Ou YH, Johnson JE (2013) Prdm13 mediates the balance of inhibitory and excitatory neurons in somatosensory circuits. *Dev Cell* 25:182-195

Chan YS, Göke J, Lu X, Venkatesan N, Feng B, Su IH, Ng HH (2013) A PRC2-dependent repressive role of PRDM14 in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cell reprogramming. *Stem Cells* 31:682-692

Cheng F, Liu J, Zhou SH, Wang XN, Chew JF, Deng LW (2008) RNA interference against mixed lineage leukemia 5 resulted in cell cycle arrest. *Int J Biochem Cell Biol* 40:2472-2481

Chia NY, Chan YS, Feng B, Lu X, Orlov YL, Moreau D, Kumar P, Yang L, Jiang J, Lau MS, Huss M, Soh BS, Kraus P, Li P, Lufkin T, Lim B, Clarke ND, Bard F, Ng HH (2010) A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature* 468:316-320

Chittka A, Chao MV (1999) Identification of a zinc finger protein whose subcellular distribution is regulated by serum and nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10705-10710

Chittka A, Nitarska J, Grazini U, Richardson WD (2012) Transcription factor positive regulatory domain 4 (PRDM4) recruits protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) to mediate histone arginine methylation and control neural stem cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem*

287:42995-43006

Clarke AS, Samal E, Pillus L (2006) Distinct roles for the essential MYST family HAT Esa1p in transcriptional silencing. *Mol Biol Cell* 17:1744-1757

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159

Davis CA, Haberland M, Arnold MA, Sutherland LB, McDonald OG, Richardson JA, Childs G, Harris S, Owens GK, Olson EN (2006) PRISM/PRDM6, a transcriptional repressor that promotes the proliferative gene program in smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 26:2626-2636

Derunes C, Briknarová K, Geng L, Li S, Gessner CR, Hewitt K, Wu S, Huang S, Woods LI Jr, Ely KR (2005) Characterization of the PR domain of RIZ1 histone methyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun* 333:925-934

de Souza FS, Gawantka V, Gómez AP, Delius H, Ang SL, Niehrs C (1999) The zinc finger gene *Xblimp1* controls anterior endomesodermal cell fate in Spemann's organizer. *EMBO J* 18:6062-6072

Eom GH, Kim K, Kim SM, Kee HJ, Kim JY, Jin HM, Kim JR, Kim JH, Choe N, Kim KB, Lee J, Kook H, Kim N, Seo SB (2009) Histone methyltransferase PRDM8 regulates mouse testis steroidogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 388:131-136

Fumasoni I, Meani N, Rambaldi D, Scafetta G, Alcalay M, Ciccarelli FD (2007) Family expansion

and gene rearrangements contributed to the functional specialization of PRDM genes in vertebrates.

BMC Evol Biol 7:187

Galli GG, Carrara M, Francavilla C, de Lichtenberg KH, Olsen JV, Calogero RA, Lund AH (2013)

Genomic and proteomic analyses of Prdm5 reveal interactions with insulator binding proteins in embryonic stem cells. Mol Cell Biol 33:4504-4516

Giallourakis CC, Benita Y, Molinie B, Cao Z, Despo O, Pratt HE, Zukerberg LR, Daly MJ, Rioux JD,

Xavier RJ (2013) Genome-wide analysis of immune system genes by expressed sequence Tag profiling. J Immunol 190:5578-5587

Gyory I, Wu J, Fejér G, Seto E, Wright KL (2004) PRDI-BF1 recruits the histone H3

methyltransferase G9a in transcriptional silencing. Nat Immunol 5:299-308

Hayashi K, Yoshida K, Matsui Y (2005) A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events

required for meiotic prophase. Nature 438:374-378

Hanotel J, Bessodes N, Thélie A, Hedderich M, Parain K, Van Driessche B, Brandão Kde O, Kricha

S, Jorgensen MC, Grapin-Botton A, Serup P, Van Lint C, Perron M, Pieler T, Henningfeld KA,

Bellefroid EJ (2014) The Prdm13 histone methyltransferase encoding gene is a Ptf1a-Rbpj

downstream target that suppresses glutamatergic and promotes GABAergic neuronal fate in the dorsal neural tube. Dev Biol 386:340-357

Harms MJ, Ishibashi J, Wang W, Lim HW, Goyama S, Sato T, Kurokawa M, Won KJ, Seale P (2014)

Prdm16 is required the maintenance of brown adipocyte identity and function in adult mice. *Cell Metab* 19:593-604

He L, Yu JX, Liu L, Buyse IM, Wang MS, Yang QC, Nakagawara A, Brodeur GM, Shi YE, Huang S (1998) RIZ1, but not the alternative RIZ2 product of the same gene, is underexpressed in breast cancer, and forced RIZ1 expression causes G2-M cell cycle arrest and/or apoptosis. *Cancer Res* 58:4238-4244

Heuser M, Yap DB, Leung M, de Algora TR, Tafech A, McKinney S, Dixon J, Thresher R, Colledge B, Carlton M, Humphries RK, Aparicio SA (2009) Loss of MLL5 results in pleiotropic hematopoietic defects, reduced neutrophil immune function, and extreme sensitivity to DNA demethylation. *Blood* 113:1432-1443

Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ, Sengupta R, Richter M, Dorsey JA, Kubicek S, Opravil S, Jenuwein T, Berger SL (2006) Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature* 444:629-632

Huang YC, Shih HY, Lin SJ, Chiu CC, Ma TL, Yeh TH, Cheng YC (2014) The epigenetic factor Kmt2a/Mll1 regulates neural progenitor proliferation and neuronal and glial differentiation. *Dev Neurobiol* doi: 10.1002/dneu.22235

Inoue M, Kuroda T, Honda A, Komabayashi-Suzuki M, Komai T, Shinkai Y, Mizutani K (2014) Prdm8 regulates the morphological transition at multipolar phase during neocortical development. *PLoS One* 9:e86356

Kamakura S, Oishi K, Yoshimatsu T, Nakafuku M, Masuyama N, Gotoh Y (2004) Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signaling. *Nat Cell Biol* 6:547-554

Karmodiya K, Analika K, Muley V, Pradhan SJ, Bhide Y, Galande S (2014) Camello, a novel family of Histone Acetyltransferases that acetylate histone H4 and is essential for zebrafish development. *Sci Rep* 4:6076

Kato S, Inoue K, Youn MY (2010) Emergence of the osteo-epigenome in bone biology. *IBMS BoneKEy* 7:314-324

Kawamura S, Yoshigai E, Kuhara S, Tashiro K (2008) smyd1 and smyd2 are expressed in muscle tissue in *Xenopus laevis*. *Cytotechnology* 57:161-168

Kim KC, Geng L, Huang S (2003) Inactivation of a histone methyltransferase by mutations in human cancers. *Cancer Res* 63:7619-7623

Kinameri E, Inoue T, Aruga J, Imayoshi I, Kageyama R, Shimogori T, Moore AW (2008) Prdm proto-oncogene transcription factor family expression and interaction with the Notch-Hes pathway in mouse neurogenesis. *PLoS One* 3:e3859

Klose RJ and Zhang Y (2007) Regulation of histone methylation by demethylination of demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:307-318

Komai T, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Shinkai Y (2009) Expression of the mouse PR

domain protein Prdm8 in the developing central nervous system. *Gene Expr Patterns* 9:503-514

Kuo YM, Henry RA, Andrews AJ (2014) A quantitative multiplexed mass spectrometry assay for studying the kinetic of residue-specific histone acetylation. *Methods* S1046-2023:00261-00268

Lim DA, Huang YC, Swigut T, Mirick AL, Garcia-Verdugo JM, Wysocka J, Ernst P, Alvarez-Buylla A (2009) Chromatin remodeling factor Mll1 is essential for neurogenesis from postnatal neural stem cells. *Nature* 458:529-533

McBurney MW, Rogers BJ (1982) Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev Biol* 89:503-508

Meani N, Pezzimenti F, Deflorian G, Mione M, Alcalay M (2009) The tumor suppressor PRDM5 regulates Wnt signaling at early stages of zebrafish development. *PLoS One* 4:e4273

Moore AW, Jan LY, Jan YN (2002) hamlet, a binary genetic switch between single- and multiple-dendrite neuron morphology. *Science* 297:1355-1358

Niewkoop P.D., J. Faber (1994) *Normal table of Xenopus laevis (daudin)*. Garland Publishing, New York and London

Park JA, Kim KC (2010) Expression patterns of PRDM10 during mouse embryonic development. *BMB Rep* 43:29-33

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) Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 methyltransferases required for mammalian heterochromatin integrity. *Cell* 150:948-960

Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferase. *Nature* 406:593-599

Ross SE, Greenberg ME, Stiles CD (2003) Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* 39:13-25

Ross SE, McCord AE, Jung C, Atan D, Mok SI, Hemberg M, Kim TK, Salogiannis J, Hu L, Cohen S, Lin Y, Harrar D, McInnes RR, Greenberg ME (2012) Bhlhb5 and Prdm8 form a repressor complex involved in neuronal circuit assembly. *Neuron* 73:292-303

Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scimè A, Devarakond S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM (2008) PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454:961-967

Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, Giltane JM, Yang L, Zhao H, Calame K, Staudt LM (2002) Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 17:51-62

Shibuya K, Kudoh J, Okui M, Shimizu N (2005) Identification of a novel zinc finger protein gene

(ZNF298) in the GAP2 of human chromosome 21q. *Biochem Biophys Res Commun* 332:557-568

Thoren LA, Fog CK, Jensen KT, Buza-Vidas N, Côme C, Lund AH, Porse BT (2013) PRDM11 is dispensable for the maintenance and function of hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cell Res* 11:1129-1136

Verdone L, Agricola E, Caserta M, Di Mauro E (2006) Histone acetylation in gene regulation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5:209-221

Wang C, Xia C, Bian W, Liu L, Lin W, Chen YG, Ang SL, Jing N (2006) Cell aggregation-induced FGF8 elevation is essential for P19 cell neural differentiation. *Mol Biol Cell* 17:3075-3084

Wu Y, Ferguson JE 3rd, Wang H, Kelley R, Ren R, McDonough H, Meeker J, Charles PC, Wang H, Patterson C (2008) PRDM6 is enriched in vascular precursors during development and inhibits endothelial cell proliferation, survival, and differentiation. *J Mol Cell Cardiol* 44:47-58

Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, Yamanaka K, Ohinata Y, Saitou M (2008) Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet* 40:1016-1022

Yang CM, Shinkai Y (2013) Prdm12 is induced by retinoic acid and exhibits anti-proliferative properties through the cell cycle modulation of P19 embryonic carcinoma cells. *Cell Struct Funct* 38:197-206

Yoon KA, Park S, Hwangbo B, Shin HD, Cheong HS, Shin HR, Lee JS (2007) Genetic polymorphisms in the Rb-binding zinc finger gene RIZ and the risk of lung cancer. *Carcinogenesis* 28:1971-1977

Zou JN, Wang SZ, Yang JS, Luo XG, Xie JH, Xi T (2009) Knockdown of SMYD3 by RNA interference down-regulates c-Met expression and inhibits cells migration and invasion induced by HGF. *Cancer Lett* 280:78-85