



Title	Brd2 is required for cell cycle exit and neuronal differentiation through the E2F1 pathway in mouse neuroepithelial cells
Author(s)	爪, 麻美
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59740">https://hdl.handle.net/11094/59740</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	つめ ま み
博士の専攻分野の名称	博 士（医学）
学 位 記 番 号	第 2 5 7 1 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 11 月 15 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Brd2 is required for cell cycle exit and neuronal differentiation through the E2F1 pathway in mouse neuroepithelial cells  (Brd2 遺伝子はマウス神経上皮細胞において E2F1 経路を介して細胞周期の離脱と神経分化に働く)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 松尾 勲  (副査) 教 授 近藤 寿人 教 授 仲野 徹

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 目 的 〕

神経上皮細胞における細胞周期と関連した細胞増殖と神経分化の制御は、中枢神経系の発生に重要な役割を果たしている。培養細胞を用いた生化学的な実験から、Brd2タンパク質はヒストンのアセチル化されたリジン残基に結合し転写を調節すること、細胞周期の進行に関与するE2F因子と結合して細胞の増殖や分化に関わることが示唆されている。しかし、マウス中枢神経系の発生過程における*Brd2*遺伝子の機能は明らかにされていない。そこで本研究では、トランスジーン挿入変異体のスクリーニングにより得られた*Brd2*欠損変異体を用いて表現型解析を行うことで、*Brd2*遺伝子の神経上皮における役割について明らかにした。

### 〔 方法ならびに成績 〕

当研究室で得られていたマウストランスジーン挿入変異体のラインは、胎齢13.5日目までに劣性致死となり、頭部神経管閉鎖不全を示した。最初に、本変異体の原因遺伝子を特定するため、トランスジーン挿入部位を決定した。Chromosomal FISHおよびinverse PCRを行った結果、トランスジーンはマウス第17番染色体上のB1領域の*Brd2*遺伝子座に挿入されており、*Brd2*遺伝子の第2イントロン以降の遺伝子領域を含む内在性のゲノム領域33.9kbを欠失していることが判明した。実際、10.5日目胚から抽出したmRNAを用いてRT-PCRを行ったところ、*Brd2*遺伝子の発現はトランスジーンホモ胚で失われていることが確認された。さらに、ホモ胚においてユビキタスに*Brd2* cDNAを発現させることで、頭部神経管閉鎖不全がレスキューされたことから、*Brd2*遺伝子が本変異体の原因遺伝子であると結論づけた。

以後、本*Brd2*欠損変異体の表現型解析を進めた。形態学および組織学的な観察から、*Brd2*欠損胚の神経上皮は野生型胚と比べて折れ曲がり、肥厚していることが分かった。*Brd2*遺伝子の発現が、神経上皮の異常と関与しているか検討するために*in situ* hybridizationを行ったところ、*Brd2* mRNAの発現はマウス発生過程において中枢神経系の広範囲にわたって認められた。特に10.5日目胚の菱脳領域では、*Brd2* mRNAが強く発現していた。さらに、神経上皮においてBrd2タンパク質の発現解析を行った。マウスBrd2タンパク質に対して免疫組織染色が可能な抗体が得られなかったため、Brd2とGFP（緑色蛍光タンパク質）との融合タンパク質を産生する*Brd2* BACトランスジェニックマウスを作製し、Brd2-GFP融合タンパク質の発現を調べたところ、神経上皮で強く発現していることが分かった。

次に、神経上皮の形態学的な観察から、*Brd2*欠損胚では、神経上皮細胞の増殖や神経分化に異常があるのではないかと考え、免疫組織化学を用いたマーカー解析を行った。神経分化に関わる特異的なマーカー(Tuj1, Kipl<sup>27</sup>)を用い

たところ、*Brd2*欠損胚の神経上皮では、細胞周期を離脱した細胞数および分化した神経細胞の数が減少していることが分かった。対照的に、増殖期にあるKi67陽性細胞数が増加し、DNA合成期におけるEdU（BrdU類似体）の取り込みが増え、S期への進行が亢進していた。これらの結果から、*Brd2*は神経上皮細胞が細胞周期から離脱し、神経細胞へと分化するために必要であることが分かった。

さらに、Brd2はE2F1やE2F2と結合して細胞周期進行に関わる遺伝子の転写を制御することが示唆されていることから、Brd2がE2Fを介して機能しているかについて検討した。細胞周期の進行において転写活性化に働く*E2F1*、*E2F2*および*E2F3*遺伝子のうち、*E2F1*のmRNAの発現が*Brd2*と同様に菱脳で最も強く発現していたので、*E2F1*を第一候補とした。*Brd2*欠損胚で見られた異常が*E2F1*遺伝子を欠失させるとどのように変化するかを調べるため、*Brd2*・*E2F1*ダブルホモ変異胚を採集し、表現型を解析した。その結果、*Brd2*欠損胚で見られた神経分化や細胞増殖の異常は、*E2F1*遺伝子を欠損させることで正常方向へと回復した。

### 〔 総 括 〕

*Brd2*欠損変異体の表現型を解析することで、*Brd2*遺伝子を欠失した神経上皮細胞では、細胞周期から離脱して神経へと分化する細胞数が減少し、増殖中の細胞数が増加することが示された。さらに、*Brd2*と*E2F1*を遺伝学的に二重欠損させることで、*Brd2*欠損胚で見られた神経分化や細胞増殖の異常は正常方向へと回復した。これらの知見は、*Brd2*遺伝子が神経上皮細胞においてE2F1経路を介して細胞周期の離脱と神経細胞への分化に働くことを示している。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者は、最初に当研究室で新規に得られたトランスジーン挿入による劣性致死マウス変異体の原因遺伝子の特定を行った。主に分子遺伝学的手法などを用いることで、頭部神経管閉鎖不全を示す本変異の原因が*Brd2*遺伝子欠損によることを明らかにした。次に、本*Brd2*欠損変異胚の中枢神経系における表現型を詳細に解析することによって、Brd2は、神経上皮細胞において、細胞周期から離脱し神経へ分化するために必須な分子であることを示した。更に、*Brd2*遺伝子と*E2F1*遺伝子のダブルホモ変異胚の表現型を解析することで、Brd2は細胞周期進行に働くE2F1経路を介して細胞周期の離脱と神経分化へ働くことを示した。神経上皮細胞における細胞周期と関連した神経分化の制御機構は、中枢神経系の発生と密接に関係している点、更にはその破綻が神経管閉鎖不全や精神・神経疾患の発症原因となっていることが示唆されている点から、本論文で明らかにされた内容は学術的意義が高く、博士（医学）の学位授与に値する。