

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14350

研究課題名(和文) 神経細胞分化におけるDNA修復酵素の1分子蛍光イメージング解析

研究課題名(英文) A study of DNA repair dynamics during neuronal differentiation using single-molecule imaging

研究代表者

菅生 紀之(SUGO, Noriyuki)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：20372625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：転写やクロマチン構造制御に加えてDNA修復機構は神経細胞分化において重要な要因であるが、どのような分子動態が機能に結びついているのかに関しては不明な点が多い。本研究では、マウス及びヒト神経細胞においてDNA修復酵素を1分子蛍光イメージングで可視化し、分化過程での核内動態を明らかにすることを旨とした。その結果、培養したマウス大脳皮質神経細胞の核内でDNA修復酵素の一つであるDNAポリメラーゼの動態を調べることに成功した。

研究成果の概要(英文)：DNA repair is an important mechanism in neuronal differentiation, in addition to transcription and chromatin regulation. Here, we examined DNA repair dynamics during neuronal differentiation using single-molecule imaging technique. We revealed the dynamics of DNA polymerase, one of DNA repair enzymes, in the nucleus of cortical neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：神経細胞 DNA損傷 エピジェネティクス 転写 1分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は、神経前駆細胞からの最終分裂後に適切な領域へ移動し神経回路を形成する。この分化過程は遺伝的に時系列が固定化されている一方、経験や学習といった神経活動に応答し可塑的に変化する側面を持ち、多様な神経細胞に基づいた脳機能構築に寄与していると考えられる。いずれも遺伝子発現を伴うが、その制御メカニズムは不明な点が多い。国内外においてクロマチン構造制御が注目されているが、その一方で国外においては次世代シーケンサーによる1個の神経細胞での全ゲノム解析が進められ、遺伝子コピー数変化とそれがモザイク状に個々の神経細胞で異なっていることが示されている (McConnell MJ, 2013)。これはつまり、神経細胞のゲノムが塩基配列のレベルで多様である可能性を示唆している。加えて、自閉症に代表される神経発達障害は、家族性遺伝と共に孤発的な突然変異が局所神経回路に異常を引き起こして発症すると考えられている。このようにゲノムの可塑性や維持の重要性が明らかになりつつあるが、神経細胞分化において何時何処どのようにDNA修復が必要とされているのかに関しては不明な点が多く、分子基盤の確立が急務である。これまで申請者らは、ノックアウトマウスの解析から神経細胞分化におけるDNA修復酵素DNAポリメラーゼβの必要性を明らかにしてきた (Sugo N, 2000; Sugo N, 2004; Sugo N, 2007)。また、数多くの他のDNA修復酵素の同様な解析でも、その重要性が示唆されている (総説 McKinnon PJ, 2013)。このような経緯から、転写因子やクロマチン構造制御因子に加えてDNA修復酵素が神経細胞分化において重要な因子であり、その反応過程を調べることで分化メカニズムを解明する上で鍵になると考えている。この課題に取り組むため方法論として、これまで初代培養大脳皮質神経細胞の転写因子を1分子蛍光イメ

ージングで捉え、その動態を定量的に計測することに成功している。

2. 研究の目的

DNA修復酵素は、神経細胞分化において重要な因子であると考えられるが、生理的意義は不明な点が多い。本研究では、これまで進めてきた遺伝学的手法に加えて、マウス及びヒト神経細胞分化において遺伝子座とDNA修復酵素の相互作用を1分子蛍光イメージングで可視化して核内空間配置と動態をとらえることで、新たな観点からその役割を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞分化におけるDNAポリメラーゼβの機能の理解を深めるため、DNAポリメラーゼβ欠損マウスの表現型解析を進めた。さらに、ヒト神経細胞におけるDNA修復酵素の役割を明らかにするため、ヒトiPS細胞を用いてDNAポリメラーゼβ欠損細胞株を作製した。そして、神経前駆細胞さらに神経細胞へと分化誘導を行って表現型を調べた。

(2) 神経細胞におけるDNA修復酵素の1分子動態を明らかにするため、幾つかのDNA修復酵素とタグタンパク質 (HaloTag) との融合タンパク質を発現するベクターの作製を行った。この発現ベクターをマウス大脳皮質神経細胞の初代分散培養に導入した。その後、タグに特異的に結合する蛍光色素で標識し、斜光レーザー顕微鏡による観察を行った。

(3) DNA損傷は染色体上に非特異的に生じるのか、もしくは特定の遺伝子座に起こりやすいのかをPCR法によって解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト神経細胞でDNA修復酵素の役割を明らかにするため、ヒトiPS細胞を用いてDNA修復酵素の一つであるDNAポリメラーゼの遺伝子破壊を試みた。遺伝子ターゲ

ティング法と CRISPR/Cas9 法とを組み合わせた方法によって、DNA ポリメラーゼ を欠損した複数のヒト iPS 細胞株をすることに成功した。この DNA ポリメラーゼ 欠損ヒト iPS 細胞株を分化誘導して作製した神経前駆細胞は、DNA ポリメラーゼ 欠損マウス由来の神経前駆細胞と同様に、野生型に比べて DNA 塩基損傷に対して高い感受性を示した。その一方、DNA 2 本鎖切断損傷に対する感受性は野生型と同様であることがわかった。以上のことから、DNA ポリメラーゼ はヒト神経前駆細胞においても DNA 修復経路の一つである塩基除去修復の経路に必要であることが示された。本研究成果の一部を国内学会にて発表を行った。本研究の基盤となる CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊法に関する研究を学会で発表すると共に、研究論文を発表した。さらに、マウス神経前駆細胞においてエピジェネティクス制御として知られる DNA 脱メチル化機構に DNA ポリメラーゼ が必要であることを明らかにした。本研究成果を国内外の学会で発表すると共に、研究論文として発表した。

(2) 幾つかの DNA 修復酵素と HaloTag タグタンパク質の融合タンパク質を発現するベクターを作製し、マウス大脳皮質神経細胞の初代分散培養に遺伝子導入した。発現した酵素を蛍光標識し、斜光レーザー顕微鏡により観察したところ、核内に動的な DNA ポリメラーゼ の輝点を検出することに成功した。加えて、変異原物質による DNA 損傷や神経活動に対する応答性を調べた。また、本研究の基盤となる神経活動依存的な転写因子の核内 1 分子動態計測の成果を学会発表すると共に研究論文を発表した。

(3) DNA ポリメラーゼ 欠損マウス神経細胞のトランスクリプトーム解析を進め、野生型とは異なる発現を示す遺伝子群を同定

した。それに基づき、特定遺伝子座の発現量と DNA 損傷との関係を明らかにするために、qRT-PCR 法による遺伝子発現解析と PCR 法を基盤とした DNA 損傷の定量解析を進めている。

研究期間を通じて、神経細胞において 1 分子レベルで DNA 修復酵素の動態を観察することに成功すると共に、DNA ポリメラーゼ 欠損マウス及びヒト iPS 細胞の遺伝的な解析を行い、神経細胞分化の新たな原理・法則性の発見に繋がる成果を得ることができた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Kohei Onishi, Akiko Uyeda, Mistuhiro Shida, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto, Noriyuki Sugo
Genome Stability by DNA polymerase β in Neural Progenitors Contributes Neuronal Differentiation in Cortical Development
J Neurosci, 37:8444-8458 (2017) (査読・有)
doi: 10.1523/JNEUROSCI.0665-17.2017

Hiroto Tsunematsu, Akiko Uyeda, Nobuhiko Yamamoto, Noriyuki Sugo
Immunocytochemistry and fluorescence imaging efficiently identify individual neurons with CRISPR/Cas9-mediated gene disruption in primary cortical cultures
BMC Neurosci, 18: 55 (2017) (査読・有)
doi: 10.1186/s12868-017-0377-9.

Ricardo Alchini, Haruka Sato, Naoyuki Matsumoto, Tomomi Shimogori, Noriyuki Sugo, Nobuhiko Yamamoto
Nucleocytoplasmic Shuttling of Histone Deacetylase 9 Controls Activity-Dependent Thalamocortical Axon Branching
Sci Rep, 7:6024 (2017) (査読・有)
doi: 10.1038/s41598-017-06243-7.

Hironobu Kitagawa, Noriyuki Sugo, Masatoshi Morimatsu, Yoshiyuki Arai, Toshio Yanagida, Nobuhiko Yamamoto.
Activity-Dependent Dynamics of the Transcription Factor CREB in Cortical Neurons Revealed by Single-Molecule Imaging. *J Neurosci*, 37:1-10 (2017) (査読・有)
doi: 10.1523/JNEUROSCI.0943-16.2016.

Noriyuki Sugo, Nobuhiko Yamamoto
Visualization of HDAC9 Spatiotemporal Subcellular Localization in Primary Neuron

Cultures. *Mehotds Mol Biol*, 1436:119-27 (2016)
(査読・有)
doi: 10.1007/978-1-4939-3667-0_9.

〔学会発表〕(計 2 1 件)

1 菅生紀之、大西公平、植田堯子、至田充宏、平山晃斉、八木健、山本亘彦
大脳皮質神経細胞分化における DNA ポリメラーゼによるゲノム恒常性維持
2017年10月8日 第39回神経組織培養研究会 サンプラザシーズンズ(愛知県・名古屋市)

2 Noriyuki Sugo, Kohei Onishi, Akiko Uyeda, Mistuhiro Shida, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto
Genome stability by DNA polymerase β is Critical for Neuronal Differentiation in Cortical Development
Gene regulatory mechanisms in neural fate decisions 2017年9月9日 (San Juan de Alicante, Spain)

3 植田堯子、菅生紀之、大西公平、平山晃斉、八木健、山本亘彦
生後発達期の脳皮質ニューロンにおける DNA ポリメラーゼ β の役割
2017年7月22日 第40回日本神経科学大会 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

4 恒松大翔、菅生紀之、黒沢綾、足立典隆、山本亘彦
iPS細胞を利用したヒト神経発生過程における DNA ポリメラーゼ β の機能解析
2017年7月22日 第40回日本神経科学大会 幕張メッセ(千葉県・千葉市)

5 菅生紀之
神経活動依存的な転写因子動態の1分子蛍光イメージング解析
第69回日本細胞生物学会シンポジウム「クラップ&ビルド・システムによる神経制御」
2017年6月13日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)招待講演

6 大西公平、菅生紀之、植田堯子、至田充宏、平山晃斉、八木健、山本亘彦
神経前駆細胞における DNA ポリメラーゼ β によるゲノム恒常性維持が発生期脳皮質の神経細胞分化に必要である
2017年5月27日 第64回日本生化学会近畿支部例会 大阪大学豊中キャンパス(大阪府・豊中市)

7 菅生紀之
1 分子蛍光イメージングによる転写因子 CREB の神経活動依存的動態の解析
日本発生生物学会秋季シンポジウム「発生と機能のイメージング」 2016年11月19日 三島市市民文化会館(静岡県・三島市)招待講演

8 Noriyuki Sugo, Kohei Onishi, Akiko Uyeda, Mistuhiro Shida, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto
Maintaining Genome Integrity by DNA polymerase beta in Neural Progenitors is Critical for Postmitotic Neuronal Development
The Brain Mosaic, cellular heterogeneity in the CNS 2016年9月22日 (Leuven, Belgium)

9 Noriyuki Sugo
“Genome maintenance by DNA polymerase β in neural progenitors is critical for postmitotic neuronal development”
国際シンポジウム **Circuit Construction in the Mammalian Brain** 2016年8月8日 大阪大学吹田キャンパス(大阪府・吹田市)招待講演

10 Hironobu Kitagawa, Noriyuki Sugo, Nobuhiko Yamamoto
Single-Molecule imaging reveals activity-dependent dynamics of the transcription factor CREB in cortical neurons
Circuit Construction in the Mammalian Brain
2016年8月8日 大阪大学吹田キャンパス(大阪府・吹田市)

11 Kohei Onishi, Akiko Uyeda, Mistuhiro Shida, Noriyuki Sugo, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto
Genome integrity maintained by DNA polymerase β in neural progenitors is required for postmitotic

neuronal development

Circuit Construction in the Mammalian Brain

2016年8月8日 大阪大学吹田キャンパス
(大阪府・吹田市)

12 Hiroto Tsunematsu, Noriyuki Sugo, Akiko Uyeda, Nobuhiko Yamamoto
Efficient disruption of gene function with CRISPR/Cas9 system in cultured primary cortical neurons

Circuit Construction in the Mammalian Brain

2016年8月8日 大阪大学吹田キャンパス
(大阪府・吹田市)

13 Akiko Uyeda, Noriyuki Sugo, Kohei Onishi, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto
DNA polymerase β is required for maintaining genome stability in postnatal cortical development

Circuit Construction in the Mammalian Brain

2016年8月8日 大阪大学吹田キャンパス
(大阪府・吹田市)

14 Kohei Onishi, Noriyuki Sugo, Akiko Uyeda, Shunsuke Toyoda, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto
DNA polymerase beta function in neural progenitors is required for postmitotic neuronal survival and differentiation in the developing cortex

2016年7月20日 第39回日本神経科学大会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

15 Akiko Uyeda, Noriyuki Sugo, Kohei Onishi, Shunsuke Toyoda, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto

Involvement of DNA polymerase beta in postnatal development of cortical neurons
2016年7月20日 第39回日本神経科学大会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

16 Noriyuki Sugo, Hironobu Kitagawa, Nobuhiko Yamamoto.
Activity-dependent movement of CREB in cortical neuron in vitro: A study using single-molecule imaging.

ASC2016 2016年3月3日 同志社大学
(京都府・京都市)

17 恒松大翔、植田堯子、菅生紀之、山本亘彦

Efficient Disruption of CREB Function Using CRIPR/Cas9 System in Primary Cortical Neurons

2015年12月6日 遺伝学会研究会・哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム(静岡県・三島市)

18 植田堯子、大西公平、菅生紀之、豊田峻輔、平山晃斉、八木健、山本亘彦
生後発達過程の大脳皮質において PoI 欠損神経細胞は2本鎖DNA切断を異常に蓄積させる

2015年12月3日 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会(BMB2015)(兵庫県・神戸市)

19 Kohei Onishi, Noriyuki Sugo, Shunsuke Toyoda, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto
DNA polymerase beta activity in neural progenitors is required for postmitotic neuronal survival in the developing cortex
2015年10月18日 **Neuroscience 2015**
(Chicago, USA)

20 Hironobu Kitagawa, Noriyuki Sugo, Nobuhiko Yamamoto
Activity-dependent dynamics of CREB in cortical neurons: A single-molecule imaging study
2015年10月17日 **Neuroscience 2015**
(Chicago, USA)

21 菅生紀之
核内1分子蛍光イメージング法による転写因子 CREB の動態解析
横浜市立大学生命環境コース教室セミナー
2015年7月10日 横浜市立大学金沢八景キャンパス(神奈川県・横浜市)招待講演

〔その他〕
報道関連情報
「DNA修復酵素が作用 神経細胞生存や回路形成担う 阪大がゲノム安定維持を解明」
2017年9月15日付科学新聞に研究成果が紹介された。

ホームページ等
大阪大学大学院生命機能研究科ホームページ
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織
(1)研究代表者
菅生 紀之 (SUGO, Noriyuki)
大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：20372625

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし