

平成21年5月22日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18300122
 研究課題名（和文） ゲノムインプリンティングが関与する脳神経系発達の制御機構
 研究課題名（英文） Genomic imprinting-involved regulatory mechanisms of central nervous system development

研究代表者
 吉川 和明（YOSHIKAWA KAZUAKI）
 大阪大学・蛋白質研究所・教授
 研究者番号：300944452

研究成果の概要：ゲノムインプリンティングによって発現調節されている Necdin は、ホメオドメイン蛋白質 Dlx2、細胞周期関連転写因子 E2F1、ヒストン脱アセチル化酵素 Sirt1、アポトーシス関連転写因子 p53 などと複合体を形成し、種々の脳ニューロンの分化や生存を促進した。Necdin 遺伝子変異マウスでは、Necdin が哺乳類の脳神経系の発達と機能維持に必要であり、Necdin が欠損すると脳神経系の発達障害を起こすことが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	1,480,000	4,440,000	1,924,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：神経科学 発生・分化 発現制御 脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

ゲノム刷り込み現象（ゲノムインプリンティング）、すなわち片親性遺伝子発現は哺乳類特有のエピジェネティック制御機構である。近年、ゲノムインプリンティングを成立させる分子機構については解明が進んできたが、この現象の脳神経系発達における意義については不明の点が多い。脳神経系で発現している数種類のインプリント遺伝子が知られているが、それらの機能や生物学的意義に関する情報は極めて少ないのが現状である。

研究代表者らが発見した Necdin は、ほとんど総てのニューロンが最終分化する際に発現するインプリント遺伝子である。母由来染色体上の Necdin 遺伝子はメチル化によるインプリントを受けているため、父性 Necdin 遺伝子のみが発現している。ヒト Necdin 遺伝子は神経内分泌障害や行動異常を示す脳神経発達異常症プラダー・ウィリー症候群（Prader-Willi syndrome, 以下 PWS と略）の責任領域 15q11-13 に存在し、PWS の原因遺伝子の最有力候補となっている。すなわち、PWS では、父性 Necdin 遺伝子が欠失することによって、ニューロンの

分化異常が起こる可能性が高い。したがって、PWS の病態を理解するためには、脳神経系の正常発達過程での Necdin の機能やその作用の分子機構を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

父性 Necdin 遺伝子 (Ndn) 変異マウス (以下、Ndn 変異マウス) では、ほとんど総ての脳神経系ニューロンは Necdin を全く発現していないため、任意のニューロン集団に着目して分化や生存、移動などに異常が起こるかどうかが調べることができる。また、Necdin は種々の蛋白質と結合する多機能分子であるため、これらの特異的結合蛋白質を内在性に発現するニューロン集団を調べることにより、Necdin を含む蛋白質複合体の作用を解析できる。したがって、本研究では、Necdin の蛋白質相互作用のデータに基づいて Ndn 変異マウス由来のニューロンを用いることにより、インプリント遺伝子 Necdin による脳神経系発達の制御機構を解析し、その異常としてのゲノムインプリンティング疾患の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

Necdin の蛋白質間相互作用に基づいて、Ndn 変異マウス由来の以下の 3 種のニューロンを用いて解析した。

(1) 大脳皮質介在ニューロン

Dlx ファミリーは前脳 GABA 作動性ニューロンの分化と移動を制御する転写因子として働くことが知られている。Necdin は前脳 GABA 作動性ニューロンが発生する基底核原基に極めて強く発現している。そこで、Necdin は MAGE-D1 (Dlxin-1, NRAGE) を介してホメオドメイン蛋白質 Dlx ファミリーと結合して複合体を形成することを、免疫共沈降法と遺伝子転写活性測定法によって検討する。また、Ndn 変異マウスは Necdin・MAGE-D1・Dlx の三者複合体が形成されないため、GABA 作動性ニューロンの発達が異常になる可能性がある。そこで、Ndn 変異マウスや野生型マウス由来の大脳皮質スライスやニューロンに上記三者の遺伝子を導入し、前脳 GABA ニューロンを介在ニューロンのマーカーである calbindin やグルタミン酸脱炭酸酵素 GAD65/67 に対する抗体で染色し、Necdin 欠損による変化を調べた。

(2) 小脳顆粒細胞

Necdin は細胞周期調節に関与する転写因子である E2F1 や E2F4 と結合する。E2F1 はニューロンの発生初期に存在し、細胞周期からの離脱とアポトーシスの制御に関与することが知られている。Necdin 欠損マウスでは E2F の脱抑制化が起こり、下流の遺伝子の発現が増加している可能性がある。そこで、小脳顆粒細胞では低カリウムによるアポトーシス刺激によって転写因子 E2F1 と、それに依存する細胞周期キナーゼ cdc2 遺伝子発現の増加が Necdin の有無によって変化が起こるかを調べた。Ndn 変異マウスの小脳顆粒細胞では E2F1-cdc2 系が脱抑制によって活性化状態になり、アポトーシスの増強と分化異常が起きる可能性があるため、それぞれの蛋白質と mRNA の変化を、それぞれ、ウエスタンブロット法と RT-PCR 法で検討した。また、Ndn 変異マウスで *in vivo* の小脳顆粒細胞の外顆粒層から内顆粒層への移動が異常になる可能性を免疫組織化学的手法を用いて検討した。

(3) 大脳皮質ニューロン

Necdin は分裂終了したニューロンや骨格筋において、細胞の増殖やアポトーシスを抑制し、その分化状態の安定性に重要な役割を果たしている。一方、ニューロンにおける内在性のアポトーシス誘発因子として知られている癌抑制遺伝子 p53 は、その転写活性化領域において Necdin と結合し、それによって転写活性やアポトーシスの抑制を受ける。そこで、大脳皮質ニューロンにおいて Necdin が p53 の転写活性を調節する可能性を調べる。ストレス反応、エネルギー代謝、寿命の制御に重要な役割を果たすヒストン脱アセチル化酵素 Sirt1 は、p53 を脱アセチル化する事によって、p53 を介したアポトーシスに関連のある遺伝子の転写を抑制することが知られている。そこで、本研究では Necdin と Sirt1 が相互作用することによって、ニューロンにおける p53 のアセチル化とそれに伴う p53 依存性のアポトーシスを抑制するかどうかを検討する。Necdin、p53、Sirt1 の三者の結合は、免疫共沈降法、組換え蛋白質を用いた *in vitro* 結合法で調べる。また、三者の複合体形成の生理的意義を明らかにするため、Ndn 変異マウスから調製した初代培養大脳皮質ニューロンおよびスライス培養を用いて、Necdin が Sirt1 を介して、p53 のアセチル化活性を調節することによって、

種々のストレスに対するアポトーシスに及ぼす影響を調べる。

4. 研究成果

(1) 大脳皮質介在ニューロン

大脳基底核原基由来の GABA 作動性介在ニューロン分化に及ぼす Necdin の影響を Necdin 遺伝子欠損マウスを用いて検討した。Necdin は、胎生 13.5 日齢のマウス前脳の大脳皮質、中隔、および視床下部において高く発現していた。この部位で Necdin と Dlx ファミリーホメオドメイン蛋白質と共存するかを免疫組織化学法で確かめたところ、Necdin は中隔や視床下部において Dlx2 や Dlx5 と共存することが明らかになった。また、これらの細胞はグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) や calbindin D-28K が陽性であるため GABA 作動性ニューロンであることが分かった。Dlx2 や Dlx5 は発生期のマウス前脳において GABA 作動性ニューロンの分化、特異化、および移動に関与することが知られている。そこで、Necdin、MAGE-D1、Dlx が互いに結合するかを免疫沈降法で検討したところ、三者の複合体が形成されることが明らかになった。また、この複合体は、Dlx2 による Wnt1 プロモーターの活性化を増強することがわかった。

次に、Necdin の GABA 作動性ニューロンへの影響を調べるために、培養した胎生 13.5 日齢マウスの前脳スライスに電気穿孔法によって Necdin cDNA を導入した。このアッセイ系で、Dlx2 および MAGE-D1 が内在性に高発現している基底核原基領域に Necdin を発現させたところ、GAD や calbindin を発現する GABA 作動性ニューロンが顕著に増加した。一方、三者複合体形成を阻害する作用がある変異型 Dlx5 を Necdin と共発現させたところ、Necdin による GABA 作動性ニューロンの分化促進が抑制された。さらに、Necdin ノックアウトマウス (父性 Necdin 遺伝子欠損マウス) では、胎生 14.5 日齢の前脳において GABA 作動性ニューロンの減少が見られた。これらの結果、Necdin は MAGE-D1 を介して Dlx と結合することにより GABA 作動性ニューロンの分化を促進するものと推定される。

本研究により、Necdin は MAGE-D1 を介して Dlx2 ホメオドメイン蛋白質と複合体を形成して、大脳皮質介在ニューロンの分化や特異化を促進していることが明らかになった。Dlx ファミリーは大脳皮質介在ニューロンの発分化を介して、自閉症様の行動異常に関連することが推定されている。したがって、Necdin は、これらの部位の細胞分化を促進して大脳皮質介在ニューロンの分化や発達を調節して

いる可能性がある。Necdin は脳発達異常症 PWS の原因遺伝子と推定されているが、Necdin は、この疾患の行動異常など精神神経異常の発症機構に関与するものと考えられる。

(2) 小脳顆粒細胞

Necdin は、神経幹細胞が神経分化する際に誘導され、ほぼ全てのニューロンに存在し、細胞周期制御因子である E2F1 と結合し、E2F1 依存的な転写活性を抑制する。また、E2F1 過剰発現による細胞死が Necdin によって抑制されることから、Necdin は E2F1 と相互作用をすることによって、神経分化に伴う細胞死の抑制に重要な役割を果たすものと推定される。これらの Necdin の性質は、E2F1 結合因子として知られている癌抑制遺伝子産物 retinoblastoma 蛋白質 (Rb) の性質と類似している。そこで、Necdin と E2F1 との相互作用を Rb との比較において検討した。Rb による E2F1 転写の抑制はヒストン脱アセチル化酵素を介することが明らかにされているため、Necdin が Rb と同様に、E2F1 依存的な転写抑制においてヒストン脱アセチル化酵素を必要とするかについて検討したところ、Necdin は細胞周期に重要な働きをする蛋白質キナーゼ Cdc2 の発現を抑制した。Cdc2 は E2F 標的遺伝子の一つであるため、クロマチン免疫沈降法を用いて Necdin が Cdc2 遺伝子プロモーターに作用するかについて検討したところ、マウス胚性癌細胞 P19 細胞 (未分化幹細胞) への遺伝子導入系では Necdin は E2F1 に依存したプロモーター局在性を示し、神経分化条件下においても内在性 Necdin は Cdc2 遺伝子プロモーターに局在することが判明した。これらの結果、Necdin は Rb とは異なる作用機序で E2F1 依存的な転写活性を抑制し、神経分化時における Cdc2 の発現を調節している可能性が示された。

次に、Necdin と E2F1 の相互作用による Cdc2 の発現制御について検討するため、マウス小脳顆粒細胞 (CGN) を用いて検討を行った。小脳の発生段階で調べたところ、Necdin は生後に分化する CGN で高発現していた。そこで、生後 6 日目の小脳から調製した培養 CGN を低 K^+ 濃度で処理したところ、E2F1 と Cdc2 の発現量が顕著に増加した。この変化に伴ってアポトーシスが誘導されたが、内在性 Necdin の発現量には変化はなかった。この条件下でクロマチン免疫沈降解析を行ったところ、Necdin と E2F1 は共に Cdc2 遺伝子プロモーターに局在していた。次に、マウス Ndn 変異マウスから調製した CGN を用いて内在性 Necdin の機能を検討した。Ndn 変異をもつ CGN を低 K^+ 濃度で培養すると、野生型と比較してアポトーシスが增強され、E2F1

およびCdc2のmRNAと蛋白質の発現量も有意に増加していた。また、Ndn変異マウス由来CGNでは、Cdc2発現量と同様にCdc2キナーゼ活性が増加しており、Cdc2阻害剤ロスコピチンで処理をすると、アポトーシスの増強が阻止された。したがって、内在性NecdinはE2F1を介してCdc2遺伝子プロモーターに作用してCdc2遺伝子の発現を抑制し、Cdc2キナーゼ活性を低下させることによってニューロン死を抑制しているものと考えられる。

さらに、Ndn変異マウスの小脳のin vivoにおける変化を調べるため、免疫組織化学により解析したところ、分化CGNが多数存在する内顆粒層においてCdc2陽性細胞数とアポトーシスを起こした細胞数の増加が認められた。この結果から、Necdinはin vivo条件下の小脳においてもE2F1-Cdc2経路を抑制することにより、CGNのアポトーシスを防ぐ役割を果たしているものと推定される。このNecdinによるアポトーシス阻害作用は、PWSにおける小脳機能の異常を介した運動障害の原因を説明し得るものと考えられる。また、Necdin-E2F1-Cdc2軸は種々のニューロンの分化の際にも機能していることが考えられるため、この機構はCGNのみならず、他の多様なニューロンにおいても作用しているものと思われる。

(2) 大脳皮質ニューロン

大脳皮質(前脳)ニューロンにおけるNecdinのp53アセチル化への影響を検討した。まず、免疫組織化学染色によりマウス胎生14.5日目胚の前脳におけるNecdinとSirt1の発現パターンを確認したところ、大脳皮質ニューロンの核および細胞質においてNecdinとSirt1が共局在していた。次に、p53の発現がみとめられないヒト肺ガン由来H1299細胞を用い、免疫沈降法によりNecdinとSirt1の結合を確認した。さらにin vitroの結合実験により、Sirt1のN末端領域(1-235)と触媒領域(236-490a. a.)にNecdinが直接結合することが明らかとなった。またこの結合は前脳由来の抽出物を用いた解析においてもみられ、内在性に相互作用する事が示唆された。次に、NecdinがSirt1を介したp53の脱アセチル化に関与しているか検討した。H1299細胞を用いた過剰発現系とin vitro脱アセチル化検出系により、Necdin存在下においてSirt1のp53脱アセチル化反応は増強した。この時、NecdinはSirt1とp53の相互作用を高め、安定的な三者の複合体を形成した。Necdinが結合する事が出来ないN末端欠損型p53変異体(p53DN)を用いた解析では、Sirt1によるp53DNの脱アセチル

化反応を促進しなかった。したがって、NecdinはSirt1の脱アセチル化活性を直接増強するのではなく、Sirt1とp53の結合力を強めることでp53の脱アセチル化反応を促進する事が示唆された。

次に、Sirt1を介したNecdinのp53脱アセチル化反応の促進現象の生理学的意義を検討するために、Necdin欠損マウス由来の初代大脳皮質ニューロンを用いてp53依存的なアポトーシスへの影響を解析した。p53を介したニューロンのアポトーシスを誘導するために、細胞にDNA損傷を与えるトポイソメラーゼI阻害剤カンプトテシンを用いて検討したところ、Necdin欠損ニューロンではカンプトテシンに対する感受性が高く、またアセチル化p53の発現レベルも高かった。この現象はDNA傷害を誘導する過酸化水素処理でもみられた。このNecdin欠損ニューロンにおけるアポトーシスの促進が実際に内在性のp53を介したものであるかを検討するために、RNAiによるp53のノックダウンを行ったところ、Necdinはp53依存性のアポトーシスを特異的に抑制している事が明らかとなった。Sirt1の活性剤であるリスベラトロールによるSirt1の活性促進、あるいは逆に、RNAiによるSirt1のノックダウンによって、Necdinのp53誘導性のアポトーシスの抑制がSirt1に依存しているかを検討した。野生型ニューロンにおいてはリスベラトロール処理に伴いアセチル化p53レベルとアポトーシスが顕著に減少するが、Necdin欠損ニューロンにおいては変化がみられなかった。このことからSirt1のRSV感受性にはNecdinが必須である事が示唆された。また、RNAiによってSirt1をノックダウンしたところ、野生型ニューロンにおけるアセチル化p53のレベルとアポトーシスの割合が有意に上昇した。これに対してNecdin欠損ニューロンはコントロールRNAi処理の結果と同様、アセチル化p53のレベルとアポトーシスは高い状態を維持しており、Sirt1 RNAiの影響はみられなかった。よって大脳皮質ニューロンにおけるNecdinはSirt1依存的にp53のアセチル化とp53誘導性のアポトーシスを抑制している事が示唆された。

さらに、in vivoにおけるNecdin、Sirt1及びp53の局在を検討した。マウス胎生14.5日目胚前脳のスライス培養を用いてアセチル化p53を検出したところ、Ndn変異マウス由来のスライス培養においてはアセチル化p53のレベルが野生型と比較して有意に高かった。このスライス培養を過酸化水素で処理するとp53が核に集積すると共に、ニューロ

ンの核において Necdin と Sirt1 と共局在していた。このことから、Necdin、Sirt1、p53 の三者は in vivo においても酸化ストレスに応じて安定的な複合体を形成することが示唆された。

本研究により、大脳皮質ニューロンにおいて Necdin は Sirt1 と p53 との安定的な複合体を形成し、Sirt1 を介した p53 の脱アセチル化反応を促進することによって DNA 損傷誘導性のアポトーシスを抑制している事が明らかとなった。これは長期的な生存が必須とされるニューロンにおいて様々な内的、外的ストレスからの防御機構に重要な役割を果たしているものと考えられる。このことは、Necdin が PWS に見られる行動異常の背景を説明することが可能になると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Hasegawa K, Yoshikawa K
Necdin regulates p53 acetylation via Sirtuin1 to modulate DNA damage response in cortical neurons.
Journal of Neuroscience 28:8772-8784 (2008) (査読有)
- ② Nishimura I, Sakoda JY, Yoshikawa K
Drosophila MAGE controls neural precursor proliferation in postembryonic neurogenesis.
Neuroscience 154:572-581 (2008) (査読有)
- ③ Nishimura I, Shimizu S, Sakoda JY, Yoshikawa K
Expression of Drosophila MAGE gene encoding a necdin homologous protein in postembryonic neurogenesis.
Gene Expression Patterns 7:244-251 (2007) (査読有)
- ④ Kurita M, Kuwajima T, Nishimura I, Yoshikawa K
Necdin downregulates Cdc2 expression to attenuate neuronal apoptosis.
Journal of Neuroscience 26:12003-12013 (2006) (査読有)
- ⑤ Kuwajima T, Nishimura I, Yoshikawa K
Necdin promotes GABAergic neuron differentiation in cooperation with Dlx homeodomain proteins.
Journal of Neuroscience 26:5383-5392 (2006) (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

[その他]

http://www.protein.osaka-u.ac.jp/regulation/index_jap.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 和明 (YOSHIKAWA KAZUAKI)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号：30094452

(2) 研究分担者

西村 伊三男 (NISHIMURA ISAO)
大阪大学・蛋白質研究所・助教
研究者番号：70362621
大雲 剛志 (OHKUMO TSUYOSHI)
大阪大学・蛋白質研究所・助教
研究者番号：50432505

(3) 連携研究者

なし