

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06479

研究課題名(和文) 臨界期可塑性におけるコヒーシンを介したクロマチン構造制御のメカニズム

研究課題名(英文) Regulation of chromatin structure by cohesin in critical period plasticity

研究代表者

酒井 晶子 (SAKAI, Akiko)

新潟大学・医歯学総合研究科・日本学術振興会特別研究員

研究者番号：70532745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：幼年期の経験により脳が柔軟に発達する過程の、遺伝子発現調節機構は不明な点が多い。本研究では、マウス大脳皮質の発達をモデル系として、染色体の高次構造を調節するコヒーシンの挙動と役割を調べた。視覚経験により視覚野コヒーシンのゲノム結合位置は変化した。また、経験により発達して回路を調節する抑制性ニューロン(PV細胞)の成熟と、それに伴う遺伝子発現変化にコヒーシン関連因子が必要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

こどもの脳の正常な発達には、回路を調節する抑制性の神経細胞の働きが欠かせない。中でも経験により発達するPV細胞は、神経回路発達および精神疾患における重要性が示唆されながら、脳内の細胞数の少なさから遺伝子調節の研究が遅れている。本研究では、マウス脳からPV細胞を分取し、発達段階を追って遺伝子発現の解析を行うことで、PV細胞の発達を促す遺伝子群や、その調節に関わる因子の役割を明らかにしてきた。本研究の成果は、脳の成長のしくみと、その異常による精神疾患の原因の解明につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms of gene regulation during experience-dependent juvenile brain development are poorly understood. Using development of the mouse cortex as a model, this study investigated the dynamics and roles of cohesin that regulate higher order conformation of the genome. Genomic binding sites of cohesin in the visual cortex were regulated by visual experience. Moreover, a cohesin-related gene was shown to be necessary for maturation of PV-cells, which develop via experience and modulate neural circuit, as well as change in gene expression patterns accompanying their development.

研究分野：クロマチン生物学

キーワード：脳発達 抑制性ニューロン PV細胞 コヒーシン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 幼年期のほ乳類の脳には、環境から受けた刺激や経験に応じて神経回路が活発に再構築される(可塑性が高まる)時期がある。これは「臨界期」と呼ばれ、生涯の中で生後の一時期にしか現れない。臨界期に経験により興奮性と抑制性の神経細胞がそれぞれ正常に発達することで回路が整えられていく。この時期の神経細胞の発達・調整不全による興奮性/抑制性のバランスの異常は、精神疾患の原因となる。

(2) 我々のグループでは、ホメオタンパク質 *Otx2* が、マウス大脳皮質において臨界期の開始に必須の役割を持つことを報告してきた (Sugiyama *et al.*, *Cell* 2008, Sakai *et al.*, *Front Neurosci.* 2017)。転写因子である *Otx2* が臨界期を引き起こすという事実は、回路を構成する神経細胞で特異的な遺伝子発現と、それに伴うクロマチン動態変化が起こることを示唆している。実際、臨界期特異的な遺伝子発現変化が起こること、および経験依存的なヒストン修飾が臨界期で起こりやすいことが、細胞種の混在した脳組織レベルの解析から報告されていた。

臨界期における神経細胞の変化に関しては、形態や生理学的性質、および細胞外基質等の環境について、分子レベルの理解が進みつつある。一方で、その基盤となる細胞種ごとの遺伝子発現制御機構やクロマチン動態は、複雑なネットワークを構成する生後の脳の解析の難しさから世界的にも研究が進んでいない。とりわけ、経験により発達して臨界期を開始させる抑制性ニューロンであるパルブアルブミン陽性細胞 (PV 細胞) は、神経回路発達および精神疾患における重要性が示唆されながら、脳内の細胞数の少なさから遺伝子発現制御の研究が遅れている状況であった。

(3) 時期・細胞特異的な転写は、エンハンサーとプロモーターの相互作用といった、クロマチン高次構造の変化により誘導される。コヒーシ複合体は、染色体クロマチン高次構造の構築を介して遺伝子制御領域間の相互作用を制御し、発現調節に関わる。興味深いことに、コヒーシ関連因子の変異は自閉症や精神遅滞を伴う *Cornelia de Lange* 症候群 (CdLS) の原因となる。さらに、ショウジョウバエおよびマウスにおいて、コヒーシは軸索の刈り込みや神経細胞の発達に必要であることが報告されていた。これらのことから、コヒーシが臨界期の神経細胞で特異的なクロマチン高次構造を作り出し遺伝子発現を制御する機能を持つと推測される。しかし、これまでに臨界期脳におけるコヒーシの挙動と役割に関する報告はなかった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、経験による脳発達の遺伝子発現制御メカニズムを明らかにすることを目的として、臨界期に重要な抑制性ニューロンである PV 細胞の発達に焦点を当て、(1) 発達に伴う遺伝子発現プロファイルの変化、(2) 遺伝子制御領域の変化、(3) コヒーシの挙動と役割、について知見を得ることを目指した。

## 3. 研究の方法

本研究では、生後のマウス大脳皮質の発達をモデル系とする。

臨界期におけるコヒーシのゲノムワイドな結合位置を調べるためには、視覚野の ChIP-seq 解析を行った。

PV 細胞特異的な解析を行うためには、*Ai14* レポーターマウスを *PV-cre* マウスと交配し、*tdTomato* で蛍光標識した PV 細胞を大脳皮質よりフローサイトフローメトリーにより分取した。1匹のマウス大脳皮質から数千個以上の PV 細胞が得られる。それを用いて RNA-seq によるトランスクリプトーム解析、およびゲノム制御領域を調べるためのオープンクロマチン解析 (ATAC-seq) を行った。次世代シーケンサーによる塩基配列決定は、先進ゲノム支援のサポートを受けて行った。

また、PV 細胞の発達と、それに伴う遺伝子発現および遺伝子調節領域の変化がコヒーシ機能欠損マウスにおいてどのような影響を受けるかを調べ、コヒーシの役割を検討した。解析には CdLS のモデルとなる、コヒーシ関連因子 (コヒーシローダー) のコンディショナルノックアウト (cKO) マウスを用いた。PV 細胞特異的なノックアウトには *PV-cre* マウスを交配した。

#### 4. 研究成果

(1) 臨界期（生後 28 日齢）のマウス大脳皮質におけるコヒーシンのゲノム全体にわたる結合位置を、ChIP-seq 解析により同定した。生後 14 日齢の未熟な大脳皮質と比較して、臨界期大脳皮質に特異的なコヒーシン結合部位を転写開始点近傍に持つ遺伝子には、シナプス関連およびイオントランスポーターの遺伝子群が含まれていた。この結果は、発達過程において変化していく神経細胞の機能に関わる遺伝子発現にコヒーシンが関与することを示す。

(2) 経験により大脳皮質のコヒーシン局在が変化するのかを調べるために、臨界期マウスの視覚野のコヒーシン結合部位を、暗所飼育により視覚経験を遮断した同じ週齢マウスのものと比較したところ、視覚経験に依存したコヒーシン結合部位が存在することが分かった。それらのコヒーシン結合部位を持つ遺伝子群は、転写制御因子に加え、神経の発達や細胞の環境応答に関係する遺伝子、さらに活動電位や抑制性後シナプス電位に関する遺伝子が多かった。これらのことから、経験依存的にコヒーシンにより遺伝子発現が制御され、神経回路の発達が促されることが示唆された。

(3) 臨界期の開始に必須な PV 細胞について、発達過程における遺伝子発現パターンの変化を調べるために、野生型マウスの臨界期前（生後 16 日齢）、臨界期（生後 28 日齢）、成体（生後 60 日齢以降）における PV 細胞特異的な RNA-seq を行った。臨界期前の未熟な PV 細胞から臨界期にかけて、特に大きく遺伝子発現パターンが変動することが分かった。

(4) PV 細胞の発達におけるコヒーシンの役割を検討するために、コヒーシン関連因子を PV 細胞特異的に欠損させる cKO マウス系統を作成した。このマウスでは、成体になる前の発達期の段階で死亡する場合があったが、成長したマウスは外見上野生型マウスと変わらず、脳の形態も目立った欠損は認められなかった。組織学的解析から、cKO マウスでは大脳皮質の PV 細胞が臨界期までに成熟していないことが示唆された。

(5) コヒーシン関連因子の cKO マウスを用いて PV 細胞特異的なトランスクリプトーム解析を行ったところ、成体に比べて臨界期において野生型と比較した発現変動遺伝子の数が多く、中でも PV 細胞の発達に必要であることが知られる遺伝子が多く含まれていた。また、野生型 PV 細胞で臨界期前から臨界期にかけて発現変動する遺伝子が、臨界期相当の cKO の PV 細胞では正常に発現していなかった。これらのことから、PV 細胞に特徴的な機能の発達に関わる遺伝子群の正常な発現変化にコヒーシンの機能が必要であると考えられる。

(6) さらに PV 細胞の遺伝子発現に関わる制御領域の情報を得るために、PV 細胞特異的な ATAC-seq によりオープンクロマチン解析を行った。野生型 PV 細胞で臨界期前には見られず臨界期で出現するオープンクロマチン領域の約半数は、臨界期相当の cKO の PV 細胞では同定されなかったことから、臨界期のオープンクロマチン領域の形成にコヒーシンの機能が関与することが示された。臨界期野生型のみで見られるオープンクロマチン領域は、神経細胞の分化・発達に関わる遺伝子が多く、RNA-seq の結果を裏付けるものであった。また、以前に同定した PV 細胞の発達に必須な転写因子 Otx2 の臨界期大脳皮質特異的な結合部位の多くが、本研究で同定された臨界期 PV 細胞の ATAC-seq ピークと重なっていた。胚生期や網膜神経細胞の Otx2 結合部位は一部しか重ならないことから、今回の ATAC-seq では臨界期 PV 細胞に特徴的な遺伝子発現の基盤となるクロマチンプロファイルを捉えているといえる。

以上の結果から、経験による PV 細胞の発達には、コヒーシンおよび Otx2 を介したクロマチン構造の変換による遺伝子発現制御が必要であることが示唆された。今後、臨界期に特異的なエンハンサー等の制御領域、およびその制御におけるコヒーシンの役割の解析を進め、これまで分かっていなかった PV 細胞の発達や精神疾患に関わる遺伝子発現制御機構の詳細を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakai Akiko, Sugiyama Sayaka	4. 巻 60
2. 論文標題 Experience-dependent transcriptional regulation in juvenile brain development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 473 ~ 482
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12571	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sakai, A., Nakato, R., Peters. H., Shirahige, K., Sugiyama, S.
2. 発表標題 Role of cohesin loader in experience-dependent development of interneuron in juvenile brain
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井 晶子、中戸 隆一郎、Heiko Peters、白髭 克彦、杉山 清佳
2. 発表標題 幼若脳の経験依存的な抑制性介在ニューロン発達におけるコヒーシンローダーの役割
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒井 晶子、中戸 隆一郎、Heiko Peters、白髭 克彦、杉山 清佳
2. 発表標題 生後脳の経験依存的な抑制性ニューロン発達におけるコヒーシンローダーの役割
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井 晶子、中戸 隆一郎、Heiko Peters、白髭 克彦、杉山 清佳
2. 発表標題 コヒーシローダーNipblは幼若脳の経験依存的な抑制性ニューロン発達に必要である
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井 晶子
2. 発表標題 経験が脳を発達させる仕組み - 遺伝子発現制御の観点から -
3. 学会等名 マルチNGSオミクス解析研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akiko Sakai, Ryuichiro Nakato, Heiko Peters, Katsuhiko Shirahige, Sayaka Sugiyama
2. 発表標題 Regulation of chromatin structure by cohesin during juvenile cortical development
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井晶子、中戸隆一郎、白髭克彦、杉山清佳
2. 発表標題 生後脳の経験依存的なニューロン発達へのコヒーシンの関与
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井 晶子・中戸 隆一郎・凌 一葦・侯 旭濱・飯島 友也・原 範和・桑野 良三・奥田 修二郎・白髭 克彦・杉山 清佳
2. 発表標題 経験による脳の発達に必須な抑制性介在ニューロンにおける転写制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakai A.
2. 発表標題 Regulation of transcription and chromatin structure in postnatal cortical development
3. 学会等名 The 9th BRL International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中戸 隆一郎  (Nakato Ryuichiro)  (60583044)	東京大学・定量生命科学研究所・講師    (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
英国	Newcastle University		