

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2010

課題番号：20200009

研究課題名（和文） 神経細胞分化におけるゲノムの構造と核内配置の制御

研究課題名（英文） Dynamics of Nuclear Architecture and Genome Organization during Neuronal Differentiation

研究代表者

菅生紀之 (SUGO NORIYUKI)

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教

研究者番号：20372625

研究成果の概要（和文）：

神経細胞分化における核内変化の全体像に明らかにすることで多様な分化の分子メカニズム解明を目指し、蛍光イメージング技術を用いて染色体の遺伝子座や転写因子など核内因子の動態を解析した。その結果、転写因子とその認識配列との相互作用を1分子レベルで解析することが出来た。

研究成果の概要（英文）：

Dynamics between multiple nuclear factors and genomic DNA in the nucleus during neuronal differentiation remain undiscovered. Here, we quantitatively observed dynamics of some nuclear proteins and genomic loci by fluorescent imaging *in vitro* and *in vivo*. As a result, we can detect an interaction between a transcription factor and its recognition sequence at the single-molecule level.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 8,800,000 | 2,640,000 | 11,440,000 |
| 2009年度 | 8,300,000 | 2,490,000 | 10,790,000 |
| 2010年度 | 8,300,000 | 2,490,000 | 10,790,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 25,400,000 | 7,620,000 | 33,020,000 |

研究分野：総合領域 複合新領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般、

ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：分子・細胞神経科学、1分子生理・生化学

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質神経細胞の多様性は、発生期における遺伝的プログラムと可塑性期の経験や学習といった神経活動に依存的な遺伝子発現を介して形成され、脳機能の発現に不可欠である。このような細胞特性の決定、固定化さらに再構成といった一連の遺伝子発現制御は、転写調節領域にある塩基配列を基にし

た転写因子による制御に加えてDNAメチル化やヒストン修飾などのクロマチン構造制御が不可欠であることが明らかとなりつつある。つまり、染色体を含めて核内構造は高度に制御され細胞の分化を決定する重要な要因になりうる。この構造変化は特に長期間にわたる遺伝子発現のオン・オフ制御には重要であると考えられ、増殖を停止し、特定の領域へ

移動、回路形成をするという神経細胞の発生・分化を解明する上で鍵になるものと言えよう。しかし、クロマチン構造制御に着目した神経細胞分化の研究は申請者らの研究グループを含めて国内外問わず発展途上であり、その解明は脳研究において重要な課題である。一方、1分子計測は、多分子計測では不可能な分子動態を明確に解析できることが、全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) による細胞表面に存在する分子の *in vivo* 解析から明らかとなってきた。一方、TIRFM では技術的に困難である核内分子の解析についての報告は、極めて数少ない。しかし、その有用性から急速な技術開発の進展が予想され申請者らも着手していた。

これまでにクロマチン構造を制御するヒストン脱アセチル化酵素 HDAC9 と転写因子 CREB の共役因子でヒストンアセチル化酵素 CBP の活性を調節すると考えられている TORC1 に注目し蛍光タンパク質による大脳皮質神経細胞内の時空間的動態の解析を試み、電気活動依存的に核・細胞質間を移動すること、それによって樹状突起の形態形成が制御されることを見出していた。これは、電気活動に伴って移動する因子がクロマチン構造を変化させ神経細胞分化を制御することを示唆している。また、DNA 修復酵素 DNA ポリメラーゼ β (Pol β) ノックアウトマウスの解析から、神経幹細胞から最終細胞分裂を終え分化を開始した直後の神経細胞がアポトーシスを起こすこと、アポトーシスを抑制した場合でも神経投射異常が生じることを明らかにしており、ゲノム維持に携わる DNA 修復酵素の神経細胞分化への関与を示唆している (研究代表者ら, 2000, 2004)。このような経緯から、神経細胞分化において既知の転写因子の調節領域への結合・解離を基本とした転写制御の概念に加えてより動的なゲノムの制御を捉える新たな側面からの解析の必要性を強く感じていた。

2. 研究の目的

本研究は大脳皮質神経細胞の発生と電気活動依存的変化という2つの分化過程に焦点をあて、核内変化の全体像に明らかにすることで多様な分化の分子メカニズムを解明する。つまり、転写因子やヒストン修飾酵素、DNA 修復酵素などの核内因子は核内空間において一様に分布するのではなく染色体の遺伝子座に対して特異的な配置を示し、全体が協調することで機能的意味を持つと考えられる。核内3次元配置の分化に伴った変化と

遺伝子発現との相関を明らかにすることで新たな側面から細胞分化の分子メカニズムの解明に迫る。

第1に、申請者らのノックアウトマウスの解析から予測される DNA 修復酵素の大脳皮質形成における役割の意義を明らかにするため、DNA 修復酵素と相互作用が予想される核内因子の同定と核内配置を解析する。また、協同した動態により遺伝子発現が制御される遺伝子群を同定する。

第2に、核内1分子計測の技術開発のために BAC クローンに組み込まれた遺伝子座の転写調節領域をモデルとした系を作製する。

第3に、核内1分子計測を用いて転写因子や DNA 修復酵素などの核内因子の分化に連動した時空間的に明確な動態を明らかにする。また観察後の単一細胞による網羅的遺伝子発現プロファイルを試み、分子動態の生理学的意義を明らかにする。

第4に、大脳皮質の大きさと染色体構造が非常に異なるマウスとヒトの神経細胞分化において大脳皮質層形成に関与する遺伝子群の遺伝子座と核内因子の動態、さらに遺伝子発現との相関を解析することで、ゲノム構造と核内配置に依存した遺伝子発現制御の分子進化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 大脳皮質神経細胞分化における DNA メチル化制御の機能解析

大脳皮質神経細胞分化における DNA メチル化制御の役割を明らかにすることを目指し、DNA メチル基転移酵素 Dnmt3b 発現ベクターを用いて *in vivo* で過剰発現させ遺伝子発現への影響を調べた。Dnmt3b-EGFP 融合タンパク質の発現ベクターを作製し、胎生 12.5 日マウス胚に子宮内胎仔エレクトロポレーション法によって大脳皮質深層の神経細胞に遺伝子導入した。3日後に胎仔から大脳皮質を切り出しトリプシンで分散した後、EGFP 陽性細胞のみを顕微鏡下でガラスピペットを用いて 20~50 個単離した。コントロールには同時期に EGFP 発現ベクターを遺伝子導入した細胞を用いた。その後、全 RNA を精製し定量的 RT-PCR 法によって遺伝子発現量を調べた。まず、大脳皮質深層に発現が知られている転写因子 Tbr1 の発現と Dnmt3b-EGFP の過剰発現を確認したのち、候補遺伝子の発現量の変化を解析した。

(2) 大脳皮質神経細胞分化における神経活動依存的な染色体動態の解析

大脳皮質神経細胞の神経活動依存的な遺

伝子調節発現における染色体配置の役割を明らかにすることを旨とし、神経活動依存的な染色体の再配置をセントロメア領域の動態から調べた。大脳皮質神経細胞におけるセントロメア領域の核内配置を調べるため、胎生 16 日マウス胚から調製した大脳皮質分散培養に、すべての染色体のセントロメア領域を認識する DNA プローブを用いた FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法による染色を行った。また、培養 7 日目と 14 日目に高濃度カリウムによる脱分極の誘導、またはテトロドトキシン (TTX) による神経活動の抑制を行い、セントロメア領域の神経活動依存的な局在変化を調べた。

(3) 神経活動依存的な遺伝子発現における核内小器官の動態解析

神経細胞分化における核内小器官の時空間的動態をライブイメージングにより明らかにすることを旨とし、主要な核内小器官でそれぞれ特異的局在が知られている核小体の Nucleophosmin、核スペckル of Sfrs1、Cajal ボディ of Coilin、PML ボディ of Sp100 に可視化のために蛍光蛋白質 mCherry を連結した融合蛋白質発現ベクターを作製した。胎生 15 日令マウス胚を用いて *in utero* エレクトロポレーション法により大脳皮質上層の神経細胞に遺伝子導入を行い、翌日に遺伝子発現が観察された領域のみを摘出し分散培養をカバーガラス上に行った。ライブイメージングは蛍光倒立顕微鏡のステージ上に培養装置を設置し、5%CO₂、37°C の培養条件下で観察を行った。

(4) 神経活動依存的な遺伝子発現制御の 1 分子計測

遺伝子発現制御における核内分子動態の役割を明らかにするため、タンパク質と DNA の相互作用の時空間的動態を明らかにする新たな研究手法として 1 分子蛍光イメージング法を用い、転写因子 CREB と CRE 配列に着目してその相互作用を可視化し定量的な計測からその時空間的動態を明らかにすることを旨とした。CREB はもっとも研究されている転写因子の 1 つで、二量体を形成することで認識配列である CRE 配列 (TGACGTCA) に特異的に結合し、cAMP やカルシウムイオンのような細胞シグナルに反応して遺伝子発現を制御することが知られている。特に神経系においては神経細胞の回路形成や生存、さらには海馬において長期記憶の形成に関与することが知られている。初めに、1 分子の CREB を可視化するため大腸菌組換えタンパク質を精製しナノクリスタル Qdot

で標識した。次に、カバーガラス表面上に CRE 配列または NF- κ B 配列を固定化し、Qdot 標識した CREB との相互作用を全反射顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 大脳皮質神経細胞分化における DNA メチル化制御の機能解析

遺伝子発現に伴うプロモーター領域のメチル化 CpG の脱メチル化のメカニズムに関しては多くの点が不明であるが、DNA メチル化酵素と DNA 修復酵素の相互作用によるヌクレオチド除去と再合成による活性化が示唆されている。このメカニズムの神経細胞分化における役割を明らかにするため、分化過程の遺伝子発現制御においてこの作用を受ける遺伝子群の探索を行った。その結果、Dnmt3b の過剰発現によって神経細胞の軸索誘導に関与するある分泌因子の発現減少と膜タンパク質の発現上昇が観察された。この結果から、大脳皮質神経細胞分化において Dnmt3b を介したメチル化もしくは脱メチル化によって遺伝子発現が正負いずれにも制御されている可能性が示唆された。今後、大脳皮質神経細胞分化における DNA メチル化制御の役割をさらに明らかにするために有効な実験系が構築できたと考えている。

(2) 大脳皮質神経細胞分化における神経活動依存的な染色体動態の解析

マウス染色体数は 40 であり、その数のシグナルが検出されることが予測されたが、大脳皮質神経細胞では大きさに違いがあるが、10 前後のシグナルが観察された。また、培養 7 日目に比べて神経活動が活発な 14 日目にシグナル数が増加する傾向が見られた。そこでシグナル数に着目して神経活動依存的な変化を解析したところ、培養 14 日目において脱分極を起こした場合はシグナル数が増加し、TTX で抑制した場合は減少する傾向が見られた。以上の結果から、大脳皮質神経細胞においてセントロメア領域はクラスターを形成し、神経活動依存的に再配置が起きることが示唆された。神経活動依存的に染色体の再配置が起こることで特定の遺伝子発現が変化する可能性が考えられる。

(3) 神経活動依存的な遺伝子発現における核内小器官の動態解析

神経細胞分化における核内因子として核内小器官の動態と役割に関しては多くの点が不明である。神経細胞分化における核内小器官の時空間的動態をライブイメージングにより明らかにすることを旨とした。その結

果、核内に複数のドット状の局在とその動態を観察することが可能となった。

(4) 神経活動依存的遺伝子発現制御の1分子計測

組換えCREBタンパク質のCRE配列特異的な結合活性をゲルシフト法により調べた結果、これまでの報告と同様にコントロールとして用いた非認識配列である転写因子NF κ Bの認識配列(NF κ B配列)に比べて明らかに高い結合性が観察された。加えて、電子顕微鏡にてQdot-CREBが二量体を形成することを確認した。次に、カバーガラス表面上にCRE配列またはNF κ B配列を固定化し、Qdot 標識したCREBとの相互作用を全反射顕微鏡で相互作用を観察した。その結果、Qdot-CREBはNF κ B配列に比べてCRE配列により長い時間結合することが初めて明らかとなった。以上の結果から、CREBは弱い親和性でDNA鎖上を移動してCRE配列を探し、認識するとその場に長く結合して転写を誘導することが示唆される。

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3件)

① Hong Zhao, Takuro Maruyama, Yuki Hattori, Noriyuki Sugo, Hyota Takamatsu, Atsushi Kumano, Ryuichi Shirasaki, Nobuhiko Yamamoto. A Molecular Mechanism That Regulates Medially Oriented Axonal Growth of Upper Layer Neurons in the Developing Neocortex. *J Comp Neurol.* 519:834-848 (2011). (査読・有)

② Noriyuki Sugo, Hiroaki Oshiro, Mitsuhiro Takemura, Toshiaki Kobayashi, Yusuke Kohno, Naofumi Uesaka, Wen-Jie Song, and Nobuhiko Yamamoto. Nucleocytoplasmic translocation of HDAC9 regulates gene expression and dendritic growth in developing cortical neurons. *Eur J Neurosci.* 31: 1521-1532 (2010). (査読・有)

③ Yoshiyuki Arai, Tatsuo Shibata, Satomi Matsuoka, Masayuki J Sato, Toshio Yanagida, and Masahiro Ueda. Self-organization of the phosphatidylinositol lipids signaling system for random cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 12399-404 (2010). (査読・有)

[学会発表] (計3件)

① 菅生紀之, 至田充宏, 山本亘彦
発生期大脳皮質の前駆細胞においてDNA修復酵素は転写活性と連動して集積する
第33回日本神経科学大会 (Neuro2010)
2010年9月2日 神戸

② Noriyuki Sugo, Hiroaki Oshiro, Mitsuhiro Takemura, Toshiaki Kobayashi, Yusuke Kohno, Naofumi Uesaka, Wen-Jie Song, and Nobuhiko Yamamoto. Activity-dependent nucleocytoplasmic translocation of HDAC9 regulates gene expression and dendritic growth in developing cortical neurons. "Construction and Reconstruction of the Brain" Awaji Yumebutai, October 9, 2009

③ Yoshiyuki Arai, Tatsuo Shibata, Satomi Matsuoka, Masayuki J Sato, Toshio Yanagida, and Masahiro Ueda. Self-organization in phosphatidylinositol lipids signalling pathway for random cell migration and polarization. 日本生物物理学会第47回年会 2009年10月31日(徳島)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/neurobiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅生 紀之 (Sugo Noriyuki)
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
研究者番号: 20372625

(2) 研究分担者

新井 由之 (Arai Yoshiyuki)
大阪大学・大学院生命機能研究科・特任助教
研究者番号: 20444515
(2009年度まで分担者として参画)

(3) 連携研究者

なし