

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21700373

研究課題名(和文)

転写因子NF-Yの中樞神経系における生理的・病的役割の解明

研究課題名(英文)

Functional analysis of NF-Y transcription factor in nervous system

研究代表者

山中 智行(YAMANAKA TOMOYUKI)

独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チーム・研究員

研究者番号：00381575

研究成果の概要(和文)：

転写因子NF-Yの1つの構成因子であるNF-YAについて、神経特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製、解析したところ、出生後の体重が増加せず、離乳前に死滅してしまうことが確認された。一方、マウス脳を用いたChIP on CHIPの解析から、NF-Yターゲット候補として、遺伝子転写・翻訳やタンパク質フォールディング・分解等に関わる、様々な遺伝子が同定された。よって、NF-Yは、神経細胞において、これら遺伝子の発現を制御し、新生児期の成長に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

To investigate physiological function of NF-Y transcription factor in nervous system, we made neuron-specific NF-YA (one of NF-Y components) conditional knockout mice. Although the knockout mice could be born, increase in body weight was severely affected, resulting in neonatal death. We further identified many potential NF-Y target genes involved in gene transcription/translation and protein folding/degradation by ChIP on CHIP analysis using mouse brain. Thus, NF-Y-mediated expression of these genes in neuron may be important for neonatal mouse development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：転写印紙、NF-Y、神経細胞、ノックアウトマウス、神経変性

1. 研究開始当初の背景

NF-Y は、NF-YA、NF-YB、NF-YC の 3 つのサブユニットから構成される転写因子であり、プロモーター領域の CCAAT モチーフに結合する。そのターゲットとしては、主に *in vitro* 系の解析から、cell cycle 関連因子やシャペロン関連因子など様々な遺伝子が同定されつつある。近年、NF-YA のノックアウトマウスが作製され、その表現型として、胎生 8.5 日以前に致死を起こすことが見出され、NF-Y がマウス初期胚の発生に必須であることが明らかとなった。さらに、上記マウスの embryonic fibroblast を用いた解析から、NF-YA のノックアウトが cell cycle を阻害することも見いだされ、NF-Y が細胞増殖に必須の役割を担っていることも明らかとされた。

興味深いことに、生体マウスを用いた生化学的解析から、NF-Y の 3 つのサブユニットは全身の組織に広く発現するにもかかわらず、筋肉組織で特異的に NF-YA の発現が消失していること、また、同組織において、NF-Y の DNA 結合活性も消失していることが報告された。一方で、未分化な筋細胞（筋芽細胞）では NF-YA の発現は確認されること、NF-YA を筋芽細胞に強制発現させるとその分化過程が阻害されることも明らかとされた。同様の現象は造血幹細胞においても観察されており、よって、NF-Y は、筋細胞、造血細胞においては、未分化細胞の維持、増幅を制御することにより、これら細胞の分化に関与していることが明らかとされた。

一方で、生体マウスの脳においては、NF-Y の 3 つのサブユニットの発現と共に、その DNA 結合活性も確認されている。また、免疫組織染色法により、実際、神経細胞においてこれらサブユニットが発現することも確認されている。これらのことは、NF-Y は神経細胞においては、上記細胞とは異なる形でその分化や機能発現に関与していることを期待させる。しかしながら、その実体はまったく不明である。

近年、我々は、神経変性疾患の 1 つであるハンチントン病の病態メカニズムの解析から、NF-Y がその病態進行に関与する可能性を見出した。ハンチントン病では、その原因遺伝子であるハンチンチン遺伝子内で CAG リピートの異常伸長が観察される。その結果、異常伸長したポリグルタミン鎖を有するハ

ンチンタンパク質（変異ハンチンチン）が生成され、神経細胞の核内に凝集体を形成する。我々は、ハンチントン病モデルマウスを用いた解析から、脳の神経細胞において、NF-YA と NF-YC が変異ハンチンチンの凝集体に取り込まれると共に NF-Y の活性が低下すること、これにより、HSP70 タンパク質等、変異ハンチンチンの凝集・毒性に抑制的に働くシャペロンタンパク質の発現が減少することを見出した。よって、NF-Y が変異ハンチンチンによる神経変性に関与していることが強く示唆されると同時に、NF-Y が、中枢神経系の分化した神経細胞において、その機能発現や維持に重要な役割を担っていることが期待された。

2. 研究の目的

本研究においては、NF-YA のコンディショナルノックアウトマウスを用いて、中枢神経細胞の分化過程のいくつかの段階において NF-Y の機能破壊を行い、未分化、分化過程、あるいは分化後の神経細胞における NF-Y の生理的機能を明らかとすることを目的とする。そのために、未分化状態あるいは分化後の神経細胞に cre を発現するトランスジェニックを用い、それぞれを NF-YA のコンディショナルノックアウトマウスと交配させ、その表現型を形態学的に観察する。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞の分化過程特異的 NF-YA ノックアウトマウスの作製、及び表現型の解析

NF-YA のコンディショナルノックアウトマウスを用いて、中枢神経細胞の分化過程のいくつかの段階において NF-Y の機能破壊を行い、各分化状態の神経細胞における NF-Y の生理的機能を明らかとする。

まず、分化 - 成熟過程、分化後の神経細胞に cre を発現するトランスジェニックマウス（それぞれ、synapsinI-cre、camk2a-cre）を用い、NF-YA のコンディショナルノックアウトマウスと交配させ、神経細胞の各分化状態で特異的に NF-Y の機能破壊を試みる。次に、上記マウスを用いて、神経細胞の分化状態をマーカーや形態等を指標に観察すると共に、脳組織形態への影響も観察する。

(2) 脳における NF-Y ターゲット遺伝子の同定

これまでに、主に in vitro 系における解析から、NF-Y のターゲット遺伝子が多く同定されてきている。しかし、神経細胞系におけるターゲット遺伝子は何か等、神経細胞での NF-Y の働く分子メカニズムはほとんど不明である。

そこで、NF-Y の神経組織における直接のターゲット遺伝子を同定するため、マウスの脳を用いて、NF-YA 及び NF-YC に対する特異抗体でクロマチン免疫沈降を行い、沈降 DNA について DNA microarray 解析を行った。

(3) NF-YA ノックアウトマウスを用いた NF-Y の神経病態における役割の解明

これまでの我々の解析から、NF-Y がハンチントン病の病因タンパク質のターゲットであることが明らかとされている。しかしながら、NF-Y の活性抑制がどのようにして神経変性や神経学的異常に関与しているかはまだよくわかっていない。

これを解明するため、NF-YA のヘテロマウスと、変異ハンチンチンを発現するハンチントン病モデルマウス (R6/2) とを交配し、NF-Y の機能破壊あるいは機能減少がモデルマウスの病態進行にどのように影響するかについて、運動機能、寿命、神経機能等を指標に検討した。

4. 研究成果

(1) 神経細胞の分化過程特異的 NF-YA ノックアウトマウスの作製、及び表現型の解析

まず、分化 - 成熟過程の神経細胞に cre を発現する synapsinI-cre トランスジェニックマウスを用い、NF-YA のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、解析した。このマウスは、生まれてくるものの、出生後の体重増加が観察されず、約 2 週間で死滅してしまった。解剖したところ、胃内にミルクが観察されず、なんらかの理由で母乳が摂取できていないことが、成長障害に結びついていると考えられる。

次に、脳形態について観察した。RNZ reporter マウスを用いた解析から、synapsinI-cre による recombination は、大脳 (嗅球、皮質、海馬、線条体、視床等) から小脳まで、広い範囲で観察され、NF-YA が脳の広範囲でノックアウトされていると考えられる。しかしながら、脳重に変化は観察されず、組織切片の解析からも、形態には変化が観察されなかった。よって、分化 - 成熟

過程の脳神経での NF-Y の機能阻害は、脳形態には影響を与えないと考えられた。

次に、分化後の中枢神経細胞に cre を発現するトランスジェニックマウス (cank2a-cre) を用いて、NF-YA のコンディショナルノックアウトマウスの作製を行った。その結果、上記マウスとは異なり、このマウスは正常に出生し、離乳後も生存していた。RNZ reporter マウスを用いた解析から、cank2a-cre による recombination は、大脳の嗅球、皮質、海馬、線条体で特異的に観察されること、その時期は、離乳週令である 4 週前後から始まることが確認された。よって、新生児期には、NF-Y の機能は阻害されておらず、よって、新生児発達には影響していないと考えられる。

以上のことから、神経細胞の分化過程における NF-Y の機能阻害は、マウスの正常生育を阻害し、死に至ることが見出された。

(2) 脳における NF-Y ターゲット遺伝子の同定 (ChIP on CHIP 法)

NF-Y の神経組織における直接のターゲット遺伝子を同定するため、マウスの脳を用いて、NF-YA 及び NF-YC に対する特異抗体でクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。沈降 DNA について、まず機知ターゲット遺伝子について PCR により確認したところ、HSP70、HSP40 のプロモーター領域が含まれていることが確認された。よって、実際、NF-Y が脳内において、これら遺伝子の制御に関わっていることが支持された。

その後、affymetrix 社の DNA micro array を用いて網羅的に解析したところ、約 600 遺伝子のプロモーター領域が沈降 DNA に含まれていることが確認された。これらには、遺伝子の転写・翻訳やタンパク質フォールディング・分解等に関わる様々な遺伝子が含まれていた。沈降 DNA へのこれら遺伝子のプロモーターの含有は、特異的プライマーを用いた rela time PCR 解析からも確認された。よって、ChIP on CHIP 解析により、マウス脳において、NF-Y の制御下に存在しうる様々な遺伝子が同定された。

(3) NF-YA ノックアウトマウスを用いた NF-Y の神経病態における役割の解明

NF-Y の神経変性における関与を明らかとするため、NF-YA のヘテロマウス (+/-) と、変異ハンチンチンを発現するハンチントン病モデルマウス (R6/2) とを交配した。交配マウスについて、脳の組織解析を行ったところ、NF-YA のヘテロマウスと野生型マウスとの間で、脳形態やユビキチン陽性の凝集体の数に大きな差は観察されなかった。NF-YA ヘテロマウスについて解析したところ、

遺伝子数は半分になっているにも関わらず、その mRNA 発現量は、野生型 (+/+) と比べ約 20% 程度しか減少していなかった。よって、ヘテロマウスでは、それほど NF-Y の機能は阻害されていないと考えられ、このことが脳形態に大きな影響を示さなかった原因であると考えられた。

(4) まとめ

以上のマウスを用いた解析から、神経系における NF-Y のマウス発達・生存における重要性が明らかとなるとともに、その機能に関わると目される NF-Y ターゲット遺伝子を同定することに成功した。しかしながら、実際、NF-Y が神経細胞の分化や機能にどのような役割を持つか、また、それがどのようにしてマウスの発達・生存に結びついているかはまだ不明であり、今後の課題である。

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 2 件)

① Yamanaka T, Nukina N., Transcription factor sequestration by polyglutamine proteins. *Methods Mol Biol.* 2010;648:215-29. (査読無し)

② Yamanaka T, Tosaki A, Miyazaki H, Kurosawa M, Furukawa Y, Yamada M, Nukina N., Mutant huntingtin fragment selectively suppresses Brn-2 POU domain transcription factor to mediate hypothalamic cell dysfunction., *Hum Mol Genet.* 2010 Jun 1;19(11):2099-112. (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

① 山中智行、戸崎麻子、宮崎晴子、黒沢大、古川良明、山田みず樹、貫名信行：変異ハンチンチンは Brn-2 POU ドメイン転写因子の活性を阻害し視床下部神経ペプチドの発現を抑制する：第 62 回日本細胞生物学会大会 2010 年 5 月 21 日 大阪

② 山中 智行、戸崎 麻子、宮崎 晴子、黒沢 大、古川 良明、山田 みず樹、貫名 信行：変異ハンチンチンは POU ドメイン転写因子 Brn-2 を特異的に阻害し、視床下部神経細胞の機能を障害する：包括脳ネットワーク・

夏のワークショップ 2010 年 7 月 29 日 札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 智行 (YAMANAKA TOMOYUKI)

独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チーム・研究員

00381575

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし