

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700404

研究課題名(和文) クロマチン動態による神経細胞分化の制御機構の解明

研究課題名(英文) Chromatin Dynamics 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)：

神経細胞分化を制御する分子メカニズムに関しては不明な点が多い。クロマチン動態を含めた統合的な遺伝子発現制御の研究が必要とされている。本研究では、大脳皮質形成をモデルとして神経細胞分化においてクロマチン構造制御に関与すると予測されるヒストン脱アセチル化酵素とDNA修復酵素の役割の一端を新たに明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：

Molecular mechanism of neuronal differentiation including transcription and chromatin regulation has remained unclear. In this study, we revealed that histone deacetylase (HDAC) and DNA repair protein play a critical role in cortical differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：発生・分化・老化、遺伝子発現調節、クロマチン、DNA修復

1. 研究開始当初の背景

高次脳機能を担う大脳皮質は多様な特性を持つ神経細胞からなるシステムであることが神経突起の形態や6層の細胞構築、領野特異的な回路形成から明らかになっている。特に回路形成には、発生期における遺伝的プログラムに加えて生後発達の可塑性期の経験や学習といった神経の電気活動に依存した過程も不可欠である。このような分化過程においては、様々なシグナルが核へ伝えられ遺伝子発現を制御する分子メカニズムが

必要であると考えられるが不明な点が多く、転写因子などの発現パターンの解析等にとどまっているのが現状である。一般に遺伝子発現制御の基本は転写因子群であるが、ヒストンタンパク質の化学修飾(リン酸化・メチル化・アセチル化など)やDNAのメチル化を基本としたクロマチン構造の3次元的な変化がエピジェネティックな制御として重要な要素となることが明らかとなってきた。また、転写活性化にともなって損傷とは関係なく積極的な酵素活性によるDNA切断と修復が

構造制御の一つとして行われていることも示唆されている。このようなエピジェネティックな構造変化は特に長期間にわたる遺伝子発現のオン・オフ制御には不可欠であると考えられ、神経細胞の分化制御機構を解明する上で鍵になるものと言えよう。国内ではほとんど皆無であるが、国外からはこのような視点からの解析が徐々に報告されており、その重要性が注目されている。

我々は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 (HDAC) の一つである HDAC9 に注目し蛍光タンパク質による細胞内の時空間的動態の解析を試み、生後発達期の脳皮質神経細胞において電気活動依存的に核から細胞質へ移動すること、それによって樹状突起の形態形成が促進されていることを見出ししてきた (Sugo, et al. 2010)。これは、電気活動に伴って核・細胞質間を移動する HDAC がクロマチン構造を変化させることによって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、神経前駆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 p53 欠損により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、これは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 (Sugo et al., 2000, 2004)。さらに、このアポトーシスは PARP-1 欠損で有意に減少することを明らかにしており、クロマチン構造制御の関与も示唆される (Sugo et al., 2007)。しかし、根本となる DNA 修復を必要とする損傷の原因は不明であり、解明が求められている。

2. 研究の目的

本研究はクロマチン構造から DNA 修復にまで踏み込んで、胎生期から生後発達期の電気活動依存的な細胞分化における一連のエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を明らかにすることで多様な脳皮質神経細胞分化の分子メカニズムを解明する。第 1 に、HDAC9 をモデルとして脳皮質の層と領野構造に着目し、その構造の基礎となる転写因子と HDAC9 の時空間的なタンパク質間相互作用と発現パターン解析、網羅的遺伝子発現プロファイルを作製することで制御の標的となる遺伝子群を同定し、脳皮質形成でクロマチン構造制御による遺伝子発現の標的となる遺伝子の多様性を明らかにする。第 2 に、ノックアウトマウスの解析から明らかになった DNA 修復酵素の脳皮質形成における役

割の意義を明らかにするため、DNA 切断を伴う転写活性化機構への関与を解析する。第 3 に、ヒストン修飾酵素や DNA 修復酵素、転写因子を細胞内で可視化し、胎生期および生後発達期の神経細胞分化に連動した時空間的な動態と、その動態を変化させた際の樹状突起の形態解析や遺伝子発現プロファイルを単一細胞レベルで行い、その生理学的意義を明らかにする。これにより、単なる遺伝子発現レベルの解析だけでは理解し得ない構造制御が細胞分化に及ぼす機能的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HDAC による神経活動依存的な遺伝子発現制御の解析

神経活動依存的な HDAC 活性による遺伝子発現の制御を調べるため、先行研究の結果から遺伝子発現に変化が見られた *c-fos* 及び *Arc* に着目した。これらの遺伝子は共に HDAC9 による発現制御を受けている可能性が高いと考えられる。まずこれらの遺伝子が活動依存的に発現量を変化させているかを調べるため脳皮質分散培養系で培養日数ごとにその発現量を確認した。また、KCl による脱分極や電位依存性ナトリウムチャネル阻害剤テトロドトキシン (TTX) による薬理処理も行いその影響を調べた。次に神経活動依存的な遺伝子発現における HDAC の関与を調べるため、自発的発火活動がほとんど起こっていない培養 2 日目、及び活動頻度の高い培養 14 日目の細胞に HDAC 活性阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) を用いて遺伝子発現変化を調べた。また、得られた結果が活動依存的な HDAC9 による脱アセチル化制御を受けたものであるのかどうかを調べるためにヒストン H3 の K9、K14 のアセチル化を特異的に認識する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法を利用して *c-fos* 及び *Arc* のプロモーター領域のアセチル化レベルについて解析し、遺伝子発現との相関性を調べた。また HDAC 活性、及び神経活動が細胞の形態形成に与える影響を解析するために、TSA または TTX を添加した培地中で細胞を培養し、その樹状突起の形態を定量的に観察した。

(2) 神経細胞分化における DNA 修復酵素の動態解析

複数の DNA 修復遺伝子のノックアウトマウスにおいて、神経細胞分化の過程で異常なアポトーシスが起きることが報告されている。例えば、塩基除去修復に関与する Pol β や DNA 二本鎖切断修復に関与する ligase IV、XRCC2 のノックアウトマウスにおいて、胎生期の脳から後脳、神経管と神経系特異的に顕著に

アポトーシスが観察されている。大脳皮質では特に解析が進められており、XRCC2のノックアウトマウスでは未分化な神経幹細胞の存在する脳室帯でアポトーシスが観察されるのに対して、Pol β のノックアウトマウスでは最終分裂を終えて神経細胞へ分化が決定した細胞が存在する皮質板でアポトーシスが観察され、修復系の違いによってその表現型は異なっている。また、このようなアポトーシスは神経分化の時期特異的に観察されており、分化との関連性が注目されている。しかしながら、神経細胞分化においては損傷部位の構造や量すら不明であり、DNA修復の意義は未だ明らかにされていない。本研究では、DNA修復酵素の核内局在を調べることによって、その役割を解明することを目指した。DNA修復遺伝子は損傷部位に集積して機能することが知られており、このような局在はfociと呼ばれている。本研究ではfociの形成に着目し、ノックアウトマウスにおいてアポトーシスが観察される二本鎖切断修復と塩基除去修復に関与する修復酵素について、発生期における内在的な核内分布を免疫染色により解析した。加えて、fociの観察されたDNA修復酵素XRCC1について、分化と関連して共局在する分子を探することで、神経分化におけるDNA修復の役割の解明を目指した。

4. 研究成果

(1) HDACによる神経活動依存的な遺伝子発現制御の解析

神経活動依存的な遺伝子発現におけるHDACの関与を調べるため、大脳皮質分散培養系で自発的発火活動が低い培養2日目にHDAC活性阻害剤TSAを培養液中に添加し、前初期遺伝子群の*c-fos*及び*arc*の発現量をリアルタイムRT-PCRで解析した結果、発現の増加が見られた。その一方、発火頻度が増加した培養14日目では、TSA添加による効果はわずかであった。この遺伝子発現変化とプロモーター領域のヒストンのアセチル化との関連性を調べるために、アセチル化されたヒストンH3に特異的な抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により*c-fos*と*arc*のプロモーター領域におけるヒストンのアセチル化レベルの解析を行った。その結果、培養2日目で遺伝子発現増加が見られたTSA添加、およびKC1による脱分極状態ではコントロールに比べアセチル化レベルが高くなっていた。さらに、培養14日目に電位依存性ナトリウムチャンネル阻害剤TTXを添加し神経活動を抑制したところ、コントロールに比べアセチル化レベルは低下していた。またTSAによるHDAC活性の阻害が細胞形態に与える影

響を調べたところ、樹状突起の全長、及び先端数が増加することが明らかとなった。以上の結果から、神経活動依存的なHDACの活性によってプロモーター領域のヒストンアセチル化レベルを調節することで遺伝子発現を制御していることが明らかになった。この中には特に細胞の樹状突起伸長に関わる遺伝子が含まれると考えられる。また今回のヒストンアセチル化の変化は、神経活動に依存したHDAC9の核・細胞質間移動と相関することから、HDAC9の局在性により制御されている可能性が示唆された。

(2) 神経細胞分化におけるDNA修復酵素の動態解析

DNA二本鎖切断修復と塩基除去修復の酵素に着目し、免疫染色によって発生期マウス大脳皮質におけるDNA修復酵素の核内分布を解析した。その結果、DNA修復酵素XRCC1と γ H2AX共に脳室帯にある神経前駆細胞の核内に損傷部位への集積と考えられるfociが数多く観察された。XRCC1に関しては、過酸化水素などで損傷を与えた場合に観察されるfociよりも大きく特徴的なfociが1細胞につき数個程度観察された。興味深いことにXRCC1のfociは、転写伸長中であるリン酸化RNA polymerase II CTDのfociと共局在していた。さらに、大脳皮質分散培養においても同様な共局在が見られたが、RNA polymerase II特異的な転写阻害剤 α -amanitinを培養液に添加すると、リン酸化RNA polymerase II CTDと共にXRCC1のfociも減少する傾向が観察された。以上の結果から、神経前駆細胞においてDNA損傷が生じていることが明らかとなった。また、XRCC1がRNA polymerase IIと共にfociを形成し、転写と共役して機能している可能性が初めて示唆された。このことから、神経細胞の正常な分化には、神経前駆細胞の段階で転写と共役したDNA修復が機能する必要があると考えられる。

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2件)

① Hong Zhao, Takuro Maruyama, Yuki Hattori, Noriyuki Sugo, Hyota Takamatsu, Atsushi Kumanogoh, 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)

[学会発表] (計2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

[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

なし

(3) 連携研究者

なし