

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19312

研究課題名(和文) 新生ニューロンのDNA損傷に由来する脳ゲノム不均一性の検証

研究課題名(英文) Verification of brain genomic heterogeneity derived from DNA damage in newborn neurons

研究代表者

見学 美根子 (Kengaku, Mineko)

京都大学・高等研究院・教授

研究者番号：10303801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脳皮質形成過程の形態形成運動の機械的ストレスにより生じるDSBが、特定のクロマチン構造やDNA配列を標的とするかをマルチオミクス解析により検証することを目的とした。END-seq法、gH2AXに対するChIP-seqおよびCUT&Tag法を確立し、in vitro遊走アッセイで隘路通過後に増加するDSBのピークの同定を試みた。しかし上記培養系は回収率と実験操作で生じるDNA損傷のため不適であることが判明した。そこで脳組織を凍結後に核を採取し、精製過程にDNA損傷修復反応が起こらない条件でクロマチン精製する方法を最適化して検証したところ、転写活性領域にDSBが集積することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞遊走は発生、免疫、がん転移などの様々な生理・病理過程に必須の過程である。隘路遊走に伴うDNA損傷が体細胞突然変異を誘発する可能性は株化細胞を用いた研究で議論されているが、生体での意義については推論の域を出ない。本研究は、生体内のニューロンで初めて捉えた3D隘路遊走に伴うDSB形成の生理的病理的意義を明らかにする画期的な挑戦であり、DSBの詳細なマッピングの手法を確立した。今後野生型とDSB修復の起こらない遺伝子改変動物を用いて隘路遊走により生じるDSBがニューロン特有のゲノム不均一性に関わる可能性を検証する。

研究成果の概要(英文)：We previously found that newborn neurons undergo DNA double strand breaks (DSBs) by mechanical stress during morphogenetic movement in the developing mouse brain. To examine if the mechanical stress-induced DSBs are associated with frequent somatic mutations in the brain, we performed END-seq, ChIP-seq and CUT&TAG for gH2AX to detect DSB sites after confined migration in an in vitro transwell assay. However, the transwell assay was found to be unsuitable due to low cell recovery rate and unexpected DNA damage during cell harvesting. Therefore, we isolated nuclei from frozen brain tissue and purified chromatin to eliminate the possibility of de novo DNA damage during experimental processes. Using the mouse cerebellum at postnatal day 20, we found that DSBs accumulated in the transcription start sites.

研究分野：神経発生学

キーワード：小脳顆粒細胞 ニューロン遊走 DNA損傷 ゲノム不均一性 NGS解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物の誕生から死に至るまで、DNAは複製、転写、紫外線、薬物など内外のストレスで確率的に損傷して体細胞変異を蓄積し、時として発癌に至ることが知られている。個体の生涯を通じて維持される哺乳類脳のニューロンには、増殖期の複製エラーによると考えられる単塩基置換以外に、コピー数増加やindel、転座などの大規模な体細胞突然変異がモザイクに蓄積してゲノム不均一性を生じており、ニューロン機能の多様性や精神神経疾患との因果関係に注目が集まっている。これらの変異の多くは発生期に生じると考えられるが、その誘因は一部を除いて明らかでない。

哺乳類の脳皮質は、分裂層で最終分化したニューロンが神経組織を大規模に移動し、秩序正しく重層することで形成される。新生ニューロンは、核を柔軟に変形させてその直径よりはるかに狭い組織間隙の隘路をすり抜けて遊走する。応募者は小脳皮質形成過程における顆粒細胞をモデルとした予備研究で、狭い組織間隙を通過する機械的ストレスがDNA二重鎖切断(DSB)を高頻度で誘発することを見出した。さらにこれらのDSBは非相同末端結合(NHEJ)でニューロンの細胞死を起こさず速やかに修復されることを見出した。NHEJによる修復は不完全でエラーを起こしやすいことが知られており、遊走後に生じるDSBの一部は変異を残す可能性が高い。これらの予備知見と予測から、正常脳発生の生理的な機械的ストレスがニューロンに不可避のゲノム損傷を引き起こし、その確率的修復エラーが成体脳のニューロン機能遺伝子発現の揺らぎを生む一因となるという仮説が浮かび上がった。

### 2. 研究の目的

本研究は、正常脳発生のニューロン遊走に伴う生理的な機械的ストレスがゲノム損傷を引き起こし、その確率的修復エラーが成体脳のニューロンのゲノム不均一性を生む一因となる可能性を検証することを目的とした。小脳皮質発生における顆粒細胞ニューロンの遊走をモデルに、マルチオミックス解析により遊走中のDSB形成のホットスポットを同定し、その修復エラーが特定の遺伝子発現に影響を与え、精神神経疾患やニューロンの個性獲得に結びつくかを明らかにすることを旨とした。

### 3. 研究の方法

予備研究で、多孔性メンブレンを用いて組織間隙の隘路遊走を再構成したtranswell遊走アッセイを確立して分子経路を探索した結果、隘路通過後に生じるDNA二重鎖切断(DSB)はTop2b活性に依存しており、一過的にTop2bと共有結合(Top2 cleavage complex; Top2cc)を形成することを見出した。申請研究ではまずChIP-seqでゲノム上のTop2b依存的DSBの分布の描出を試みた。またTop2ccに限らず全DSBを1塩基レベルで特定できるEND-seq法を用い、DSBの詳細なゲノムワイドマッピングを試みた。並行してChIP-seq(H3K4me3, H3K27me3など)を行い、ゲノム・エピゲノムプロファイルとDSB部位の相関を明らかにした。同様に転写活性分布をRNA-seqにより描出して上記DSBマップと照合し、機械的ストレスによるDSBがゲノムの特定の領域や配列で起こるかを、特にニューロン機能遺伝子の制御領域との相関に注目して検証した。

予備実験で隘路遊走によるDSBがNHEJ経路で修復されることを確認しているため、最終分化した顆粒細胞でのみNHEJ責任分子Ligase IVが欠損する動物 (NeuroD1-Cre; Ligase IV flox/flox, 各ライン共入手済) を作出した。本動物では遊走後DSBの修復エラー蓄積が増加するかどうかを確認した。

#### 4. 研究成果

トランズウェル遊走アッセイにおいて、隘路遊走した小脳顆粒細胞に DSB 形成が上昇する現象に着目し、1塩基の精度で DSB サイトの検出が可能な END-seq を用いて隘路遊走後に増加する DSB のピークの同定を試みた。しかし細胞回収時の機械的ストレスにより DNA 損傷が起こると考えられ、隘路遊走させない対照群にも多くの DSB が検出されて有意な差が得られなかった。

次に少数の細胞で感度高く ChIPseq ができる CUT&Tag 法を合わせて検証した。CUT&Tag 法は DNA 結合活性の強いヒストンや一部転写因子では強力であるが、DNA 損傷修復分子についてはほとんど報告がなかったため、複数の分子の抗体を用いて解析を行ったが、いずれも特異的なシグナルを得ることができず、分子と DNA の結合が十分でなく方法が適合しないことが判明した。

一方、並行して DSB 修復が起こらない Lig4 変異マウスの表現型を解析したところ、野生型では DSB が消失している生後 2 週間を過ぎても、多くの顆粒細胞で DSB が残存していることを見出した。そこで野生型と変異動物の脳組織を凍結後に核を採取し、精製過程で生じる DNA 損傷の影響が見られない条件で END-seq および ChIP-seq を行ったところ、いずれの条件でもニューロンで DSB 頻度が高いとされている転写開始点に強いピークが検出され、方法が適切であることが明らかになった。現在 Lig4 変異マウスで特異的に高い DSB ホットスポットを探索している。今後、DSB ホットスポットの周辺に定型発達および精神神経疾患患脳で確認されている体細胞突然変異が高頻度で見られるかをデータベースを用いて検証し、遊走期の DSB がニューロン特有の生理的病理的ゲノム不均一性に寄与しているかを明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakazawa Naotaka, Greci Gianluca, Kameo Yoshitaka, Takeda Noriko, Sawada Tsuyoshi, Kurisu Junko, Zhang Zhejing, Adachi Taiji, Nonomura Keiko, Kengaku Mineko	4. 巻 -
2. 論文標題 Migrating neurons adapt motility modes to brain microenvironments via a mechanosensor, PIEZO1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.01.17.524464	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 ZHOU CHUYING, KENGAKU MINEKO	4. 巻 46
2. 論文標題 Possible mechanisms of bidirectional nuclear transport during neuronal migration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIOCELL	6. 最初と最後の頁 2357 ~ 2361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32604/biocell.2022.021050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Toshio, Fujishima Kazuto, Kengaku Mineko	4. 巻 22
2. 論文標題 Modeling Intestinal Stem Cell Function with Organoids	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10912 ~ 10912
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222010912	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 6件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Mineko Kengaku
2. 発表標題 Force Transmission to the Nucleus during Neuronal Migration in the Developing Brain.
3. 学会等名 International Symposium on Neural Development and Diseases（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Zhejing Zhang, Noriko Takeda, Hiroyuki Sasanuma, Andres Canela, Mineko Kengaku
2. 発表標題 Cerebellar granule cells form transient DNA double-strand breaks during postnatal development.
3. 学会等名 The 19th Ataxia-Telangiectasia workshop (ATW2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 見學美根子、中澤直高
2. 発表標題 脳発生におけるニューロン3D遊走は複数の動力で制御される. 3D neuronal migration driven by multiple engines.
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mineko Kengaku
2. 発表標題 Cytoskeletal forces driving neuronal migration in 3D brain tissues.
3. 学会等名 International Symposium on Development and Plasticity of Neural Systems (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mineko Kengaku
2. 発表標題 Multiple engines driving nuclear migration in neurons during brain development.
3. 学会等名 RIMS Workshop Mathematical Mechanobiology (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 見学美根子
2. 発表標題 ライブイメージングで解くニューロン遊走における核輸送の制御機構
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naotaka Nakazawa, Gianluca Grenzi and Mineko Kengaku
2. 発表標題 Mechanical stress by extracellular confinement triggers a mode transition of neuronal migration.
3. 学会等名 Materials, Mimics, and Microfluidics: Engineering Tools for Mechanobiology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chuying Zhou, You Kure Wu, Takahiro Fujiwara, Mineko Kengaku
2. 発表標題 Nesprin-2 mediates bidirectional nuclear transport through a co-dependent interplay between dynein and kinesin-1 in migrating cerebellar granule neurons.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 初田茜、藤島和人、栗栖純子、大野伸彦、見学美根子
2. 発表標題 Oscillation of AMPK activity regulates mitochondrial fission and dendritic development in hippocampal neurons.
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------