

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 7日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790332

研究課題名（和文） 遺伝性ジストニア DYT3 の原因遺伝子 N-TAF1 に関する神経細胞特異的機能の解明

研究課題名（英文） Neuron-Specific Function of N-TAF1, the disease causative gene of Hereditary Dystonia (DYT3)

研究代表者

牧野 悟士 (MAKINO SATOSHI)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・特任助教

研究者番号：30423403

研究成果の概要（和文）：遺伝性ジストニア DYT3 の原因遺伝子 TAF1 の神経細胞特異的なアイソフォームに関して、神経細胞における役割を明らかにすることを目的として、神経系および非神経系の哺乳類培養細胞株における強制発現を行い、細胞内局在のパターンを調べた。その結果、両者の間で局在パターンに差異のあることがわかった。また、N-TAF1 が直接発現を制御する遺伝子群を明らかにする目的で、TAF1 または N-TAF1 をノックダウンした細胞株を使用して、対照サンプルとの間で様々な遺伝子の発現量の変化をマイクロアレイ解析によって調べた。その結果、TAF1 によって発現制御される可能性がある遺伝子の候補を見いだした。

研究成果の概要（英文）：We previously found a neuron-specific isoform of the TAF1, which is the disease causative gene of X-linked recessive dystonia-parkinsonism. To investigate the function of the neuron-specific isoform of the TAF1 gene, we carried out over-expression of TAF1 in neuronal and non-neuronal cultured cell lines. We demonstrated that the localization pattern of TAF1 is different between neuronal and non-neuronal cell. And we performed knockdown of either TAF1 or N-TAF1 using siRNA. The microarray analysis showed some candidate gene which might be regulated by N-TAF1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：ゲノム医科学

1. 研究開始当初の背景
申請者はゲノム解析によって遺伝性ジス

トニア DYT3 の原因遺伝子探索を行い、
TAF1 のイントロンにおける DYT3 患者特異

的なレトロトランスポゾン挿入を見出した。さらに、トランスポゾン周辺のゲノム領域が高度にメチル化されていること、新たに同定したヒト TAF1 の神経細胞特異的なアイソフォーム (N-TAF1) について、DYT3 患者脳の線条体尾状核における発現量が著しく減少していることを報告した。

この TAF1 遺伝子産物は基本転写因子 TFIID 複合体の最大のサブユニットとして知られており、幅広い生物種でその構造と機能が保存されていることがわかっていた。特に細胞周期や増殖にとって必須の転写因子のひとつであるとされ、哺乳類においても、培養細胞を用いた研究から TAF1 が細胞周期に関連したいくつかの遺伝子の発現を制御していることが示されている。また、様々なヒストン修飾活性をもつことなど、TAF1 が多様な発現制御を行う仕組みについても次第に明らかとなってきた。しかしながら、TAF1 はあくまでも様々な組織で普遍的な発現様式と機能を持つと考えられており、申請者が見出したような組織特異的なアイソフォームの存在や、TAF1 が組織特異的な遺伝子発現制御に関与することはこれまでまったく知られていなかった。

申請者はまた、N-TAF1 がマウスからヒトまで脊椎動物において生物種を越えて保存されており、マウス TAF1 が胚発生期から産後まもなくのステージにおいて高度に発現しているのに対して、N-TAF1 は産後から急速に発現量が増加し、老齢に至るまで高い発現量を維持しているなど、分化後の神経細胞にとって重要な役割をもつ可能性を見出した。このように、基本転写に関連する遺伝子のなかで N-TAF1 は組織特異的かつ時期特異的な調節を受けていると考えられることから、N-TAF1 が神経細胞において特異的な役割、すなわち神経細胞特異的な遺伝子発現の制御を担っていることが示唆される。これは、TAF1 のような基本転写因子が、脳神経系の特定部位といった限定的な範囲にのみ影響を与えて疾患の原因遺伝子となることを説明する初めての例となる。よって、N-TAF1 が神経細胞においてどのような遺伝子群の発現を制御し、またどのような機構によって神経細胞特異的な遺伝子発現制御を実現しているのか調べることを計画した。

2. 研究の目的

申請者らは、ヒト TAF1 (TATA box binding protein-associated factor 1) の神経細胞特異的なアイソフォーム (N-TAF1) を見出し、伴性劣性ジストニアパーキンソン症 (XDP/DYT3) の原因遺伝子であることを報告した。TAF1 が基本転写因子 TFIID 複合体の最大のサブユニットであり、多くの組織で普遍的な発現様式および機能を持つと考え

られていたことに対して、N-TAF1 は組織特異的な調節を受け、神経細胞の生存に必須の機能を持つ可能性があることは興味深い。申請者らはまたこれまでの研究において、N-TAF1 はマウスからヒトまで生物種を越えて保存されていること、マウスでは生後まもなくの期間において N-TAF1 発現量が急激に増加し、かつ老齢マウス個体においても発現量が維持される傾向が認められた。これらのことから N-TAF1 は、神経細胞の発生・分化・維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。そこで本研究では、この N-TAF1 が持つ神経細胞特異的な役割を明らかにすることを目的として、TAF1 を過剰発現させた培養細胞株を用いた実験を計画した。具体的には、マウス TAF1 の強制発現を行うコンストラクトを作製し、マウス由来の神経系および非神経系培養細胞株に導入する。細胞内における導入遺伝子の局在を比較するとともに、導入前後の細胞についてその形態を観察する。また、TAF1 または N-TAF1 のノックダウンを行い、それぞれ対照サンプルとの間で様々な遺伝子の発現量の変化をマイクロアレイ解析によって調べて、特異的に発現量が増加した遺伝子をリストアップする。発現量変化の大きかった遺伝子に関して、蛍光プローブを利用したリアルタイム発現定量解析による確認を行う。これらの結果から、N-TAF1 がもつ神経細胞特異的な機能の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) TAF1 の細胞内局在観察

市販マウス脳 cDNA ライブラリ (Nippon Gene) をテンプレートにして、マウス TAF1 のコード領域を増幅可能なプライマーにより Long PCR を行った。得られた産物を T ベクターにクローニング後、In-Fusion PCR クローニングシステム (TAKARA) を使用して GFP 融合タンパク質発現コンストラクトを構築した。約 400 bp ごとに設計したシークエンシングプライマーによってシークエンシングを行い、配列に誤りがないことを確認した。構築したコンストラクトおよび Mock コンストラクトについて、マウス培養細胞株 Neuro-2A と Hepa1-6 へ Lipofectamine 2000 (Invitrogen) によりそれぞれトランスフェクションし、24 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を使用して観察を行った。

(2) ノックダウンとマイクロアレイ解析

ヒト TAF1 の全アイソフォームをノックダウン可能な siRNA を 3 種、ヒト N-TAF1 を特異的にノックダウン可能な siRNA を 1 種設計した。siRNA のデザインは Invitrogen

のツールを使用して行い、Stealth RNAi として合成した。これらの siRNA は、N-TAF1 の発現が確認できているヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に対して Nucleofector (Lonza) により導入した。導入後 24 時間で細胞から RNA を抽出し、N-TAF1 または TAF1 をそれぞれ特異的に検出可能な蛍光プローブによる定量的 RT-PCR を行い、ノックダウンの効果を確認した。さらに、Affimetrix の Human Focus Array を使用した GeneChip システムによるマイクロアレイ解析に供した。

4. 研究成果

(1) TAF1 の細胞内局在を観察するために、マウス TAF1 のクローニングを行い、GFP 融合タンパク質として発現可能なコンストラクトを作製した (図 1)。

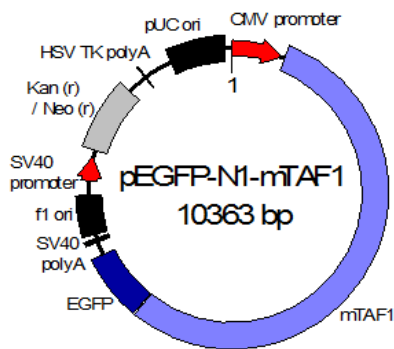


図 1: GFP 融合マウス TAF1 発現コンストラクト

コンストラクトを導入したマウス培養細胞株より crude なタンパク質を調製し、ウエスタンブロットを行ったところ、GFP 抗体と TAF1 抗体の両者で予測分子量 250kDa 付近にバンドシグナルを観察した。これにより、構築したコンストラクトから目的の GFP 融合 TAF1 タンパク質が発現しているものと考えられた (図 2)。

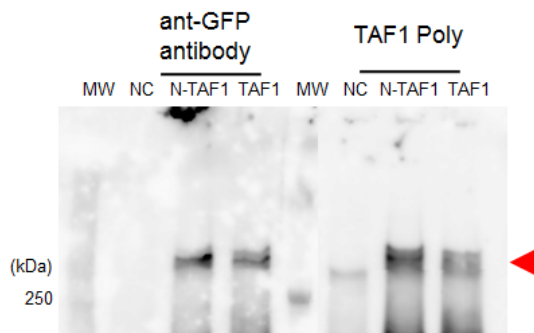


図 2: 発現させた GFP 融合マウス TAF1 のウエスタンブロット

次に、構築したコンストラクトを、マウス培養細胞株 Neuro-2A と Hepa1-6 に対してそれぞれトランスフェクションし、24 時間後に共焦点レーザー顕微鏡を使用して観察を行った。その結果、非神経系の培養細胞 Hepa1-6 では GFP-TAF1 由来の蛍光シグナルについて、核への局在が観察された。一方、神経系の培養細胞 Neuro-2A では、核への局在よりもむしろ細胞質に強いシグナルが観察された (図 3)。

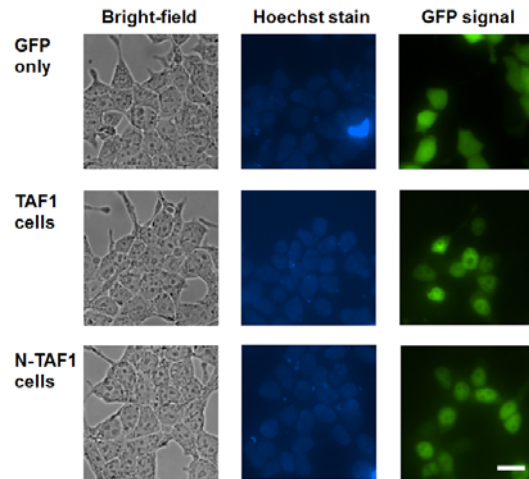


図 3: GFP 融合マウス TAF1 の細胞内局在

この結果は、神経細胞内において、TAF1 が他の細胞とは異なる機能を持つことを示唆するものと考えられた。

(2) ヒト TAF1 の全アイソフォームをノックダウン可能な siRNA を 3 種、ヒト N-TAF1 を特異的にノックダウン可能な siRNA を 1 種設計した (図 4)。

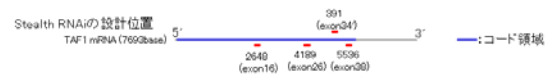


図 4: 設計した siRNA の位置

siRNA を導入した SH-SY5Y から得られた RNA について、N-TAF1 または TAF1 をそれぞれ特異的に検出可能な蛍光プローブによる定量的 RT-PCR を行ったところ、コントロールサンプルと比較して N-TAF1 では 10.4%、TAF1 全体では 27.4% にその発現量が低下していることが確認された (図 5)。また、N-TAF1 特異的となるように設計した siRNA については、N-TAF1 の発現量のみを低下させ、他のフォームの発現量に変化がないことが確認された。

マイクロアレイ実験に際して、抽出した RNA の品質を評価するためにバイオアナライザ 2100 (Agilent) による泳動を行った結

果、RNA Integrity Number (RIN)の値はいずれのサンプルにおいても8以上と高品質であった。

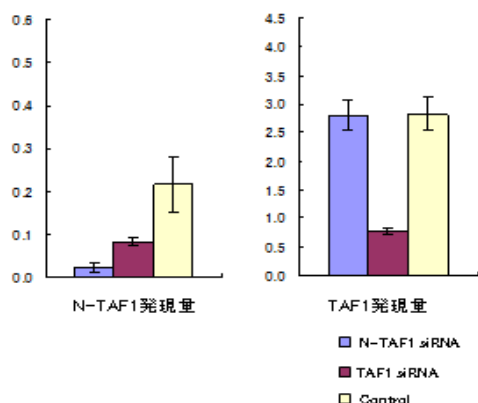


図5：リアルタイム RT-PCR によるノックダウンの確認

N-TAF1 をノックダウンした場合、コントロールとの比較において発現量低下を示す遺伝子が34見つかった。うち、5遺伝子について、N-TAF1 による発現コントロールをうける候補遺伝子として、現在関連の実験を行っているが、必ずしも十分な再現性が確認できない部分があり検討課題である。これは、SH-SY5Y における N-TAF1 発現量が、他の TAF1 アイソフォームと比較して1/10以下と少なく、脳組織から抽出した RNA における比較においても著しく少ないことが関係している可能性が考えられる。このことから、より神経細胞に近いモデルによりこれらの結果を検証したい。

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 Maebayashi H, Takeuchi S, Masuda C, Makino S, Fukui K, Kimura H, Tooyama I. Expression and Localization of TRK-Fused Gene Products in the Rat Brain and Retina. *Acta Histochem Cytochem*. 査読あり、45 巻 1 号、2012、pp.15-23、[DOI:10.1267/ahc.11015](https://doi.org/10.1267/ahc.11015)

② Nakahara H, Konishi Y, Beach TG, Yamada N, Makino S, Tooyama I. Infiltration of T lymphocytes and expression of icam-1 in the hippocampus of patients with hippocampal sclerosis. *Acta Histochem Cytochem*. 査読あり、43 巻 6 号、2010、pp.157-162、

[DOI:10.1267/ahc.10022](https://doi.org/10.1267/ahc.10022)

[学会発表] (計1件)

① Makino S, Tamiya G, Tooyama I、Neuron-specific enhanced expression of TAF1 and its isoform. The American Society of Human Genetics 2010 Annual Meeting、2010.11.5、アメリカ合衆国・ワシントン D.C.

6. 研究組織

(1)研究代表者

牧野 悟士 (MAKINO SATOSHI)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・特任助教

研究者番号：30423403