

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成23年 6月 3日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700447

研究課題名（和文） 大脳皮質の神経細胞分化におけるクロマチン構造制御の解明

研究課題名（英文）Chromatin Dynamics Associated with 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）：

大脳皮質形成において核内空間における染色体、クロマチンを含めた核内分子の動態は、高度に制御され、細胞の振る舞いや分化を決定・維持する重要な要因になりうる。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を旨とし、分子遺伝学的手法と蛍光イメージング技術を用いて転写因子とDNA修復酵素の動態を解析した。その結果、転写因子とDNA修復酵素の新たな時空間的動態を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

Neuronal differentiation during cortical development is regulated by dynamics of chromatin containing DNA and transcription factors. Here we examined spatiotemporal interactions between fluorescent-tagged transcription factors and their target sites in living cells using single-molecule imaging techniques. The transcription factor binding to its target sequences showed longer residence time compared to that binding to unrelated sequences in the nucleus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：脳神経科学、神経化学、神経薬理学

キーワード：発生・分化・老化、DNA修復、1分子生理・生化学

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は、神経前駆細胞からの最終分裂後に適切な領域へと移動して神経回路を形成する。この過程は遺伝的に時系列が固定化されている一方、神経活動として環境にตอบสนองし可塑的に変化する2つの側面を持ち、大脳皮質の機能構築に寄与していると考えられる。いずれの過程においても遺伝子発現を伴うことが明らかとなっているが、その制御メ

カニズムについては不明な点が多い。

遺伝子発現には、転写調節領域の認識配列に結合・解離する転写因子によるオン・オフ制御に加えて、エピジェネティックなDNAメチル化やヒストン修飾などクロマチン構造制御が不可欠であることが急速に明らかとなりつつある。核内空間における染色体、クロマチンを含めた核内分子の動態は、高度に制御され、細胞の振る舞いや分化を決定・

維持する重要な要因になりうる。これは、先に述べた神経細胞の発生・分化の分子メカニズムを解明する上で鍵になると考えられる。

国内外において記憶・学習の観点からエピジェネティクスが注目されており、*in vivo*でのヒストン修飾のプロファイル解析なども進められているのに比べ、細胞レベルでの基盤となる分子メカニズムには不明な点が多く残されている。遺伝性神経疾患レット症候群の原因遺伝子 MeCP2 がクロマチン制御因子であることや、成体での神経新生、軸索再生を目指した治療薬（バルプロ酸など）の標的分子としても注目されており、作用機序を含めた分子基盤の確立は急務である。しかし、非分裂細胞での遺伝子発現とクロマチン動態の関連さえほとんど明らかにされていないことに加え、多様な神経細胞は分子生物学的手法による解析を困難にしている。また、生物研究の新たな潮流としてライブイメージングによる時空間的な分子動態解析と1分子計測による定量的データに基づいた理論的な展開を求められており、脳研究においても重要な課題である。

申請者らはこの問題に対し分子遺伝学的手法と最新のイメージング手法を合わせて取り組んできた。クロマチン制御因子であるヒストン脱アセチル化酵素 HDAC9 に注目し、蛍光タンパク質によるイメージングで大脳皮質神経細胞分化での時空間的な動態を *in vitro* および *in vivo* で解析してきた。その結果、HDAC9 は電気活動依存的に核から細胞質へ移動し、遺伝子発現さらに樹状突起の形態形成を制御することを明らかにしてきた (Sugo et al., *EJN*, 2010)。これは、神経回路発達による電気活動を引き金に、核・細胞質間を移動する因子によるクロマチン動態が神経細胞分化を制御することを示唆している。さらに、新たなクロマチン制御の可能性として DNA 修復酵素に注目し研究を進めてきた。塩基除去修復に属する DNA ポリメラーゼβ (Polβ) のノックアウトマウスの作製と解析を行い、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., *EMBO J* 2000; Sugo et al., *MCB* 2004; Sugo et al., *BBRC* 2007)。これらの研究成果に基づいて、クロマチン動態に

よる神経細胞分化の可能性を強く示唆するに至っている。

2. 研究の目的

大脳皮質形成において核内空間における染色体、クロマチンを含めた核内分子の動態は、高度に制御され、細胞の振る舞いや分化を決定・維持する重要な要因になりうる。本研究では申請者らがこれまで研究してきた神経細胞分化の遺伝子発現制御における核内分子動態とその役割の解明をさらに進めるために、染色体や転写因子、クロマチン制御因子、さらに DNA 修復酵素に着目して細胞分化と連動した時空間的な核内配置と機能を蛍光イメージング解析により明らかにすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) 転写は、広大なゲノムの塩基配列から転写因子がその標的遺伝子の発現調節領域にある特異的な配列に結合し、RNA ポリメラーゼを含む基本転写装置の形成を促進することで開始される。この過程において、転写因子は核内空間の3次元的な動態で特異的な配列を探索して結合すると考えられるがその実態は明らかとなっていない。生きた細胞の核内における転写因子の動態を測定する直接的な方法として、1分子蛍光イメージングは有効な手段として考えられる。1分子蛍光イメージングを用いることで個々の転写因子の時空間的な動態を定量的に解析できることが期待されるが報告はほとんどない。よく研究されている転写因子の1つである CREB (cAMP 応答配列結合タンパク質) は二量体を形成し、CRE (cAMP 応答エレメント) 配列に特異的に結合することが知られている。神経細胞では神経活動によるカルシウムイオンの細胞内への流入により CREB が活性化し複数の遺伝子の転写を早期に開始させる。転写因子の動態解析の新しいアプローチとして、転写因子 CREB と DNA の相互作用を1分子イメージングにより解析することを目指した。初めに *in vitro* で CREB と DNA の相互作用を1分子蛍光イメージングにより観察するため、タグタンパク質を付加した CREB 組換えタンパク質を無細胞系転写翻訳システムにより作製した。また、これ

までの報告を基に CRE 配列への結合を欠損、または二量体形成を欠損する 2 つの変異体 CREB を同様に作製した。その後、タグタンパク質に特異的に結合するリガンドを用いて蛍光標識した。次に、カバーガラスを 2 枚重ねたチャンバーを作製し、CRE 配列または転写因子 NFκB の認識配列 (κB 配列) をアビジン・ビオチン反応によりチャンバー内に固定した。最後に、作製した CREB タンパク質を含む反応溶液を導入し、全反射蛍光顕微鏡と高感度 EM-CCD カメラを用いて観察した。

この *in vitro* の結果を踏まえて同様の遺伝子発現ベクターを神経系細胞株に遺伝子導入を行った。その後、細胞膜透過性リガンドを用いて核内に発現している CREB タンパク質を蛍光標識した。斜光レーザー照明顕微鏡と高感度 EM-CCD カメラを用いて核内の CREB タンパク質の 1 分子蛍光を観察した。

(2) 神経細胞分化においてクロマチン構造制御への関与が示唆される DNA 修復の役割の解明を進めるため、塩基除去修復酵の一つである Pol β に着目して時空間的動態をマウス分子遺伝学的手法で調べた。発生期の脳皮質形成において発現時期が異なる遺伝子のプロモーター制御下で組換え酵素 Cre を発現するマウスを複数系統使用して、Pol β コンディショナルノックアウトマウスを交配により作製した。これら脳皮質形成において時空間的に異なったタイミングで Pol β を欠失するコンディショナルノックアウトマウスの表現型を DNA 損傷やアポトーシスを検出する免疫組織化学により調べた。

4. 研究成果

(1) CRE 配列をカバーガラスに固定化した試料では、結合した CREB の蛍光による輝点が多く観察された。一方、κB 配列を固定化した試料では輝点の数が明らかに少なかった。そこで、CREB の結合時間を定量的に解析したところ、1 秒以上存在する輝点の割合が κB 配列に比べ CRE 配列との相互作用で高いことがわかった。また、変異体 CREB ではこの結合活性が失われていた。以上の結果より、1 分子イメージングを用いた転写因子と DNA の相互作用を計測する実験系を構築

することができた。さらに、生細胞で転写の場の時空間的動態を計測する技術として、細胞核内の蛍光標識した転写因子 CREB を 1 分子レベルでイメージングすることに成功した。核内に輝点として捉えられた 1 分子の動態を画像解析ソフトウェアを用いて追跡し、定量的に解析した結果、*in vitro* の実験結果と同様に野生型のタンパク質と認識塩基配列への結合能が欠損した変異体タンパク質では異なる動態を示すことが明らかとなった。従って、CREB は非認識配列よりも CRE にわずかに長く結合することで基本転写装置の形成を誘導していることが示唆される。また、生細胞の核内での分子動態を蛍光イメージングにより計測する新しい実験系を確立することができたと考えている。今後は、染色体やクロマチン制御因子、DNA 修復酵素等の個々の計測を進めるとともに、多色蛍光による複数因子の同時計測が課題である。

(2) 作製したコンディショナルノックアウトマウスの脳皮質形成における DNA 損傷やアポトーシスを免疫組織化学により解析した。その結果、これまでの全欠損の Pol β ノックアウトマウスと同様の表現系が観察される系統と、異なる表現系が観察される系統を作製することができた。したがって、Pol β は神経細胞分化の過程で一過的に必要な時期があることを示唆してきたが、今回の研究により詳細にその必要とされる時期を明らかにすることができた。今後の課題として、塩基除去修復としての呼吸代謝による活性酸素種等によるグローバルな DNA 損傷の修復とは異なる、この限定された役割の分子メカニズムの解明が重要である。

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)

[学会発表] (計 6 件)

① Noriyuki Sugo, Masatoshi Morimatsu, Yoshiyuki Arai, Yoshinori Kousoku, Aya Ohkuni, Taishin Nomura, Toshio Yanagida, Nobuhiko Yamamoto
Single-Molecule Imaging Reveals Dynamics of CREB Transcription Factor in Living Cells

The 23rd CDB Meeting Building multi
cellular systems from Cellular Cross-Talk
2013年1月22日 神戸

② 菅生紀之、森松賢順、新井由之、香束剛
章、大國紋、野村泰伸、柳田敏雄、山本亘彦
1分子イメージングによる転写因子 CREB の
動態解析
第35回日本分子生物学会年会
2012年12月11日 福岡

③ Noriyuki Sugo, Masatoshi Morimatsu,
Yoshiyuki Arai, Yoshinori Kousoku, Aya
Ohkuni, Taishin Nomura, Toshio Yanagida,
Nobuhiko Yamamoto
Single-Molecule Imaging of Transcription
Factor CREB in Living Cells
Neuroscience 2012
October 15, 2012 New Orleans, USA

④ 菅生紀之、森松賢順、新井由之、香束剛
章、大國紋、野村泰伸、柳田敏雄、山本亘彦
1分子イメージングによる転写因子 CREB
の核内動態解析
第35回日本神経科学学会
2012年9月9日 名古屋

⑤ Alchini, R., Sugo, N., Yamamoto, N.
Histone deacetylase 9 (HDAC9) regulates
thalamocortical axon branching by
shuttling from the nucleus to cytoplasm in
an activity-dependent fashion
第35回日本神経科学大会
2011年9月15日 横浜

⑥ Alchini, R., Sugo, N., Yamamoto, N.
Nucleocytoplasmic translocation of the
histone deacetylase 9 (HDAC9) regulates
thalamocortical axon branching
Cortical Development
May 20, 2001 Chania, Greece

[その他]
ホームページ等

大阪大学大学院生命機能研究科細胞分子神
経生物学研究室ホームページ
<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・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