

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590400

研究課題名(和文) 基本転写因子 TAF1 が関与する転写障害と神経変性の研究

研究課題名(英文) General transcription factor TAF1 is involved in transcriptional impairment and neurodegeneration

研究代表者

牧野 悟士 (MAKINO, Satoshi)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・研究支援者

研究者番号：30423403

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：基本転写因子のサブユニットにおける転写障害が神経変性を引き起こす可能性の観点から、TAF1とその神経細胞特異的なアイソフォームにおける機能面での差異を調べる実験として、細胞周期に関する機能を喪失したハムスターのmutantセルラインを用いた実験を行った。様々な発現コンストラクトを導入した細胞をFACSによって細胞周期解析したところ、mutantセルラインがもつ細胞周期の機能に影響する点突然変異は、TAF1の神経細胞特異的な機能との関連が低いと示唆され、TAF1がもつ細胞周期関連の機能と神経細胞特異的な機能との関連について知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We performed cell-cycle analysis in TAF1 or neuron-specific TAF1 (N-TAF1) transfected temperature-sensitive mutant hamster cell line, exhibits cell cycle arrest and apoptosis at the restrictive temperature. The aim is the comparison of the functional difference between TAF1 and N-TAF1 according to the view of possibilities that transcriptional impairment of subunit of general transcription factor causes neurodegeneration. Analysis of cell cycle by flow cytometry in TAF1 or neuron-specific TAF1 (N-TAF1) transfected mutant hamster cell line showed that the point mutation affects cell cycle in the cell line is less relevant to TAF1's neuron-specific functions.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：転写因子 神経変性 転写障害

1. 研究開始当初の背景

神経難病である遺伝性ジストニア DYT3 は、30 歳代で局所性のジストニアとして発症後に全身性に移行するが、50 歳代ではパーキンソン病の症状を示すといった、単一の遺伝子異常によりジストニアとパーキンソニズムを生ずる珍しい疾患である。申請者はゲノム解析によって 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、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 (Makino S et al. 他 15 名、筆頭著者 Reduced neuron - specific expression of the TAF1 gene is associated with X-linked dystonia-parkinsonism. *Am J Hum Genet.* 80(3):393-406. 2007)。

また、病変は新線条体 (尾状核と被核) に限局し、神経細胞の脱落と顕著なアストロサイトーシスが観察される一方で、腹側線条体である側坐核は正常に保たれていること (Goto S, Makino S et al. 他 7 名、6 番目 Functional anatomy of the basal ganglia in X-linked recessive dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol.* 58(1):7-17. 2005) TAF1 の神経細胞特異的なアイソフォーム特異的な抗体によるラット脳組織切片の免疫染色像が、DYT3 患者脳でみられる神経細胞脱落パターンとよく一致していたこと (Sako W, Tooyama I et al. 他 5 名、4 番目 Identification and localization of a neuron-specific isoform of TAF1 in rat brain: implications for neuropathology of DYT3 dystonia. *Neuroscience.* 189:100-7. 2011) が明らかとなっている。

神経変性疾患の病態として、軸索輸送異常やミトコンドリア機能異常など、様々なポリグルタミンによる分子病態が近年注目されている。しかしながら、ポリグルタミンタンパク質の生理的な機能は完全に解明されたわけではなく、異常タンパク質がもたらす分子病態についても明らかとなっていない。こうしたなかで、最近 'transcription syndrome' という概念 (Vermeulen et al. Three unusual repair deficiencies associated with transcription factor BTF2 (TF IIH): evidence for the existence of a transcription syndrome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59:317-329. 1994) として、遺伝子の転写阻害によって生じる疾患についての理解がすすみつつある。本研究では、遺伝子発現の根本ともいえるべき基本転写因子 TAF1 の異常により、どのようにして中枢神経系にのみ障害が生じるのか、また、なぜ選択的な神経細胞脱落につながるのか、DYT3 の分子病態や発症機序を解明することを本研究の目的とした。このことを通して、神経変性疾患の分子病態解明へ新たな展開

をもたらしことが期待された。

2. 研究の目的

RNA ポリメラーゼ II 依存性遺伝子転写調節の異常が、転写症候群と呼ばれる疾患群とその病態に深く関わっていることの報告が相次いでいる。よく知られた例では、ハンチントン病の発症が、RNA ポリメラーゼ II 依存性遺伝子転写におけるアクチベーターからコアクチベーターへの経路遮断と関係している。また、TBP の異常によって SCA17 が発症し (Koide R et al. A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Hum. Molec. Genet.* 8: 2047-2053, 1999) CCFDN (Congenital cataracta facial deformity neuropathy) の原因遺伝子 CTDP1 は、RNA ポリメラーゼ II のリン酸化・脱リン酸化制御を担っている (Varon, R et al. Partial deficiency of the C-terminal-domain phosphatase of RNA polymerase II is associated with congenital cataracts facial dysmorphism neuropathy syndrome. *Nature Genet.* 35: 185-189, 2003.) さらに、TFIIH に含まれるヘリカーゼの変異が、色素性乾皮症、Cockayne 症候群、TTD などの疾患において、promoter escape での転写制御の異常として関与していることが示唆されている。

これらの事実から、RNA ポリメラーゼ II 依存性の構造遺伝子転写が神経細胞において特別に重要な意味合いを持つことは疑いのないものと考えられる。遺伝子発現の根本ともいえるべき基本転写因子の異常により、どのようにして中枢神経系にのみ障害が生じるのか、また、なぜ選択的な神経細胞脱落につながるのか、興味深い点である。昨年度までに、TAF1 の神経細胞特異的なアイソフォームについて、マウスホモログのクローニングと組織別の発現定量解析を行い、マウスホモログがヒトのそれと同様に神経細胞特異的な発現を示し、生物種を越えて保存されていることを見いだした。本研究においては、これに引き続き、TAF1 とその神経細胞特異的なアイソフォームにおける機能面での差異を調べる実験のひとつとして、細胞周期に関する機能を喪失したハムスターの mutant セルラインを用いた実験を行った。TAF1 が神経細胞特異的かつ、選択的な発現調節を行っている遺伝子ドメインの網羅的なスクリーニングがなされることにより、DYT3 の分子病態や発症機序の解明につながるだけでなく、神経変性疾患を引き起こす神経細胞死メカニズムの発見にもつながると期待できる。

さらに、転写因子の組織特異的な役割が明らかになることは、組織特異的な転写制御機構の理解につながり、脳神経系における一連の遺伝子発現カスケードを解明するきっかけ

となりうる。これにより、将来、運動・感覚知覚・記憶・情動をはじめ高次脳機能の分子的な理解にも結びつくものと期待される。

3. 研究の方法

(1) TAF1 神経細胞特異的アイソフォーム (N-TAF1) 特異的な抗体のキャラクタライズ

N-TAF1 特異的な抗体を作製し、マウス N-TAF1 もしくは TAF1 タンパク質を強制発現するコンストラクトをトランスフェクションした培養細胞から精製したタンパク質試料に対して免疫沈降を行い、この抗体が N-TAF1 特異的に反応することの確認を行った。

(2) N-TAF1 の神経細胞特異的な機能ドメインの検索

TAF1 と N-TAF1 タンパク質における機能面での差異を調べる実験として、細胞周期に関する機能を喪失したハムスターの mutant セルラインを用いた実験を行った。突然変異のないセルラインが 39 度の培養条件でも通常通り培養可能であるのに対して、mutant セルライン (TAF1 のコード領域上に点突然変異をもつ) は、39 度の培養条件で G1 期停止を起こす。これらのセルラインに、マウス Taf1 および神経細胞特異的アイソフォームを強制発現させ、レスキューの有無を比較した。37 度で培養したハムスターの変異セルラインに対して、それぞれの発現コンストラクトをトランスフェクションし、39 度で 27 時間インキュベートした後に FACS による細胞周期解析を実施した。細胞周期解析の手順は以下の通り。

トランスフェクション後の細胞を 6 ウェルプレートに蒔き、39.5 度で 27 時間培養する。

培養後、蛍光観察と 1%パラホルムアルデヒド固定 (on ice, 30 分) を行い、70% エタノール固定を 4 度で 9 時間行う。

エタノール固定後の細胞を洗浄し、200 ug/mL の RNase A 入り PBS で 37 度、45 分処理する。

FACS 解析直前に終濃度 50 mg/mL とするよう PI を加えて on ice で DNA を 10 分染色する。

35 um のメッシュストレーナーを通して、軽く Vortex した後 FACS 解析を行う (BD FACSCalibur)。シグナルフィルタリング後の細胞について 10,000 つのデータを回収する。

回収したデータについて、ModFit Ver.3.2.1 により細胞周期解析を行う。

4. 研究成果

(1) TAF1 神経細胞特異的アイソフォーム (N-TAF1) 特異的な抗体のキャラクタライズ

作製した N-TAF1 特異的な抗体において、

N-TAF1 もしくは TAF1 タンパク質を強制発現させた培養細胞株を用いた免疫沈降により、この抗体が N-TAF1 特異的に反応することを確認した (図 1)。これらの成果について、国際学術誌に論文発表した (雑誌論文)。

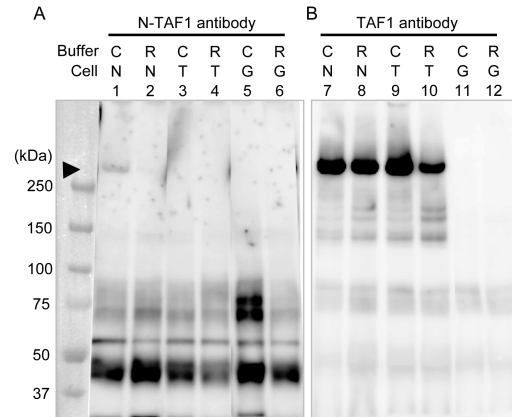


図 1. N-TAF1 特異的な抗体 (左) と TAF1 抗体 (右) を使用した免疫沈降。N: N-TAF1 タンパク質発現細胞、T: TAF1 タンパク質発現細胞、G: GFP 発現細胞。

(2) N-TAF1 の神経細胞特異的な機能ドメインの検索

37 度で培養したハムスターの変異セルラインに対して、それぞれの発現コンストラクトをトランスフェクションし、39 度で 27 時間インキュベートした後に FACS による細胞周期解析を実施したところ、どちらのコンストラクトを導入した場合も、G1 期の割合が約 20% 減少し、S 期の割合が増えることがわかった。この結果より、mutant セルラインがもつ、細胞周期の機能に影響する点突然変異は、TAF1 の神経細胞特異的な機能との関連が低いと示唆され、TAF1 遺伝子配列上の位置情報から、TAF1 がもつ細胞周期関連の機能と神経細胞特異的な機能との関連について知見を得ることができた (図 2)。

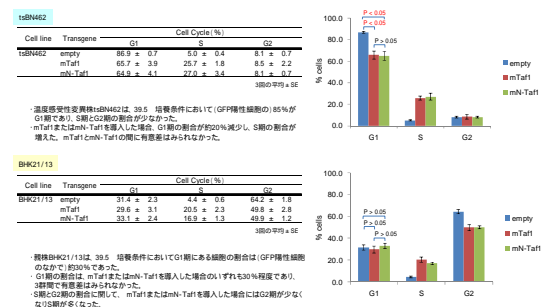


図 2. TAF1 変異細胞株に対して TAF1 または N-TAF1 を強制発現させた際の細胞周期解析

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9件)

Tamiya G, Makino S, Hayashi M, Abe A, Numakura C, Ueki M, Tanaka A, Ito C, Toshimori K, Ogawa N, Terashima T, Maegawa H, Yanagisawa D, Tooyama I, Tada M, Onodera O, Hayasaka K. A mutation of *COX6A1* causes a recessive axonal or mixed form of Charcot-Marie-Tooth disease. **Am J Hum Genet**. 査読あり、95 巻、2014 年、pp.294-300.
DOI: 10.1016/j.ajhg.2014.07.013

Obata M, Tsutsumi S, Makino S, Takahashi K, Watanabe N, Yoshida T, Tamiya G, Kurachi H. Whole-exome sequencing confirmation of a novel heterozygous mutation in *RUNX1* in a pregnant woman with platelet disorder. **Platelets** 査読あり、May22 巻、2014 年、pp.1-6.
DOI: 0.3109/09537104.2014.912750

Yezdimer EM, Umemoto T, Yamada H, Makino S, Tooyama I. Visualizing hepatic copper release in Long-Evans cinnamon rats using single-photon emission computed tomography. **Appl Biochem Biotechnol**. 査読あり、170 巻、2013 年、pp.1138-1150.
DOI: 10.1007/s12010-013-0252-9

Abdelalim EM, Tooyama I. Knockdown of p53 suppresses Nanog expression in embryonic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 査読あり、443 巻、2013 年、pp. 652-657.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.030

Yang H, Yang M, Guan H, Liu Z, Zhao S, Takeuchi S, Yanagisawa D, Tooyama I. Mitochondrial ferritin in neurodegenerative diseases. **Neurosci Res**. 査読あり、77 巻、2013 年、pp.1-7.
DOI: 10.1016/j.neures.2013.07.005

Makino S, Masuda C, Tamiya G, Tooyama I. Generation of a Monoclonal Antibody Specifically Reacting with Neuron-specific TATA-Box Binding Protein-Associated Factor 1 (N-TAF1). **Antibodies** 査読あり、2 巻、2013 年、pp.1-8.
DOI: 10.3390/antib2010001

Jambaldorj J, Makino S, Munkhbat B, Tamiya G. Sustained expression of a neuron-specific isoform of the *Taf1* gene in development stages and aging in mice. **Biochem Biophys Res Commun**. 査読あり、425 巻、2012 年、pp. 273-277.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.081

り、425 巻、2012 年、pp. 273-277.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.081

Makino S, Umemoto T, Yamada H, Yezdimer EM, Tooyama I. In vivo detection of copper ions by magnetic resonance imaging using a prion-based contrast agent. **Appl Biochem Biotechnol**. 査読あり、168 巻、2012 年、pp. 504-518.
DOI: 10.1007/s12010-012-9792-7

Kato T, Tamiya G, Koyama S, Nakamura N, Makino S, Arawaka S, Kawanami T, Tooyama I. UBR5 gene mutation is associated with familial adult myoclonic epilepsy in a Japanese family. **ISRN Neurol**. 査読あり、45 巻、2012 年、pp. 15-23.
DOI: 10.5402/2012/508308

6. 研究組織

(1)研究代表者

牧野 悟士 (MAKINO, Satoshi)
東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・研究支援者
研究者番号：30423403

(2)研究分担者

遠山 育夫 (TOOYAMA, Ikuo)
滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授
研究者番号：20207533