

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430083

研究課題名(和文)ニューロンにおけるゲノムDNA化学修飾酵素の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of DNA methyltransferases in post-mitotic neuron

研究代表者

波平 昌一(Namihira, Masakazu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：60379534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ニューロンの発達と機能発現におけるDNA化学修飾酵素の機能解析を行い、ニューロンのDNA化学修飾機構の破綻と精神疾患発症との関連を明示することを目的とした。これまでに、胎生後期のDNAメチル化酵素の欠損が、成体神経新生の減少と不安様行動の増加することを明らかにした。また、ニューロン特異的なDNAメチル化酵素の欠損が、海馬ニューロンの形態異常、及び、マウスの活動量の増加を誘導した。これらのことは、発達過程のDNAメチル化酵素の機能異常が精神疾患を誘発する可能性あることを示している。さらに、DNAメチル化酵素と相互作用するLSD1タンパク質のヒト神経幹細胞における役割を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To investigate the function of DNA methyltransferases in neural cells, we deleted dnmt1 gene in these cells and examined the phenotype in vitro and in vivo. We found that prenatal deletion of DNA methyltransferase 1 (Dnmt1) in neural stem cells causes the impairment of neurogenesis in the adult mouse brain. Moreover, these mice exhibited anxiety-like behavior. In addition, in DNMT1 deficient neurons, axonal elongation tends to be accelerated compared to that in wild type neurons, suggesting that DNMT1 regulates neurite outgrowth during neuronal maturation. Furthermore, conditional knockout mice that dnmt1 is deleted in post-mitotic neuron exhibited hyperactivity at adult stage. Thus, these results imply that DNA methyltransferases in neural cells play an important role in neuronal development and its mutation links to psychiatric diseases.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 エピジェネティクス DNAメチル化 神経細胞 神経幹細胞 精神疾患

1. 研究開始当初の背景

ヒトやマウスなどの哺乳類において、エピジェネティクス制御の一つである DNA メチル化の神経細胞（ニューロン）における異常が、精神疾患発症や幼児期のストレス暴露による成体の行動異常などに関与することが指摘された。また、ヒドロキシメチル化という新たな DNA 化学修飾の存在が明らかとなり、それが脱メチル化の際に生じる中間産物であることが示唆されている。特に、ヒドロキシメチル化された DNA がニューロンのゲノムに豊富に存在していることが報告されたことから、ニューロンにおけるそれらの DNA 化学修飾を担う酵素群の役割解明については世界的に注目を集めている。しかし、実用性の高い研究材料の不足や解析技術の未開発などから、ニューロンの発達や機能維持におけるそれらの酵素群の役割解明や、それら酵素群の機能異常と精神疾患との関連の直接的証明は未だ行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、神経細胞（ニューロン）特異的に DNA 化学修飾酵素を欠損又は過剰発現する申請者が開発した新規遺伝子改変マウスを実験材料として、ニューロンの発達と機能発現における DNA 化学修飾酵素の機能解析を行う。これにより、ニューロンにおける DNA 化学修飾酵素群の機能解析を行うことで、その機能破綻と精神疾患発症との関連を明示することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、神経系細胞特異的に DNA 化学修飾酵素を欠損 (CKO マウス) 又は過剰発現させたマウス (TG マウス) や培養神経系細胞を用いて、以下の研究を行う。

- 1) 解剖学的解析による脳発達における DNA 化学修飾酵素の役割解明: TG 及び CKO マウスの成体期において、ニューロンの軸索や樹状突起の形態観察などの解剖学的解析と、*in vitro* での DNA 化学修飾酵素群のノックダウンなどを実施することで、脳の発達に伴う組織構築におけるニューロンの DNA メチル化酵素の役割を明らかにする。
- 2) DNA 化学修飾酵素の機能破綻と神経精神疾患との関連解析: 不安様行動試験と PPI 試験等の行動学的解析から、脳の DNA 化学修飾酵素の機能破綻と精神疾患との関連を調べる。
- 3) ニューロンにおける DNA 化学修飾酵素の標的同定: 全ゲノム解析を用いて DNA 化学修飾酵素の標的領域を同定し、ニューロンにおける DNA 化学修飾の分子メカニズムを解明する。

4. 研究成果

脳の発達過程における DNA メチル化酵素の機能解析

胎生後期に DNA メチル化酵素 DNA methyltransferase-1 (DNMT1) を神経幹細胞特異的にノックアウトしたマウスを用いて、DNA メチル化酵素の発達期における役割を検証した。その結果、そのマウスの成体期の海馬と脳室周囲部における成体神経新生の減少が認められた。さらに、オープンフィールド試験による行動解析を行ったところ、不安様行動の増加が認められた。さらに、そのマウスの各脳領域において、活性化型アストロサイトの増加と、マイクログリアの増加も観察され、脳内炎症が亢進していることも示された。これらのことから、発達後期における DNA メチル化酵素の機能欠損が、脳内炎症と、不安様行動の増加を伴う精神疾患発症に関与する可能性があることがわかった (Noguchi, 2016)。

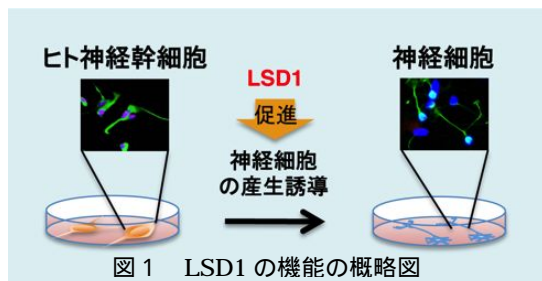
ニューロンにおける DNMT1 の役割解析

我々はニューロンに発現する DNMT1 と精神疾患との関連を明らかにするために、ニューロン特異的に *Dnmt1* 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウト (cKO) マウスを作製した。まず、DNMT1 の発現を免疫組織化学により調べたところ、精神疾患と関わりの深い脳領域である海馬、扁桃核、大脳皮質において DNMT1 の欠損が確認された。次に、この cKO マウスに対して、不安様行動評価試験を行った。その結果、オープンフィールド試験において、*Dnmt1* cKO マウスが多動性を示すことが明らかとなった。また海馬歯状回由来ニューロンにおいて *Dnmt1* をノックダウンしたサンプルを用いてマイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現変化を調べた。Gene Ontology 解析を行った結果、神経活動に関わりの深い遺伝子群であるカルシウムチャネル群やカリウムチャネル群の遺伝子発現の亢進が認められた。さらに、NCBI のデータベース上にある統合失調症や双極性障害の患者の海馬でのマイクロアレイのデータと比較すると、*Dnmt1* cKO マウスと共通して突起進展に関与する遺伝子の発現が上昇していることが明らかとなった。これらの遺伝子発現の上昇がメチル化酵素活性依存的であるかどうかを、*Dnmt1* 酵素活性変異体の導入や bisulfite sequence により調べたところ、メチル化酵素活性に依存していないことが明らかとなった。また、*sholl* analysis により実際に突起進展に異常が現れることも示された。これらの結果から、cKO マウスで観察された多動性は、DNMT1 のメチル化酵素活性非依存的な遺伝子発現によるニューロンの形態変化による影響である可能性が考えられた (論文投稿準備中)。

DNA メチル化酵素と相互作用する因子の神経発達における役割解析

DNA メチル化酵素はヒストン脱メチル化酵素 (Lysine Specific Demethylase 1, LSD1) と相互作用し、遺伝子発現を制御しているこ

とが知られている。そこで、LSD1 タンパク質のヒト神経幹細胞における役割についても検討した。その結果、LSD1 の働きを妨げる薬剤 (LSD1 阻害剤) をヒト神経幹細胞に添加すると、神経細胞への分化が抑制されることを発見した。また、LSD1 の働きを阻害すると、HEYL と呼ばれるタンパク質の発現が増加した (図 1)。



さらに、HEYL が胎児の脳内では神経幹細胞だけで発現していることや、その発現量が増加すると、神経細胞の産生が抑制されることがわかった。すなわち、HEYL がヒト神経幹細胞での神経産生を抑制していることを今回初めて明らかにした。比較のため、マウスの神経幹細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、マウス由来神経幹細胞では、ヒト神経幹細胞で見られたような、LSD1 阻害剤による神経細胞への分化抑制作用がなかった。また、HEYL 発現量も増加しなかった。これらの結果から、今回明らかにしたヒトの神経細胞の産生メカニズムは、ヒトに特徴的である可能性が示された。このことは、今回ヒト神経幹細胞で発見されたヒストン修飾酵素によって制御される仕組みが、長い進化の過程で得られた新しいものである可能性を示唆している (Hirano, 2016)。

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 5 件)

- 1) Hirano K, and *Namihira M. New insight into LSD1 function in human cortical neurogenesis, *Neurogenesis*, 3(1): e1249195, 2016. (査読有)
- 2) Noguchi H, Kimura A, Murao N, *Namihira M and *Nakashima K. Prenatal deletion of DNA methyltransferase 1 in neural stem cells impairs neurogenesis and causes anxiety-like behavior in adulthood. *Neurogenesis*, 3(1): e1232679, 2016. (*: co-corresponding author) (査読有)
- 3) Hirano K, and *Namihira M. LSD1 Mediates Neuronal Differentiation of Human Fetal Neural Stem Cells by Controlling the Expression of a Novel Target Gene, HEYL. *Stem Cells*. 34(7):1872-1882, 2016. (査読有)

- 4) Noguchi H, Kimura A, Murao N, Matsuda T, Namihira M. *Nakashima K. Existence of DNMT1 in neural stem/precursor cells is critical for survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *Neurosci Res*, 95:1-11, 2015.
- 5) Adefuin, AM, Kimura A, Noguchi H, Nakashima K, *Namihira M. Epigenetic mechanisms regulating differentiation of neural stem/precursor cells. *Epigenomics*, 6(6):637-649, 2014. (査読有)

[学会発表](計 2 件)

- 1) Hirano K, Namihira M. Lysine Specific Demethylase 1 and its downstream target gene HEYL are important for neurogenesis of human fetal neural stem cell. *Keystone Symposia*, 2017 年 1 月 8 日~2017 年 1 月 12 日, Olympic Valley, California, USA.
- 2) Namihira M. Yamano M, Hirano K, Otsuka MI, Igarashi K. Maternal high-fat diet alters epigenetic profile in neuronal precursors of fetal brain. *Neuroepigenomics: Keystone Symposia*, 2015 年 2 月 22 日~2015 年 2 月 26 日, Santa Fe, New Mexico, USA.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
波平昌一 (NAMIHIRA, Masakazu)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研
究部門・研究グループ長
研究者番号：60379534

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
海老原達彦 (EBIHARA, Tatsuhiko)
産業技術総合研究所・バイオメディカル研
究部門・主任研究員
研究者番号： 00344119

(4)研究協力者
()