

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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22710183

研究課題名（和文）細胞老化に伴うヘテロクロマチン領域形成のゲノム学的手法による機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of chromatin dynamics during aging by genomic approach

研究代表者

酒井 晶子（SAKAI AKIKO）

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：70532745

研究成果の概要（和文）：

クロマチン構造は遺伝子の発現制御に重要な役割を持ち、細胞の状態や環境の変化とともに再構築され得る。本研究では加齢に伴うクロマチン構造変化の分子機構とその役割の理解を目的として、ほ乳類の脳においてクロマチン構造の構築に関わる因子のゲノム上の結合位置をChIP-seq法を用いて網羅的に同定することを試みた。その結果、脳の可塑性が高まる臨界期には、必須の転写因子Otx2とクロマチンの高次構造を司るコヒーシンが協調して遺伝子発現を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Chromatin structure has fundamental roles in gene expression, which could be re-organized as conditions and circumstances of the cells change. In this study, we have tried to understand the molecular mechanism and the roles of the structural changes in chromatin during aging. ChIP-seq method was applied to identify the binding sites of chromatin factors throughout the genome in mammalian brain. Our results indicated that during the critical period in which the plasticity of the brain increases, Otx2, the essential transcription factor, and cohesin, the regulator of higher order chromatin structure, act cooperatively for gene regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	0	0	0
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：ゲノム・ChIP-seq・転写制御・クロマチン

1. 研究開始当初の背景

(1) クロマチン構造とクロマチン因子の網羅的結合部位解析

クロマチン構造は転写制御に重要な役割を持ち、細胞の状態変化とともに再構築され得る。例えば、細胞老化に伴って特別なヘテロクロマチン領域が形成されることが近年

報告された。本研究者はこれまでに、ヘテロクロマチンの主要な構成因子である HP1 タンパク質、および染色体高次構造を制御するコヒーシ複合体のゲノム上の局在位置を、ヒト培養細胞において ChIP-seq 法（特定のタンパク質についてクロマチン免疫沈降を行い結合 DNA の配列を次世代シーケンサーにより網羅的に決定する手法）を用いて網羅的に決定してきた。その結果、コヒーシと HP1 は染色体上で互いに排他的な結合領域を形成し、コヒーシの欠損により HP1 ヘテロクロマチン領域のバランスが崩れることが示唆された。これはコヒーシ病の細胞レベルの病態にも関連する。

しかし、個体の発生・加齢に伴ってクロマチン領域がどのように変化していくのか、またその変化が遺伝子機能の発現制御においてどのような役割を持つのかは殆ど未解明である。また、ChIP-seq 法はこの数年で開発が進み培養細胞においては方法が確立されてきたが、複数の細胞種を含む生体組織を用いた解析については、細胞の均一性の問題等課題が多い。

(2) 脳の臨界期におけるクロマチン・遺伝子発現制御

幼年期のほ乳類の脳には、環境から受けた刺激や経験に応じて神経回路が活発に再構築される（可塑性が高まる）時期がある。これは「臨界期」と呼ばれ、生涯の中で生後の一時期にしか現れない。自閉症のモデルマウスでは臨界期の異常が示唆されているように、臨界期に神経回路網が可塑性を持つことは脳の機能発達に重要である。

臨界期の研究には視覚の発達が優れたモデル系となる。臨界期に片目を遮蔽すると、開いた目からの刺激をより強く受け取る方向に回路が変化し、閉じた目の視力は低下する（弱視）。臨界期の間は神経回路は可塑的に変化するが、臨界期を過ぎた大人では回路網の再構築は起こらず、弱視は完治しない。当研究室では最近、胎生期の脳の発生に必須のホメオ蛋白質 *Otx2* が、生後の大脳皮質視覚野において臨界期の開始に必須であることを発見した（Sugiyama *et al.*, *Cell* 2008）。転写因子であるホメオ蛋白質が臨界期を引き起こすという事実は、回路を構成する神経細胞で特異的な遺伝子発現と、それに伴うクロマチン動態変化が起こることを示唆している。実際、臨界期特異的な遺伝子発現変化が起こること、および経験依存的なヒストン修飾が臨界期で起こりやすいことが報告されている。しかしながら、臨界期におけるニューロンの形態・機能・環境の変化に関しては分子レベルの理解が進み始めた一方で、その基盤となるクロマチン動態は未だ不明である。

また、コヒーシは染色体の高次構造を制御する必須因子として知られるが、近年、遺伝子発現を制御し、軸索の刈り込みや神経細胞の発達に必要であることが明らかにされた。コヒーシとその制御因子の変異が原因の疾患 *Cornelia de Lange* 症候群（CdLS）では自閉症の症状が見られ、臨界期の異常と関連する可能性が高い。これらのことから、コヒーシが臨界期に特異的な遺伝子発現を制御する可能性が推測される。

2. 研究の目的

本研究では上記の背景をふまえ、これまでの成果を発生・加齢に伴う生理的なクロマチン構造変化の原理解明へ発展させるため、マウス脳細胞核内におけるクロマチン因子の局在部位を経時的に決定することで、クロマチン構造再編成の分子機構とその役割の理解を目指した。具体的には、臨界期に必須の転写因子 *Otx2* とコヒーシのマウス大脳皮質における挙動を調べた。また、本研究を通じて複雑な生体組織である脳を用いた ChIP 法の改善・確立も目指した。

3. 研究の方法

本研究では、臨界期のマウス大脳皮質視覚野をモデルとした。

(1) クロマチン因子のゲノム上の局在部位の同定（ChIP-qPCR 法、および ChIP-seq 法）

臨界期にある野生型正常マウス（生後 28-30 日）の大脳皮質（視覚野を含む）を切り出し、1% ホルムアルデヒドで 15 分間クロスリンクを行った。ポリトロン型ホモジナイザーおよびダウンス型ホモジナイザー併用して細胞核を抽出した後、超音波破碎により断片化クロマチンを得た。この抽出液より、*Otx2* およびコヒーシの Rad21 サブユニットの特異的な抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、濃縮された DNA 配列を定量的 PCR により解析した。次世代シーケンサーによる DNA 配列の決定は新潟大学・桑野良三教授、情報統計解析は東京大学・白髭克彦教授、中戸隆一郎博士との共同研究で行った。

(2) フローサイトメトリー (FCM) による神経細胞核の単離

マウス大脳皮質視覚野より、Okada *et al.* (*J Cell Physiol.* 2011) を参考に全細胞核を分離した。その後ニューロンの核マーカー NeuN を用いて染色を行い、FACS AriaII によりニューロン核を単離した。

4. 研究成果

(1) ChIP (クロマチン免疫沈降) 法の最適化
生後のマウス脳を用いたChIP法は、培養細胞と比較して可溶性クロマチンを均一に得るのが困難であった。そこで、クロスリンク、バッファー、超音波破碎等の条件を検討した結果、コヒーシンの既知の結合部位を特異的に濃縮できることが定量的PCR法 (ChIP-qPCR) により確認された。

(2) 神経細胞核の単離法の確立

多数の細胞種が混在する脳から神経細胞を単離するため、フローサイトメトリーを用いて神経細胞核とその他の細胞の核を分離する方法を確立した。この方法により98%以上の純度でニューロン核を得ることに成功している (図1)。これにより神経細胞特異的なクロマチン構造の解析が可能となった。

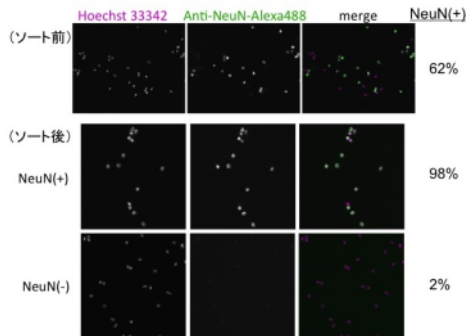


図1: FACSによる神経細胞の核の単離

神経細胞の核は特異的なマーカーNeuNに対する蛍光抗体で標識した。分離前は神経細胞は全体の約6割であったが、ソート後により98%の高純度となった。

(3) 臨界期におけるOtx2とコヒーシンの結合位置

脳の可塑性が高まる臨界期において必須の転写因子 Otx2 の ChIP-seq 解析を行った。その結果、Otx2 が神経細胞の発達や機能を調節する因子 (イオンチャネル、シナプス伝達因子等) の遺伝子領域に直接結合していることが明らかとなった。

また、ChIP-qPCR 法を用いた解析により、Otx2 が結合しているゲノム上の部位にコヒーシンも結合しているケースを複数見いだした。コヒーシンの結合が一部 Otx2 に依存していることから、臨界期のマスターレギュレーターである Otx2 がコヒーシンを介してクロマチン高次構造を制御することにより、臨界期に関わる遺伝子の発現制御を行っている可能性が示唆される。

(4) 今後の展望

今後、これまでに確立した系を用いて若い (臨界期の) マウス個体と成熟個体それぞれの脳より ChIP-seq 解析を行い、クロマチン因子の結合領域がどのように変化するのかを解析していく。特にコヒーシンについては脳内の全ての細胞で発現していることから、本研究で確立した神経細胞核の単離法を用いることで神経細胞特異的にコヒーシンが制御する遺伝子領域を特定できることが期待される。更に ChIP-seq 解析と網羅的遺伝子発現解析とを組み合わせることで、加齢による脳の可塑性変化の基盤となるクロマチン再編成の分子機構とその遺伝子発現調節における機能を明らかにしていく。

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3件)

1. Akiko Sakai "Chromatin dynamics during the critical period of ocular dominance plasticity in mouse visual cortex." 遺伝研研究会 Circuit construction in the mammalian cerebral cortex: Genetic and imaging approaches. 2012年12月15-16日 (三島)

2. 酒井晶子、中戸隆一郎、桑野良三、白髭克彦、杉山清佳 「臨界期におけるマウス視覚野のクロマチン動態の解析」 第35回日本神経科学大会. 2012年9月18-21日 (名古屋)

3. 酒井晶子、桑野良三、杉山清佳 「経験依存的な神経回路の可塑性に関わるクロマチン動態の解析」 第6回日本エピジェネティクス研究会年会. 2012年5月14-15日 (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 晶子 (SAKAI AKIKO)
新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教
研究者番号: 70532745

研究協力者

桑野 良三 (KUWANO RYOZO)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号: 20111734
白髭 克彦 (SHIRAHIGE KATSUHIKO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
研究者番号: 90273854

中戸 隆一郎 (NAKATO RYUICHIRO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：60583044