

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 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650215

研究課題名（和文）ゲノム DNA 化学修飾のニューロン発達における機能解明

研究課題名（英文）Functional analysis of DNA methylation in post-mitotic neurons

研究代表者

波平 昌一（NAMIHIRA MASAKAZU）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：60379534

研究成果の概要（和文）：哺乳類の脳の神経細胞（ニューロン）における DNA メチル化、及び、DNMT1 の役割を解明することを目的とし、研究を行った。その結果、DNMT1 が発達期において神経突起の伸長に関与すること明らかにした。また、ニューロン特異的な DNMT1 の欠損が、マウスの不安様行動を誘発させることがわかった。これらの結果は、非分裂生のニューロンにおいても DNMT1 がその機能を発揮し、ニューロンの発達と活動を制御していることを示している。

研究成果の概要（英文）：Although neurons are postmitotic cells, which completely have exited cell cycle, the expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) is observed in the cells. However, the function of DNMT1 in postmitotic neurons is unclear. To address this issue, we deleted Dnmt1 gene in neurons and examined the resultant phenotype in vitro. We found that DNMT1 plays an important role in cortical development through the regulation of neurite outgrowth mediated by neurotrophic factor signaling.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学一般

キーワード：ニューロン、発達、DNA メチル化、エピジェネティクス、DNA ヒドロキシメチル化

1. 研究開始当初の背景

脳の高次機能は、神経細胞（ニューロン）が他のニューロンとの間で複雑かつ正確で膨大な数におよぶネットワークを形成することで発揮される。ニューロンは情報交換を行う為の基本的な形態として、細胞体と機能的／構造的に異なる二種類の神経突起から構成される。神経突起の一つである軸索は、活動電位を神経末端まで伝導し、情報を他の細胞に伝達するという出力としての働きをもち、樹状突起は、主に他の細胞から神経伝達物質を受ける入力としての役割を担って

いる。中枢神経系では、発生期にニューロンが出力を担う軸索を伸長させ、標的細胞とシナプスを形成し、複雑な神経回路網が形成されることで、構造、機能の分化を反映した階層性のある情報処理機構が発達する。正確な神経ネットワークの構築には、ニューロンが適切な形態をとることが必要不可欠である。

過去の研究より、複雑な神経ネットワークの構築・維持には、様々な物質が各発生段階でその機能を果たすことが必須であることが示されている。発生期のニューロンの神経突起伸長や生存を制御する代表的な因子の一つに、神経栄養因子がある。神経栄養因子

は、nerve growth factor (NGF) に代表されるファミリータンパク質の総称であり、NGF 以外には Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、neurotrophin-3 (NT-3)、NT-4/5 が知られている(Reichardt, 2006)。神経栄養因子の受容体には、すべての神経栄養因子と低親和性に結合する p75NTR と、各神経栄養因子と特異的な高親和性受容体チロシンキナーゼ型受容体 (tyrosine kinase receptor, Trk 受容体) が存在する。Trk 受容体には TrkA、TrkB、TrkC があり、NGF は TrkA と、BDNF と NT-4/5 は TrkB と、NT-3 は TrkC とそれぞれ結合する。神経栄養因子はまず前駆体として産生され、プロセッシングを受け成熟型となることが知られている(Lessmann et al., 2003)。Trk 受容体は受容体型チロシンキナーゼであり、神経栄養因子二量体が結合することによって二量体化し、自己リン酸化がおこり細胞内に種々のシグナルが伝達される。Trk 受容体の下流では Ras-MAPK 経路、ホスホリパーゼ C γ 経路、PI3K 経路等が活性化される。これらのシグナルは、脳の発達過程においてはニューロンの分化誘導や生存維持、神経突起の伸長、成熟などに作用し、成熟後のニューロンにおいても、神経伝達の調節やそれに続く活動依存性のシナプス可塑性に影響を及ぼすなど、その機能は多岐にわたることが明らかとなっている(Bibel and Barde, 2000; Chao, 2003) (Bibel and Barde, 2000) (Chao, 2003)。

2. 研究の目的

ところで、近年、エピジェネティクスによる遺伝子発現制御が脳の発生に重要な役割を担っていることが示唆されている(Fagiolini et al., 2009)。エピジェネティクス制御機構は、遺伝子配列の変化を伴わずにクロマチンの状態を変換し遺伝子発現を時空間的に巧妙に制御する機構であり、ゲノム DNA のメチル化やヒストンタンパク質の修飾によるクロマチン構造変換がこの機構の代表的なものである。DNA メチル化は、近傍のゲノム領域のクロマチン構造変化や転写制御因子の DNA 結合能に変化をもたらし、主に遺伝子発現を抑制する。ヒストン修飾に関しては、クロマチンの主要構成因子であるコアヒストンの N 末端領域 (ヒストンテイル) の、アセチル化、メチル化、リン酸化、リボシル化、ユビキチン化などの様々な翻訳後修飾が知られている(Wolffe and Hayes, 1999) (Turner, 2002)。DNA メチル化は、DNA メチル化酵素 (DNMT) 群によってゲノム DNA にメチル基が付加されることによって生じる。これまでに DNA メチル基転移酵素としてヘミメチル化された DNA にメチル基を導入する維持型 DNMT1 (DNA methyltransferase 1) と、新規にメチル基を

導入する新規型 DNMT3a 及び DNMT3b が知られている(Bestor, 2000)。DNMT1 は、C 末端側に DNA のメチル化活性ドメインを持つ分子量約 180kD の蛋白質で、N 末端側領域には proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 結合ドメイン、targeting sequence (TS) ドメイン、CXXC モチーフなど複数の制御ドメインが存在し、C 末端側のメチル化活性領域の機能調節に関与している(Spada et al., 2006)。この DNMT1 は DNA 複製における DNA メチル化パターンの維持に必須な役割を果たすことが知られており(Jeltsch, 2006)、Dnmt1 遺伝子ノックアウトマウスでは、細胞分裂の度にゲノム全体の低メチル化が誘導され、着床後 8.5 日で致死となることから、DNMT1 によるゲノム DNA のメチル化パターンの維持は正常な発生に必須である (Li et al., 1992)。興味深いことに、既に分裂を終えたニューロンにおいても DNMT1 の発現が観察され、ニューロンの機能発現に重要な役割を担う可能性が示唆されているものの(Fan et al., 2001) (Feng et al., 2010) (Hutnick et al., 2009)、その詳細は不明である。特に、脳の発達期のニューロンにおける DNMT1 の役割については全く明らかにされていない。そこで私は、発達期のニューロンにおける DNMT1 の機能を解明することを目的とし、研究を開始した。

3. 研究の方法

胎生期マウスよりニューロンを採取、培養し、Dnmt1 に対する shRNA をレンチウイルスを用いて発現させ、ノックダウンを行った。また、Dnmt1 をレンチウイルスを用いて強制発現させた。これらの DNMT1 のノックダウン、及び強制発現を行い、ニューロンの形態変化、及び機能的変化を解析することで、DNMT1 の役割を明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

(1)ニューロンにおける Dnmt1 のノックダウンは軸索の伸長を促進する

ニューロンの発達における DNMT1 の機能的役割を検討する為に、ニューロンにて Dnmt1 のノックダウンを誘導し、形態的变化の有無を観察した。胎生 17.5 日目のマウス大脳皮質ニューロンを単離し、播種三時間後に、レンチウイルスを用いて Dnmt1 の 3'UTR を標的として設計した特異的な shRNA を発現させることで、Dnmt1 のノックダウンを誘導した。コントロールとして、GFP のみを発現するレンチウイルスを感染させたニューロンを用い、4 日間培養した後に免疫染色を行った。GFP で標識された shRNA を発現するニューロンの神経軸索を Tau-1 に対する抗体を用いて染色し、形態を観察した。その結果、Dnmt1

のノックダウンを誘導したニューロンでは、コントロールと比べ、Tau-1 で染色された神経軸索の伸長がより促進される傾向が観察された。また観察したニューロンを、それらが有する軸索の長さによって分け、各長さのニューロンごとの割合を調べたところ、コントロールと比較して、Dnmt1 をノックダウンしたニューロンにおいて、より長い軸索をもったニューロンが増加する傾向にあった。これらの結果から、DNMT1 がニューロンの成熟過程において、軸索伸長の制御に関与している可能性が示唆された。

(2) DNMT1 の過剰発現は軸索伸長を抑制する

Dnmt1 をノックダウンする実験に加え、ニューロンに Dnmt1 を過剰発現させる実験を行った。レンチウイルスにより GFP と Dnmt1 をニューロンに過剰発現させ、上記の実験と同様、Tau-1 に対する抗体を用いた免疫染色にて、それらニューロンの軸索の長さを観察した。その結果、Dnmt1 を過剰発現させたニューロンでは、コントロールと比較して、神経軸索の伸長が抑制される傾向にあり、より短い軸索をもつニューロンの割合が増加した。また、C 末端側に存在する酵素活性部位に点変異を誘導し、メチル化活性を欠失した Dnmt1 を発現させたニューロンにおいても、同様に軸索伸長の抑制効果が観測されたことから、DNMT1 は DNA メチル化活性非依存的に、軸索伸長を抑制している可能性が示唆された。

(3) Dnmt1 のノックダウンにより観察される軸索伸長亢進には液性因子が関与している

次に、前述の Dnmt1 のノックダウンで観察された神経軸索制御の作用機序を解明するため、Dnmt1 のノックダウンを誘導した培養ニューロンの培養上清 (Conditioned medium, CM) を用いて、野生型ニューロンの培養系に添加する実験を行い、ニューロンの軸索伸長を観察した。CM は、レンチウイルスを用いて Dnmt1 のノックダウンを誘導した後、二日後にレンチウイルスを含まない培地に全量を交換し、四日間培養した後に、その培養上清を回収することで準備した。コントロールとして、GFP のみを発現するニューロンから回収した培養上清を用いた。回収した CM を、新たな野生型ニューロン培養開始後翌日の培地に添加し、四日間培養を行った後、それら野生型ニューロンの形態を免疫染色法にて観察した。CM を添加し四日間培養をおこなったニューロンにおいて、GFP 陽性の細胞は観察されなかったことから、レンチウイルス感染による直接の Dnmt1 のノックダウンの影響は無いと考えられる。

Dnmt1 のノックダウンを誘導した培養ニューロンから回収した CM を添加して培養を行

ったところ、コントロールニューロンの CM を添加して培養した場合に比べ、軸索伸長の亢進が観察された。このことから、Dnmt1 のノックダウンで観察される軸索伸長の亢進は、培養液中に産生された細胞外因子によるものであることが示唆された。

(4) ニューロンにおける Dnmt1 のノックダウンにより Trk のリン酸化が亢進される

神経軸索伸長における DNMT1 が制御する因子を探索するために、レンチウイルスを用いて Dnmt1flox/flox マウスから培養したニューロンに Cre 組換え酵素を発現させることで Dnmt1 の欠損を誘導したニューロンより RNA を抽出し、Affymetrix 社製 GeneChip (Mouse Expression Set 430 arrays) を用いて遺伝子の発現レベルを網羅的に解析した (Kanno et al., 2006)。その結果、コントロールとして GFP のみを発現させたニューロンと比較して、Dnmt1 欠損ニューロンにおいて発現の変化が認められた遺伝子は、2 倍以上の増加が認められたものが 338 遺伝子、2 分の 1 以下の減少が認められたものが 262 遺伝子あった。そのうち、発現量の増加が認められた遺伝子群について PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) を用いて遺伝子の機能ごとに分類したところ、膜貫通受容体型キナーゼの活性化に関する遺伝子群が多く含まれていることがわかった。

そこで、Dnmt1 がノックダウンされたニューロンにおける膜貫通受容体型チロシンキナーゼの活性化の有無を検討するために、Mouse Phospho-Receptor Tyrosine Kinase Array (R&D Systems) にて、チロシンキナーゼ型受容体のリン酸化を検討した。膜貫通受容体型チロシンキナーゼの活性化について、リン酸化抗体を用いて検出を行った。その結果、Dnmt1 のノックダウンを誘導したニューロンにおいて、神経栄養因子の受容体である Trk ファミリーの TrkB、TrkC のリン酸化の亢進がみられ、活性化されていることがわかった。これらの結果から、DNMT1 がそれらの受容体の活性化調節を介して軸索伸長を制御する可能性が示された。

(5) 脳のニューロンにおける Dnmt1 の欠損はマウスの不安様行動を誘発する。

我々は、Dnmt1 の機能低下と精神疾患との関連を明らかにするために、Synapsin 遺伝子を発現する成熟神経細胞特異的に Dnmt1 を欠損させたコンディショナルノックアウト (cKO) マウスを用いて、その cKO マウスの精神疾患様の表現型の有無を解析した。まず、DNMT1 欠損領域を免疫組織化学に供し調べたところ、記憶、情動と関連のある脳領域である海馬や、情動に関与する脳領域である扁桃体において著しく欠損していることが示された。次に、この cKO マウスに対して、不安様行動評価試験、記憶評価試験を行った。そ

の結果、不安様行動評価試験の1つであるオープンフィールド試験において、cKO マウスが不安様行動を示すことがわかった。

これらの結果は、非分裂生のニューロンにおいても DNMT1 がその機能を発揮し、ニューロンの発達と活動を制御していることを示している。これらの研究成果は、学会発表等を通じて社会に発信した。

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 3 件)

- 1) Urayama S, Semi K, Sanosaka T, Hori Y, Namihira M, Kohyama J, Takizawa T, Nakashima K. Chromatin accessibility at a STAT3 target site is altered prior to astrocyte differentiation. *Cell Struct Funct.* (査読あり) 2013. 38(1):55-66. (https://www.jstage.jst.go.jp/article/csf/38/1/38_12034/_article)
- 2) Wu Z, Huang K, Yu J, Le T, Namihira M, Liu Y, Zhang J, Xue Z, Cheng L, Fan G. Dnmt3a regulates both proliferation and differentiation of mouse neural stem cells. *J Neurosci Res.* (査読あり) 2012. 90(10):1883-1891. DOI 10.1002/jnr.23077.
- 3) Fujimoto Y, Abematsu M, Falk A, Tsujimura K, Sanosaka T, Juliandi B, Semi K, Namihira M, Komiya S, Smith A, Nakashima K. Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. *Stem Cells.* (査読あり) 30(6):1163-1173, 2012. DOI 10.1002/stem.1083.

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 波平昌一. DNA メチル化による神経発生制御機構. 奈良先端未来開拓コロキウム「シグナルの破綻による疾患の生物学」(招待講演). 2013年01月28日. 奈良県生駒市.
- 2) Fujimoto, Y., Abematsu, M., Falk, A., Tsujimura, K., Sanosaka, T., Juliandi, B., Semi, K., Namihira, M., Komiya, S., Smith, A., Nakashima, K. Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human iPS cell-derived long term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. NEUROSCIENCE 2012. 2012年10月15日. New Orleans.
- 3) Matsuda, T., Murao, N., Juliandi, B.,

Namihira, M., Kawai, T., Akira, S., Nakashima, K. TLR9-signaling regulates neurogenesis in the adult mouse hippocampus. NEUROSCIENCE 2012. 2012年10月13日. New Orleans.

- 4) 村尾直哉、松田泰斗、古関明彦、波平昌一、中島欽一. マウス脳における NP95 発現細胞の解析. 第 35 回日本神経科学大会. 2012年09月18日. 愛知県名古屋市.
- 5) 石川寛、波平昌一、竹林浩秀、中島欽一. グリア細胞の分化と発達における DNA メチル化の役割. 包括脳ネットワーク夏のワークショップ. 2012年07月25日. 宮城県仙台市.
- 6) 赤土正一、田中友規、波平昌一、野口浩史、五十嵐勝秀、辻村啓太、中島欽一. ニューロンの発達及び興奮毒性神経細胞死制御における DNMT1 の機能解析. 包括脳ネットワーク夏のワークショップ. 2012年07月25日. 宮城県仙台市.
- 7) Matsuda T., Juliandi B., Murao N., Namihira M., Kawai T., Akira S., Nakashima K. REGULATION OF ADULT MOUSE NEURAL STEM CELLS BY TLR9 MEDIATED SIGNALING. ISSCR 2012. 2012年06月13日. 神奈川県横浜市.
- 8) Sanosaka T., Namihira M., Nakashima K. MENINGEAL CELLS INDUCE ASTROCYTE DIFFERENTIATION OF NEURAL STEM CELLS. ISSCR 2012. 2012年06月13日. 神奈川県横浜市.
- 9) 佐野坂司、波平昌一、中島欽一. Meningeal cells regulate astrocytic differentiation in the embryonic mouse brain. 第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会. 2012年05月28日. 兵庫県神戸市.
- 10) 野口浩史、波平昌一、田中友規、佐野坂司、中島欽一. DNA-methyltransferase 1 functions as a suppressor of neuronal differentiation in late-gestational neural stem cells. 第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会. 2012年05月28日. 兵庫県神戸市.
- 11) 村尾直哉、松田泰斗、古関明彦、波平昌一、中島欽一. マウス脳における NP95 発現細胞の解析. 第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会. 2012年05月14日. 東京都千代田区.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[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)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教
研究者番号：60379534

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし