

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700410

研究課題名(和文)CTCFによる神経細胞の多様化と神経回路形成

研究課題名(英文)Functional analysis of CTCF for generating neuronal diversity and neuronal networks

研究代表者

平山 晃斉(Hirayama, Teruyoshi)

大阪大学・生命機能研究科・特任助教

研究者番号：40437398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：終脳領域の神経細胞で特異的にCTCFを欠損させたマウス(cKO)を作製した。cKOマウスは、生後の発達異常や行動異常を示し、生後1ヶ月以内に全て死亡した。遺伝子発現解析の結果、クラスター型Pcdhの発現が著しく低下していることが分かった。また、cKOマウスは、体性感覚野のバレルと呼ばれる特徴的な構造が全く形成されないことがわかった。さらに、CTCFを欠損した神経細胞では、樹状突起の分枝やスパインの発達に異常を示すことを明らかとした。以上の結果は、分化した神経細胞においてCTCFが体性感覚野のバレル形成に必要な因子であること、Pcdhの確率的な遺伝子発現に関与することを示す。

研究成果の概要(英文)：I generated postmitotic neurons specific CTCF conditional knockout mice and investigated the role of the brain and the regulation of clustered Pcdh genes. The CTCF-cKO mice exhibited growth retardation, abnormal behavior, and died within one month. Gene expression profile exhibited significant downregulation of clustered Protocadherin genes. I examined structure of somatosensory cortex and found that barrel structure was disappeared in the CTCF-cKO mice. I also found that the CTCF deficiency lead to morphological changes of dendrite and spine formation during neuronal maturation. These results indicate that CTCF is required for the refinement of somatosensory maps and stochastic expression of clustered Pcdh genes in neurons.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・融合基盤脳科学

キーワード：CTCF Neuron diversity

1. 研究開始当初の背景

脳には、莫大な数の神経細胞が個性をもちながら存在し、複雑な神経回路を形成して統合的に活動している。しかし、その基本単位である神経細胞がどのような分子メカニズムにより多様化しているのかについては、未だ明らかにされていない。

エピジェネティクス制御は、染色体構造の形成に働き、DNA配列を変化させる事無く、遺伝子発現を可塑的かつ長期に渡り安定的に制御することで分子的・機能的に個性化した細胞をつくり出す。DNAメチル化やヒストン修飾は、染色体構造形成に重要なエピジェネティクス制御機構として多くの研究がなされている。同様に、染色体の立体構造形成を担う分子は、多細胞生物の複雑な遺伝子構造を制御するために極めて重要であり、CCCTC結合タンパク質(CTCF)はこの役割を担う鍵となる分子である。CTCFは、DNAに結合して染色体の立体構造形成に働き、ある遺伝子から遠く離れた所に位置する制御領域を近づけたり、ある遺伝子の近傍に位置する別の遺伝子の制御領域が働かないようにしたりして遺伝子発現をコントロールしている。また、CTCFのDNAへの結合はDNAメチル化の影響を受ける。

最近、CTCFにより形成される染色体の立体構造が細胞の種類や分化段階によって異なること、莫大な多様性を生む免疫グロブリンの発現制御に働いていることなどが報告されている(Guo et al. *Nat. Genet.* 2011)。これらの結果は、染色体の立体構造形成が細胞の多様化における重要な要因であることを示唆する。しかし、脳神経系におけるCTCFの役割は未だ明らかでない。

申請者は、CTCFがクラスター型プロトカドヘリン(*c-Pcdh*)遺伝子群の発現制御に関与することを見出した。*c-Pcdh*遺伝子群は、神経細胞の多様化を担う最も有力な分子と考えられている。*c-Pcdh*遺伝子群は、1つの神経細胞に複数個の異なるアイソフォームを発現し、四量体を形成する。そして、四量体の種類が一致すると最も強い細胞接着活性を示す。その結果、58種類の*c-Pcdh*遺伝子群から、組み合わせにより少なくとも20万種類以上の多様性を生みだすことが示された。申請者は、これまで*c-Pcdh*遺伝子群の発現制御機構の解析をおこない、父親由来の染色体と母親由来の染色体からは、それぞれ異なる*c-Pcdh*アイソフォームを発現していることを示した研究プロジェクトに参加し、cisの制御エレメントが重要であることを見出した。次にcis制御エレメントを同定する研究プロジェクトを推進し、制御エレメントにCTCF結合配列があることが明らかとなった。最近、CTCF結合領域を網羅的に解析した報告でも、*c-Pcdh*遺伝子領域には他の遺伝子領域と比較して、多数のCTCF結合領域があることが示されている。

このような背景のもと、CTCFによる染色体構造の確立が神経細胞の分子的個性を規定する重要な制御メカニズムであり、その制御の破綻が機能的回路形成の異常を引き起こすとの考えに至った。また、その制御下にある*c-Pcdh*遺伝子群をモデルとすることで染色体構造の変換と神経細胞の分子的個性化との関係を検証できると考えた。

2. 研究の目的

染色体の立体構造形成を担うCTCFを終脳領域の分化した興奮性神経細胞特異的に欠損させ、マウス大脳皮質を解析することで、脳神経系におけるCTCFの役割を解析する。また、58種類の遺伝子から組み合わせ発現により20万種類以上の多様性を生み出す*c-Pcdh*遺伝子群がCTCFの制御下にあることをin vivoの解析により明らかにする。これらの研究を通して、CTCFによる染色体の立体構造変換が、限られた遺伝子情報から莫大な分子的多性を生み出すことを可能とし、かつ、それが機能的神経回路の精緻化に働いていることを示すことを目的とする。

3. 研究の方法

終脳領域の興奮性神経細胞特異的に*Ctcf*を欠損させたマウスの作製をおこなう。次に、*Ctcf*欠損により発現が変化する遺伝子を網羅的に解析する。特に、*c-Pcdh*遺伝子群の発現変化に対しては、Real-time PCR法による検証、及びin situ hybridization法による発現分布の確認をおこなう。また、CTCFが欠損した神経細胞の形態の詳細な解析をおこなう。

4. 研究成果

終脳領域の分化した神経細胞で特異的にCTCFを欠損させたマウス(CTCF-cKO)を作製した。CTCF-cKOマウスは、生後の発達異常や行動異常が認められ、生後1ヶ月以内に全て死亡した。CTCF-cKOマウスにおける遺伝子発現変化を網羅的に解析した結果、特にクラスター型プロトカドヘリン(*Pcdh*)の発現が著しく低下していることが分かった。また、CTCF-cKOマウスでは、生後にヒゲからの入力刺激を受けることで大脳皮質に形成されるバレルと呼ばれる特徴的な構造が全く形成されないことを明らかにした。さらに、CTCFを欠損した神経細胞では、樹状突起の分枝やスパインの形成に異常を示すこと、興奮性後シナプス電流は正常でありながら、発火頻度が減少していることを明らかとした。以上の結果から、分化した神経細胞においてCTCFがクラスター型*Pcdh*の確率的な遺伝子発現に関与し、機能的な神経回路の発達に関わる重要な因子であることを示すことができた。

一方、CTCFを神経幹細胞で特異的に欠損させると、生後1日以内に死亡し、上記の分化した神経細胞で欠損させた場合の表現型と大きく異なった。組織化学的な解析の結果、

神経細胞の発生・分化過程で大量の細胞死を引き起こしていること、CTCFを欠損した神経幹細胞でも一部は神経細胞に分化することができることが分かった。これらの結果は、神経幹細胞から神経細胞への分化過程においてもCTCFが重要な役割を果たしていることを示唆する

これらの研究成果は、英文査読付論文や新聞への掲載、学会発表など通して国内外に発信することができた。

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)

Toyoda S, Kawaguchi M, Kobayashi T, Tarusawa E, Toyama T, Okano M, Oda M, Nakauchi H, Yoshimura Y, Makoto S, Hirabayashi M, Hirayama T, Hirabayashi T, Yagi T. Developmental epigenetic modification regulates stochastic expression of clustered Protocadherin genes, generating single neuron diversity. *Neuron*. 2014 82, 94-108. (査読あり)
DOI;10.1016/j.neuron.2014.02.005.

Hirayama T and Yagi T, Clustered Protocadherins and Neuronal Diversity. In Frans van Roy, editor: Progress in Molecular Biology and Translational Science, Vol. 116, Elsevier Academic Press, 2013, pp. 145-167. (査読なし)
DOI;10.1016/B978-0-12-394311-8.00007-8.

Hirayama T, Tarusawa E, Yoshimura Y, Galjart N, Yagi T. CTCF Is Required for Neural Development and Stochastic Expression of Clustered Pcdh Genes in Neurons. *Cell Rep*. 2012 2:345-357. (査読あり)
DOI;10.1016/j.celrep.2012.06.014.

[学会発表](計7件)

Hirayama T, Tarusawa E, Yoshimura Y, Galjart N, Yagi T. CTCF is required for the refinement of somatosensory maps and stochastic expression of clustered Pcdh genes in neurons. EMBO meeting 2013. 2013年9月21日～24日, Amsterdam (Netherlands)

角岡佑紀、平山晃斉、崎村建司、八木健、Behavior analysis of CTCF-deficient mice specifically in Purkinje cell、第36回日本分子生物学会年会(神戸)2013年12月3～6日

豊田 峻輔、川口 将史、小林 俊寛、足澤 悦子、遠山 知子、岡野 正樹、小田 昌朗、中内 啓光、吉村 由美子、三宝 誠、平林 真澄、平山 晃斉、平林 敬浩、八木 健、Dnmt3b 依存的なDNAメチル化は単一神経細胞におけるクラスター型プロトカドヘリン遺伝子群の確率的発現と樹状突起の自己忌避を制御する、第36回日本神経科学学会(京都)2013年6月20～23日

大西公平、菅生紀之、豊田峻輔、平山晃斉、八木 健、山本巨彦、DNAポリメラーゼの神経前駆体細胞における作用が脳皮質における神経細胞分化に必要である、第36回日本神経科学学会(京都)2013年6月20～23日

平山晃斉、足澤悦子、吉村由美子、Galjart N、八木健、CTCFによる神経細胞の多様化と神経回路形成、第7回日本エビジェネティク研究会年会(奈良)2013年5月30～31日

Hirayama T, Tarusawa E, Yoshimura Y, Galjart N, Yagi T. CTCF is required for neural development and stochastic expression of clustered Pcdh genes in neurons. 第35回日本分子生物学会年会(博多)2012年12月11日～14日.

Toyoda S, Kawaguchi M, Toyama T, Okano M, Oda M, Kobayashi T, Hirayama T, Hirabayashi T, Yagi T, Promoter DNA methylation is dependent on gene cluster structure and regulates allocation of isoforms expression in each Protocadherin cluster. 第35回日本神経科学大会(名古屋)2012年9月18～21日

[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

平山 晃斉 (HIRAYAMA, Teruyoshi)
大阪大学・生命機能研究科・特任助教
研究者番号：40437398