

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14781

研究課題名(和文) 発達期の脳の細胞種特異的クロマチン動態から解明する神経回路可塑性のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of neural circuit plasticity investigated from cell-type specific chromatin dynamics of juvenile brain

研究代表者

酒井 晶子 (SAKAI, Akiko)

新潟大学・医歯学総合研究科・日本学術振興会特別研究員

研究者番号：70532745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ほ乳類において経験による脳機能の発達を司る抑制性ニューロン(PV細胞)に特異的な遺伝子発現・クロマチン動態制御を明らかにすることを目的とした。PV細胞の発達に必須なホメオタンパク質Otx2の下流遺伝子群を、ChIP-seqおよび細胞種特異的RNA-seqを用いて網羅的に同定したところ、PV細胞に特徴的な高頻度発火に必要な機能発達に加え、それに伴うホメオスタシス制御の重要性が明らかになった。また、コヒーシオン関連因子の機能解析からPV細胞の成熟にクロマチン構造の制御が重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳の成長には、神経回路の興奮性を調節する抑制性の神経細胞の働きが不可欠である。本研究では、経験に応じて脳の発達を促すOtx2が調節し得る遺伝子として、抑制性神経細胞の機能に必要な遺伝子群や、細胞の恒常性を保つ抗酸化遺伝子を新たに発見した。また、遺伝子調節の背景にある染色体の構造の調節の重要性も見出した。本研究の成果は、脳の成長のしくみと、その異常による精神疾患の原因の解明につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify gene expression and chromatin dynamics specific to interneurons (PV cells) that govern development of brain function depending on juvenile experience in mammals. Downstream target genes of Otx2 homeoprotein necessary for development of PV cells were identified comprehensively using ChIP-seq and interneuron-specific RNA-seq. Important functions of Otx2 were suggested to be promoting functional development for fast-spiking property characteristic to PV cells as well as homeostatic regulation. Moreover, functional analysis of a cohesin-related factor indicated importance of regulating chromatin structure in maturation of PV cells.

研究分野：クロマチン生物学

キーワード：臨界期 抑制性ニューロン PV細胞 ChIP-seq 細胞種特異的トランスクリプトーム クロマチン 転写制御 Otx2

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 脳発達の臨界期とクロマチン動態

ほ乳類の脳では、誕生の前後までに、遺伝的プログラムに従って殆どの細胞の分裂・分化・配置が完了し、基本的な構造ができあがる。一方、脳機能の発達には、受けた刺激に応じた細胞の性質の変化が必須である。特に幼少期には経験に応じて神経回路の柔軟性が高まる「臨界期」が出現する。神経細胞には興奮性と抑制性の二種類があり、臨界期に抑制性ニューロンが経験により発達することで回路が整えられていく。抑制性ニューロンの発達不全による興奮性/抑制性のバランスの異常は、精神疾患の原因となる。臨界期には、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起きやすいことが報告されていることから、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が示唆される。しかしながら、臨界期における神経細胞の形態・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、その基盤となる細胞種特異的な遺伝子発現とクロマチン動態は世界的にも殆ど研究されていない。その背景には、生後の脳は複数種の神経細胞やグリアの複雑なネットワークから成るため、細胞種特異的な解析がきわめて難しいことがある。近年になって漸く、回路の安定した成体の脳で数種類の神経細胞についての網羅的エピジェネティクス解析が報告されたが、比較的少数の細胞で可能な DNA メチル化やヒストン修飾解析に留まりクロマチン結合因子の解析には至っていなかった (Mo et al., 2015)。

### (2) 臨界期に必要な転写因子 Otx2

当研究室では、胎生期の脳の形成に必要なホメオタンパク質 Otx2 が、生後の脳において臨界期を開始させる役割を持つことを発見した (Sugiyama et al., 2008)。Otx2 は視覚経験に応じて網膜から視覚野の抑制性ニューロン (特にパルプアルブミン陽性細胞: PV 細胞) へ運ばれ、細胞発達を促すという興味深い挙動を示し、経験に依存して視覚野に可塑性をもたらす仲介役を果たす。Otx2 が PV 細胞に特異的に取り込まれる転写因子であることから、PV 細胞の発達に必要な遺伝子の発現制御を行うことが予測される。しかし、生後の大脳皮質における Otx2 の下流ターゲット因子は全く分かっていなかった。臨界期大脳皮質において Otx2 のゲノム上での局在を詳細に解析することにより、PV 細胞特異的な遺伝子発現制御を明らかにでき、細胞種特異的なクロマチン制御機構解明の手がかりになることが期待された。

### (3) 神経細胞の発達に関与するクロマチン構造制御因子コヒーシン

時期・細胞特異的な転写は、エンハンサーとプロモーターの相互作用といった、クロマチン高次構造の変化により誘導される。コヒーシン複合体は、クロマチン高次構造の構築を担い、遺伝子発現調節に関わる。また、コヒーシン関連因子の変異は自閉症や精神遅滞を伴う Cornelia de Lange 症候群 (CdLS) の原因となる。さらに、ショウジョウバエおよびマウスにおいて、コヒーシンは軸索の刈り込みや神経細胞の発達に必要である (Pauli et al., 2007, Fujita et al., 2017)。これらのことから、コヒーシンが臨界期の神経細胞で特異的なクロマチン高次構造を作り出し遺伝子発現を制御する機能を持つと推測される。しかし、これまでに臨界期脳におけるコヒーシンの挙動と役割に関する報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、臨界期を司る抑制性ニューロンに特異的な遺伝子発現・クロマチン動態制御を明らかにする目的で、以下の課題に取り組んだ。

- 1) Otx2 により発現制御を受けて PV 細胞の発達・成熟を促す遺伝子群を、ChIP-seq 法、および抑制性ニューロン特異的なトランスクリプトーム解析を用いて網羅的に明らかにする。
- 2) 生後の脳の特定の細胞におけるクロマチン因子の網羅的局在解析法を構築し、PV 細胞におけるコヒーシンの動態および役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、臨界期のマウス大脳皮質をモデル系とした。次世代シーケンサーによる DNA 配列の決定および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。

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

臨界期にある野生型正常マウス (生後 28-30 日) の大脳皮質を切り出し、1% ホルムアルデヒドで 15 分間クロスリンクを行った。マイクロコッカルヌクレアーゼおよび超音波破碎により断片化クロマチンを得た。可溶性クロマチン溶液より、Otx2 およびコヒーシンの 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 および次世代シーケンサーにより解析した。

## (2) 抑制性ニューロン特異的なトランスクリプトーム解析

生後のマウス大脳皮質の細胞を分離するにあたり、細胞の生存率を高く保つために、トレハロースを加える方法を用いた(Saxena et al., 2012)。抑制性ニューロン特異的に Venus を発現するトランスジェニックマウス (VGAT-Venus; Wang et al., 2009) を用い、フローサイトメトリーにより抑制性ニューロンを単離した。細胞は Trizol LS (Ambion) に直接分取し、RNA 精製後、次世代シーケンサーにより配列を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 臨界期大脳皮質ゲノムにおける Otx2 の網羅的局在解析

ChIP-seq 法により臨界期大脳皮質ゲノム上の Otx2 の結合部位を網羅的に同定した。これに先立ちまず、Otx2 の局在を臨界期 (生後 28 日齢) マウス大脳皮質全体にわたり調べた。Otx2 は視覚野のみならず、体性感覚野、運動野、前頭前野においても主に PV 細胞に局在していた (図 1)。

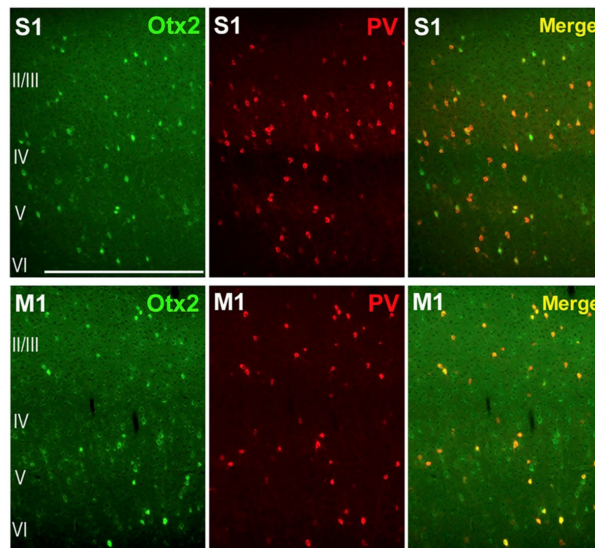


図 1: 臨界期大脳皮質における Otx2 の局在。S1:体性感覚野, M1:運動野。

そこで大脳皮質全体を用いて Otx2 の ChIP-seq を行った。Otx2 の局在する PV 細胞は皮質全体の細胞の数%ではないためバックグラウンドが高くなるが、得られる ChIP シグナルは PV 細胞特異的なものと考えられる。より信頼性の高いピークを同定するために、自作、および市販の合計 3 種類の抗体を用いて ChIP-seq を行い、2 種類以上の抗体で同定されたピークを Otx2 結合位置とした。Otx2 の結合部位を持つ遺伝子について gene ontology (GO) 解析を行ったところ、転写制御・クロマチン制御因子が最も多かったことから、Otx2 は胎生期と同様、臨界期脳においても転写カスケードを制御すると考えられる。加えて、Otx2 はシナプス関連因子や軸索伸長因子等、回路形成に関わる遺伝子にも結合していた。臨界期に関わる既知の遺伝子を個別に調べたところ、Otx2 は当研究室で明らかにしたコンドロイチン硫酸合成に関わる酵素を含む、複数の臨界期遺伝子のプロモーター領域に結合していた。さらに面白いことに、Otx2 結合遺伝子群は、統合失調症やアルツハイマー等ヒト疾患に関わる因子を多数含んでいた。これら疾患のカテゴリーで共通する遺伝子としてミトコンドリア因子が複数含まれることから、Otx2 は後述のように PV 細胞におけるエネルギー代謝を制御すると考えられる。また、胎生期脳における報告との比較から、臨界期特異的な Otx2 結合遺伝子として、PV 細胞に特徴的な高頻度発火を司る因子 (Kv3.1 イオントランスポーター等) が明らかになった。これらの遺伝子群の Otx2 による統合的な発現制御が PV 細胞の機能発達に重要であると推測される。

### (2) 臨界期抑制性ニューロンにおける Otx2 の下流遺伝子の網羅的解析

フローサイトメトリーを用いて Otx2 欠損マウスおよびコントロールマウスの抑制性ニューロン特異的なトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行った。GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) により、Otx2 欠損により発現が変化する遺伝子のカテゴリーとして、転写制御因子、シグナル伝達因子、およびミトコンドリア因子が同定された。これらは、ChIP-seq で同定された、Otx2 結合部位を持つ遺伝子のカテゴリーとよく重なっていた。さらに、大脳皮質での役割は未知であった酸化ストレス耐性遺伝子 oxidative resistance-1 (*Oxr1*) が、Otx2 制御下で抑制性ニューロン特異的に強く発現することを発見した (図 2)。Oxr1 の全長アイソフォームのプロモーター領域には臨界期大脳皮質のみで Otx2 結合が見られたことから、発達期の抑制性ニューロン特異的な発現制御を Otx2 が直接担う可能性が強く示唆された。PV 細胞は成熟に伴い、この細胞に特異的な高頻度発火 (fast spiking) を行う。このため、ミトコンドリアによるエネルギー

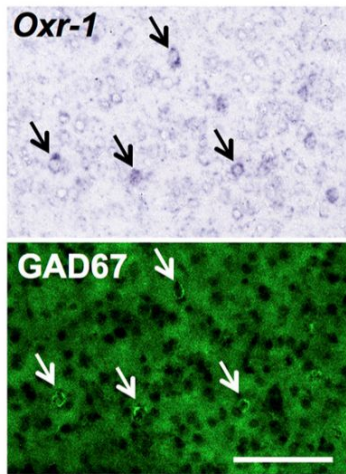


図2 : *Oxr1* の転写産物 ( *in situ* hybridization ) と抑制性ニューロンのマーカー ( GAD67 免疫染色 ) の共局在。スケールバー : 100  $\mu$ m。

代謝とその結果生じる酸化ストレスへの応答が不可欠となる。Otx2 がミトコンドリア構成因子および酸化ストレスに対応する因子の発現調節に関わるという結果は、発達中のPV細胞での恒常性(代謝とストレスのバランス)の維持がOtx2による臨界期制御機構の重要な一面であることを示唆する。近年、酸化ストレスによるPV細胞の機能不全が発達障害や自閉症・統合失調症といった精神疾患に深く関与することが明らかとなってきた。本研究の結果はOtx2がPV細胞の発達とホメオスタシス制御を通じて臨界期の回路可塑性、および神経・精神疾患に関与することを示唆する。一方で、Otx2は臨界期可塑性に関与する様々な遺伝子のプロモーターに結合するにも関わらず、通常の飼育条件下でOtx2機能欠損により有為に発現変動を示す遺伝子はごく一部に限ら

れた。このことは、Otx2が臨界期に入力の変化があったときに可塑性関連因子の迅速な発現変化を可能にするよう、待機状態のクロマチン構造を作り出している可能性を示唆するものと考えている。

### (3) 臨界期脳におけるコヒーシンの結合部位と役割

さらにクロマチン制御の観点からPV細胞発達の機構を明らかにするため、臨界期におけるコヒーシンの機能解析を開始した。PV細胞特異的にコヒーシン関連因子を欠損するマウスを作成したところ、PV細胞の成熟遅延が見られたことから、コヒーシンによるクロマチン構造制御の重要性が示唆された。ChIP-seqより、臨界期大脳皮質におけるコヒーシン結合部位はOtx2結合部位のおよそ半数と重なることから、Otx2がコヒーシンによるクロマチン構造変化をもたらす臨界期特異的遺伝子発現を引き起こす可能性が考えられた。現在、少数細胞からクロマチン因子のゲノムワイド解析を行うことが可能なChIL法(Harada et al., 2018)を生後脳に応用した系の構築を進め、PV細胞に限定した詳細な解析を目指している。

#### < 引用文献 >

- Fujita, Y., Masuda, K., Bando, M., Nakato, R., Katou, Y., Tanaka, T., Nakayama, M., Takao, K., Miyakawa, T., Tanaka, T., Ago, Y., Hashimoto, H., Shirahige, K., Yamashita, T., 2017. Decreased cohesin in the brain leads to defective synapse development and anxiety-related behavior. *The Journal of Experimental Medicine* 214, 1431–1452.
- Harada, A., Maehara, K., Handa, T., Arimura, Y., Nogami, J., Hayashi-Takanaka, Y., Shirahige, K., Kurumizaka, H., Kimura, H., Ohkawa, Y., 2018. A chromatin integration labelling method enables epigenomic profiling with lower input. *Nature Cell Biology* 21, 287–296.
- Mo, A., Mukamel, E.A., Davis, F.P., Luo, C., Henry, G.L., Picard, S., Urich, M.A., Nery, J.R., Sejnowski, T.J., Lister, R., Eddy, S.R., Ecker, J.R., Nathans, J., 2015. Epigenomic Signatures of Neuronal Diversity in the Mammalian Brain. *Neuron* 86, 1369–1384.
- Pauli, A., Althoff, F., Oliveira, R.A., Heidmann, S., Schuldiner, O., Lehner, C.F., Dickson, B.J., Nasmyth, K., 2008. Cell-type-specific TEV protease cleavage reveals cohesin functions in *Drosophila* neurons. *Dev Cell* 14, 239–251.
- Saxena, A., Wagatsuma, A., Noro, Y., Kuji, T., Asaka-Oba, A., Watahiki, A., Gurnot, C., Fagiolini, M., Hensch, T.K., Carninci, P., 2012. Trehalose-enhanced isolation of neuronal sub-types from adult mouse brain. *BioTechniques* 52, 381–385.
- Sugiyama, S., Di Nardo, A.A., Aizawa, S., Matsuo, I., Volovitch, M., Prochiantz, A., Hensch, T.K., 2008. Experience-Dependent Transfer of Otx2 Homeoprotein into the Visual Cortex Activates Postnatal Plasticity. *Cell* 134, 508–520.
- Wang, Y., Kakizaki, T., Sakagami, H., Saito, K., Ebihara, S., Kato, M., Hirabayashi, M., Saito, Y., Furuya, N., Yanagawa, Y., 2009. Fluorescent labeling of both GABAergic and glycinergic neurons in vesicular GABA transporter (VGAT)-Venus transgenic mouse. *Neuroscience* 164, 1031–1043.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(全て査読有り)



Sakai, A., Sugiyama, S.

Experience-dependent transcriptional regulation in juvenile brain development.

*Development, Growth & Differentiation*. 60:473-82. (2018)

doi: 10.1111/dgd.12571

Hou, X., Yoshioka, N., Tsukano, H., Sakai, A., Miyata, S., Watanabe Y., Yanagawa, Y.,

Sakimura, K., Takeuchi, K., Kitagawa, H., Hensch, TK., Shibuki, K., Igarashi, M., Sugiyama, S.

Chondroitin sulfate is required for onset and offset of critical period plasticity in visual cortex.

*Scientific Reports*. 7:12646. (2017)

doi: 10.1038/s41598-017-04007-x

Sakai, A., Nakato, R., Ling, Y., Hou, X., Hara, N., Iijima, T., Yanagawa, Y., Kuwano, R., Okuda, S.,

Shirahige, K., Sugiyama, S.

Genome-wide target analyses of Otx2 homeoprotein in postnatal cortex.

*Frontiers in Neuroscience*. 11:307 (2017)

doi: 10.3389/fnins.2017.00307

酒井 晶子・杉山 清佳「臨界期の機構 — こどもの脳の柔軟性を紐解く」

生体の科学. 2017年68巻1号 pp.54-58

doi: 10.11477/mf.2425200575

#### [学会発表](計 7 件)

Sakai, A. “Regulation of transcription and chromatin structure in postnatal cortical development.”

*The 9<sup>th</sup> BRI International Symposium*. 新潟県新潟市. (2019年3月)

酒井 晶子・中戸 隆一郎・凌 一葦・侯 旭濱・飯島 友也・原 範和・桑野 良三・奥田 修二郎・白髭 克彦・杉山 清佳「経験による脳の発達に必須な抑制性介在ニューロンにおける転写制御」

第41回日本分子生物学会. 神奈川県横浜市. (2018年11月)

Sakai, A. “Analysis of chromatin dynamics in postnatal cortical plasticity.”

Brain Research Institute the 8<sup>th</sup> international symposium8: *The innovative progress of neuroscientific research through the use of advanced animal models*. 新潟県新潟市. (2018年3月)

Sakai, A., Nakato, R., Ling, Y., Hou, X., Hara, N., Iijima, T., Yanagawa, Y., Kuwano, R., Okuda, S.,

Shirahige, K., Sugiyama, S. “Genome-wide Target Analyses of Otx2 Homeoprotein In Postnatal Cortical Interneuron.”

第40回日本神経科学大会. 千葉県幕張市. (2017年7月)

酒井 晶子、中戸 隆一郎、凌 一葦、侯 旭濱、飯島 友也、原 範和、柳川 右千夫、桑野 良三、奥田 修二郎、白髭 克彦、杉山 清佳「発達期の抑制性介在ニューロンにおける Otx2 下流因子群は代謝と精神疾患に関わる」

第58回新潟生化学懇話会. 新潟県新潟市. (2017年6月)

酒井 晶子、中戸 隆一郎、凌 一葦、侯 旭濱、飯島 友也、原 範和、柳川 右千夫、桑野 良三、奥田 修二郎、白髭 克彦、杉山 清佳。「生後の抑制性介在ニューロン発達におけるホメオタンパク質 Otx2 の網羅的ターゲット解析」

第11回日本エピジェネティクス研究会年会. 東京都千代田区. (2017年5月)

Sakai, A., Nakato, R., Ling, Y., Hou, X., Hara, N., Iijima, T., Yanagawa, Y., Kuwano, R., Okuda, S.,

Shirahige, K., Sugiyama, S. “Genome-wide targets of Otx2 homeoprotein in postnatal cortical interneuron are implicated in mitochondria and neurodevelopmental disorders.”

第10回神経発生討論会. 宮城県仙台市. (2017年3月)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中戸 隆一郎

ローマ字氏名：(NAKATO, Ryuichiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。