

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18364

研究課題名(和文) コヒーシンによるシナプス形成制御機構

研究課題名(英文) Cohesin regulates synapse formation in the brain

研究代表者

藤田 幸 (Fujita, Yuki)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60631215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、染色体高次構造を制御するコヒーシンが中枢神経回路形成、正常な脳機能の発現に必要であることを明らかにした。コヒーシンの機能が低下したマウスの大脳皮質では、成熟スパインの密度やシナプス数が低下し、不安様行動が亢進することがわかった。コヒーシン機能低下により染色体動態制御、遺伝子転写調節が破綻した結果、中枢神経回路形成に異常をきたし、不安様行動が亢進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cohesin complex is composed of four subunits, Smc3, Smc1, Scc3, and Scc1/Rad21, and has a role in sister chromatid cohesion, which is crucial for accurate chromosome segregation. Cohesin is also known to be involved in chromatin organization by forming chromatin loops at particular loci and regulates gene expression in postmitotic cells. To investigate the potential role of cohesin in terminally differentiated cells in vivo, we generated conditional Smc3-knockout mice. We observed increased dendritic complexity and decreased spine density in cortical neurons of heterozygous Smc3-knockout mice. Neuron-specific Smc3-knockout mice showed the same phenotype. Heterozygous Smc3-knockout mice exhibited increased anxiety-related behavior, a symptom of Cornelia de Lange syndrome, also caused by disruption of cohesin. Thus, neuronal cohesin contributes to neural network formation, presumably by modulating gene expression, and cohesin deficiency leads to higher brain dysfunction.

研究分野：神経科学

キーワード：中枢神経 ゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

コヒーシンは染色体の接着に関わるタンパク質複合体で、4つのサブユニットから構成されるリング状の構造を形成する。このリングの中に、姉妹染色分体を束ねて接着し、染色体を正確に娘細胞へ分配するという、細胞の分裂・増殖に必須の役割を担っている。一方で、コヒーシンは染色体分配以外にも、転写制御において重要な役割を担うことが報告されている。すなわち、ゲノムをループ状に束ね、一つの遺伝子発現制御単位を形成するとともに、離れたエンハンサーを空間的にプロモーターの近傍に配置し、適切な相互作用を可能にする。ヒトのコヒーシン関連遺伝子の変異により引き起こされる疾患である **Cornelia de Lange Syndrome (CdLS)** では、姉妹染色体分配に異常を呈さないにも拘らず、精神遅滞、四肢の形成異常、心奇形などの分化発生異常を伴うことが知られている。このことから、姉妹染色体分配機能と遺伝子転写調節機能は根本的に異なるものであると推察される。また、ショウジョウバエでは神経回路形成段階における、過剰に形成された軸索の刈り込み (**axon pruning**) にコヒーシンが必要であることが2つの研究グループから報告されている。これは、分化後の細胞においても、染色体分配機能とは別で、コヒーシンが機能することを示す有力な証拠である。しかし、コヒーシンによる染色体立体構造変化を介した遺伝子発現調節が中枢神経回路形成を制御するメカニズムは解明されていない。脳の発生・発達過程におけるコヒーシンの役割を調べるため、申請者は、コヒーシンサブユニットの一つである **Smc3** 欠損マウスを作成した。

### 2. 研究の目的

本研究では、染色体動態制御の破綻により生じる中枢神経回路の障害とその分子機序を解明することを目的とした。中枢神経系の発生・発達過程では、ゲノム高次構造の変化を伴った遺伝子発現調節機構が密接に関与している。しかし、染色体動態の制御機構の破綻がどのようなメカニズムにより細胞や神経回路レベルでの異常をもたらすかについては未解明のままであった。本研究では染色体動態を司る因子として、染色体接着因子コヒーシンに着目した。コヒーシンはクロマチンループの形成を介して遺伝子転写を制御していると考えられてきたクロマチン高次構造の調節因子である。これまでに私達は **Cre-LoxP** システムを用いて、コヒーシン欠損マウスを作成している。このマウスを用いてシナプス形成の過程を解析することで、中枢神経回路形成過程における染色体動態制御の重要性を明らかにすることを目標とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、染色体動態制御の破綻により生じる中枢神経回路の障害とその分子機序を解明することを目的とする。栄養状態や精神ストレスなどの環境要因がエピゲノム状態を変化させ、精神疾患発症に影響すると推定されている。しかし、クロマチン動態の制御機構の破綻がどのようなメカニズムにより細胞や神経回路レベルでの異常をもたらすかについては未解明のままであった。本研究ではクロマチン動態制御を司る因子として、染色体接着因子コヒーシンに着目した。コヒーシンはクロマチンループの形成を介して遺伝子転写を制御していると考えられてきたクロマチン高次構造の調節因子である。これまでに私達は **Cre-LoxP** システムを用いて、コヒーシン欠損マウスを作成している。このマウスを用いてシナプス形成の過程を解析することで、中枢神経回路形成過程における染色体動態制御の重要性を明らかにしたいと考えた。

そこで、本研究ではコヒーシンを介した染色体動態制御の破綻がもたらす中枢神経回路形成障害が生じるメカニズムを明らかにすることを目指した。さらに、組織学的な異常がどのようにして脳の高次機能障害を引き起こすのかについて解明することを目標とした。具体的には、以下の3点に焦点をあて、研究を進めた。

- (1) コヒーシン欠損マウスの脳における細胞、シナプスの異常
- (2) コヒーシン欠損マウスの行動異常、特に、社会行動性や学習・記憶障害など
- (3) コヒーシン欠損マウスにおける発現変動遺伝子の同定

### 4. 研究成果

- (1) コヒーシン欠損マウスの脳における細胞、シナプスの異常

これまでの研究からコヒーシンが分化後の細胞においても機能しうることが推察されてきたが、中枢神経系において、実際にコヒーシンが発現しているか、組織学的に検証した。マウス大脳皮質において、分化後の神経細胞にコヒーシンサブユニットの一つである **Smc3** が発現していることを、免疫染色法により確認した。野生型、及びコヒーシン欠損マウスの脳の異常を概括的に検証するため、Nissl 染色を行い、脳の構造を検証したが、目立った異常は認められなかった。さらに詳細に神経細胞の形態を調べるためにゴルジ染色を行った結果、コヒーシン欠損マウスでは野生型マウスと比較して、大脳皮質第 II/III 層の樹状突起数の増加、成熟スパインの減少が認められた。スパインを5つのタイプに分類し、各割合を調べた結果、コヒーシン欠損マウスでは、成熟型スパインである Mushroom 型の割合が減少しているのに対し、

未熟なスパインである Thin 型、Filopodia 型の割合が増加していた (図 1)。スパインは後シナプスの形成に寄与する構造であり、成熟スパインの減少はシナプス形成不全を示唆する結果と考えた。そこで、コヒーシン欠損マウスにおけるシナプスの構造的な異常を検証するため、電子顕微鏡による解析を行った。その結果、コヒーシン欠損マウスでは後シナプスの形態異常が観察された。これらの結果はコヒーシン機能が低下することにより、シナプス形成が障害されることを示唆している。

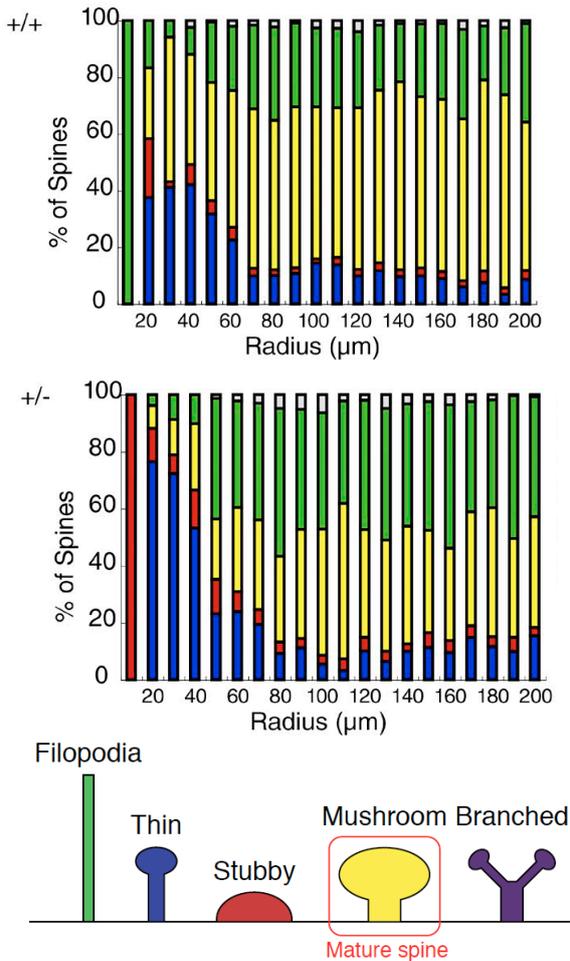


図 1. コヒーシン機能低下による成熟スパインの減少。グラフは大脳皮質 II/III 層錐体細胞の各種スパインの割合を示す。

(2) コヒーシン欠損マウスの行動異常

コヒーシン欠損により、上記の様なシナプス形成障害を確認した。このマウスでは脳の高次機能に異常を呈するか検証した。行動バッテリー試験 (general health and neurological screening, light dark transition test, open field test, elevated plus maze, rota-rod test, hot plate test, social interaction (novel environment, Crawley test), acoustic startle response, prepulse inhibition, porsolt forced swim,

barnes maze, t-maze) を行い、マウスの行動を網羅的に検証した。マウスの一般的な筋力や運動能力、痛覚感受性、社会的行動性、空間学習については、野生型とコヒーシン欠損マウスの間で有意な差は認められなかった。一方で、明暗箱試験による明所での不安様行動が亢進していた。そのため、不安様行動に関するテストを追加して行った。Marble burying test の結果、コヒーシン欠損マウスは無意味な行動を執拗に繰り返す傾向があることから、不安様行動が亢進していると考えられた。Novelty induced hypophagia test によっても、コヒーシン欠損マウスは野生型マウスと比較して、新規環境における不安様行動の亢進が認められた (図 2)。これまでに、Cornelia de Lange Syndrome (CdLS) においても、精神遅滞や自閉症様行動に加えて、不安の亢進が報告されている。これらの知見から、コヒーシン欠損マウスにおける中枢神経回路形成の障害が、不安様行動の亢進を引き起こす可能性が推察される。

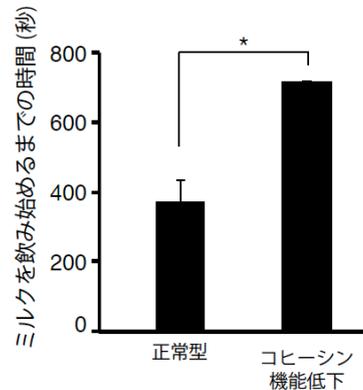


図 2. コヒーシン機能低下による新規環境での不安様行動の亢進 (Novelty induced hypophagia test)。コヒーシンの機能が低下したマウスでは、好物であるミルクを飲み始めるまでの時間が有意に延長した。

(3) コヒーシン欠損マウスにおける発現変動遺伝子の同定

コヒーシンは染色体高次構造を広範囲にわたり制御すると考えられる。そのため、コヒーシンの機能低下により発現が変化する遺伝子は多数あると予想される。発現変動を示す遺伝子の中でも、特定の機能を有する遺伝子群の発現に変化が生じるなどの共通性はあるか検証した。中枢神経回路の形成過程における遺伝子発現変動を検証するため、野生型マウス、コヒーシン欠損マウスの大脳皮質を経時的 (生後 1, 3, 7, 14, 21 日) に摘出した。摘出した組織から、RNA を抽出し、RNA-seq により発現が変化する遺伝子を探索した。発現変動を示す遺伝子群を階層化し、クラスターごとに GO 解析を行った。その結果、コヒーシン欠損マウスの大脳皮質では、神経発生に関わる遺伝子群の発現が生後 7 日に発現上昇を示すことがわかった。

以上の結果から、コヒーシンは神経発生に関わる遺伝子群の発現調節を介して中枢神経回路網の形成、脳機能の発現に寄与することが示唆された。コヒーシンの機能低下によって、シナプス形成障害をきたし、不安様行動が亢進した。本研究により、染色体高次構造がシナプス形成を制御するメカニズムの一端が明らかになったと考える。

#### 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1件)

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., and Yamashita, T. (2017) Decreased cohesin in the brain leads to defective synapse development and anxiety-related behavior. *J Exp Med.* 214(5):1431-1452. 査読有.  
DOI: 10.1084/jem.20161517

[学会発表] (計8件)

1) Yuki Fujita, Toshihide Yamashita  
Decreased cohesin in the brain leads to defective synapse development and anxiety-related behavior. Neuroscience 2017; Society for Neuroscience. Washington, DC, USA. November 11-15, 2017

2) 藤田 幸、山下 俊英  
染色体接着因子コヒーシンの機能低下によるシナプス形成障害、第 64 回日本生化学学会 近畿支部例会、2017 年 5 月 27 日、大阪府豊中市

3) 藤田 幸、山下 俊英  
中枢神経系における Smc タンパク質の機能、第 93 回 日本解剖学会近畿支部 学術集会、2017 年 11 月 25 日、滋賀県 大津市

4) 藤田 幸、山下 俊英  
中枢神経発生・発達におけるコヒーシンの機能解析、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017 年 3 月 28 日-30 日  
長崎県 長崎市

5) 藤田 幸、山下 俊英  
コヒーシンによる中枢神経回路形成制御、第 40 回 日本神経科学大会、2017 年 7 月 20 日-23 日、千葉県 千葉市

6) 藤田 幸、白髭 克彦、山下 俊英  
コヒーシン病モデルマウスの解析 (指定シンポジウム演者)、第 68 回 日本細胞生物学会大会、2016 年 6 月 15 日-17 日、京都府 京

都市

7) 藤田 幸、山下 俊英  
染色体接着因子コヒーシン欠損によるシナプス形成障害、第 109 回 近畿生理学談話会、2016 年 11 月 5 日  
大阪府 大阪市

8) 藤田 幸、山下 俊英  
コヒーシン欠損によるシナプス形成障害、第 92 回 日本解剖学会・近畿支部学術集会、2016 年 11 月 27 日、大阪府 狭山市 近畿大学東大阪キャンパス

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 幸 (Yuki Fujita)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：60631215