

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07109

研究課題名（和文）神経細胞分化における転写動態の1分子イメージング解析

研究課題名（英文）Single Molecule Imaging of Transcription Dynamics in Neuronal Differentiation

研究代表者

菅生 紀之（Sugo, Noriyuki）

大阪大学・生命機能研究科・特任准教授（常勤）

研究者番号：20372625

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：脳機能構築において不可欠な神経細胞分化では遺伝子発現調節を伴うことが知られています。しかし、その制御メカニズムの時空間的動態には不明な点が多く残されています。本研究では、遺伝子組換えマウスやヒト多能性幹細胞を用いて神経細胞分化における転写調節因子やエピジェネティクス制御因子といった核内の分子を可視化することで時空間的動態変化が果たす役割を新たに明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児期から生後発達期の脳機能構築において、その中心にある神経細胞の成熟には適切な遺伝子の発現調節が重要です。その過程は、核内のゲノムDNAや酵素タンパク質といった分子の相互作用によって引き起こされると考えられますが、それら分子がいつ・どこで・どのように振る舞うのかに関しては不明な点が多く残されています。本研究では、そのような分子である転写因子とエピジェネティクス制御因子に着目してマウスおよびヒト神経細胞の成熟過程での詳細な動態や新たな役割を明らかにすることができました。この成果は、脳形成の学問的理解に貢献するとともに脳発達障害や精神神経疾患といった病態の理解に繋がることが期待されます。

研究成果の概要（英文）：Gene expression regulation is essentially involved in the process of neuronal differentiation. However, the spatiotemporal dynamics of its regulatory factors in the nucleus remains unclear. In this study, we found the role of spatiotemporal dynamics of nuclear molecules such as transcription factors and epigenetic regulatory factors during neuronal differentiation using imaging tools in genetically modified mice and human pluripotent stem cells.

研究分野：神経科学 分子生物学

キーワード：分子・細胞・神経生物学

1. 研究開始当初の背景

神経細胞分化の過程は、遺伝的に時系列が固定化されている一方、経験や学習といった神経活動に応答して変化する側面を持ち、神経回路形成とシナプス可塑性に基づいた脳機能構築に寄与していると考えられています。この過程において遺伝子発現を伴うことは明らかですが、その制御メカニズムの時空間的動態は不明な点が多く残されています。脳はヒトで劇的な進化を遂げましたが、全ゲノム塩基配列解析の結果から見ればそれを担う特別な遺伝子の出現は明らかになっておらず、ゲノムサイズも他の動物種に比べ差して大きいわけではないことから、遺伝子発現調節の洗練こそが進化の原理ではないかと考えられます。しかも、染色体の数や形態は哺乳類においても種により異なることが知られており、この違いは遺伝子発現制御の場の形成に大きく影響し、神経細胞の特性を変える可能性があります。この理解には、転写動態からクロマチン構造さらには核内空間配置にまで踏み込んで、分子イメージングにより捉える解析が不可欠です。

『細胞内での素過程を直接見る』という観点の取組みは、顕微鏡技術の進歩とあいまって国内外問わず急速に展開されています。我々の研究グループは、これまで神経細胞の核内分子を1分子蛍光イメージングで捉え、その動態を定量的に計測することに取り組んできました。1分子イメージングは分子動態を定量的に解析できることが全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF)による細胞表面分子の解析から明らかですが、核内分子の解析に関しては極めて少ないのが現状です。しかし、これまでにタグ(HaloTag)を付加したタンパク質と斜光照明蛍光顕微鏡(HILO)を用いた核内1分子イメージングの実験系の構築を独自に進めてきました。その結果、HaloTagを利用して蛍光色素テトラメチルローダミン標識した転写因子 CREB とその認識配列 CRE の相互作用をライプセル(Neuro2a 細胞株)の核内で1分子動態計測することに成功しています。その成果として、特異的相互作用は僅か数秒間であることを明らかにしています(Sugo N et al., 2015)。さらに、この実験系を初代大脳皮質培養神経細胞に導入し光遺伝学的手法と組み合わせることで神経活動依存性な CREB 動態を解析したところ、核の一部の領域で相互作用(解離速度定数)を変化させることなく、頻度高く結合を繰り返すことを明らかにしました(Kitagawa H, et al., 2017)。つまり、この領域ホットスポットには神経活動依存性な遺伝子発現を示す遺伝子座があると考えられます。その一方で、クロマチン構造に着目し、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC9 が神経活動依存性に核・細胞質間を移動してクロマチン構造を制御することで転写に作用し、樹状突起形成に寄与することを明らかにしています(Sugo N, et al., 2010)。さらに、DNA 修復酵素である DNA ポリメラーゼβ (Polβ) が神経細胞分化の過程に不可欠であることをノックアウトマウスの解析から明らかにしてきましたが(Sugo N, et al., 2000; Sugo N, et al., 2004; Sugo N, et al., 2007)、その役割は分化に際してのエピジェネティックな遺伝子発現制御である能動的 DNA 脱メチル化経路にあることを示唆しています(Ohnishi K., et al., 2017)。つまり、DNA 修復のメカニズムを利用してメチル化されたシトシンを取り除き、新たにシトシンを Polβにより再合成することで、神経細胞分化に必要な遺伝子発現をオンに制御していると考えられます。以上の経緯から、既知の転写研究の概念に加えて、転写やクロマチン構造を制御する核内因子さらに染色体 DNA の脱メチル化の時空間的制御が神経細胞分化・可塑性の重要な要因であり、その素過程を明らかにすることがメカニズムを理解する上で鍵になると考えています。

2. 研究の目的

本研究は遺伝子発現の過程を蛍光イメージングで可視化し3次元的な核内空間配置と動態を定量的に観察することで、神経細胞分化・可塑性における新たな原理・法則性を明らかにすることを目指しました。これまで推進してきた転写因子 CREB の動態解析に加えて、新たに我々の研究グループが見出した神経細胞分化における Polβ依存性な能動的 DNA 脱メチル化を介した転写制御の動態解析を進めました。

3. 研究の方法

(1) 神経活動依存性な転写制御の動態を詳しく解析するため、これまでのマウスに加えてヒト多能性幹細胞(ES細胞またはiPS細胞)から作製したの神経細胞を用いて転写因子 CREB と転写共役因子の分子動態を HILO 顕微鏡により1分子レベルで捉えて調べました。また、ヒト iPS 細胞にゲノム編集技術を用いて遺伝子改変した株を作製すると共に、その細胞株から大脳オルガノイドを作製することで実際の発生分化に近い培養モデルの構築を試みました。

(2) 神経細胞分化過程での能動的 DNA 脱メチル化制御の動態を明らかにするために、その過程の鍵となる Polβのコンディショナルノックアウトマウスを用いて時空間的な役割を分子イメー

ジングで、さらに生理学的役割をマウス行動解析によって調べました。

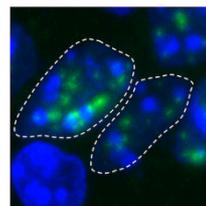
4. 研究成果

(1) ヒト多能性幹細胞を分化誘導して作製した神経細胞を用いて、神経活動依存的な転写因子 CREB の動態を斜光レーザー顕微鏡による 1 分子蛍光イメージング法で解析しました。ヒト神経細胞での計測が初めて可能となり、さらには CREB とその共役因子を異なる蛍光色素で同時に 1 分子蛍光観察することにも成功して相互作用を明らかにすることができました。その結果は学会にて発表を行いました。また、神経細胞の転写因子の 1 分子イメージング解析の方法論に関する論文を発表しました。

(2) ヒト神経細胞分化のより忠実なモデル実験系を確立するために、ヒト iPS 細胞から特定の神経細胞種を分化誘導する実験系として、ヒト iPS 細胞由来大脳オルガノイドの作製を試みました。発生期大脳皮質様の細胞構築として、神経前駆細胞からなる脳室帯様構造と最終分裂後の神経細胞から構成される皮質板様構造が観察され、特に皮質深層の神経細胞の分子マーカー Tbr1 や Ctip2 を時空間的に再現性良く発現する神経細胞を約 40 日程度の培養期間で作製することができました。

(3) CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いて、ヒト iPS 細胞の染色体の狙った遺伝子座にバクテリオファージ由来の塩基配列 MS2 を含む DNA 断片を導入する改変を行うことで、特定の転写産物の分子イメージング解析を行うことができました。

(4) Pol β 欠損マウスは生後 2 週程の間に、学習・記憶を司ることが知られる海馬神経細胞の核内に重篤なゲノム不安定化である DNA2 本鎖切断が一過的に数多く観察され、遺伝子発現や樹状突起形成に異常をもたらすことを発見しました (図を参照)。さらに、脳機能へ及ぼす影響を調べるために行動解析を行ったところ、空間学習・記憶や不安様行動に異常が認められました。この分子メカニズムとして能動的 DNA 脱メチル化に着目したところ、生後発達初期にゲノム DNA 中のメチル化シトシン量が大幅に減少することがわかりました。そこで、この過程の開始に必要なとされる TET 酵素の高発現と発現抑制の遺伝子操作を行うと、それぞれ DNA2 本鎖切断の増加と減少が観察され、Pol β はこのエピジェネティックな転写制御においてゲノム安定性維持に必要であることが明らかになりました。本研究成果を学会で発表すると共に、研究論文として発表しました。



図・蛍光イメージングにより明らかとなった Pol β 欠損海馬神経細胞に観察される DNA2 本鎖切断

(5) ヒト神経細胞分化過程における能動的 DNA 脱メチル化制御の動態を明らかにするために、DNA ポリメラーゼ β 欠損ヒト iPS 細胞由来大脳オルガノイドを作製して調べたところ、マウスと同様にヒト神経前駆細胞においても DNA2 本鎖切断が蓄積してゲノム不安定性が増加することを明らかにしました。この結果は学会にて発表を行いました。

<引用文献>

- ① Kohei Onishi, Akiko Uyeda, Mistuhiro Shida, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto, Noriyuki Sugo Genome Stability by DNA polymerase β in Neural Progenitors Contributes Neuronal Differentiation in Cortical Development. **J Neurosci.** 37:8444-8458 (2017).
- ② Hironobu Kitagawa, Noriyuki Sugo, Masatoshi Morimatsu, Yoshiyuki Arai, Toshio Yanagida, Nobuhiko Yamamoto. Activity-Dependent Dynamics of the Transcription Factor CREB in Cortical Neurons Revealed by Single-Molecule Imaging. **J Neurosci.** 37:1-10 (2017).
- ③ Noriyuki Sugo, Masatoshi Morimatsu, Yoshiyuki Arai, Yoshinori Kousoku, Aya Ohkuni, Taishin Nomura, Toshio Yanagida, Nobuhiko Yamamoto. Single-Molecule Imaging Reveals Dynamics of CREB Transcription Factor Bound to Its Target Sequence. **Sci Rep.** 5:10662 (2015).
- ④ Noriyuki Sugo, Hiroaki Oshiro, Mitsuhiro Takemura, Toshiaki Kobayashi, Yusuke Kohno, Naofumi Uesaka, Wen-Jie Song, and Nobuhiko Yamamoto. Nucleocytoplasmic translocation of HDAC9 regulates gene expression and dendritic growth in developing cortical neurons. **Eur J Neurosci.** 31:1521-1532 (2010).

- ⑤ Noriyuki Sugo, Naoko Niimi, Yasuaki Aratani, Mitsuko Masutani, Hiroshi Suzuki, and Hideki Koyama. Decreased PARP-1 levels accelerate embryonic lethality but attenuate neuronal apoptosis in DNA polymerase β -deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 354:656-661 (2007).
- ⑥ Noriyuki Sugo, Naoko Niimi, Yasuaki Aratani, Keiko Takiguchi-Hayashi, and Hideki Koyama. p53 deficiency rescues neuronal apoptosis but not differentiation in DNA polymerase β -deficient mice. *Mol Cell Biol*. 24:9470-9477 (2004).
- ⑦ Noriyuki Sugo, Yasuaki Aratani, Youji Nagashima, Yoshinobu Kubota, Hideki Koyama. Neonatal lethality with abnormal neurogenesis in mice deficient in DNA polymerase β . *EMBO J*. 19:1397-1404 (2000).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Akiko Uyeda, Kohei Onishi, Teruyoshi Hirayama, Satoko Hattori, Tsuyoshi Miyakawa, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto, Noriyuki Sugo | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Suppression of DNA Double-Strand Break Formation by DNA Polymerase β in Active DNA Demethylation Is Required for Development of Hippocampal Pyramidal Neurons | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 9012-9027 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.0319-20.2020 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Akiko Uyeda, Kohei Onishi, Teruyoshi Hirayama, Satoko Hattori, Tsuyoshi Miyakawa, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto, Noriyuki Sugo | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Suppression of DSB Formation by Pol β in Active DNA Demethylation is Required for Postnatal Hippocampal Development | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 bioRxiv | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/852053 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuri Atsumi, Noriyuki Sugo, Ryohei Iwata, Pierre Vanderhaeghen, Nobuhiko Yamamoto |
| 2. 発表標題 Single-molecule imaging of CREB transcriptionfactor in human cortical-like neurons |
| 3. 学会等名 IBRO 2019（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 菅生紀之 |
| 2. 発表標題 Genome Stability by DNA polymerase β in Cortical Development |
| 3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 シンポジウム「大脳皮質の形成と機能発現を担う遺伝子制御システムの新展開」（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Akiko Uyeda, Kohei Onishi, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto and Noriyuki Sugo |
| 2. 発表標題 Maintenance of genome stability by DNA polymerase in necessary for postnatal development in cortical and hippocampal neurons |
| 3. 学会等名 第41回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Akiko Uyeda, Kohei Onishi, Teruyoshi Hirayama, Satoko Hattori, Tsuyoshi Miyakawa, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto and Noriyuki Sugo |
| 2. 発表標題 DNA polymerase is required for postnatal hippocampal development and function |
| 3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia meeting on Latest Advance in Development & Function of Neuronal Circuit (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Akiko Uyeda, Kohei Onishi, Teruyoshi Hirayama, Satoko Hattori, Tsuyoshi Miyakawa, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto and Noriyuki Sugo |
| 2. 発表標題 Involvement of Pol in postnatal neuronal development and function via active DNA demethylation |
| 3. 学会等名 国立遺伝学研究所研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 菅生紀之 |
| 2. 発表標題 神経活動依存的な転写因子動態の1分子蛍光イメージング解析 |
| 3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会シンポジウム「クラップ&ビルド・システムによる神経制御」(仙台)(招待講演) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Noriyuki Sugo, Kohei Onishi, Akiko Uyeda, Mistuhiro Shida, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto |
| 2. 発表標題 Genome stability by DNA polymerase is Critical for Neuronal Differentiation in Cortical Development |
| 3. 学会等名 Gene regulatory mechanisms in neural fate decisions (San Juan de Alicante, Spain) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 菅生紀之、大西公平、植田堯子、至田充宏、平山晃斉、八木健、山本亘彦 |
| 2. 発表標題 大脳皮質神経細胞分化におけるDNAポリメラーゼ によるゲノム恒常性維持 |
| 3. 学会等名 第39回神経組織培養研究会(名古屋) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 植田堯子、菅生紀之、大西公平、平山晃斉、八木健、山本亘彦 |
| 2. 発表標題 生後発達期の脳皮質ニューロンにおけるDNAポリメラーゼ の役割 |
| 3. 学会等名 第40回日本神経科学大会(舞浜) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 恒松大翔、菅生紀之、黒沢綾、足立典隆、山本亘彦 |
| 2. 発表標題 iPS細胞を利用したヒト神経発生過程におけるDNAポリメラーゼ の機能解析 |
| 3. 学会等名 第40回日本神経科学大会(舞浜) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Akiko Uyeda, Noriyuki Sugo, Kohei Onishi, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi1 and Nobuhiko Yamamoto |
| 2. 発表標題 DNA polymerase is required for active DNA demethylation in postnatal development of cortical neurons |
| 3. 学会等名 第48回 生理研国際シンポジウム(岡崎)(国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Akiko Uyeda, Noriyuki Sugo, Kohei Onishi, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi1 and Nobuhiko Yamamoto |
| 2. 発表標題 DNA polymerase is involved in active DNA demethylation during postnatal development of cortical neurons |
| 3. 学会等名 遺伝研研究会：哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム(三島) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 渥美友梨, 菅生紀之, 岩田亮平, Pierre Vanderhaeghen, 山本亘彦 |
| 2. 発表標題 ヒト由来大脳皮質神経細胞における転写調節因子CREBの共因子CBPを介した神経活動依存的な動態変化 (Activity-dependent dynamics of the transcription factor CREB via cofactor CBP in human cortical-like neurons) |
| 3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 渥美友梨, 菅生紀之, 岩田亮平, Pierre Vanderhaeghen, 山本亘彦 |
| 2. 発表標題 ヒト由来大脳皮質神経細胞における転写調節因子CREBと共因子CBPの神経活動依存的な動態 (Activity-dependent dynamics of the transcription factor CREB via cofactor CBP in human cortical-like neurons) |
| 3. 学会等名 第43回神経組織培養研究会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 渥美友梨, 菅生紀之, 岩田亮平, Pierre Vanderhaeghen, 山本亘彦 |
| 2. 発表標題 ヒト由来大脳皮質神経細胞において共因子を伴ったCREBの動態変化が神経活動依存的に転写を促進する |
| 3. 学会等名 第15回神経発生討論会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 千葉清歌, 増田光起, 恒松大翔, 黒沢綾, 足立典隆, 山本亘彦, 八木健, 菅生紀之 |
| 2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来大脳オルガノイドにおいてDNAポリメラーゼ 欠損は神経前駆細胞にDNA2本鎖切断を引き起こす |
| 3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Kitagawa H., Sugo N., Yamamoto N | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 Humana, New York, NY | 5. 総ページ数 20 |
| 3. 書名 Live-Cell Single-Molecule Imaging with Optogenetics Reveals Dynamics of a Neuronal Activity-Dependent Transcription Factor. In: Yamamoto N., Okada Y. (eds) Single Molecule Microscopy in Neurobiology. Neuromethods, vol 154 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>大阪大学大学院生命機能研究科 http://www.fbs.osaka-u.ac.jp</p> <p>生後の「脳」の発達にDNA修復システムが不可欠だった https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2020/20201105_2</p> <p>脳の発生におけるゲノム安定維持の仕組みを解明 https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2017/20170821_1</p> |
|--|

6. 研究組織

| | | | |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|