

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02723

研究課題名(和文)変性神経細胞におけるダイナミックなクロマチン構造変化の同定

研究課題名(英文)Analysis of chromatin structure in degenerating neurons

研究代表者

山中 智行(Yamanaka, Tomoyuki)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：00381575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ハンチントン病で起こる遺伝子発現異常について、障害神経細胞に着目した詳細な解析をおこなった。まず、ハンチントン病で障害される転写因子NF-Yについて、これをマウス脳内でノックダウンし、FACSによりこれら細胞を回収しRNA-seq解析を行った。その結果、NF-Y阻害は小胞体関連遺伝子を優先的に発現抑制することを見出した(Sci Rep. 2020)。また、ハンチントン病モデルマウスから、線条体の有棘神経細胞のみをFACSで回収しDNA microarray解析を行い、この神経細胞特異的なトランスクリプトーム変化を同定し共著で発表した(J Biol Chem. 2020)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハンチントン病のモデル脳等を使った遺伝子発現解析は多数報告されているが、これらが実際に変性神経細胞の中での変化なのか、グリアなど周りの細胞の応答反応をみているのか、その判断は難しい。本研究では、変性過程にある細胞のみをFACSで回収し網羅的に遺伝子発現解析を行うことにより、ハンチントン病で障害される新たなトランスクリプトームを同定することに成功した。一方、ヒストン修飾に大きな差は見られておらず、これ以外のクロマチン構造変化が関わっていると考えられ、現在も解析を進めている。このメカニズムの制御はより広範の遺伝子発現を正常化できると期待されその同定が急がれる。

研究成果の概要(英文)：We performed detail analyses of the transcriptional dysregulation focusing on the neurons affected in Huntington's disease. First, we knocked down NF-Y, a transcription factor shown to be affected in Huntington's disease, in mouse brain, and then collected the knockdown cells by FACS and subjected them to RNA-seq analysis. We found a neuron-specific ER transcriptome affected by NF-Y dysfunction in brain neurons (Yamanaka et al. Sci Rep. 2020). We also collected striatal medium spiny neurons, the most vulnerable neurons in Huntington's disease, by FACS from mouse disease model, and performed RNA-seq analysis. We identified novel transcriptome dysregulated before the neurodegeneration (Miyazaki, Yamanaka et al. J Biol Chem. 2020).

研究分野：分子神経病態学

キーワード：ハンチントン病 トランスクリプトーム クロマチン 転写因子

1. 研究開始当初の背景

ハンチントン病では、伸長ポリグルタミン鎖を持つ変異タンパク質(変異ハンチンチン)が産生され、これが重合・凝集し核内封入体を形成する。これまでに、疾患モデルマウス脳や患者脳を用いた解析から、非常に多くの遺伝子(～5000 遺伝子)が発現変化することが見出されており、“遺伝子発現異常”が病態進行に深く関わっていることが示唆されている。一方、我々を含めた研究グループから、NF-Yなどいくつかの転写調節因子がハンチンチン封入体に取り込まれ、活性阻害されることが報告され(Yamanaka T et al. EMBO J 2008, Hum Mol Genet 2010, PLoS ONE 2014, Seredenina T et al. Neurobio Dis 2012 etc)、さらに我々は、NF-Yの機能阻害のみでユビキチン陽性の神経変性病態を引き起こすことも明らかとした(Yamanaka T et al. Nat Commun 2014, Sci Rep 2016)。これらの結果は遺伝子発現異常による神経変性機構を一部説明するものであるが、これまで同定された～20 個の転写調節因子では多大な遺伝子発現変化は説明できていない。この理由として、1つは神経細胞以外のグリア細胞などの変化も一緒にとらえてしまっている可能性、もう1つはそれぞれの転写因子の阻害以外にもダイナミックなクロマチン構造変化を伴う核内変化が起きている可能性も考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、FACSにより変性過程の神経細胞を選択的に回収し、RNA-seq, DNA microarrayやChIP-seq解析を行うことで、ハンチントン病の神経細胞変性に直接的に関わる核内変化の同定を試みた。

3. 研究の方法

まず、変異ハンチンチンの直接のターゲットである転写因子NF-Yに焦点を当て、そのマウス脳神経細胞でのノックダウンをAAVベクターで行った。EGFPの蛍光をもとにノックダウン神経細胞をFACSにより回収し、RNA-seq解析を行い、遺伝子発現変化を検討した。

一方、ハンチントン病で選択的に変性する線条体のmedium spiny neuron (MSN)に着目し、この細胞特異的にEGFPを発現するトランスジェニックマウスを作製した。これとハンチントン病モデルマウス(R6/2)とを交配し、発症前のマウス脳よりFACSによりMSNを回収しDNA microarray解析を行った。なおハンチントン病モデルマウス(R6/2)は共同研究者の貫名教授より供与頂いた。

また、ハンチントン病モデルマウス(R6/2)の脳皮質より細胞核を抽出し、NeuNを蛍光ラベルしFACSを行うことで神経細胞核のみを回収した。これを用いてH3K4me3など遺伝子発現に関わるヒストン修飾の変化をChIP-seq解析により検討した。なおFACSによる神経細胞核単離は東京大学の岩田先生、間野先生に共同研究のもと行っていただいた。

4. 研究成果

まず、NF-Yノックダウン脳神経細胞のRNA-seq解析により、神経細胞では特異的な遺伝子セット、特に小胞体関連遺伝子が多く発現変化していることを見出した(図1; Yamanaka T et al. Sci Rep. 2020)。これらは、他の増殖・分裂細胞でのNF-Yノックダウンの結果とは異なっており、増殖しない神経細胞では、NF-Yの機能が増殖制御から小胞体制御にシフトすることを示唆している。このメカニズムとして、NF-YAサブユニットのスプライシングが神経細胞では異なっており、これが特異的な遺伝子発現制御に関わっていると考えている。これら小胞体遺伝子の発現変化はハンチントン病モデルマウス脳でも一部確認されつつあり、神経変性に関わりうる新たなパスウェイの存在が示唆された。

次に、ハンチントン病モデルでのMSN特異的な遺伝子発現解析について、これまでの脳全体を用いた解析からは見つかったこなかった遺伝子が多数検出された(図2; Miyazaki H, Yamanaka T et al. J Biol Chem. 2020)。詳細な解析から、MSN特異的な遺伝子というより、脳全体に普遍的に発現している遺伝子が多く見られ、これによりMSNでの変化が薄まりこれまで検出されなかったと考えられた。遺伝子発現制御やDNAダメージに関わる遺伝子も複数同定され、これら遺伝子が治療標的にもなりうるということが示唆された。

最後にクロマチン構造変化について、H3K4me3でのChIP-seqでプロモーター領域が濃縮されてきたが、ハンチントン病で発現低下する遺伝子に着目しても、R6/2とコントロールマウスとの間で大きな差は検出されず、少なくともヒストン修飾は発現変化に大きく関わっていないことが示唆された(未発表データ)。現在、クロマチンの3次元構造に関わるCTCFなど、また変異ハンチンチン自体でもChIP-seqを試みており、よりマクロでのクロマチン構造変化の同定を検討

している。

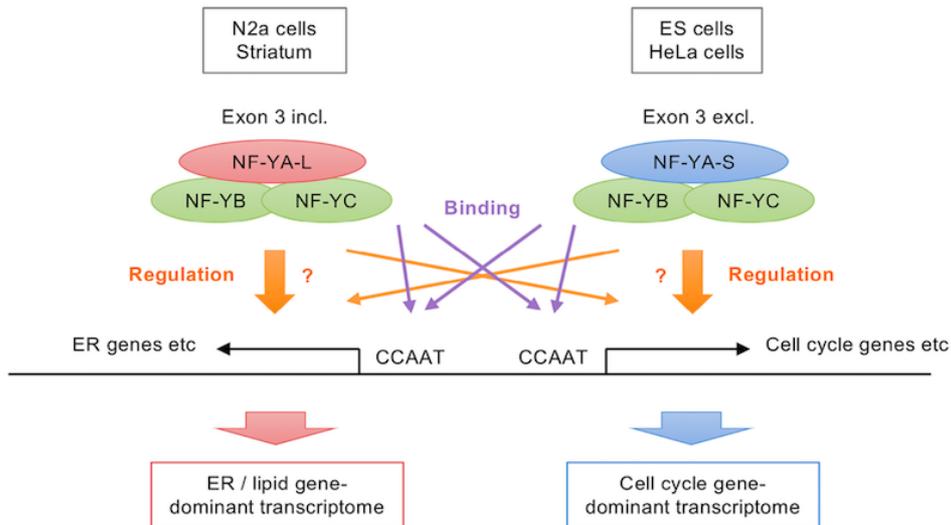


図1 NF-Yによる神経細胞特異的なトランスクリプトーム制御 (Yamanaka T et al. Sci Rep. 2020 より抜粋)

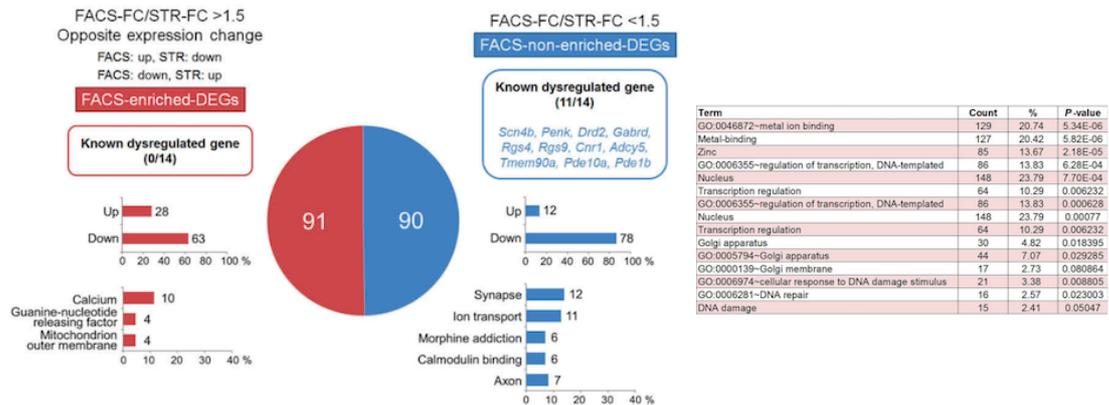


図2 FACS-arrayによるMSN特異的な発現変化遺伝子の同定 (左) とGO解析 (右) (Miyazaki H, Yamanaka T et al. J Biol Chem. 2020 より抜粋)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Yamanaka Tomoyuki, Nishiyama Risa, Shimogori Tomomi, Nukina Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Proteomics-Based Approach Identifies Altered ER Domain Properties by ALS-Linked VAPB Mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64517-z	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Miyazaki Haruko, Yamanaka Tomoyuki, Oyama Fumitaka, Kino Yoshihiro, Kurosawa Masaru, Yamada-Kurosawa Mizuki, Yamano Risa, Shimogori Tomomi, Hattori Nobutaka, Nukina Nobuyuki	4. 巻 295
2. 論文標題 FACS-array based cell purification yields a specific transcriptome of striatal medium spiny neurons in a murine Huntington disease model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 9768 ~ 9785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.012983	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Yamanaka Tomoyuki, Miyazaki Haruko, Tosaki Asako, Maity Sankar N., Shimogori Tomomi, Hattori Nobutaka, Nukina Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Gene expression profiling in neuronal cells identifies a different type of transcriptome modulated by NF- κ B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-78682-8	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Kasahara Junya, Imamura Yukio, Hiyama Akiko, Yamanaka Tomoyuki, Miyazaki Haruko, Nukina Nobuyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Proteomic analysis of subcellular compartments containing disseminated alpha-synuclein seeds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 30494-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2020.11.009	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 Yamanaka Tomoyuki, Nishiyama Risa, Shimogori Tomomi, Nukina Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Proteomics-Based Approach Identifies Altered ER Domain Properties by ALS-Linked VAPB Mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64517-z	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yoshinaga Saki, Yamanaka Tomoyuki, Miyazaki Haruko, Okuzumi Ayami, Hiyama Akiko, Murayama Shigeo, Nukina Nobuyuki	4. 巻 522
2. 論文標題 Preserved proteinase K-resistant core after amplification of alpha-synuclein aggregates: Implication to disease-related structural study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 655 ~ 661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.11.142	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 Tanaka Goki, Yamanaka Tomoyuki, Furukawa Yoshiaki, Kajimura Naoko, Mitsuoka Kaoru, Nukina Nobuyuki	4. 巻 19
2. 論文標題 Sequence- and seed-structure-dependent polymorphic fibrils of alpha-synuclein	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 30065-1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2019.02.013	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 Tanaka Goki, Yamanaka Tomoyuki, Furukawa Yoshiaki, Kajimura Naoko, Mitsuoka Kaoru, Nukina Nobuyuki	4. 巻 508
2. 論文標題 Biochemical and morphological classification of disease-associated alpha-synuclein mutants aggregates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 729 ~ 734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.11.200	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 Park Hongsun, Miyazaki Haruko, Yamanaka Tomoyuki, Nukina Nobuyuki	4. 巻 18
2. 論文標題 Non-coding RNA Neat1 and Abhd11os expressions are dysregulated in medium spiny neurons of Huntington disease model mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 30551-0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2018.10.013	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 Okuzumi Ayami, Kurosawa Masaru, Hatano Taku, Takanashi Masashi, Nojiri Shuuko, Fukuhara Takeshi, Yamanaka Tomoyuki, Miyazaki Haruko, Yoshinaga Saki, Furukawa Yoshiaki, Shimogori Tomomi, Hattori Nobutaka, Nukina Nobuyuki	4. 巻 6
2. 論文標題 Rapid dissemination of alpha-synuclein seeds through neural circuits in an in-vivo prion-like seeding experiment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-018-0587-0	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Yamanaka Tomoyuki, Nukina Nobuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 ER Dynamics and Derangement in Neurological Diseases	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2018.00091	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Borgese Nica, Navone Francesca, Nukina Nobuyuki, Yamanaka Tomoyuki	4. 巻 4
2. 論文標題 Mutant VAPB: Culprit or Innocent Bystander of Amyotrophic Lateral Sclerosis?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Contact	6. 最初と最後の頁 1177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/25152564211022515	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山中智行、檜山晃子、松井秀彰、貫名信行
2. 発表標題 シヌクレインの変異タンパク質ライブラリを用いた凝集制御部位の検索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoyuki Yamanaka, Hideaki Matsui
2. 発表標題 Analysis of the molecular mechanism underlying a-synuclein propagation using fish disease models.
3. 学会等名 第12回 生理研-脳研-ヒト進化研究センター合同シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山中智行、西山里瑛、下郡智美、貫名信行
2. 発表標題 オルガネラ係留タンパク質VAPBのALS変異による小胞体プロテオーム変化
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中智行、西山里瑛、下郡智美、貫名信行
2. 発表標題 Identification of ER sheet/tubule-specific proteomes and its alteration by ALS-linked VAPB mutation
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中智行
2. 発表標題 ALS関連遺伝子による小胞体病態とプロテオミクス
3. 学会等名 2019年度同志社大学ハリス理化学研究所研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中智行、下郡智美、貴名信行
2. 発表標題 神経の発生と変性を異なるメカニズムで制御する普遍的転写因子
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamanaka T, Nishiyama R, Nukina N
2. 発表標題 Immuno-isolation of different ER membrane domains from cultured cells
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamanaka T, Nukina N
2. 発表標題 Biochemical characterization of pathological ER domain isolated from cultured cells
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamanaka T
2. 発表標題 A transcriptional factor involved in neurogenesis and degeneration
3. 学会等名 Burke Neurological Institute Special Seminar (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

新潟大学脳研究所脳病態解析分野 https://www.bri.niigata-u.ac.jp/field/neuroscience/matsui/index.html
--

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
研究分担者	貫名 信行 (Nukina Nobuyuki) (10134595)	同志社大学・脳科学研究科・教授 (34310)	
研究分担者	岩田 淳 (Iwata Atsushi) (40401038)	地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員 (82674)	
研究分担者	下郡 智美 (Shimogori Tomomi) (30391981)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・チームリーダー (82401)	追加：2020年9月25日

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
---------	---------