

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300123

研究課題名（和文） ニューロン活動依存的転写応答の差異に関する
クロマチンダイナミクス変動解析研究課題名（英文） Chromatin dynamics in regulation of activity-dependent
transcription in neurons.

研究代表者： 中島 欽一（NAKASHIMA KINICHI）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：80302892

研究成果の概要（和文）：ニューロンが興奮した際に素早く応答し発現が誘導される遺伝子群と遅れて誘導される遺伝子群のクロマチン修飾の差異、ならびにそこに関与するクロマチン分子のダイナミクスを解析した。クロマチン修飾、RNAポリメラーゼ II の結合、転写抑制因子の結合などが、両群で異なっており神経活動依存性転写の時間的制御に関与していることを解明した。

研究成果の概要（英文）：We have identified two different types of genes induced in a neuronal activity-dependent manner; one is immediately expressed while the other expressed lately. We examined differences in chromatin modifications in two groups of genes and analyzed dynamic behavior of chromatin related proteins which are assumedly involved in activity-dependent transcription. We found that chromatin modifications, recruitment of RNA polymerase II and the negative elongation factor are different between the two groups. These results demonstrate molecular basis for temporal regulation of activity-dependent genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：ニューロン、クロマチン、転写

1. 研究開始当初の背景

（1）神経系は、外界からの刺激に応じて応答性を変化させる、すなわち可塑性を有することが大きな特徴のひとつであるが、その可塑性を担保する機構には遺伝子発現制御が関与している。例えば、ニューロンにおいて

興奮刺激により発現誘導される c-fos は記憶増強に関与していることが示されている（Guzowski *Hippocampus* 2002）。このような遺伝子発現制御には、CREB などの特異的転写因子の活性化に加えて、標的遺伝子のエピジェネティック修飾変化の重要性が示唆され

ている。エピジェネティクス修飾の中でもクロマチンの主要構成因子であるコアヒストンのN末端(ヒストンテイル)の修飾は、アセチル化、メチル化、リン酸化、リボシル化、ユビキチン化など多岐にわたり、これらの修飾の複数の組み合わせ(ヒストンコード)とそれを読み解く機構により、転写、複製、修復など多様な生命現象の制御に関与している可能性が指摘されている(Ruthenburg et al. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007)。また、これらコアヒストンに結合しクロマチン凝縮に関与しているリンカーヒストン H1 や heterochromatin-protein 1(HP1)の動態は、その機能から想像される以上に動的であり細胞種やクロマチンの状態によって変化することで転写制御に関与している(Misteli *Science* 2001)。

(2) ニューロンやその機能を支持するグリア細胞は、共通の神経幹細胞から分化・産生される。我々はこれまでに神経幹細胞分化制御におけるエピジェネティクスの重要性を明らかにしてきた(*Dev Cell* 2001, *PNAS* 2004,)。近年ニューロンでも、様々な状況下でエピジェネティックな変化が生じ、個々のニューロンのみならず脳の高次機能に影響を及ぼすことが報告され始めている。ニューロンで最もダイナミックに変化するヒストン修飾のひとつにヒストンH3のpS10があげられる(Sng et al. *Eur J Neurosci* 2006)。pS10は、興奮刺激により一過性の上昇を示し転写活性化に関与していると考えられている。しかし、その分子機構の詳細は明らかとなっていない。一方、分裂中の細胞では、pS10はM期に上昇することが知られている。特にTriMeK9を有するヒストンH3へのAuroraBキナーゼによるpS10付加(TriMeK9/pS10修飾)は、TriMeK9を認識しクロマチンに結合しヘテロクロマチン化(転写抑制的に作用)に寄与するHP1のクロマチン遊離を誘導し、M期の進行に必須である(Hirota et al *Nature* 2005)。

(3) 我々は、これまでの予備実験によって、このTriMeK9/pS10同時修飾が細胞分裂を終えた海馬成熟ニューロンにおいてNMDA受容体刺激依存的に核内全体で上昇することを免疫染色およびウエスタンブロット解析に

て見いだした。またこの刺激により転写誘導されるBdnfのプロモーター領域では刺激前には転写抑制性ヒストン修飾TriMeK9がみられ、刺激後にはTriMeK9/pS10へと変化していた。これらのことから、抑制的ヒストン修飾TriMeK9を有する遺伝子の転写では、特異的転写因子結合およびTriMeK9/pS10によるHP1のクロマチンからの解離によるヘテロクロマチン化の解除が必要である可能性が推察された。また、染色上TriMeK9/pS10は核内全体での増加が認められるためHP1は広範囲にわたりクロマチンから解離し、その結果としてダイナミクスが変化していると予想される。このような独自の予備の実験結果や考察を基に、我々がこれまで習得したエピジェネティクスに関する技術・成果・アイデア・材料等を有機的に融合させることで、この修飾が脳神経系高次機能を担う遺伝子制御における役割を解明することができると考え本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究計画では、主にマウス海馬由来ニューロンの培養系を用いて以下の点を明らかにすることを目的として研究を開始した。

1) TriMeK9/pS10修飾を受ける遺伝子の探索、2) 同修飾を伴わずに転写される遺伝子との発現制御の相違点の解明、3) 生細胞でのHP1ダイナミクス検討、4) HP1ダイナミクスがTriMeK9/pS10修飾を有する遺伝子の発現に及ぼす影響の解明。

しかし本研究計画開始後、神経活動依存性遺伝子には、素早く発現する遺伝子とゆっくりと発現する遺伝子の2つの群があることを発見した。そこで、本研究はこの2つの群のクロマチン修飾の差を明らかにすることで、神経活動依存性遺伝子発現の時間的制御機構の分子基盤を明らかにする目的で展開された。

3. 研究の方法

(1) 胎生17.5日のICRマウスから海馬を調製し使用した。すなわち、マウス胎仔脳から切り出した海馬を細切した後パパイニンにて処理した後に、細胞密度 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ で予めpoly-L-lysineにてコートした培養皿にて、

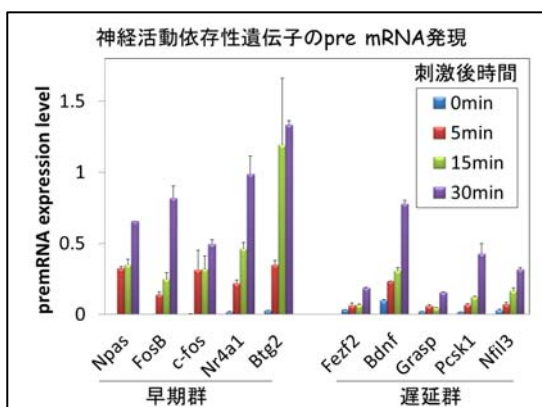
10 日間以上培養した。培養液は、Neurobasal に B27 添加液を 50 分の 1 となるように加えたものを使用した。

(2) 10 日間以上培養した後、Bading らの方法 (*Nat Neurosci* 2007) に従い GABA_A 受容体拮抗薬である bicuculline と弱いカリウムチャンネル拮抗薬である 4-aminopyridine (4-AP) を培地中に添加することによりシナプスに存在するグルタミン酸受容体を内在性のグルタミン酸にて刺激する手法を用いて、ニューロンに神経活動を誘導した。

(3) 神経活動誘導前後のニューロンを用いて、RT-PCR 法にて神経活動依存性遺伝子の pre mRNA 発現を検討するとともに、クロマチン免疫沈降法にて神経活動依存性遺伝子のヒストン修飾、RNA ポリメラーゼの有無、CREB 結合の有無等を検討した。

4. 研究成果

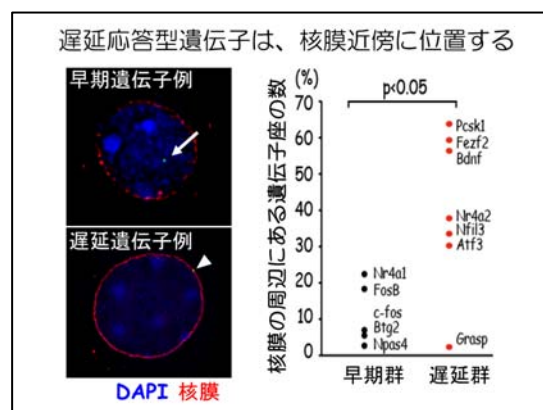
(1) 神経活動依存性に転写される遺伝子群のマイクロアレイを用いた網羅的解析にて、神経活動依存性遺伝子は 30 分後には 1.5 倍以上発現が上昇する早期群と 180 分後に初めて上昇する遅延群に分けられることが分かった。これらの遺伝子の pre mRNA の発現を、RT-PCR にて解析すると早期群の遺伝子は、刺激前には転写が強く抑制され得ているものの、刺激後 5 分には転写量が急激に増加していることがわかった。一方、遅延群の遺伝子は、刺激前の発現量が早期群より若干高く、刺激にて徐々に増加することがわかった。



(2) 次に、早期群と遅延群のクロマチン修飾の差異についてクロマチン免疫沈降法にて検討した。遅延群の遺伝子は転写抑制に関与しているヒストン H3 の 9 番目リジンのジ

メチル化修飾 (H3K9me2) および 27 番目リジンのトリメチル化修飾 (H3K27me3) が高いことが分かった。一方、早期群の遺伝子の転写開始点近傍には、神経活動による転写誘導前より RNA ポリメラーゼ II (PolII) が結合しており、転写伸長せずに停止していた。この転写の伸長停止は、negative elongation factor (NELF) という因子に依存していることを明らかにした。すなわち、早期群の遺伝子では予め結合した PolII が、神経興奮により一斉に伸長することで、素早く RNA を合成できるようになっていることが示唆された。

(3) さらに、これら早期遺伝子群と遅延遺伝子群の、細胞核内での遺伝子座の配置の違いについて DNA fluorescence *in situ* hybridization (FISH) にて検討した。早期群に比べ、遅延群の遺伝子座は、通常は転写が抑制されているとされる核膜近傍に高頻度に配置していることが分かった。これら遅延遺伝子の Pre mRNA に対する RNA FISH を施行したところ、興味深いことに、核膜近傍に存在している遅延群の遺伝子座も、核膜から離れている遺伝子座同様に、転写されることが分かった。



(4) これらの結果から、ニューロンにて神経活動依存性に発現される遺伝子の発現応答の時間と遺伝子座の核内空間配置に関連があることが分かった。

(5) これらの結果は、2009 年、2010 年の分子生物学会、2011 年の日本トキシコロジー学会等で発表し、神経系細胞における新たな知見として大きな反響を得た。

(6) 本研究の過程で、神経活動依存性に転写される遺伝子群の中に、コアヒストンをコ

ードする遺伝子があることを見出した。この知見をもとに、神経が興奮することでクロマチンの主要構成成分のコアヒストンの入れ替わりが起こっているか、起こっているとすれば、早期群と遅延群で入れ替わりに差があるかどうか、差があるとすればそれは遺伝子座の核内での配置と関連があるかどうか、またその生理学的意義は何か、などについて今後検討していきたいと考えている。

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2件)

1. Sailaja, BS., Takizawa, T., Meshorer, E. Chromatin immunoprecipitation in mouse hippocampal cells and tissues. *Methods Mol Biol.* 809, 353-64. 査読有 (2012)
2. Nagao, H., Ijiri, K., Hirotsu, M., Ishidou, Y., Yamamoto, T., Nagano, S., Takizawa, T., Nakashima, K., Komiyama, S. & Setoguchi, T. Role of GLI2 in the growth of human osteosarcoma. *J Pathol* 224, 169-179, 査読有 (2011).

[学会発表] (計25件)

1. 伊藤謙治、中島欽一、荒川浩一、滝沢琢己。神経幹細胞の性質変換に伴う遺伝子座の核内配置の変動。第58回北関東医学会総会。平成23年9月29日。前橋市
2. 滝沢琢己。Epigenetics 関連技術である細胞核構造解析とその毒性学的研究への適用の可能性。第38回日本トキシコロジー学会 学術年会。平成23年7月11日。横浜市。
3. 伊藤謙治、中島欽一、荒川浩一、滝沢琢己。神経幹細胞性質変換に伴う遺伝子座の核内配置の変動解析。第5回日本エピジェネティクス研究会年会。平成23年5月19日。熊本市
4. Takumi Takizawa. Identification and Spatio-temporal Regulation of Distinct Classes of Activity-dependent Genes in Post-mitotic Neurons. International

Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities. 2011年1月24日。兵庫県。

5. 裏山悟司、滝沢琢己、神山淳、中島欽一。Analysis of DNA methylation-independent regulatory mechanisms of astrocyte specific gene expression in embryonic stem cells (ESCs). BMB2010. 2010年12月7日。兵庫県。
6. 滝沢琢己。神経系細胞における遺伝子座核内配置。BMB2010. 2010年12月7日。兵庫県。
7. Takizawa, T., Takagi M., Itoh K., Nakashima K. Spatiotemporal regulation of activity dependent genes in post-mitotic neurons. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010. 2010年11月13日。San Diego.
8. Urayama S., Takizawa T., Hori Y., Kohyama J., Nakashima K. Analysis of DNA methylation independent regulatory mechanisms of astrocyte specific gene expression in embryonic stem cells. 40th Annual Meeting NEUROSCIENCE2010. 2010年11月13日。San Diego.
9. 佐野坂司、波平昌一、滝沢琢己、中島欽一。Meningeal Cells Induce Astrocyte Differentiation of Neural Stem Cells. The 29th NAITO CONFERENCE ON GLIA WORLD. 2010年10月5日。神奈川県。
10. 佐野坂司、波平昌一、滝沢琢己、中島欽一。アストロサイト分化誘導性サイトカイン発現細胞の同定。Neuro2010. 2010年9月2日。兵庫県。
11. 滝沢琢己、高木美智、笹岡寛敏、伊藤謙治、中島欽一。神経活動依存性遺伝子発現の時空間制御。Neuro2010. 2010年9月2日。兵庫県。
12. 裏山悟司、滝沢琢己、堀由貴奈、神山淳、中島欽一。胚性幹細胞におけるGFAP遺伝子の発現制御機構の解析。日本分子生物学会 第10回春季シンポジウム。2010年6月8日。宮城県。
13. Takagi M., Sasaoka H., Itoh K., Kimura

- H., Nakashima K., Takizawa T.. Spatiotemporal regulation of activity dependent gene expression in post-mitotic neurons. The 75th Cold Spring Harbor Symposium. 2010年6月2日. New York.
14. 高木美智, 滝沢琢己, 笹岡寛敏, 中島欽一. ニューロン活動依存的に発現する遺伝子の核内空間配置解析. 第32回日本分子生物学会年会. 2009年12月9日. 横浜市.
 15. 笹岡寛敏, 滝沢琢己, 木村宏, 中島欽一. Analysis of chromatin modifications and transcriptional regulations of activity-dependent genes in post-mitotic neurons. 第32回日本分子生物学会年会. 2009年12月9日. 横浜市.
 16. 佐野坂司, 犬伏浩規, 神山淳, 滝沢琢己, 中島欽一. A source of astrocyte-inducing cytokines in the developing mouse brain. 第32回日本分子生物学会年会. 2009年12月9日. 横浜市.
 17. 裏山悟司, 滝沢琢己, 堀由貴奈, 神山淳, 中島欽一. Analysis of DNA methylation-independent regulatory mechanisms of astrocyte specific gene expression. 第32回日本分子生物学会年会. 2009年12月9日. 横浜市.
 18. Takizawa T., Sasaoka H, Takagi M, Kimura H, Nakashima K. The spatio-temporal regulation of activity-dependent genes in post-mitotic neurons. The 4th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest. 2009年11月29日. 沖縄.
 19. 笹岡寛敏, 滝沢琢己, 木村宏, 中島欽一. ニューロンでの遺伝子発現におけるエピジェネティック修飾の解析. 第82回日本生化学会大会. 2009年10月23日. 神戸市
 20. 高木美智, 笹岡寛敏, 滝沢琢己, 中島欽一. ニューロン活動依存的に発現する遺伝子の核内空間配置解析. 第82回日本生化学会大会. 2009年10月23日. 神戸市
 21. Takizawa T., Taga T, Misteli T, Nakashima K. DYNAMIC CHANGES IN DNA METHYLATION AND SPATIAL POSITIONING OF AN ASTROCYTE SPECIFIC GENE, GFAP DURING ASTROCYTE DIFFERENTIATION. ISSCR 7th Annual Meeting. 2009年7月8日. Barcelona, Spain.
 22. Takizawa T., Nakashima K., Gudla RP, Lockett S, Misteli T. Allele-specific nuclear positioning of the monoallelically expressed astrocyte marker GFAP. 第24回内藤コンファレンス. 2009年6月23日. 札幌市.
 23. 滝沢琢己. アストロサイト特異的遺伝子 GFAP 発現制御に関する DNA メチル化と遺伝子座核内配置. 第52回日本神経化学会大会. 2009年6月22日. 渋川市.
 24. 笹岡寛敏, 滝沢琢己, 中島欽一. ニューロンでの遺伝子発現におけるエピジェネティック修飾の解析. 第3回日本エピジェネティクス研究会年会. 2009年5月22日. 東京都.
 25. 滝沢琢己, Tom Misteli, 中島欽一. アストロサイト特異的遺伝子 GFAP の核内配置と転写活性. 第3回日本エピジェネティクス研究会年会. 2009年5月22日. 東京都.
- 〔図書〕 (計3件)
1. 滝沢琢己, 高木美智, 笹岡寛敏. (2010) “ゲノムDNAの核内配置と遺伝子発現制御” 生化学 Vol.82 (2), 143-149.
 2. 滝沢琢己, 中島欽一. (2009) “神経系細胞における核内機能ドメイン配置” 実験医学 10月増刊号 Vol. 27(17), 146-152.
 3. 滝沢琢己. (2009) “神経系におけるゲノム核内配置” Clinical Neuroscience Vol.26 (8), 848-9

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島欽一 (NAKASHIMA KINICHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエ
ンス研究科・教授

研究者番号：80302892

(2) 研究分担者

滝沢琢己 (TAKIZAWA TAKUMI)

群馬大学大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30531115