

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25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22241048

研究課題名（和文） 特定神経細胞特異的プロモーターの大規模スクリーニングとそれを用いた脳高次機能解析

研究課題名（英文） Large-scale screening of specific promoters for target neuronal cells and its application to high-order functional analysis in brain

研究代表者

鈴木 治和 (SUZUKI HARUKAZU)

独立行政法人理化学研究所・LSA 要素技術開発グループ・プロジェクトディレクター

研究者番号：80333293

研究成果の概要（和文）：

革新的技術である定量 deepCAGE 法による特異的プロモーターを精度高く同定する技術と、トランスジェニックマウスを用いた回路遺伝学の技術連携で、「脳における任意の神経細胞機能をノックダウンする基盤技術パイプライン」を構築することに成功した。パイプラインで同定した特異的プロモーターを用いた Cre トランスジェニックマウスは標的領域特異的な組み換えを示しており、標的脳3領域の機能解析に有用であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

We have succeeded to develop a technology pipeline to specifically knockdown neuronal cells in any desirable brain regions, which are constructed by integration of the quantitative deepCAGE, the revolutionary technology to identify specific promoters with high accuracy, and the circuit genomics technologies using transgenic mice. Cre transgenic mice, using specific promoters identified by the pipeline, already showed specific recombination in the target regions, indicating usefulness of the mice for the functional analysis of the target brain regions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2011年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2012年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
総計	29,600,000	8,880,000	38,480,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：トランスクリプトーム、プロモーター、視床、トランスジェニックマウス、回路遺伝学

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らの所属する理研オミックス

基盤領域(OSC)では、世界におけるトランスクリプトーム研究をリードしてきた。国際科

学コンソーシアム FANTOM を組織し、マウス完全長 cDNA の機能注釈 (FANTOM1-3)、哺乳動物での多種類のタンパク非コード転写物 (non-coding RNA) の発見 (RNA 大陸の発見、FANTOM3)、独創的な手法である CAGE 法 (キャップのついた転写物の 5' 末端を、ゲノムワイドにシーケンス解析する手法) の開発と、それを用いた哺乳動物の転写開始点およびプロモーター解析 (FANTOM3)、を成し遂げてきた。FANTOM4 では CAGE 技術を次世代シーケンサーに応用した deepCAGE 法を開発し、ヒト白血病由来の THP-1 細胞がフォルボールエステルにより単芽球様細胞から単球-マクロファージ様細胞へ分化する過程を、プロモーターレベルで転写制御ネットワーク解析した。すなわち、新たな概念に基づきプロモーター発現を汎用的な方程式で表現し、deepCAGE データを基にプロモーター上の転写因子結合モチーフ活性をコンピュータ解析するパイプラインを構築した。約 200 種類の転写因子結合モチーフの中で、分化過程を支配している 30 種類のモチーフを抽出し、それらの制御ネットワークを明らかにした。deepCAGE のプロモーター解析における有用性は、レトロトランスポゾン由来のリピートエレメントからの転写 (FANTOM4)、転写開始点とリンクする新たな小分子 RNA (tiRNA) の発見 (FANTOM4) においても示された。また、*Dlgap1* をはじめとするいくつかの遺伝子発現では、脳の各領域 (海馬、小脳、体性感覚野、視覚野) で異なった特異的プロモーター (alternative promoters) が使用されていることを見出した。

研究分担者らは、神経回路の経験依存的発達機構の研究、学習記憶および情動の発現機構の研究において、Cre リコンビナーゼやテトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (tTA synthetic transcription factor) を領域特異的に発現させたトランスジェニックマウスを使うことで、神経回路の動作原理の理解を進展させてきた。薬理学的手法や古典的な遺伝子ノックアウト技術では視床・皮質回路の形態的成熟の分子機構を明らかにすることが困難であったが、NMDA 受容体あるいはアデニールシクラーゼ遺伝子を脳皮質あるいは視床特異的にノックアウトし、神経

回路の成熟と可塑性に、これらを介したシグナル伝達が果たす役割を明らかにした。また、Cre/loxP と floxed DTA (Cre 依存的 DTA 発現技術) の 2 つの技術を組み合わせて、ジフテリア毒素を細胞種および時間特異的に発現させることにより、特定細胞を除去し、その細胞集団が脳高次機能で果たす役割を明らかにしている。RIKEN-MIT 利根川進らは、Cre/loxP と tTA/tetO の技術を組み合わせてトランスジェニックテタヌス毒素を領域および時間特異的に発現させることにより、誘導可能かつ可逆的に海馬の小領域で神経細胞の情報伝達の抑制に成功し、学習記憶の素過程の分離同定を可能とした。

これらの遺伝学的手法は、汎用性が高く、様々な脳の高次機能に関与する神経細胞 (神経核) の役割を解明するための革新的手法である。しかしながら、神経科学者が興味のある特定細胞あるいは特定領域における特異的プロモーターを自在に得ることは難しい。現在一般的に用いられているマイクロアレイや in situ ハイブリダイゼーションの技術・データでは困難であり、神経回路遺伝学におけるボトルネックとなっていた。

2. 研究の目的

特異的プロモーター同定の革新的技術である LSA と、研究分担者らで開発している回路遺伝学の技術連携で、「脳における任意の神経細胞機能をノックダウンする基盤技術 (パイプライン)」を構築するとともに、特異的神経集団の機能解析を行うことを目的とする。具体的な標的として、これまで回路レベルでの精密な検証がほとんど行われて来なかった、意識・注意・衝動性の制御機構の一端の解明に挑戦する。我々は、これらの制御に関わると考えられる神経回路で、特に 3 つの神経核に注目する。一つ目は視床網様核で、この領域の機能異常は癲癇や睡眠障害に関わることが示唆され、知覚情報を經由する背側視床核を抑制性支配することから、注意機構上の役割が示唆されている。二つ目は、不確帯 (zona incerta) と呼ばれる腹側視床核で、その機能はほとんどわかっていない。その背側視床の亜核への接続様式から、不確帯の抑制性ニューロンが注意や意識を支配

する可能性が示唆されるが、従来の生理学的手法では統一的な見解は得られていない。三つ目は手綱核である。研究分担者らは Cre/loxP と floxed DTA システムを用い、内側手綱核を選択的に破壊したマウスの作成に成功し、この神経核が衝動性の制御に極めて重要な役割を担う事を明らかにした。内外側手綱核および、その入出力領域の詳細な回路機能解析の重要性が指摘される。

上記した3つの標的領域(細胞)を単離し、LSA を用いて特異的なプロモーターを同定し、諸実験により確認する。また、下述するように既存データベースを用いた特異的なプロモーター同定も並行する。このようにして同定された特異的なプロモーターを、前述の Cre/loxP、tTA/tet0 やトランスジェニックテタヌス毒素あるいはジフテリア毒素の技術に適用し、視床網様核、不確帯、手綱核での領域特異的な神経伝達阻害により、意識・注意・衝動性の制御機構を調べる。これらの研究を通じて、脳における任意の神経細胞機能をノックダウンする基盤技術(パイプライン)の構築を達成し、その有用性を示す。

3. 研究の方法

解析パイプラインの構築のために2つのアプローチを実行した。第一プランは、ゲノムワイドに標的神経細胞に特異的なプロモーターを同定・確認し、そのプロモーターエレメントを単離して、Cre トランスジェニックマウスを作成する。しかし、細胞調製から特異的なプロモーターの単離、Cre トランスジェニックマウスの作製と機能解析までは長期間を要す。よって、プロモータースクリーニングの網羅性を多少犠牲にした第二プランとして、Allen Brain Atlas を使って候補遺伝子(RNA)をみつけ、その細胞特異的なプロモーターを5' RACE 等で確認することにより、Cre トランスジェニックマウス作製に早期に着手する。このことにより機能解析部分のパイプラインを作ることを第一プランと並行して行う。

第一プランは、三種類の神経核、すなわち、癩癩や睡眠障害に関わるとされる視床網様核、注意や意識を支配すると提唱されている不確帯、衝動性を強く支配する手綱核に注目

し、マウスの少量サンプルからでも正確なトランスクリプトームが得られる nanoCAGE 法を適用する。不確帯では抑制性ニューロンに注目するが、この領域は様々な種類の細胞が混在しているため、通常の解剖学的手法では抑制性ニューロンだけを抽出することは困難である。そこで、抑制性ニューロンに蛍光蛋白質が発現するトランスジェニックマウスを用いて、この領域から標的ニューロンのみを蛍光標識を頼りに選別して解析する(この目的で使用されるプロモーターは、この領域に局限すれば抑制性ニューロンでのみ働くことが保証されているが、不確帯の抑制性ニューロンのみをノックダウンする目的には使えない)。上記の三種の神経核と、その対照となる細胞をマイクロダイセクション法により切除し、それぞれの細胞群から RNA を抽出する。細胞分取には、蛍光フローサイトメトリー法も併用する。得られた RNA を用いて CAGE ライブラリーを作成し、次世代シーケンサーにより、ゲノムワイドにプロモーター活性を測定する。対照細胞群との比較により、目的とする神経細胞に特異的なプロモーター活性の同定を行なう。ついで、この活性が目的とする神経細胞に特異的であるかどうかを検証するため、特異的なプロモーターの直下流のゲノム配列をプローブとして用い、in situ での発現解析を行なう。また、種々の組織や細胞から取得した、現有する全ての CAGE 情報との比較解析も実行する。これらの解析により、目的とする神経細胞にのみ発現する特異的なプロモーターであるかどうかの評価を行なう。評価で得られた真に標的神経細胞に特異的なプロモーターを用い、Cre トランスジェニックマウス作製を開始する。

第二プランは、標的領域で特異的に発現する有力なプロモーター候補遺伝子を Allen Brain Atlas を用いて少数個数選抜する。これらの細胞種特異的な転写開始点を正確に評価した上で、ベクターを構築し、Cre トランスジェニックマウスを作製する。殆どの候補遺伝子の場合、既存データを吟味する範囲では、必ずしも発現領域特異性が十分でない。これまでの研究では、とりわけ高い特異性の獲得に、トランスジーンのゲノム上の組み換

え場所の違いによる偶然の位置効果の助けを期待せざるを得なかった。転写開始点の事前解析は、ベクター設計の精度を著しく高めると期待され、ゲノムワイドプロモーター探索への理論的根拠を与える。具体的には、凍結脳切片から対象脳領域をレーザーマイクロダイセクションにより、可能な限り厳密に採取する。採取組織よりRNAを調製し、標的とする遺伝子特異的にcDNAを合成し、その5'端塩基配列を同定する(5' RACE法)。この塩基配列は、当該特定領域で発現するその遺伝子の転写産物(mRNA)の最も5'端のキャップサイト(転写開始点)を示唆するものである。同様の5' RACEをリファレンスとなる脳領域に適用することにより、同じ遺伝子が有する(不要な)第2の転写開始点を同定する。次に、同遺伝子を含むBACクローンをもちい、厳密に同定した第1と第2の転写開始点の間に、Cre遺伝子またはtTA遺伝子を挿入し、トランスジェニックマウスの作製に供する。ゲノム構造に応じて、不要な転写開始点を予め除去することも考えられる。作製されたCreまたはtTAトランスジェニックマウスを、LoxPまたはtetOトランスジェニックマウスと交配し、標的とする神経細胞においてコンディショナルに機能が欠落するマウス系統を作出し、表現型解析を行う。このように、第一および第二のプランが合わさることで、研究期間内に機能解析までが、ひとつのパイプラインとしてつながったシステムを構築する。

4. 研究成果

第1プランでは、まず標的脳領域周辺で当該領域のみが蛍光タンパク質でラベルされたトランスジェニックマウスを作成し、マイクロダイセクションと蛍光FACS分離法との併用で解析に必要な神経細胞試料の作製を試みた。種々の試みを行った結果、切片を乾燥させずに手でマイクロダイセクションにする手法がRNA劣化を最小限に抑えることがわかった。この場合、得られる微量RNAには劣化はほとんどないが、精製試薬の残留が認められた。そこで、試しに標的脳領域とその対照試料の各1サンプルについて、nano deepCAGE法での予備実験を試みたが、十分に

定量性のあるデータを得ることができなかった。RNAの精製度が問題であることが推測されたので、同じ領域から独立した3つの試料を独立に解析すること当面あきらめ、各領域からできる限り多くのRNAを合わせて(数百ng-数ug)、解析する戦略に変更した。すなわち、合わせたRNAを再精製した後に定量性の高いHeliscope CAGEによる解析を行った。その結果、視床網様核、不確帯をはじめ背側視床、室傍核、尾状核被殻において有意な発現があり、かつ、対照である大脳皮質および各標的間において特異性が高いCAGEタグ(プロモーター)をリストアップすることができた。これらプロモーターの中には既存の公共データで特異性が示されていたプロモーターも含まれており、解析結果の妥当性を裏付けた。また、既存の遺伝子モデルに対応しないnon-coding RNAに対応するプロモーターも含まれている。これらのデータから、価値が明確なプロモーターについてはCreトランスジェニックマウス作成に進んだ。視床核解析用プロモーター候補として選択した遺伝子について、そのBACベクターを用いて作成したCreマウスの一つは、視床網様核および不確帯特異的組み換えを誘導した。もう一つは束傍核選択的組み換えを誘導した。一方、広範な脳領域で組換え活性を誘導したベクターも有った。後者のベクターは発生初期に多様な細胞系譜で転写活性を持つと考えられた。視床束傍核特異的Creマウスを用いてNMDA受容体遺伝子に条件変異を導入した。このマウスは過活動性と協調運動の不全を示した。

レム睡眠に関わると考えられている候補二領域においては、20-50ng量のRNAを調製することができたが、Heliscope CAGEによる解析には十分量ではなかったため、直線増幅法を用いた微量サンプル適応のマイクロアレイ法による解析を行った。コントロールと比較してターゲット領域で発現が高い遺伝子数十個についてAllen Brain Atlasでのシグナルと比較解析してみたところ、多くの遺伝子で選択的な発現が確認された。In situ hybridizationによる解析結果は、ノンレム睡眠中枢およびレム睡眠中枢を標識する可能性を示唆した。上記遺伝子は、それら自身

が睡眠調節に直接関与する可能性を持つので、それらの機能を個別に明らかにする必要が有るとともに、それらの転写調節領域は今後の睡眠中枢の遺伝学的機能操作法の確立に資するツールとして期待される。

第2プランでは、まず Allen Brain Atlas により、候補遺伝子のリストを作成し、既に公開されている転写開始点情報、cDNA 情報との比較検討により、転写開始点を推測した。そこで、第一プランほどの厳密性を問わずに、標的領域を含む視床組織とその対照として大脳皮質領域を切り出して RNA を調製した。次に上記の推測情報をもとに、5' RACE にて、プロモーターの位置確認と特異性の再確認を行う実験を行った。優先度が高いトップ 20 の遺伝子について解析した結果、既存の主要プロモーターからの転写活性は確認されたが、これと活性において匹敵し、特異性の異なる第 2 のプロモーター (Alternative promoters) は見つからなかった。

我々は、この研究を通じて、特異的プロモーター同定から、トランスジェニックマウス作成による機能解析までがパイプラインでつながったシステム構築に成功した。今後、このシステムで作製したトランスジェニックマウスを用いた脳領域機能解析について、さらに解析を続けてゆく。また、研究代表者らは deepCAGE 法で得られたデータからエンハンサーを特定する技術をほぼ開発することができたので、プロモーターのみならず特異的なエンハンサー同定についても試みたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

・小林祐樹、佐野良威、Vannoni Elizabetta、後藤大道、鈴木瞳、大葉敦子、川崎弘詔、神庭重信、Lipp Hans-Petter、Murphy Niall P、Wolfer David P、糸原重美、Genetic dissection of medial habenula-interpeduncular nucleus pathway function in mice、Frontiers in Behavioral Neuroscience、査読あり、7 巻、Article 17、2013

[学会発表] (計 13 件)

1. 林悠、齊藤芳和、糸原重美、マウス遺伝学的手法による REM 睡眠中枢ニューロンの解析、日本睡眠学会第 35 回定期学術集会・シンポジウム「睡眠・覚醒の神経機構を探る戦略」(招待講演)、2010 年 7 月 1 日、名古屋・名古屋国際会議場
2. 矢口邦雄、西村幸子、糸原重美、Ntng1 と Ntng2 のシス調節エレメントの進化的変化は、脊椎動物における高次脳機能と神経回路の精緻化に重要な役割を持つ、Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会 第 53 回日本神経化学学会大会 第 20 回日本神経回路学会大会 合同大会)、2010 年 9 月 2 日、神戸・神戸コンベンションセンター
3. 鈴木治和、次世代シーケンサーとオミックス科学の展開、京都府立医大大学院講義(招待講演)、2010 年 9 月 30 日、京都・京都府立医大
4. 矢口邦雄、西村幸子、糸原重美、Ntng1 と Ntng2 遺伝子のシス調節エレメントの進化的変化は脊椎動物における高次脳機能と神経回路の精緻化に重要である、BMB2010(第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学学会 合同大会)、2010 年 12 月 7 日、神戸・神戸ポートアイランド
5. 鈴木治和、次世代シーケンサーを用いた神経疾患のオミックス解析、第 52 回日本神経病理学会総会学術研究会(招待講演)、2011 年 6 月 4 日、京都・京都テルサ
6. 矢口邦雄、西村幸子、糸原重美、Evolutionary changes of cis-regulatory elements for Ntng1 and Ntng2 genes in the elaboration of neuronal circuits and higher brain functions in vertebrates、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13-16 日、横浜・パシフィコ横浜
7. 鈴木治和、FANTOM5 phase 1: ヒト及びマウスの網羅的プロモーター解析、モロシヌス研究会、2012 年 6 月 15 日、東京・東京大学 中島董一郎記念ホール
8. 鈴木治和、Transcription factor interactions in FANTOM、日本プロテオ

- ーム学会 2012 年大会 (招待講演)、2012 年 6 月 11 日、東京・日本科学未来館
9. 林 悠、酒井一弥、安田光佑、安藤れい子、糸原重美、レム睡眠中枢ニューロンの遺伝学的解析、日本睡眠学会第 37 回定期学術集会・シンポジウム「越境する睡眠科学」、2012 年 6 月 29 日、横浜・パシフィコ横浜
 10. 矢口邦雄、穂吉幸子、糸原重美、Identification of transcriptional regulatory elements for Ntng1 and Ntng2 genes in mice、BMAP2012、2012 年 8 月 29-31 日、東京・慶応大学
 11. 安田光佑、林悠、田中三佳、糸原重美、Genetic analysis of the role of parafascicular nucleus in attention and learning.、BMAP2012、2012 年 8 月 29-31 日、東京・慶応大学
 12. 安田光佑、林悠、田中三佳、糸原重美、注意と学習におけるマウス東傍核の遺伝学的解析、第 35 回日本神経学会大会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋・名古屋国際会議場
 13. 林悠、酒井一弥、安田光佑、Julia Nguyen、安藤れい子、糸原重美、レム睡眠中枢回路とその発生学的起源に関する遺伝学的解析、第 90 回日本生理学会大会・シンポジウム「睡眠・覚醒の包括的な理解を目指した若手研究者による新しいアプローチ」(招待講演)、2013 年 3 月 29 日、東京・タワーホール船堀

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 治和 (SUZUKI HARUKAZU)

独立行政法人理化学研究所・LSA 要素技術開発グループ・プロジェクトディレクター

研究者番号：80333293

(2) 研究分担者

糸原 重美 (ITO HARA SHIGEYOSHI)

独立行政法人理化学研究所・行動遺伝学技術開発チーム・チームリーダー

研究者番号：60252524