

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 6月 3日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22680027

研究課題名（和文） 細胞核構造に着目した神経活動依存性遺伝子発現におけるクロマチン制御機構の解明

研究課題名（英文） Chromatin regulation and nuclear architecture during activity-dependent transcription in post-mitotic neurons

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：神経活動依存性に転写される遺伝子群の転写調節機構をクロマチン動態および遺伝子座の空間配置という観点から解析した。神経活動依存性に転写される遺伝子群は、その転写応答の時間と遺伝子座の空間配置に関連があること、およびニューロンが興奮した際には、これら神経活動依存性遺伝子に結合するクロマチン関連タンパク質の動態がダイナミックに変化することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have studied the transcriptional regulation of activity dependent genes from the aspects of chromatin dynamics and spatial gene positioning. We have revealed, in this study, that temporal regulation of activity dependent genes is associated with their spatial positioning. We also found that chromatin-related proteins occupying activity-dependent genes dynamically change their behavior in a neuronal activity dependent manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

研究分野：脳神経科学・神経科学一般

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学 細胞核構造

1. 研究開始当初の背景

ヒトでは 2m 以上にもおよぶ巨大なひも状構造物であるゲノムがどのようにして直径約 10mm の細胞核に収納されているかという細胞核構造 (Nuclear architecture) の理解は生物学的にきわめて重要である。核構造の決定には、1) 染色体および特異的遺伝子座を

含むゲノムDNAの核内空間配置と、2) クロマチンおよびクロマチン関連タンパク質の動的な振る舞いが関与している。1) 遺伝子座の核内配置に関して、遺伝子座の核膜周辺から核中心への移動や異なる遺伝子座の会合による転写増強などが知られる。さらに、

インプリンティング、転写抑制など様々な現象において遺伝子座の核内配置は重要な役割を果たしている (Takizawa et al, *Cell* 2008)。ニューロンは刺激にตอบสนองして数百もの遺伝子を発現する転写の活発な細胞であるが、これまでニューロンの核内のどこで遺伝子が転写されているか、つまり神経活動依存的な遺伝子発現と遺伝子座配置に関する先行研究はほとんどない (Takizawa & Meshorer *Trends Neurosci* 2008)。

2) クロマチン結合タンパク質の動的な振る舞いに関して、クロマチン高次構造形成に必須なヘテロクロマチンタンパク質 (HP1) やリンカーヒストン H1 などのクロマチン結合タンパク質も、結合と解離を頻繁に繰り返していることが明らかとなり、クロマチンが動的性質を有していることが分かっている。このようなクロマチン関連タンパク質の動的な振る舞いは変動し (クロマチン可塑性)、その可塑性が遺伝子発現や細胞分化に密接に関連している (Meshorer et al *Dev Cell* 2006)。

2. 研究の目的

クロマチンの機能発現に重要である核内ゲノム配置やクロマチンダイナミクス (動態) などを含む「細胞核構造」は神経系では明らかになっていない。そこで、本研究はニューロンの分化成熟過程および成熟ニューロンの神経活動過程での核構造変換を解析し、脳におけるクロマチン制御機構の基本原理解明を目的として立案した。

3. 研究の方法

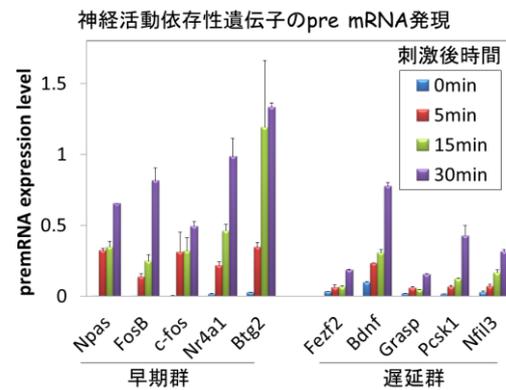
神経活動依存的な遺伝子を網羅的に同定後、これら遺伝子群の細胞核内での位置および遺伝子間会合を調べる。神経活動制御下にあるクロマチン結合タンパク質を同定し、そのゲノムワイドな分布を調べ、遺伝子座との関連を解明する。FRAP 法にてクロマチン関連タンパク質の動態変動を解析し、上記のゲノムワ

イド分布結果および核内配置の検討結果と照らし合わせることで、核構造制御のメカニズム解明に迫る。これらの結果を統合的に理解し、ニューロンにおける核構造、クロマチン制御の原理を解明する。

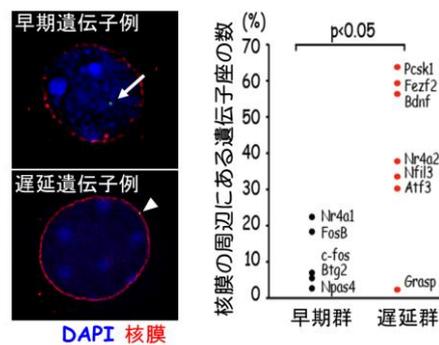
4. 研究成果

1) 神経活動依存的に転写される遺伝子群の細胞核内配置

マウス胎仔海馬由来のニューロン初代培養系を用いて、グルタミン酸受容体刺激によって発現誘導される遺伝子群を網羅的にマイクロアレイで解析した。その結果、刺激後 30 分で 1.5 倍以上発現が増加する早期応答遺伝子、および 180 分後に増加する遅延応答遺伝子の 2 群が存在することが分かった。それぞれの群の遺伝子のニューロン核内での配置を検討すると、遅延型遺伝子群の方が優位に高頻度に核膜周辺部位に存在することが分かった。また、遅延型遺伝子群は、核膜周辺に位置したまま転写されることも明らかとなった。



遅延応答型遺伝子は、核膜近傍に位置する



2) 神経活動依存性に転写される遺伝子群のクロマチン状態

さらに、それぞれの遺伝子群のクロマチンの状態をクロマチン免疫沈降法にて検討すると、早期遺伝子群には、転写開始前より RNA ポリメラーゼ (RNAP) II が存在していた。また、RNAPII が結合している早期遺伝子には、RNAPII の転写伸長抑制に関与している negative elongation factor (NELF) が存在していることが分かったさらに NELF をノックダウンすると、早期遺伝子群の刺激前の転写が増強していた。これらのことから、早期遺伝子群には RNAPII が転写開始点上に存在するものの転写伸長が抑制された状態になっており、脱分極刺激により一斉に転写が開始されるというモデルが考えられた。

2) ニューロンの核膜周辺部位の転写活性について

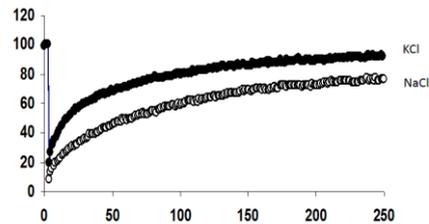
ニューロンでの細胞核内における転写活性を、UTPにより新生RNA標識にて検討すると、ニューロンはアストロサイトに比べて核膜周辺領域まで転写活性が高いことが分かった。そこで、核膜周辺で転写抑制に関連している核ラミナの発現を検討したところ、成熟したニューロンあるいは成体脳では、ラミン B1 の mRNA が発現しておらず、蛋白質レベルでは完全長のラミン B1 の発現はほぼ消失していた。この完全長のラミン B1 の発現減少が、核膜周辺での転写活性と関連があるかどうか現在、ラミン B1 発現ベクターを作成し検討するところである。

3) 神経活動依存性のクロマチンダイナミクス

神経が興奮した際に、クロマチンを構成する因子の動態が変化することが転写活性化に寄与している可能性を考え、ヌクレオソームリンカー部分に結合するヒストン分子、リンカーヒストン H1 の動態を検討した。GFP と

H1 との融合タンパク質をニューロンに強制発現し、FRAP 法にて検討したところ、脱分極刺激に反応して、H1 がハイパーダイナミックな挙動を示すことが分かった。

リンカーヒストンH1のKCL脱分極刺激後のハイパーダイナミックな挙動



また H1 をポリ ADP 修飾することが知られる PARP の機能を阻害するとこの H1 のハイパーダイナミクスな挙動は抑制されることが分かった。また、この際に神経活動依存性に転写される遺伝子の転写が抑制されることから、H1 の動態は転写に関連した現象である可能性が示唆された。さらに、興味深いことに、クロマチン免疫沈降法にて、H1 が離れたクロマチン領域に PARP 1 が結合することも分かった。すなわち、神経活動が誘導されると PARP 1 が活性化され、H1 がポリ ADP リボシル化され PARP 1 と入れ替わることが、転写活性の調節に関与していると考えられた。現在、ゲノムワイドな H1 と PARP 1 の交換の領域を同定し、その意義を検討する目的で ChIP シークエンスを行っているところである。

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 3 件)

1. Satoshi Urayama, Katsunori Semi, Tsukasa Sanosaki, Yukina Hori, Masakazu Namihira, Jun Kohyama, Takumi Takizawa, Kinichi Nakashima, "Chromatin accessibility at a STAT3 target site is altered prior to astrocyte differentiation", Cell Struct Funct, [Epub ahead of print], 2013,査読有

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

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 滝沢琢己：神経系細胞におけるクロマチン空間配置、第 7 回茨城大学遺伝子実験施設公開シンポジウム、2013 年 3 月 11 日、茨城県
2. 伊藤謙治、魚崎祐一、野口東美、荒川 浩一、滝沢琢己：神経幹細胞における遺伝子座核内配置と転写活性の関連、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡県
3. 伊藤謙治、魚崎祐一、野口東美、荒川浩一、滝沢琢己：神経幹細胞分化での遺伝子座の核内配置の変動解析、第 59 回北関東医学会総会、2012 年 9 月 27 日、群馬県
4. 魚崎祐一、野口東美、伊藤謙治、荒川浩一、滝沢琢己：成熟ニューロンにおける複製依存性ヒストンのダイナミズム解析、第 59 回北関東医学会総会、2012 年 9 月 27 日、群馬県
5. 野口東美、伊藤謙治、魚崎祐一、荒川浩一、滝沢琢己：ニューロン成熟過程における核内構造変換と遺伝子発現機構の解明、第 59 回北関東医学会総会、2012 年 9 月 27 日、群馬県
6. 滝沢琢己：神経細胞における細胞核構造解析、第 39 回日本毒性学会学術年会、2012 年 7 月 17 日 (招待講演)、宮城県
7. 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。2011 年 9 月 29 日。群馬県
8. 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。2011 年 7 月 11 日。神奈川県。
9. 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。2011 年 5 月 19 日。熊本県
10. 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。
11. 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。
12. 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。
13. 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.
14. 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.
15. 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。
16. 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.
17. 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.
 18. 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.
 19. 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.

[図書] (計 2 件)

1. 伊藤謙治、魚崎祐一、滝沢琢己: 神経系細胞とクロマチン高次構造、細胞工学、31 巻、8 号、2012 年
2. 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.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし