

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650167

研究課題名（和文） 成熟ニューロンでの神経活動に伴う複製依存性コアヒストンのダイナミクス

研究課題名（英文） Activity-dependent dynamics of replication-dependent core histones 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）：

成熟マウス海馬ニューロンにおいて、グルタミン酸受容体刺激は、通常分裂細胞でのみ発現する細胞複製依存性コアヒストン H3.2 をコードする hist1h3f 遺伝子の発現を誘導することが分かった。また、塩抽出法や新規蛋白質代謝標識により、コアヒストンは蛋白質レベルでもその発現が増加していた。ニューロンにおいて、新たに合成されるコアヒストンが何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In mature post-mitotic neurons derived from mouse hippocampus, a hist1h3f gene, which encodes replication-dependent core histone H3.2, is expressed upon stimulation to glutamine receptors. Salt extraction and metabolic labeling of newly synthesized proteins in neurons revealed that core histone proteins are increased at protein levels in response to glutamine receptor stimulation. These results suggest that newly synthesized replication dependent core histones play a role in post-mitotic neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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、クロマチン、ヒストン、神経活動依存性転写

## 1. 研究開始当初の背景

神経活動依存的遺伝子発現は、ニューロンの機能を支える重要な機構である。そこには細胞内カルシウム濃度上昇と引き続く種々のキナーゼおよび転写因子の活性化に加え、ヒストン修飾の変化が関与している。申請者らは、マイクロアレイによる網羅的解析の過程で神経活動依存的なコアヒストン H3.2 の発現上昇を見出した。細胞複製依存性ヒストン

H3.1、H3.2 は、S 期に必要な分が一過性に転写される（図2）。一方、H3.3 は細胞周期に依存せず転写されクロマチンに取り込まれている。このようなヒストンの発現誘導と代謝は、細胞機能に重要であるにも関わらずニューロンでの知見は非常に乏しい。

## 2. 研究の目的

ニューロンは外界からの刺激に応じて多くの遺伝子を発現する。この神経活動依存性転

写は、ニューロンの機能、ひいては脳の高次機能に重要である。クロマチンの主要構成因子であるコアヒストンの翻訳後修飾は転写、修復など種々のゲノム機能調節に深く関与しており、神経活動依存性転写調節における役割も指摘されている。一方、転写、修復の際にはコアヒストンの交換、いわばヒストンの代謝調節も伴うが、神経活動依存性転写での関与については全くわかっていない。本研究では、分裂終了後の成熟ニューロンにおける神経活動依存性転写制御の際の、ヒストン代謝のダイナミクスを解明し、分裂しない細胞でのヒストンの代謝制御、並びに神経活動依存性転写の新規機構を明らかにしたい。

### 3. 研究の方法

1) 細胞の調製：胎生 14.5 日マウス海馬より定法に従ってニューロンを単離し培養皿上で 10 日間培養した。グルタミン酸受容体刺激は、GABA<sub>A</sub> 受容体遮断薬 bicuculline を培養上清中に添加することで行った。すなわち、培養中に 10% 程度含まれる抑制性ニューロンによる抑制を解除することで、内在性のグルタミン酸による受容体刺激を誘導した。刺激後、細胞を回収し種々の実験に供した。

2) 分裂細胞では、細胞複製依存的に転写されるコアヒストンは polyA テイルを有さない特殊な mRNA として転写されている。ニューロンでも同様に polyA テイルを有するかどうかを、逆転写に用いるプライマーを oligo dT と Random hexamer と変えて逆転写の効率を比較することで検討した。

3) 蛋白質レベルで、コアヒストンの発現が神経活動依存性に増強するかどうかを、塩抽出法により検討した。

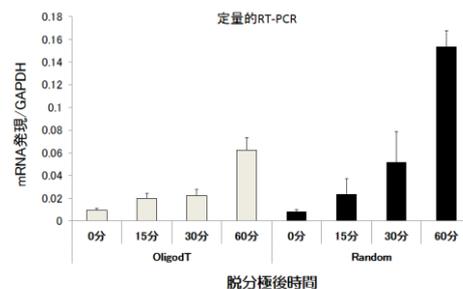
3) 非放射性標識による新生タンパク質標識法を応用して、新規合成ヒストンを標識し、これが取り込まれるヌクレオソームの DNA を回収し、ハイスループットシーケン法にて、新規合成ヒストンがゲノム上のど

の領域に取り込まれるかを検討しようと試みた。

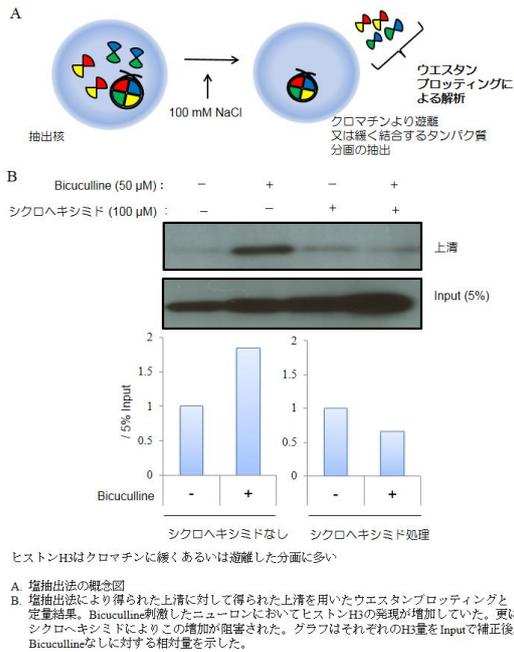
### 4. 研究成果

1) bicuculline 刺激後ニューロンより RNA を回収し、oligo dT あるいは random hexamer により逆転写反応を行った後、コアヒストン H3.2 をコードする遺伝子 hist1h3f の量を定量的 PCR にて検討したところ、どちらのプライマーでも増幅が見られた。すなわち、ニューロンでは hist1h3f 遺伝子は、通常の mRNA と同様に polyA テイルが付加されていることが示唆された。

ニューロン脱分極後ヒストンH3.2遺伝子 (hist1h3e, 3f)の発現誘導

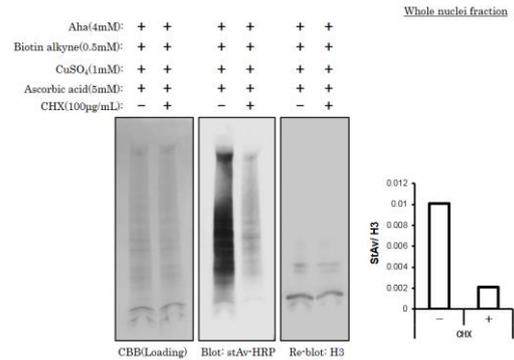


2) bicuculline 刺激したニューロン、および bicuculline 刺激前に蛋白質合成阻害剤サイクロヘキシミドで処理したニューロンから細胞核を抽出して、100mM の塩化ナトリウム溶液中に 1 時間懸濁させて、溶液中に抽出されてくるコアヒストン H3 をウエスタンブロット法にて検出した (塩抽出法)。Bicuculline 刺激にて、上清中の H3 は増加することから、bicuculline 刺激でクロマチンに緩く結合する H3 が増加していることが示唆された。またこの増加はサイクロヘキシミドにて抑制され新規蛋白質合成が関与していると考えられた。



3) メチオニンのホモログであるアジ化ホモアラニンを加えてタンパク質を標識し、回収した細胞核をアルキル化ビオチンと反応させることで、新規合成タンパク質をビオチン標識した。原法ではアルキル化合物との反応時間が 2 時間となっていたが、アジ化ホモアラニンの添加量を増やし、アルキル化ビオチンとの反応時間を 12 時間としたところ、非常に強く標識されることが分かった。また、この標識はタンパク質合成阻害剤にてほぼ完全に抑制されることから、タンパク質合成に特異的な反応であると考えられた。また、ヒストン H3 が、ビオチンにて標識されていることも分かった。

#### Metabolic Labeling of newly synthesized proteins in neurons



4) 次に、細胞核を **micrococcal nuclease (MNase)** で処理し、クロマチンをモノヌクレオソームの状態まで消化した後、ストレプトアビジン付加マグネットビーズにて免疫沈降し、沈降物中のヒストンの含有量を検討した。しかし、免疫沈降にて標識していない細胞からもヒストンが若干少ないながらも回収されてしまうことが分かった。内在性のビオチン修飾がヒストンに存在する可能性が示唆されたため、タンパク質の標識を **Oregon Green** へと変更し条件検討している。タンパク質標識したサンプルでのみヒストンが免疫沈降されるのが確認できたら、沈降物中に含まれる DNA の配列をハイスループットシークエンスにて検討する。

#### 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9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

[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