

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700430

研究課題名(和文)ポリグルタミン病モデルを用いた神経細胞維持・変性に関わる新たな転写制御機構の同定

研究課題名(英文) Identification of novel transcription factors involved in neuronal maintenance and degeneration.

研究代表者

山中 智行 (YAMANAKA, TOMOYUKI)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：00381575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：Protein-DNAアレイ(Panomics)を用いたスクリーニングにより、ハンチントン病モデルマウスの線条体、皮質でDNA結合活性が変化している転写因子を複数同定した。このうちE-box結合因子について、変異ハンチンチン凝集体に結合すること、さらに、ChIP-chipや遺伝子発現アレイにより、その直接の下流遺伝子を同定すると共に、その一部はハンチントン病モデルマウス脳で発現低下していることも見いだされ、その病態への関与が期待された。一方、別の転写因子NF-Yについて、ロックアウトマウス解析やChIP-chip等により、NF-Yを介した遺伝子発現制御が神経変性に関わっている事も明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Through screening using Panomics Protein-DNA array, we identified several transcription factors (TFs) whose DNA binding activities were affected in Huntington's disease (HD) model mice brain. One of them, an E-box binding factor, interacted with mutant huntingtin aggregates. We identified ~300 downstream genes of it by ChIP-chip, and some of their expressions were affected in HD model brains. These data suggest the suppression of E-box binding factor by mutant huntingtin may be involved in some aspects of HD pathogenesis. We also examined NF-Y, another TF affected by mutant huntingtin, by analyzing its neuronal knockout mice or ChIP-chip data, and revealed its critical role in neuronal cell maintenance and degeneration.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経変性 ハンチントン病 転写因子 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

ハンチントン病等のポリグルタミン病は、優性遺伝性の神経変性疾患であり、原因遺伝子内の CAG リピートの異常伸長が観察される。その結果、異常伸長したポリグルタミン鎖を有する変異タンパク質が産生され、これが、神経細胞の核内に凝集体を形成し、神経変性が引き起こされると考えられている。DNA microarray 解析等の結果から、様々な遺伝子の発現異常と病態進行との関連が指摘されているが、その分子メカニズムの詳細については不明な点が多い。

これまでに、我々は、ハンチントン病モデルを用いて、スクリーニング的アプローチにより、神経維持・変性に関わる転写制御機構を解析してきた。まず、ハンチントン病の原因タンパク質である変異型ハンチンチンについて、その凝集体の質量分析解析により、転写因子 NF-Y の構成因子である NF-YA を新たに凝集体結合タンパク質として同定した。さらに、ハンチントン病モデルマウスでは、脳皮質の神経細胞において、凝集体へ取り込まれることにより活性型 NF-Y が減少し、結果、HSP シャペロンタンパク質の発現が減少することを見出した (Embo J 2008)。

また、転写因子の活性変化を指標とした別のアプローチの解析から、POU domain factor である Brn-2 の活性がハンチントン病モデルマウス脳で低下していることを見出した。さらに、Brn-2 も変異ハンチンチン凝集体へ取り込まれ、これにより、視床下部の神経ホルモンの発現が低下することも明らかとした (Hum Mol Genet 2010)。

以上の結果は、ハンチントン病という単一遺伝子の変異による変性疾患においても、凝集体形成に伴い、いくつかの転写因子が部位・細胞特異的に活性阻害され、神経変性が引き起こされることを示唆するものである。同時に、スクリーニング及びモデルマウスを組み合わせた我々の解析方向性が、変異型ハンチンチンの新規生理ターゲット転写因子の同定、及びその生理的意義の解明において、非常に有用なストラテジーとなり得ることを示すものである。

2. 研究の目的

本研究では、部位・細胞特異的に神経細胞の維持・変性に関わる新たな転写制御機構を同定することを目指す。そのために、まず、これまでのストラテジーを用いて、ハンチントン病モデルマウス脳において、部位・細胞特異的に機能減少する転写因子を、さらに検索し同定する。次に、クロマチン免疫沈降 (ChIP) や遺伝子発現アレイ等を用いて、機能阻害される転写因子の下流遺伝子を同定すると共に、これらのハンチントン病モデルマウス脳での発現変化について検討する。最

後に、これら転写因子をマウス脳にて機能障害し、神経細胞の形態、生存、機能に対する影響を観察する。

3. 研究の方法

3-1. 活性変化を指標としたハンチントン病で機能阻害される転写因子群のさらなる検索

ハンチントン病モデルマウスの変性の強い部位(皮質、線条体)について、Protein-DNA array (Panomics 社) を用いて DNA 結合活性を指標として、機能阻害される転写因子の検索を行う。ここで同定された転写因子についてゲルシフトアッセイを用いて確認する。

DNA 結合活性が阻害されたものについては、変異ハンチンチン凝集体との相互作用について、細胞高発現系にて、免疫染色、Western blotting、filter trap assay 等を用いて検証する。また、特異抗体を作製あるいは購入し、ハンチントン病モデルマウス脳を抗ハンチンチン抗体と共染色し in vivo での相互作用についても検討する。

一方、ハンチントン病モデルマウス脳について遺伝子発現アレイを行い、コントロールに比べ発現が変化する転写因子を検索し、発現変化により活性が影響される転写因子を同定する。

3-2. 機能阻害転写因子の生理的下流遺伝子の検索

転写因子について、その特異抗体を用いてクロマチン免疫沈降し結合してくるプロモーター領域を Affymetrix のマウスプロモーターアレイにて同定する (ChIP-chip)。一方、コントロールとして rabbit IgG を用いて同様の実験を行う。アレイデータは CisGenome software にて解析し、コントロールと比べ有意に検出される領域、すなわち転写因子が結合する領域を同定する。ここで得られたプロモーターを持つ遺伝子について、Gene ontology analysis や pathway analysis 等を行い、転写因子が何らかの特定の細胞機能に関わる遺伝子群を制御しているかを検討する。

一方、これらについて、ハンチントン病モデルマウス脳での遺伝子発現アレイのデータと比較し、転写因子が結合しかつ発現が変化する遺伝子、すなわち生理的下流遺伝子の検索を行う。これらについて、文献検索やデータベース解析によりその生理的・病理的意義について検討する。

3-3. 正常マウスを用いた機能阻害実験

NF-Y 等の機能阻害される転写因子について、遺伝子ノックダウンやノックアウト等に

より機能阻害し、神経細胞の生存・形態や機能への影響を観察する。NF-Y 機能破壊マウスは、NF-YA flox mice (Bhattacharya A et al. Cancer Res. 2003) を用いて作製する。具体的には、NF-YA flox mice を分化神経細胞で cre recombinase を発現する camk2a-cre transgenic mice と交配し、神経細胞のみで NF-Y を機能欠損するマウスを作製する。

4. 研究成果

4-1. ハンチントン病で機能阻害される転写因子の同定

Protein-DNA アレイを用いた ~250 因子のスクリーニングにより、ハンチントン病モデルマウスの線条体、皮質で、それぞれ 28 個 (17; 減少, 11; 亢進) 10 個 (6; 減少, 4; 亢進) の転写因子について DNA 結合活性が変化していることを見出した。一方、Affymetrix 社の遺伝子発現アレイを用いた網羅的解析から、モデルマウスの線条体、皮質で共に 20 個 (15; 減少, 5; 亢進) の転写因子の mRNA 量が変化していることも明らかとした。

このうちの 1 つ E-box 結合因子 (E-box BF) についてさらに解析を進め、その DNA 結合活性が低下していることをゲルシフトアッセイにてまず確認した。さらに、この転写因子は、変異ハンチンチン凝集体に結合すること、一方その mRNA 量は変化しないことから、共凝集がその活性低下に関与していると考えられた。

また全く別のアプローチから Tcf20 という転写因子も変異ハンチンチン凝集体に含まれることを見出された。現在その他の転写因子についても、その確認と生理的意義について検討している。

4-2. E-box BF 及び NF-Y の下流遺伝子の同定

E-box BF についてまずその特異抗体を C 末ペプチドを抗原としてウサギで作製し、アフィニティ精製した。まず、マウス脳の抽出液を調整し、これより E-box BF 及び NF-Y をクロマチン免疫沈降した。このサンプルについて PCR を行い、共に既知下流遺伝子のプロモーターは含まれていることは確認した。

このサンプルをプローブ標識し、プロモーターアレイに hybridization してこれら転写因子が結合してくる領域の同定をおこなった。それぞれ数百遺伝子の領域が検出された。GO term enrichment analysis の結果、共にストレスや輸送系に関わる遺伝子がある程度濃縮されているのがわかり、E-box BF 及び NF-Y がここに関わっている可能性が示唆された。

4-3. 転写因子の機能欠損マウスの作製・解析

NF-YA を分化神経細胞で欠損させたところ、神経脱落、グリオシス、脳萎縮、脳重減少が確認され、NF-Y が神経細胞の維持に必須であることを初めて明らかとした。今後 E-box BF やその他転写因子については順次解析していく予定である。

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. Yamanaka T, Wong HK, Tosaki A, Bauer PO, Wada K, Kurosawa M, Shimogori T, Hattori N, Nukina N*. Large-scale RNA interference screening in mammalian cells identifies novel regulators of mutant huntingtin aggregation. PLoS One. 2014 Apr 4;9(4):e93891. doi: 10.1371/journal.pone.0093891 (査読有)

2. Yamanaka T, Tosaki A, Kurosawa M, Matsumoto G, Koike M, Uchiyama Y, Maity SN, Shimogori T, Hattori N, Nukina N*. NF-Y inactivation causes atypical neurodegeneration characterized by ubiquitin and p62 accumulation and endoplasmic reticulum disorganization. Nat Commun. 2014 Feb 25;5:3354. doi: 10.1038/ncomms4354. (査読有)

3. Yamanaka T*, Tosaki A, Kurosawa M, Akimoto K, Hirose T, Ohno S, Hattori N, Nukina N*. Loss of aPKC in differentiated neurons disrupts the polarity complex but does not induce obvious neuronal loss or disorientation in mouse brains. PLoS One. 2013 Dec 31;8(12):e84036. doi: 10.1371/journal.pone.008403 (査読有)

[学会発表](計 3 件)

1. 山中智行、戸崎麻子、黒澤大、松本弦、小池正人、内山安男、Sankar N. Maity、下郡智美、服部信孝、貫名信行：転写因子 NF-Y の機能破壊はユビキチン・p62 の蓄積、小胞体異常を伴う神経変性を誘導する 第 134 回日本薬学会 2014 熊本

2. 山中智行、戸崎麻子、黒澤大、秋本和憲、廣瀬智威、大野茂男、服部信孝、貫名信行：Depletion of aPKC in mouse differentiated neurons disrupts the polarity protein complex but does not induce cell degeneration or brain structural disorganization 包括脳ネット

ワーク 夏のワークショップ 2013 名古屋
国際会議場

3. Yamanaka T, Tosaki A, Kurosawa M, Koike M, Uchiyama Y, Maiti SN, Nukina N, Role of NF-Y transcription factor in neuronal cell maintenance and chaperone gene expression. EMBO EMBL conference, September 2012, Heidelberg, Germany
Thursday, 20 September 2012. 9/19-22

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
プレス発表
www.juntendo.ac.jp/graduate/pdf/news06.pdf

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山中 智行 (YAMANAKA TOMOYUKI)
独立行政法人理化学研究所・構造神経病理研究チーム・研究員
研究者番号：00381575

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし