

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24613006

研究課題名(和文)クロマチン制御因子による神経幹細胞の維持機構に関する研究

研究課題名(英文)Mechanism of neural stem cell maintenance by chromatin regulator

研究代表者

富永 薫 (TOMINAGA, KAORU)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20265242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、クロモドメインを持つクロマチン結合タンパク質MRG15の神経幹/前駆細胞における役割を解明することを目的とした。神経幹/前駆細胞特異的MRG15欠損マウスは、正常に生まれてきたが、成長とともに体重の増加がコントロール群に比べ、著しく抑制されていた。神経幹/前駆細胞特異的MRG15欠損マウスから分離された神経幹/前駆細胞は、その数が少ないだけでなく、増殖も抑制されていた。MRG15を介した遺伝子発現制御やスプライシング機構が、神経幹/前駆細胞の維持および機能に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic mechanism via chromatin regulation is crucial for many aspects of biological processes including maintenance of stem cells. MRG15 is the chromodomain-containing and chromatin-binding protein. It is known that MRG15 involves in gene regulation and splicing via making large complexes with other proteins. To investigate the role of MRG15 in neural stem/progenitor cells, we have produced MRG15 deficient mice in which MRG15 was specifically deleted in neural stem/progenitor cells. Although these mice were born in accordance with Mendelian ratio, their body size as well as brain weight was significantly reduced compared with that of control littermates. Moreover, in vitro growth ability of the neural stem/progenitor cells isolated from these mice was strongly suppressed. These results suggest that gene regulation and splicing in which MRG15 involves have a pivotal role in maintenance and function of neural stem/progenitor cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：エピジェネティクス クロマチン 神経幹細胞 ヒストンアセチル化 細胞増殖 遺伝子発現 マウスモデル

## 1. 研究開始当初の背景

エピジェネティックな調節機構を介したクロマチン制御は種々の細胞機能に重要である。現在クロマチン制御に関与する多くの因子が同定され、その役割も明らかになってきている。細胞内の DNA はクロマチン構造を形成し保護されていることから、DNA の転写、複製、修復にはクロマチン構造変換が必須である。幹細胞におけるクロマチン制御は自己複製能と分化能のバランス維持に必須であり、幹細胞におけるクロマチン制御機構の解明は、幹細胞の再生医療への応用に向けて最重要研究課題の一つとなっている。MRG15 はクロモドメインを持つクロマチン結合タンパク質で、核内で他のタンパク質と大きな複合体を形成する。種々の複合体形成を介して、転写制御、mRNA スプライシング、DNA 損傷応答などに関与することが知られている。MRG15 は Tip60 ヒストンアセチル化酵素複合体の構成成分で、Tip60 酵素複合体が胚性幹細胞の分化抑制に関与することや DNA 損傷応答に必須であることを示す興味ある報告があいついでなされている。我々は、MRG15 の個体レベルでの機能解析を目指し、恒常的 MRG15 欠損マウスを作製した。恒常的 MRG15 欠損マウスは胎生致死であり、その胎生致死性は、種々の組織における細胞増殖の抑制に起因することをこれまで示してきた。恒常的 MRG15 欠損胎児の脳はコントロールに比べ明らかに小さいので、MRG15 が神経幹細胞の増殖維持にも関与することが考えられた。

## 2. 研究の目的

幹細胞の存在が中枢神経系を含む多くの組織で報告されており、その自己複製能と分化能の厳密な調節を通じて組織の恒常性維持に関与すると考えられている。神経幹細胞は中枢神経系を構成するニューロンとグリアに分化することができる多分化能を持つ細胞で、器官形成の活発な発生期(胎児期)のみならず成体脳にも存在し、継続的に機能的な神経細胞を個体の一生を通じて供給して

いる。本研究では、神経幹細胞の自己複製および神経分化における Tip60 ヒストンアセチル化酵素複合体の役割を、その構成成分であるクロマチン制御因子 MRG15 の機能解析を通じて明らかにすることを目的とする。本研究を通じて神経幹細胞におけるクロマチン制御機構のよりいっそうの理解が期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経幹細胞特異的 MRG15 欠損マウスの作製

マウス MRG15 遺伝子の第3エキソンを loxP ではさんだ MRG15 マウスラインとネスチンプロモーターにより神経幹細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウスを掛け合わせ、神経幹細胞特異的 MRG15 欠損マウスを作製した。Cre 組換え酵素の働きにより、クロモドメインのほとんどを欠出するとともに、第3エキソン以降の読み枠がずれることから、正常な MRG15 タンパク質は発現しない。

### (2) ニューロスフェア法

神経幹細胞特異的 MRG15 欠損マウス胎児脳および成体脳より神経幹細胞を分離し、細胞培養系で神経幹細胞の自己複製能および多分化能を解析した。胎生期 14.5 日の脳あるいは成体脳で神経新生の起こる脳室下領域および海馬歯状回の下顆細胞層領域より細胞を分離し、線維芽細胞増殖因子(FGF2)および上皮細胞増殖因子(EGF)を含む培地で培養し、神経幹/前駆細胞を回収した。回収された神経幹/前駆細胞をトリプシン処理により単細胞化し、1 穴当たり 1000 個の細胞を 96 穴プレートに継代した。10 日間の培養後、新たに形成されたスフェアの大きさと数を顕微鏡下で計測した(初代ニューロスフェア)。形成されたスフェアは回収され、同様の方法で継代された(2次ニューロスフェア)。ニューロスフェア法で増幅された細胞を分化促進培地で培養し、分化した細胞系譜をマーカータンパク質に対する免疫染色により評価した。

### (3) MRG15 欠損ニューロスフェアにおける遺伝子発現の検討

ニューロスフェア法により増幅された MRG15 欠損神経幹 / 前駆細胞における遺伝子発現の変化を検討するために、Mouse Neurogenesis and Neural Stem Cell PCR アレイを行い、MRG15 の標的遺伝子の検索を行った。ニューロスフェア法で増幅された細胞より RNA を分離し、PCR アレイを行った。コントロールの細胞と比べ発現量に差の認められた遺伝子の発現は、定量的 PCR で確認した。

### (4) 脳の組織学的解析

還流固定の後、脳を取り出し、パラフィンに包埋した。側脳室および海馬領域の 5-mm 冠状切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色により病理変性を評価した。種々のマーカータンパク質に対する免疫染色を行い、細胞系譜の追跡を行った。

### (5) 条件付き Tip60 ヒストンアセチル化酵素欠損マウスラインの作製

MRG15 は Tip60 ヒストンアセチル化酵素と複合体を形成することから、MRG15 欠損マウスの表現系と比較する目的で、条件付き Tip60 ヒストンアセチル化酵素欠損マウスラインの作製を試みた。ターゲティングベクターを構築し、マウス胚性幹細胞 (E14TG2a) に導入した。正確に遺伝子がターゲットされた細胞よりキメラマウスを作製し、ターゲットされた遺伝子を持つマウスラインを樹立した。

#### 4. 研究成果

条件付き MRG15 欠損マウスとネスチンプロモーターにより神経幹細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウスを掛け合わせ、神経幹細胞特異的 MRG15 欠損マウスを作製した。神経幹細胞特異的 MRG15 欠損マウスは、構成的 MRG15 欠損マウスで見られた胎生致死は回避され、正常に生まれてきた。神経幹細胞特異的 MRG15 欠損マウス由来の肝臓や腎臓では野生型マウスと同程度の MRG15 の発現が認めら

れたが、脳では MRG15 の発現がほとんど認められず、このマウスモデルの有用性が示された。

神経幹細胞特異的 MRG15 欠損マウスは、メンデルの法則に従って生まれてきたが、同腹のコントロール群に比べ体が優位に小さかった。マウスの遺伝的背景の違いによる影響を排除するために、C57BL/6J マウスラインへのバッククロスを開始し、10 世代交配した。C57BL/6J へバッククロスされた神経幹細胞特異的 MRG15 欠損マウスも、メンデルの法則に従って生まれてきたが、同様に同腹のコントロール群に比べ体が優位に小さかった。C57BL/6J バックグラウンドの神経幹細胞特異的 MRG15 欠損マウスの加齢にともなう体重変化を追跡調査し、コントロール群と比較したところ、20 週齢前後まで優位な低体重が認められた。この低体重はオスで特に顕著だった。以上の結果は、体重調節機構における神経系での MRG15 の役割の重要性を示唆するものであった。

6 ヶ月齢の神経幹細胞特異的 MRG15 欠損マウスの脳の大きさはコントロール群に比べ優位に小さかったが、顕著な組織学的異常は確認できなかった。ニューロスフェアを形成する神経幹 / 前駆細胞の数は優位に少なく、脳の大きさを反映していると考えられた。

ニューロスフェア法で解析した結果、神経幹細胞特異的 MRG15 欠損マウスの神経幹 / 前駆細胞の数はコントロールに比べ減少しており、2 次ニューロスフェア形成能も低下していた。さらに、ニューロスフェア法で増幅された細胞の RNA 解析により、MRG15 の新たな標的遺伝子の候補としてインテグリン beta1 などが同定され、神経幹細胞の増幅機構の一端が明らかとなった。

神経幹細胞特異的 MRG15 欠損マウスの表現系と比較する目的で、条件付き Tip60 ヒストンアセチル化酵素欠損マウスを作製した。酵素活性に必須であるアセチル CoA 結合部位を

コードする第 10 および 11 エキソンを loxP ではさんだ遺伝子を構築し、胚性幹細胞に導入し、遺伝子が正確にターゲットされた細胞をスクリーニングした。ターゲットされた細胞を用いてキメラマウスを産出し、条件付き Tip60 欠損マウスラインを作製した。条件付き Tip60 欠損マウスとネスチンプロモーターにより神経幹細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウスを掛け合わせ、神経幹細胞特異的 Tip60 欠損マウスを作製した。神経幹細胞特異的 Tip60 欠損マウスは、メンデルの法則に従って生まれてきたが、生後すぐに致死となり、また、脳が明らかに小さく小頭症であった。神経幹細胞特異的 Tip60 欠損マウスの脳では、層構造の形成に異常が認められ、脳の組織学的な異常も明らかであった。以上の結果は、Tip60 ヒストンアセチル化酵素が神経発生に必須であることを示していた。

#### 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 6 件)

Mashiko, T., Sakashita, E., Kasashima, K., Tominaga, K., Kuroiwa, K., Nozaki, Y., Matsuura, T., Hamamoto, T., Endo, H.: Developmentally-regulated RNA-binding Protein 1 (Drb1)/RNA-binding Motif Protein 45 (RBM45), a Nuclear-cytoplasmic Trafficking Protein, Forms TAR DNA-binding Protein 43 (TDP-43)-mediated Cytoplasmic Aggregates. *J Biol Chem.* in press 2016. 査読有 doi:10.1074/jbc.M115.712232.

Tominaga, K.: The emerging role of senescent cells in tissue homeostasis and pathophysiology. *Pathobiol Aging Age Relat Dis.* 5:27743, 2015. 査読有 doi: 10.3402/pba.v5.27743

Yamamoto, S., Nagao, Y., Kuroiwa, K., Hakamata, Y., Ichida, M., Saito-Ohara, F., Tominaga, K., Endo, H.: Rapid selection of XO embryonic stem cells using Y chromosome-linked GFP transgenic mice. *Transgenic Res.* 23:757-765, 2014. 査読有

doi: 10.1007/s11248-014-9813-0.

Tetsuka, S., Tominaga, K., Ohta, E., Kuroiwa, K., Sakashita, E., Kasashima, K., Hamamoto, T., Namekawa, M., Morita, M., Natsui, S., Morita, T., Tanaka, K., Takiyama, Y., Nakano I., Endo, H.: Paraneoplastic cerebellar degeneration associated with an onconeural antibody against creatine kinase, brain-type. *J. Neurol. Sci.* 335:48-57, 2013. 査読有 doi: 10.1016/j.jns.2013.08.022

Akimoto, C., Sakashita, E., Kasashima, K., Kuroiwa, K., Tominaga, K., Hamamoto, T., Endo, H.: Translational repression of the McKusick-Kaufman syndrome transcript by unique upstream open reading frames encoding mitochondrial proteins with alternative polyadenylation sites. *Biochim Biophys Acta.* 1830:2728-2738, 2013. 査読有 doi:10.1016/j.bbagen.2012.12.010

Tominaga, K., Pereira-Smith, O.M.: The role of chromatin reorganization in the process of cellular senescence. *Curr Drug Targets.* 13(13):1593-1602, 2012. 査読有 DOI: 10.2174/138945012803529983

[学会発表](計 4 件)

遠藤 仁司、山本 智、長尾 泰光、黒岩 憲二、市田 勝、冨永 薫「Rapid selection of XO embryonic stem cells using Y chromosome-linked GFP transgenic mice」第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学会年会合同大会 2015 年 12 月 01 日 神戸市

益子 貴史、坂下 英司、笠嶋 克巳、黒岩 憲二、冨永 薫、松浦 徹、遠藤 仁司「発達段階特異的 RNA 結合蛋白質 Drb1 の細胞質封入体形成機構の解析」第 38 回日本分子生物学会、第 88 回日本生化学会年会合同大会 2015 年 12 月 01 日 神戸市

岩森 巨樹、富永 薫、岩森 督子、佐藤  
哲也、大川 恭行、小野 悦路、Martin  
Matzuk「ヒストン修飾によるスプライシング  
制御が精子形成過程を制御する」第9回日本工  
ピジェネティクス研究会年会 2015年5月25  
日 東京都

富永 薫「Chromatin regulator MRG15 is  
required for spermatogenesis in mice.」  
The 10th Nikko International Symposium  
2013年10月17日 栃木県・下野市

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.jichi.ac.jp/biochem/kinou/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

富永 薫 (Tominaga, Kaoru)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20265242