

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770204

研究課題名(和文) 選択的姉妹染色体分配を介した左右非対称性決定機構の解析

研究課題名(英文) Establishment of bilateral asymmetry through selective segregation of sister chromatids

研究代表者

中野 俊詩 (Nakano, Shunji)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60608529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経系左右非対称性はヒトを含めた様々な動物に存在する。近年、脳の左右非対称性における異常は神経疾患に関与することが示唆されており、神経系左右非対称性決定機構の解明は重要な課題である。線虫 *C. elegans* の神経系にも左右非対称性があり、これまでに研究代表者は神経系左右非対称性形成に異常を示す変異体を単離した。本研究課題では、新規の神経系左右非対称性決定遺伝子の同定に成功した。この遺伝子は、線虫からヒトまで進化的に広く保存されたタンパク質リン酸化酵素であり、染色体分配に関与することが以前に報告されている。これらことから、染色体分配を介した神経系左右非対称性決定機構が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bilateral asymmetry is a prevalent feature of the nervous system of many animals and is thought to play an important role in the lateralized brain function. Abnormality in brain asymmetry is implicated in several neuropathology. Identification of the molecular mechanism that establish left-right asymmetry is thus a fundamental problem in developmental biology, neurobiology and neuropathology.

The nervous system of *C. elegans* displays left-right asymmetry. We have previously isolated mutants in which a neuronal left-right asymmetry is lost. In this study, we identified a novel gene required for the establishment of neuronal asymmetry and found that an evolutionarily conserved protein kinase is required to generate a bilateral asymmetry. This protein kinase was previously shown to be important for chromosome segregation. These observations suggested that regulation of chromosome segregation might be involved in the generation of bilateral asymmetry in the *C. elegans* nervous system.

研究分野：遺伝学

キーワード：左右非対称性

1. 研究開始当初の背景

神経系左右非対称性はヒトを含めた様々な動物に存在する。近年、脳の左右非対称性における異常は神経疾患に關与することが示唆されている。しかしながら哺乳動物における脳左右非対称性を決定する発生機構は解明されていない。したがって、神経系左右非対称性決定機構の解明は重要な課題であると考えられる。

線虫 *C. elegans* の神経系にも左右非対称性がある。例えば、MI 神経細胞は左右の対をもたない左右非対称的な神経細胞である(図1)。このMI 神経細胞は、左右非対称的

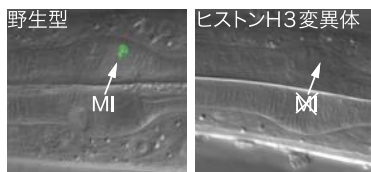


図1 左右非対称的なMI神経細胞形成。
MI神経細胞に特異的なGFPLレポーターは野生株で発現する。ヒストンH3変異体では、MI神経細胞が失われ、GFPLレポーターの発現が消失する。

な細胞系譜から生じる(図2)。胚発生50細胞期に生まれる ABaraap 多能性前駆細胞は、左右対称的な細胞系譜を経て左右対称的な細胞群(m1D,mc,NSM,M3,M2)を生じる。一方で、ABaraap 細胞系譜の非対称性によって、左右非対称的な MI 神経細胞が生まれる。MI 神経細胞は細胞系譜の右側から生じ、左側に相当する細胞は e3D とよばれる上皮細胞に分化する。すなわち、細胞系譜の対称性の喪失により、左右非対称的な MI 神経細胞が生まれる。

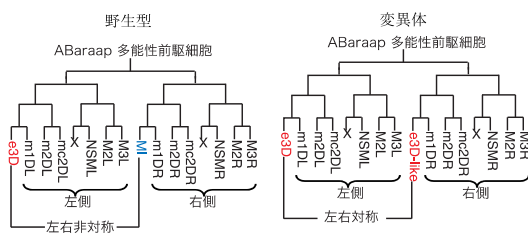


図2 MI神経細胞を生み出す左右非対称的な細胞系譜

申請者らはこのような線虫神経系左右非対称性の形成に關与する遺伝子を同定するために、遺伝学的スクリーニングを行った(Nakano et al., *Development*, 2010)。このスクリーニングにより、MI 神経細胞が喪失する変異体を単離し、これらのうちいくつかの変異体では、MI 神経細胞となるべき細胞が、e3D 上皮細胞へと運命転換し、本来左右非対称的であるべき細胞系譜が左右対称になっていることを明らかにした(図1)。現在までにこのような左右非対称性形成に異常を示す変異体を16系統単離し、これら16変異体は7つの遺伝子座に属する事を見いだした。つぎに、遺伝学的マッピングを用

いて、これらの左右非対称性決定遺伝子の同定を試みた。興味深い事に、左右非対称性決定遺伝子の一つはヒストン H3 蛋白質をコードする *his-9* 遺伝子であることを見いだした(Nakano et al., *Cell*, 2011)。

線虫ゲノムには24個のヒストン H3 遺伝子が存在する。遺伝学的解析から、1) *his-9* 変異は機能獲得型変異であること、2) *his-9* 遺伝子以外の他のヒストン H3 遺伝子に同様の機能獲得型変異を導入しても、MI 神経細胞が失われること、3) 変異型ヒストン H3 遺伝子は MI 神経細胞の mother cell (以降、「MI mother cell」と表記する)で作用すること、を見いだした。ヒストン H3 遺伝子の発現はほぼ全ての細胞に見られるのにも関わらず、変異型ヒストン H3 遺伝子によって引き起こされる異常が MI 神経細胞形成に非常に特異的であったことから、左右非対称決定機構は変異型ヒストン H3 遺伝子に高い感受性をもつことが考えられた。

ヒストン H3-H4 蛋白質は CAF-1 と呼ばれる蛋白質複合体を介して DNA に相互作用しヌクレオソームを形成する。ヒト CAF-1 複合体は PCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen)との相互作用を介して DNA 複製の場にリクルートされ、DNA 複製依存的にヌクレオソーム構成を促進する。

線虫 CAF-1 および PCNA ホモログが左右非対称性決定に關与しているかどうかを RNA 干渉法により検討した。CAF-1 と PCNA ホモログの機能低下株では、ヒストン H3 変異株と同様に、MI 神経細胞が喪失した。この結果から DNA 複製依存的なヌクレオソーム構成が左右非対称性決定に必要であると結論した。さらに、これらの結果から、変異型ヒストン H3 蛋白質は CAF-1 のヌクレオソーム構成活性を阻害する可能性が考えられた。CAF-1 活性の試験管内測定実験を行ったところ、CAF-1 活性は変異型ヒストン H3 蛋白質の存在下で阻害される事を見いだした。

2. 研究の目的

これらの背景から、神経系左右非対称性を決定する機構をさらに解明するために、本研究では、主に次の2点の研究を目的とした。

(1) これまでに単離されていたが未だ未解析であった変異体に着目し、これらの変異体の表現型解析とその原因遺伝子の同定へ向けた遺伝学的マッピング、および全ゲノムシーケンス解析を行う。

(2) CAF-1 複合体の神経系左右非対称性決定における標的遺伝子を明らかにするために、CAF-1 複合体の DamID と呼ばれるアッセイ系を構築する。このアッセイ系では、CAF-1 複合体のサブユニットに、DNA アデニンメチルトランスフェラーゼを融合する。

アデニンのメチル化は真核生物ではほとんど認められないことから、この融合遺伝子によってメチル化されたアデニンを同定すれば、CAF-1 複合体が相互作用する遺伝子群が明らかになることが期待される。そこで、この CAF-1-Dam 融合遺伝子を作成し、DamID アッセイ系の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 変異体の解析に関しては、まず、変異体系統に e3D 上皮細胞のマーカー遺伝子を導入し、MI 神経細胞が e3D 上皮細胞に運命転換しているかを検討する。原因遺伝子の同定に関しては、一塩基多型をもちいたマッピングを行い、責任変異がある領域を特定する。同時に、変異体の全ゲノムシーケンスを行い、変異体系統がもつ変異を網羅的に特定する。これらの変異のうち、遺伝学的マッピングの結果から明らかとなった染色体領域に存在するものに注目し、その野生型遺伝子を変異体に導入して、左右非対称性異常が快復するかを検討する。これらの方法によって、神経系左右非対称性形成に影響を及ぼす変異を特定し、非対称性形成に関与する遺伝子を明らかにする。

(2) DamID アッセイの構築のために、まず、大腸菌由来の Dam (DNA アデニンメチルトランスフェラーゼ) と CAF-1 複合体のサブユニットの一つである *chaf-1* 遺伝子との融合遺伝子を作成する。この遺伝子が機能的であるかどうかを検討するために、*chaf-1* 遺伝子の機能欠損株を単離し、得られた変異体の表現型を評価した上で、Dam-*chaf-1* 融合遺伝子を変異体に導入し、表現型が快復するかどうかを検討する。その上で、DamID アッセイの評価系を構築する。

4. 研究成果

(1) e3D 上皮細胞の GFP マーカーを変異体に導入し、発現パターンを観察した。野生株では e3D 上皮細胞の数は一つであるのに対して、変異体では二つに増加していることが明らかとなった。この観察結果と、MI 神経細胞が喪失していることから、この変異体では MI 神経細胞が e3D 上皮細胞に運命転換することで、本来左右非対称的であるべき細胞系譜が対称的になる異常を示すことが明らかとなった (図 1)。

この変異の原因遺伝子を同定するために、カリフォルニア産の野生型線虫系統を用いた一塩基多型マッピングを行った。マッピング解析の結果、この変異は 3 番常染色体に存在することが明らかとなった。これまでに MI 神経細胞にみられる神経系左右非対称性形成に関与することが知られている遺伝子のうち、3 番染色体に存在するものがないことから、この変異が新規の神経系左右非対称性形成遺伝子であることが明らかとなった。さらに、マッピングを進めたところ、この変異

は 3 番染色体の約 1 Mbps の領域に存在することが明らかとなった。

次世代 DNA シークエンスをもちいて、この変異体の全ゲノムシーケンスを行った。これにより、上記の 3 番染色体の 1 Mbps の領域に存在する変異を網羅的に同定することに成功した。これらの変異のうち責任変異の絞り込みを行うため、ホモ接合であり、タンパク質をコードすると予測されている領域に存在し、かつ変異によってアミノ酸配列が変化するものを選定したところ、そのような変異がひとつだけ同定された。この変異は、進化的に保存されたタンパク質リン酸化酵素をコードする遺伝子上に存在していることが明らかとなった。そこで、この変異が責任変異であるかどうかを検証するために、この遺伝子の欠損変異体を解析したところ、この欠損変異体も、MI 神経細胞における左右非対称性形成に異常を持つことが明らかとなった。また、RNA 干渉法をもちいて、この遺伝子の活性を低下させた場合も同様にして、神経系左右非対称性形成に異常を示すことを見いだした。これらの結果から、このタンパク質リン酸化酵素が非対称性形成に必須であることが明らかとなった。

このタンパク質リン酸化酵素は、ヒトまで進化的に保存されている。過去の研究から、このリン酸化酵素は、染色体分配の制御に関与することが示唆され、またヒストン H3 タンパク質をリン酸化することも報告されている。これらの知見から、ヒストン H3 タンパク質のリン酸化を介した染色体分配制御機構が、神経系左右非対称性形成に関与する可能性が考えられた。

(2) CAF-1 複合体のサブユニットの一つである *chaf-1* 遺伝子と Dam 遺伝子の融合遺伝子を作成することに成功した。この融合遺伝子が *chaf-1* 遺伝子としての機能性を維持しているかどうかを検討するために、*chaf-1* 遺伝子活性を評価することが必須となった。そこで、*chaf-1* 遺伝子を欠失する変異体を単離することを目指した。ランダムに変異導入をした線虫集団の中から、PCR を用いて *chaf-1* 遺伝子に欠損をもつ系統をスクリーニングした。*chaf-1* 変異をホモ接合でもつ系統の単離を試みたが、ホモ接合体は胚性致死の表現型を示すことが明らかとなった。

そこで、この劣勢胚性致死の表現型を *chaf-1-Dam* 融合遺伝子がレスキューするかを検討するために、欠損変異をヘテロ接合でもつ変異体系統に融合遺伝子を導入した。その結果、欠損変異をホモ接合でもつ系統が単離されなかったことから、この融合遺伝子は *chaf-1* 遺伝子の機能の少なくとも一部が失われていることが明らかとなった。この理由として、Dam 遺伝子の融合によってタンパク質の活性が変化したことが考えられる。そこで、今後は、CAF-1 タンパク質の N 末端側に Dam を融合させた遺伝子の作成を試みる。ま

た、*chaf-1* 遺伝子の予測されている遺伝子構造が、本来の C 末端を適切に捉えていない可能性も考えられる。この場合は、*chaf-1* cDNA のクローニングを詳細に行い、異なるアイソフォームが存在するか、検討する必要がある。これらの知見を、今後の研究に生かし、神経系左右非対称性決定機構の更なる解明を目指したい。

<引用文献>

Nakano, S., Ellis, R. E., and Horvitz H. R. (2010). Otx-dependent expression of proneural bHLH genes establishes a neuronal bilateral asymmetry in *C. elegans*. *Development* 137, 4017-4027.

Nakano, S., Stillman, B., and Horvitz H.R. (2011). Replication-coupled chromatin assembly generates a neuronal bilateral asymmetry in *C. elegans*. *Cell* 147, 1525-1536

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)

[学会発表](計 3 件)

Nakano S., “Chromatin and transcriptional regulators establish a bilateral asymmetry in the *C. elegans* nervous system” Epigenetics seminar series, 2013.11. Riken (Saitama, Wako)

Nakano S., Horvitz B. and Mori I., “Tousled-like Kinase Is Required to Generate a Bilateral Asymmetry in the *C. elegans* Nervous System” 19th International *C. elegans* meeting, 2013.6. University of California, Los Angeles (Los Angeles (United States))

Nakano S., “Chromatin and transcriptional regulators act in a cascade to establish a bilateral asymmetry in the *C. elegans* nervous system” UK-Japan Workshop, Neural Epigenetics: From Mechanisms to disease, 2013.2. UK Embassy (Tokyo)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中野 俊詩 (NAKANO, Shunji)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：60608529