

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890114

研究課題名(和文)染色体接着因子コヒーシンによる中枢神経回路形成の制御

研究課題名(英文)Functional analysis of cohesin during CNS development

研究代表者

藤田 幸(Fujita, Yuki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：60631215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：コヒーシンはリング状構造の中に姉妹染色分体を束ねて接着するタンパク質複合体である。また、ゲノムをループ状に束ね、遺伝子間の「区切り」として働くため、遺伝子の転写を制御すると考えられている。コヒーシン変異により生じる疾患では、染色体分配は正常にも拘らず、精神遅滞、四肢の形成異常などの分化発生異常を伴うと考えられている。本研究では、コヒーシンの機能低下が中枢神経の分化・発生に及ぼす影響について検証した。

研究成果の概要(英文)：Cohesin complex is composed of four subunits, Smc3, Smc1, Scc3, and Scc1, and has a role in sister chromatid cohesion, which is crucial for accurate chromosome segregation. Cohesin is also known to be involved in chromatin organization by forming chromatin loops at particular loci and regulate gene expression in postmitotic cells. Disruption of cohesin network results in cohesinopathies such as Cornelia de Lange syndrome. These diseases cause higher brain dysfunction, suggesting the role of cohesin in gene regulation rather than chromosome segregation. In this study, we tested the hypothesis that cohesin regulates genome organization and its deficiency leads to higher brain dysfunction.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経外科学

キーワード：中枢神経

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経回路の形成

中枢神経回路は、神経細胞が正しい方向へ軸索を伸ばし、特定の標的細胞と繋がることで形成される。発生過程において、神経細胞は一度過剰な軸索を伸ばし、その後不要な突起を「刈り込み」によって除去することで、精密な神経回路の形成を可能にする。マウスでは特に、皮質脊髄路を構成する神経細胞軸索の刈り込みが起こることが有名である。このような、中枢神経回路形成の過程では、様々な遺伝子の発現が変化する。

(2) コヒーシン

中枢神経回路形成過程における遺伝子発現調節の仕組みを理解するために申請者はコヒーシンに着目した。コヒーシンは染色体の接着に関わるタンパク質複合体で、4つのサブユニットから構成されるリング状の構造を形成する。このリングの中に、姉妹染色分体を束ねて接着し、染色体を正確に娘細胞へ分配するという、細胞の分裂・増殖に必須の役割を担っている。

一方で、コヒーシンは染色体分配以外にも、転写制御において重要な役割を担うことが報告されている。コヒーシンは、ゲノム上で遺伝子間の“区切り”として機能し、転写制御において重要な役割を担うと考えられている。ヒトのコヒーシン関連遺伝子の変異により引き起こされる疾患である Cornelia de Lange Syndrome (CdLS) では、姉妹染色体分配に異常を呈さないにも拘らず、精神遅滞、四肢の形成異常、心奇形などの分化発生異常を伴うことが知られている。このことから、姉妹染色体分配機能と遺伝子転写調節機能は根本的に異なるものであると推察される。しかし、哺乳類の中枢神経系におけるコヒーシンの機能は明らかになっていない。申請者は、コヒーシンの機能低下が遺伝子の転写調節に変化を及ぼし、中枢神経回路の形成が障害されるのではないかと考えた。この仮説を検証するため、コヒーシンサブユニットの一つである Smc3 欠損マウスを作成し、中枢神経系におけるコヒーシンの機能解析を試みた。

(3) Smc3 欠損マウス

本研究の開始以前に、Smc3 ホモ欠損マウスが、胎生致死(胎生9日以前)であることを確認している。また、Smc3 ヘテロ欠損マウスでは外見上の異常は検出されず、Real-Time PCR法で Smc3 の発現が WT マウスの約 50%に減少していることを確認した。Smc3 ホモ欠損マウスは、コヒーシンの機能の欠如により、細胞の増殖・分裂などに破綻を生じた結果、細胞死が誘導されたと推察される。一方で、Smc3 ヘテロ欠損マウスにおいては、細胞の増殖・分裂への影響は小さく、コヒーシンの遺伝子転写調節機能に異常が生じる可能性が推察される。

2. 研究の目的

本研究は、中枢神経回路形成過程における遺伝子発現調節のしくみを明らかにすることを目的とする。

精密な中枢神経回路の形成過程は、種々の遺伝子発現により調節されている。このことから、包括的に遺伝子の発現を調節する因子が、中枢神経回路の形成において重要な役割を果たすと考えられる。この仮説を、コヒーシン複合体に着目して検証する。

(1) コヒーシンの機能低下により、神経軸索の刈り込みに異常を生じるか調べるため、Smc3 ヘテロ欠損マウスで過剰な軸索が残っているか検証する。

(2) Smc3 ヘテロ欠損マウスで発現の変化している遺伝子を探索する。

(3) 刈り込みが傷害されることで、Smc3 ヘテロ欠損マウスの行動に異常が認められるか検証する。

以上について調べることで、コヒーシン複合体が、遺伝子の転写調節を包括的に制御することによって、軸索の刈り込みという生命現象に寄与するということを明らかにする。これは、中枢神経回路形成の新たなメカニズムを提示するものと期待される。

3. 研究の方法

本研究では、コヒーシン機能低下により、中枢神経回路形成が妨げられるか検討する。特に、皮質脊髄路を構成する神経細胞における、軸索の刈り込みが阻害されるかどうか、Smc3 ヘテロ欠損マウスを用いて、解析する。

(1) コヒーシンの機能低下により、軸索の刈り込みが妨げられるか。

哺乳類の神経細胞におけるコヒーシンの機能は未だ明らかになっていない。マウスにおける軸索の刈り込みにコヒーシンが必要かどうか、逆行性トレーサーを用いて検証する。

刈り込み後の皮質脊髄神経細胞の標識
生後 14 日目の野生型マウス、Smc3 ヘテロ欠損マウスの上丘に、逆行性トレーサー-green fluor microsphere (GFM) を注入する。トレーサーが十分に行き渡る5日後にマウスを環流固定し、矢状断で脳切片を作成、大脳皮質第 V 層の標識された細胞の分布を調べる。皮質脊髄路を構成する運動神経細胞は、大脳皮質運動野(脳の前部)に細胞体を有する。この細胞は生後 3-7 日目の間に、脊髄のみならず上丘へも軸索枝を伸ばすが、生後 10 日目になると、上丘への軸索枝は刈り込みを受け、脊髄に投射した軸索のみが残る。そのため、生後 10 日目以降に上丘に逆行性トレーサーを注入しても、運動野は標識されない。Smc3

ヘテロ欠損マウスで、皮質脊髄路を構成する神経細胞の刈り込みが阻害され、上丘への軸索が残存した場合、運動野も標識されると考えられる。

刈り込み前の皮質脊髄神経細胞の標識
Smc3 ヘテロ欠損マウスでは、軸索の伸長や分枝に影響が出ているのではなく、刈り込みに異常を来すことを示すため、刈り込み前には皮質脊髄神経細胞の軸索の走行に異常がないことを確認する。軸索の刈り込みが起こる前の生後5日目、野生型マウス、Smc3 ヘテロ欠損マウスの上丘に、逆行性トレーサー-GFMを注入する。野生型マウス、Smc3 ヘテロ欠損マウスともに、運動野が標識されることを確認する。

(2) コヒーシンの機能低下により遺伝子の発現は変化するか。
コヒーシン欠損により発現が変化する遺伝子は多数あると予想されるが、特定の遺伝子群の発現に変化が生じるなどの共通性はあるか。コヒーシンの機能低下で発現の変化する遺伝子群を、microarrayにより網羅的に調べる。

発現の変化する遺伝子の探索
軸索の刈り込みが起こり始めると考えられる、生後8日目の野生型マウス、Smc3 ヘテロ欠損マウス的大脑皮質を抽出する。抽出した組織から、RNAを抽出し、microarrayにより発現の変化する遺伝子を探索する。

(3) コヒーシンの機能低下により、運動機能が妨げられるか。
皮質脊髄路は、運動神経細胞より構成され、随意運動を司る。そのため、皮質脊髄路に異常を来すと、運動機能障害を生じると考えられる。上記(1)の結果から、コヒーシンの機能低下により、皮質脊髄路を構成する神経細胞の刈り込みが阻害され、その神経回路網が不適切に形成された場合、運動機能障害が現れると仮説を立て、これを検証する。

4. 研究成果

(1) Smc3 ヘテロ欠損マウスにおける神経細胞の形態変化
当初予定していた方法で、Smc3 ヘテロ欠損マウスにおける神経軸索の刈り込み阻害を検出することは難しかった。この原因として、ヘテロ欠損マウスを使用しているため、刈り込み阻害現象を確認するのに十分な Smc3 の機能欠損ができていないことや、神経細胞以外(グリア細胞)でも Smc3 の機能が減少しているということが推察される。申請者は、Cre-loxP システムを用いて神経回路特異的に Smc3 を欠損させることが可能であると想定している。具体的には Cre を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV-Cre) を作成し、皮質脊髄路神経細胞が存在する的大脑皮質第 V 層に注

入する。

一方で、Smc3 ヘテロ欠損マウス的大脑皮質神経細胞を培養した場合には、コントロールに比べ、軸索が短くなる傾向が認められた。

また、大脑皮質における神経細胞の形態変化が観察された。

(2) Smc3 ヘテロ欠損マウス的大脑皮質における遺伝子発現変化
マウスの発達期(生後1日-21日)に、大脑皮質より RNA を抽出した。回収した RNA を RNA-Seq により解析した結果、Smc3 ヘテロ欠損マウスで発現変動遺伝子が同定された。

(3) Smc3 ヘテロ欠損マウスの行動解析
Smc3 ヘテロ欠損マウスの網羅的行動解析を行っている。

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1件)

1. Fujita, Y., Sato, A. and Yamashita, T. (2013) Brimonidine promotes axon growth after optic nerve injury through Erk phosphorylation. Cell Death Dis. 4, e763

[学会発表](計3件)

(1) 藤田 幸、山下 俊英
中枢神経発生・発達における SMC3 タンパク質の役割
第119回 日本解剖学会総会・全国学術集会
2014年3月27日 - 29日
栃木県 下野市 自治医科大学キャンパス

(2) 藤田 幸、坂東 優篤、白髭 克彦、山下 俊英
コヒーシン欠損による神経新生の抑制
Neuro2013:
第36回日本神経科学大会、第56回日本神経化学学会大会、第23回日本神経回路学会大会
2013年6月20日 - 23日
京都府 京都市 国立京都国際会館

(3) 藤原 慧、藤田 幸、山下 俊英
Identification of a novel binding partner of SIRT1 in neurons
Neuro2013:
第36回日本神経科学大会、第56回日本神経化学学会大会、第23回日本神経回路学会大会
2013年6月20日 - 23日
京都府 京都市 国立京都国際会館

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molneu/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 幸 (Yuki Fujita)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：60631215