

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290011

研究課題名(和文) 霊長類領野特異的発現遺伝子のエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis for epigenetic mechanisms of genes selectively expressed in the primate neo cortex

研究代表者

山森 哲雄 (Yamamori, Tetsuo)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：80260206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：霊長類大脳皮質の代表的領野特異的発現遺伝子の網羅的解析から、特定の領野で発現が多い遺伝子に、視覚野特異的発現遺伝子と連合野特異的発現遺伝子の2群あることを報告してきた。これらの2群の遺伝子の転写を制御するプロモーターのCpG領域のメチル化を調べたところ連合野特異的発現遺伝子では、高く、視覚特異的発現遺伝子では低い事が分かった。更に、メチル化結合蛋白質の一つMBD4の発現は連合野で高く視覚野では低くその発現を操作することによって、連合野特異的遺伝子PNMA5とRBP4の発現を制御できることを示した。

研究成果の概要(英文)：By large scale analysis of genes selectively expressed in certain area in the primate neocortex, we had reported that such genes could be classified two groups: One is high in the association areas and the other is high in the primary visual cortex. We examined the promoter region of representative association and primary visual area selective genes and found high and low methylation levels, respectively. Furthermore, we found that MBD4, a member of MBPs, can control the association area selective genes of PNMA5 and RBP4 by GOF (gain of function) and LOF (loss of function) analysis.

研究分野：分子脳科学

キーワード：大脳皮質 連合野 視覚野 メチル化 MBD4

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、1990年代後半から、霊長類の代表的領域で特異的に発現する遺伝子を網羅的に探索し、その発現解析を詳細に行った。これらの遺伝子発現の制御と機能を解析することを目的として研究を開始した。

霊長類の領域間で顕著な発現の差のある遺伝子を網羅的に探索し、連合野特異的・視覚野特異的な2群に分かれることを明らかにしてきた。本研究計画では、これらの霊長類特異的発現遺伝子の発現機構を解明することを目指して研究を行った。

2. 研究の目的

以上の研究背景から、本研究では、以下の2つを目標に掲げて研究を行った。

- (1) 視覚野と連合野の領域特異的発現を制御している分子機構の解明
- (2) その為の、機能解析と霊長類での解析手段の開発

3. 研究の方法

上記研究目標を達成するため、以下の方法を用いて研究を行った。

(1) 視覚野と連合野特異的に発現する遺伝子の発現制御機構を解明するため、視覚野と連合野特異的に発現する遺伝子の発現制御のエピジェネティック制御機構の解明。

上記の代表的領域で顕著な発現差のある遺伝子群の解析は、主観的なバイアス無しに、発現量の高いものから順に、詳細な解明を行ったものである。各遺伝子は、それぞれ、直接には何の関連性も前提としていないので(各遺伝子それぞれにファミリー遺伝子メンバーがあり、それらには、勿論、相関性がある)各遺伝子のマカカ大脳皮質に於ける詳細な発現パターンを先ず調べ報告した。我々が、先ず最初に報告した遺伝子は、マカカの一次視覚野に顕著に発現する遺伝子で *Occipital 1* (*OCC1*)と命名した(Tochitani et al., 2001)が、この遺伝子は、後に *Na-K ATPase* (*FSTL1*)として、別のグループで、ラット後根神経節で向心性神経入力依存的に、神経伝達物質の放出を抑制的に制御していることが明らかになった(Li et al., *Neuron*. 2011 69:974-987)。しかし、我々が、マカカ一次視覚野に選択的に発現する遺伝子として、同定したセロトニン受容体のサブタイプ (*HTR1B* と *HTR2A*)とは、その機能に自明な相関性はない。しかし、これらの遺伝子発現パターンを比較すると、細かな違いはあるものの、実は、非常に良く似ている。我々は、*HTR1B* 産物である *5HTR2B* は、アゴニストにより、視覚入力刺激に同期した活動が増加し、*HTR2A* の産物である *5HTR2A* は、入力量が小さい時には、視覚野神経活動を増大させ、一方入力量が多い時には、視覚野神経活動を減少させることから、プレシナプスに局在する *5HTR1B* はシグナル(S)/ノイズ(N)比を増大し、一方、後シナプスに多い *5HTR1B* は、ゲイン制御として作動し、S/N比制御の分を補正する。これらの結果は、分子・細胞レベルでみれば、一見何の関係もないような遺伝子群が、例えば霊長類一次視覚野

の機能を協調的に果す為、何らかの協調的な共通した遺伝子発現制御を受けている可能性を示唆する。

連合野特異的に発現する *RBP4*, *PNMA5*, *SLIT1* も機能的連関を分子機能から直ちに類推することは難しいが、*RBP4* と *PNMA5* の発現パターンは、マカカの大脳皮質では、驚く程、似ている(Takaji et al., 2009)。なお、*SLIT1* の発現は、領域特異性という点では、*RBP4*・*PNMA5* との共通性があるが、後者は前者が発現している4層では、発現していないという層発現の相補性を示す。

共同研究者の畑克介は、これらの事実から、視覚野特異的発現遺伝子と連合野特異的発現遺伝子間での相違、及び、視覚野と連合野で共通に発現している遺伝子発現を説明できる何か共通の機構があるのではないかと考えて、視覚野特異的発現遺伝子と連合野特異的発現遺伝子のエピジェネティック制御機構、特にメチル化レベルの相違を調べ、それぞれの遺伝子プロモーターの CpG 領域のメチル化が連合野特異的発現遺伝子では高く、視覚野特異的発現遺伝子では低いことが判った。これを手がかりとして、一連の研究を行い、以下の成果を得た(研究成果の項目に記載)。

(2) 霊長類視覚野における活動依存的遺伝子発現の制御機構の解明

上記の研究から、霊長類の視覚野特異的発現遺伝子のメチル化レベルが非常に低いことが判った。このことは、霊長類視覚野に固有の、或は、進化した発現制御機構が存在する可能性を示唆する。この事を検証する為、これで議論があったマーモセットの眼優位性カラムを最初期遺伝子の発現用いた系で確認し、更に、この系を用いて、霊長類視覚野に於ける転写制御の分子機構を解明することを目指した。

(3) 霊長類の領域特異的発現遺伝子の発現制御と機能解析のため、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入システムの開発。

上記の研究を遂行する為には、霊長類における遺伝子導入システムの開発が必須である。TG マーモセットやノックアウト霊長類の開発も行われているが、分子機構解明のツールとして用いるには、利便性、効率性の点から、ウイルスベクターを用いることがどうしても必要である。その為、我々は、本研究では、特に AAV ベクターを用いた遺伝子導入法を検討した。

4. 研究成果

上記の研究方法に即して以下の研究結果を得た。

(1) 視覚野と連合野特異的発現遺伝子の発現制御機構を解明するため、連合野特異的発現遺伝子 (*PNMA5*, *RBP4*, *SLIT1*) と視覚野特異的発現遺伝子 (*5HTR1B*, *5HTR2A*, *FSTL1/OCC1*) のプロモーターの CpG 領域のメチル化レベルを調べた。その結果、連合野特異的発現3遺伝子の CpG 領域のメチル化レベルは高く、視覚野特異的発現3遺伝子のメチル化レベルは、いずれも低かった。しかし、メチル化レベルは、遺伝子毎に決まっており、視覚野と連合野間で差はなかった。もし、メチル化レベルが連合野特異的発現遺伝子と視覚野特異的発現遺伝子の発現レベルを決定しているとすれば、何

かこれを仲介するものがなければならぬと考えた。そこで、古典的メチル化結合蛋白質 (MBD1,2,3,4,5) の霊長類大脳皮質に於ける発現分布を調べた。その結果、MBD 4 のみが領域間の発現差があり、連合野で選択的に高かった(図1、Hata et al., J. Neuroscience 33, 19704-19714, 2013) に公表)

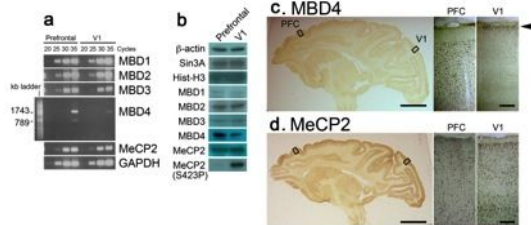


図1

更に CHIP 法で、連合野 (前頭葉) と視覚野の組織から MBD4 の抗体で沈降した DNA にそれぞれの遺伝子に特異的な PCR プライマーで増幅をかけると連合野特異的発現遺伝子のプライマーを用いた場合にのみ増幅がみられた。このことから、MBD4 が連合野に多く、且つ、連合野特異的発現遺伝子と結合していることが判った。そこで、MBD4 が実際に、連合野特異的発現遺伝子の制御に関わっていることを示すため、培養ヒト神経芽細胞を用いて (PNMA5 プロモーターの CpG 領域は、高度にメチル化されているが、MBD 4 は発現していない)、脱メチル化により PNMA5 への結合が起こらなくなり、一方、MBD4 を強制的に発現させることにより、PNMA5 を発現されることが示された。これらの実験から、培養ヒト神経芽細胞においては、PNMA5 プロモーターの CpG 領域のメチル化部位への MBD4 の結合によってその転写が促進されることが明らかになった (図2、Hata et al., J Neurosci., 33, 19074-19714, 2013)

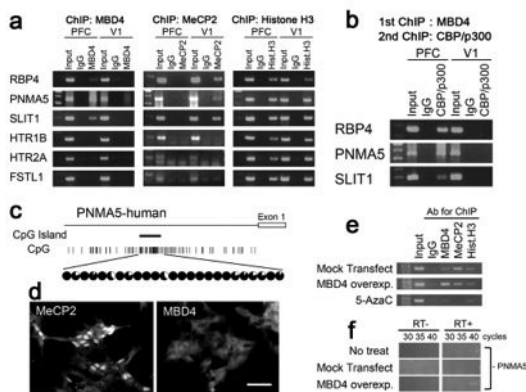


図2

そこで、成熟個体に於ける MBP4 の機能を LoF(loss of Function)と GoF(Gain of Function) を AAV ベクターを用いて調べた。その結果、MBP 4 の発現が高い連合野では、LoF では、PNMA5 と RBP4 の発現が低下し、発現が低い視覚野では、GoF で発現が増加することを証明した(Hata et al., J Neurosci., 33, 19074-19714, 2013)。

(2) 上記のように、霊長類一次視覚野に於いては、視覚野特異的発現遺伝子は、殆どメチル化さ

れていない。そこで、こうした霊長類に於ける非メチル化プロモーターの活動依存的遺伝子発現制御機構を解明するために、マーモセットの一次視覚野に於ける最初期遺伝子の発現を指標に解析する系の立ち上げを目指した。そのため、Markstahler 等(J Comp Neurol .393:118-34, 1998) によって、開発された TTX を片眼に注入、暗闇に 24-48 時間おいた後、光照射によって一次視覚野に誘導される最初期を in situ hybridization 法によって検出することによって、成熟マーモセットに於ける眼優位性カラムの存在の確証を得た (Nakagami Y., et al., Front. Neural Circuits 7, 43, 2013)。この光誘導による遺伝子発現と眼優位性カラムの組織化学的指標をもとに、マーモセット視覚野に於ける活動依存的遺伝子発現制御機構を解明できる系の開発を行った。

(3) 上記の大脳皮質領野特異的発現遺伝子の機能を解析するためには、霊長類に適用可能な遺伝子操作法を確立しなければならなかった。その為に、ウイルスベクター法を用いた遺伝子操作法確立を目指し、AAV ベクターの異なる血清型 (1,2,5,8,9) による感染性の違いをマウス、マーモセット、マカカの大脳皮質で比較した。また、逆行性ベクターと二重感染法を用いた大脳皮質と皮質下結合解析へ適用した ((Watakabe, A., et al., 93, 144-157, 2014; Front Neural Circuits 8, 110, 2014))

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7件)

1、ウイルスベクターを用いた霊長類大脳皮質遺伝子導入システムの開発

Watakabe A, Ohtsuka M, Kinoshita M, Takaji M, Isa K, Mizukami H, Ozawa K, Isa T, Yamamori T. Comparative analyses of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 8 and 9 in marmoset, mouse and macaque cerebral cortex. Neurosci Res 93, 144-157 (2014). (査読有)

2、大脳皮質領野特異的発現遺伝子のメチル化とメチル化結合蛋白質 MBD4 による発現制御
Hata K, Mizukami H, Sadakane O, Watakabe A, Ohtsuka M, Takaji M, Kinoshita M, Isa T, Ozawa K, Yamamori T. DNA methylation and methyl-binding proteins control differential gene expression in distinct cortical areas of macaque monkey. J Neurosci 33, 19704-19714 (2013). (査読有)

3、活動依存的遺伝子発現を用いたマーモセツ

ト視覚野に於ける眼優位性カラムの存在の確証
Nakagami Y, Watakabe A, Yamamori T.
Monocular inhibition reveals temporal and
spatial changes in gene expression in the
primary visual cortex of marmoset. Front
Neural Circuits 7, 43 (2013). (査読有)

〔学会発表・シンポジウム講演〕(計9件)

- Tetsuo Yamamori Gene manipulation in the
marmoset brain 第3回日本マーモセット研
究会大会 2013.12.13 九州大学医学部百年
講堂(福岡)
- 山森哲雄 神経疾患・損傷モデルとしての霊
長類における神経科学的研究 第36回日本
神経科学大会 2013.6.21 国立京都国際会館
(京都)
- 渡我部昭哉, 加藤茂樹, 小林和人, 水上浩明,
小澤敬也, 山森哲雄
TET 重感染法(TEDI)を使った大脳皮質投射ニ
ューロンサブタイプの同時標識 第36回日
本神経科学大会 2013.6.20 国立京都国際会
館(京都)

〔図書〕(計1件)

Chapter 13 Genes Selectively Expressed in the
Visual Cortex of the Old World Monkey in
「Cortical Development: Neural Diversity and
Neocortical Organization」(Kageyama,R. and
Yamamori,T Eds) Springer (Tokyo, Heidelberg,
New York, Dordrecht, London) 2013

〔産業財産権〕

出願状況該当なし

〔その他〕

研究室ホームページ

<[http://www.brain.riken.jp/jp/faculty/detail
s/83](http://www.brain.riken.jp/jp/faculty/details/83)>

<<http://www.nibb.ac.jp/~divspe1/>>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山森 哲雄(Yamamori, Tetsuo)
国立研究開発法人理化学研究所・
脳科学総合研究センター・チームリーダー
研究者番号：80260206

(2) 研究分担者

畑 克介(Hata, Katsusuke)
国立研究開発法人理化学研究所・
脳科学総合研究センター・研究員
研究者番号：20546692