

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640035

研究課題名(和文) 神経活動依存的遺伝子発現制御の1分子イメージングによる解析

研究課題名(英文) A study of neuronal activity-dependent transcription factor dynamics using single-molecule imaging

研究代表者

菅生 紀之(SUGO, Noriyuki)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号：20372625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞において電気活動に依存した遺伝子発現は神経回路の精緻化とその可塑的变化に重要であるが、どのように神経活動が転写制御に影響しているかについては不明な点が多く残されている。本研究では、神経細胞の核内空間における転写調節因子の動態を斜光レーザー顕微鏡による1分子蛍光イメージングによって明らかにすることを旨とした。その結果、神経活動依存的に転写調節因子CREBが核内の同じ場所への結合を繰返すこと明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Neuronal activity-dependent gene expression is necessary for circuit formation and plasticity, although it remains unclear how neuronal activity affects transcription mechanisms. Here, we studied dynamics of transcription factor in cortical neurons, using a single-molecule imaging technique with a highly inclined and laminated optical sheet microscope. We found that the transcription factor CREB appeared repeatedly at highly restricted nuclear locations in response to neuronal activity.

研究分野：神経科学

キーワード：神経細胞 神経活動依存的 転写 1分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は、最終分裂後に適切な領域へ移動し神経回路を形成する。この分化過程は遺伝的に時系列が固定化されている一方、経験や学習といった神経活動にตอบสนองし可塑的に変化する2つの側面を持ち、多様な神経細胞の特性に基づいた脳機能構築に寄与していると考えられる。いずれも遺伝子発現を伴うことが明らかだが、その制御メカニズムは不明な点が多い。遺伝子発現には、ゲノム遺伝子座の転写調節領域に存在する認識配列に結合・解離する転写調節因子によるオン・オフ制御に加えて、エピジェネティックなDNAメチル化やヒストン修飾などクロマチン構造制御が不可欠であることが急速に明らかとなりつつある。

これまで我々はこの問題に対し分子遺伝学的手法と最新のイメージング手法を合わせて取り組んできた。クロマチン制御因子であるヒストン脱アセチル化酵素 HDAC9 に注目し、蛍光タンパク質 EGFP を付加した HDAC9 を発現させ、イメージングにより大脳皮質神経細胞分化での時空間的な分子動態を *in vitro* および *in vivo* で解析した。その結果、HDAC9 は電気活動依存的に核から細胞質へと移動し、遺伝子発現さらに樹状突起の形態形成を制御していることを明らかにしてきた (Sugo et al., 2010)。このような経緯から、核内空間において転写やクロマチン構造を制御する核内因子さらに染色体の時空間的動態こそが細胞分化を決定・維持する重要な要因であり、その素過程をイメージングにより明らかにすることがメカニズムを解明する上で鍵になると考え本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究は神経活動依存的遺伝子発現を染色体の遺伝子座と転写調節因子を含む様々な核内因子の相互作用としてとらえ、それを1分子蛍光イメージングで可視化して詳細に3次元的な核内空間配置と動態をとらえることで新たな観点から神経細胞分化の原理・法則性を明らかにすることを目指した。具体的には、神経活動依存的遺伝子発現制御に関わることが知られている転写調節因子 CREB とその DNA 認識配列である CRE との相互

作用に着目した。生化学的実験により、結合活性は示されており、細胞内でその結合が転写を促進することが示されている。しかし、実際の神経細胞内でその相互作用がどのような時間特性を持つのか、神経活動の状態によって変化するのかに関してはほとんど不明である。この問題に取り組むために、初代培養神経細胞において CREB 動態の1分子蛍光イメージングによる計測を行った。

初代培養神経細胞において核内1分子イメージングの実験系を確立し、CREBの電気刺激にตอบสนองした動態変化を解析する。

神経活動にตอบสนองした転写の場の形成を明らかにするために、CREBが頻度高く結合する遺伝子座の核内空間位置を調べる。

3. 研究の方法

(1) 大脳皮質神経細胞における核内1分子蛍光イメージングの実験系の構築

CREBとCREの相互作用を定量的に解析するために、1分子蛍光イメージングの実験系を構築した(図1を参照)。CREBの可視化には、細胞内に発現させた後に細胞膜透過性の蛍光色素を付加することが可能なタグタンパク質 HaloTag を用いた。初代培養では神経細胞以外の複数の細胞種が混在するので、神経細胞特異的な $T\alpha 1$ プロモーターの下流に HaloTag を付加した野生型 CREB または CRE 配列への結合活性を失った変異体 CREB を連結した発現ベクター p $T\alpha 1$ HaloTag-CREB を構築した。エレクトロポレーション法でこの発現ベクター

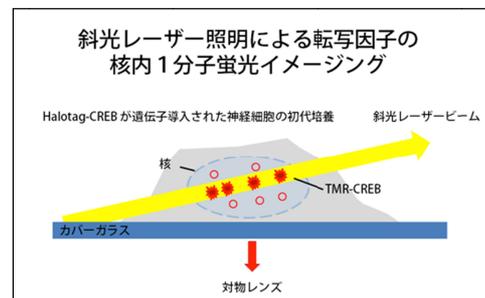


図1. 神経細胞において転写因子 CREB の動態を1分子蛍光イメージングにより計測するための実験系の模式図

をマウス胎児大脳皮質から調整した初代培養神経細胞に遺伝子導入し、その後観察を行う

直前に HaloTag-CREB に共有結合する細胞膜透過性のテトラメチルローダミン (TMR) 標識 HaloTag Ligand を低濃度で培養液中に添加して疎に蛍光標識した (TMR-CREB)。

全反射照明顕微鏡は、一般的に 1 分子蛍光イメージングによく用いられているが、カバーガラス表面に形成されるエバネッセント場よりも遠位に位置する核内分子の観察は不可能である。そこで、核内分子を低いバックグラウンドで 1 分子蛍光の観察が可能であることが示されている斜光レーザー照明顕微鏡を用いて計測を試みた。

(2) 薬理学的手法方法による刺激後の CREB 結合特性の解析

神経活動依存的な CREB の結合特性の変化を解析するため、培養液中に高 KCl 溶液を添加して脱分極を誘導した。反対に、テトロドトキシン (TTX) を添加して活動電位の発生を抑制する操作を行った。加えて、pTα1 HaloTag-CREB に代えて、観察時のみ核内の HaloTag-CREB を低レベルに発現させるテトラサイクリン発現誘導系 (Tet-On) を用いた発現ベクターを構築した。観察の直前に少量のドキシサイクリンを培養液中に添加することで、発現を開始させることが可能である。同様に遺伝子導入と斜光レーザー照明顕微鏡による観察を行った。

(3) 光遺伝学的手法による刺激後の CREB 結合特性の解析

KCl により脱分極を誘導することに加えて、より実際の活動に近い刺激で CREB 動態を調べるために、光遺伝学的手法により活動を操作した。光感受性のチャンネルロドプシン発現ベクターを HaloTag-CREB 発現ベクターと共に大脳皮質神経細胞に遺伝子導入した。パルス状の青色光を照射することで、活動電位を発生させた後に CREB の動態を計測した。

(4) CREB が結合する核内空間場の解析

先行研究である神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞での解析から、CREB の結合が高頻度に誘導される核内の場が存在することが明らかとなり、ホットポイントと定義した。ホットポイントの形成と神経活動の関係を定量的に計測した。

4. 研究成果

(1) 斜光レーザー照明顕微鏡を用いて検出を試みたところ、Tα1 プロモーターにより神経細胞特異的に発現している TMR-CREB の輝点を核内に観察することができた (図 2 を参照)、またその輝点は 1 分子であることを確認した。先行研究として *in vitro* および Neuro2a 細胞の核内で解析を行った結果、定常状態での CREB と CRE 配列との結合時間は数秒間であることが明らかとなった。Neuro2a 細胞と同様に、大脳皮質神経細胞においても

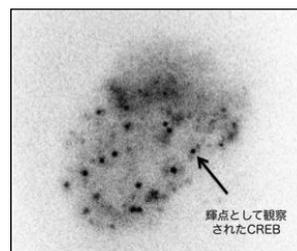


図 2. 核内 1 分子蛍光イメージングにより検出された転写因子 CREB の輝点 (黒点)

核内 TMR-CREB の輝点が一定の位置に留まる時間を結合時間として解析した。その結果、野生型 CREB では神経細胞においても数秒間の結合が観察され、変異体では確かにこの結合が失われていた。以上の結果から、この結合は CRE 配列への結合を示していると考えられる。

(2) Tet-On を用いたベクターを導入したことで、観察時のみ低レベル HaloTag-CREB を発現誘導させることができた。これによって、過剰ではなく内在性 CREB の発現レベルに近い状態で TMR-CREB の動態観察が可能となった。次に、KCl または TTX を培養液中に添加することで、脱分極状態や神経活動を抑制した状態における CREB の動態を観察したが、いずれの状態においても CREB の結合時間に大きな変化は観察されなかった。

(3) チャンネルロドプシンによる光刺激を数分間行った後、直ちに斜光レーザー照明顕微鏡により CREB の動態を調べた。刺激の有効性は、CREB の共役因子である CRTCl の刺激に回答した細胞質から核への移動を指標とした。確かに刺激に回答した CRTCl の移動は観察されたが、CREB の結合時間に大きな変化は観察されなかった。

(4) チャネルロドプシンによる光刺激の前後でホットポイントの検出を行った。Neuro2a細胞の実験では、定常状態でホットポイントが観察されたが、大脳皮質神経細胞ではほとんど観察されなかった。しかし、光刺激後には有意高い頻度でホットポイントが形成されることが明らかとなった。

以上の結果から、*in vitro*の実験とNeuro2a細胞での観察と同様に、大脳皮質神経細胞においても数秒間の結合で転写を誘導しうることが示された。最近の1分子蛍光イメージングを用いた海外の複数の研究グループからの報告において、他の転写調節因子も認識配列への秒オーダーの結合が観察されている。したがって、このような時間オーダーでの転写調節因子の結合でRNAポリメラーゼを含む基本転写装置の会合と転写開始が行われていることが考えられる。

CREBは神経活動に応答して結合時間の特性を大きく変化させることはないが、頻度高く結合する場であるホットポイントの形成に影響することが明らかとなった。今回の研究ではDNA側であるCRE配列の位置を可視化することは実現できなかったが、ホットポイントでは神経活動に応答してCREBとCRE配列の相互作用が繰返されることで、効率よく転写が行われている遺伝子座が存在すると考えられる。つまり、神経活動に対して早い応答性を示すFosのような早期応答遺伝子群での分子動態を観察している可能性がある。また、ホットポイントの形成には、CREBの存在が必要であるが、加えてCRE配列の領域のクロマチン構造変化が重要である可能性が考えられる。

神経細胞の核内で転写調節因子の分子動態を1分子レベルで計測した報告はまだ他に無いが、他の核内因子を含めて今後急速に研究が国内外問わず展開されると考えられる。

<引用文献>

Noriyuki Sugo, Hiroaki Oshiro, Mitsuhiro Takemura, Toshiaki Kobayashi, Yusuke Kohno, Naofumi Uesaka, Wen-Jie Song, and Nobuhiko Yamamoto. Nucleocytoplasmic translocation of HDAC9 regulates gene expression and dendritic growth in developing cortical neurons. *Eur. J. Neurosci.* 31: 1521-1532 (2010).

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 2件)

Noriyuki Sugo, Masatoshi Morimatsu, Yoshiyuki Arai Y, Yoshinori Kousoku Y, Aya Ohkuni, Taishin Nomura, Toshio Yanagida, Nobuhiko Yamamoto. Single-Molecule Imaging Reveals Dynamics of CREB Transcription Factor Bound to Its Target Sequence. *Sci Rep*, 5:10662 (2015) (査読・有)
DOI: 10.1038/srep10662

Björn Granseth, Yuichi Fukushima, Noriyuki Sugo, Leon Lagnado, Nobuhiko Yamamoto. Regulation of Thalamocortical Axon Branching by BDNF and Synaptic Vesicle Cycling. *Front Neural Circuits*, 7:202 (2013) (査読・有)
DOI: 10.3389/fncir.2013.00202

[学会発表](計 6件)

Noriyuki Sugo, Hironobu Kitagawa, Nobuhiko Yamamoto. Activity-dependent movement of CREB in cortical neuron *in vitro*: A study using single-molecule imaging. ASC2016, 2016年3月3日, 同志社大学・寒梅館(京都府・京都市)

Hironobu Kitagawa, Noriyuki Sugo, Nobuhiko Yamamoto. Activity-dependent dynamics of CREB in cortical neurons: A single-molecule imaging study. *Neuroscience 2015*, 2015年10月17日, Chicago (U.S.A)

菅生紀之 Transcription factor dynamics revealed by single-molecule imaging in cortical neurons.

第57回日本神経化学学会大会・第36回日本生物学的精神医学会 合同年会 2014年10月1日 奈良県新公会堂(奈良県・奈良市) 招待講演

北川宏信、菅生紀之、大國紋、山本亘彦 CREB dynamics in neuronal activity-dependent transcription studied by

single-molecule imaging in cortical neurons
国立遺伝学研究所研究会「哺乳類脳の機能的
神経回路の構築メカニズム」2014年12月1、
2日 国立遺伝学研究所（静岡県・三島市）

北川宏信、菅生紀之、山本巨彦 大脳皮質
神経細胞における神経活動依存的な転写調節
因子 CREB 動態の1分子イメージング解析
2014年9月11日
第37回日本神経科学大会 パシフィコ横浜
（神奈川県・横浜市）

菅生紀之 1分子イメージング法を用い
た大脳皮質神経細胞における神経活動依存的
な転写調節因子 CREB の解析 国立遺伝学研
究所研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構
築メカニズム」 2013年12月9日 国立遺
伝学研究所（静岡県・三島市） 招待講演

〔その他〕

ホームページ等

大阪大学大学院生命機能研究科・細胞分子神
経生物学研究室ホームページ

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/neurobiol/>

6．研究組織

(1)研究代表者

菅生 紀之 (SUGO, Noriyuki)

大阪大学・大学院生命機能研究科・助教

研究者番号：20372625

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし