

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430010

研究課題名(和文) ホメオ蛋白質による臨界期の分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Target analyses of Otx2 homeoprotein in postnatal plasticity

研究代表者

杉山 清佳 (SUGIYAMA, Sayaka)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：10360570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：子どもの脳には、経験に応じて神経回路を形成する「臨界期」がある。これまでに、ホメオ蛋白質Otx2が視覚の臨界期を制御することを明らかにした。そこで、Otx2の標的遺伝子としてホメオ蛋白質(転写因子)に注目し、臨界期における作用を検討した。まず、Otx2がプロモーター領域に結合し、直接発現を制御する標的遺伝子を網羅的に探索した。その結果、数種のホメオ蛋白質を同定した。さらに、Otx2は最初期遺伝子(転写因子)の発現を、待機状態(神経活動により即転写を開始できる状態)にすると推測された。このことは、Otx2の標的遺伝子カスケードが回路の可塑性に広く関与することを示唆している。

研究成果の概要(英文)： Neuronal circuits are sharpened by experience during critical periods in early life. We previously demonstrated that Otx2 functions as an inducer of the critical period in mouse postnatal visual cortex. In this study, we investigated Otx2 target genes such as transcription factors or homeoproteins by chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) and cell-type specific RNA-seq analyses for critical period plasticity. Our results suggest some homeoproteins and immediate-early genes (IEGs) as novel targets of Otx2. Otx2 may render the chromatin environment capable of an immediate response to neuronal depolarization and may be required for such a 'poised' state of histone modifications of IEGs promoters. Our data indicates that Otx2-induced genetic cascade is broadly involved in neuronal plasticity as well as critical period.

研究分野：神経回路形成

キーワード：臨界期 ホメオ蛋白質 抑制性介在ニューロン 眼優位性可塑性

1. 研究開始当初の背景

人々の経験則として古くから伝えられる「3つ子の魂100まで」のことわざは、脳の成長では現実の現象として注目されている。外国語やスポーツ、音楽といった習い事は、大人より子どもの上達が早いことを実感した方も多いはず。それは、子どもの脳には経験を柔軟に吸収し、神経回路を機能的に作る特別な時期（臨界期）があるためと考えられている。それでは、なぜ臨界期は子どもの脳だけに現れ、大人の脳には現れないのであろうか。臨界期には記憶・学習と同じメカニズムが働くと考えられ、神経生理学からの観点で主に研究が行われてきた。さらに、記憶・学習の研究蓄積から、回路網の可塑的变化はシナプスの伝達効率や形態の変化に起因すると考えられ、転写・翻訳の必要性が論じられながらも、未だ解明された分子は数少ない。臨界期の分子的理解は未だ進んでいないのが現状である。

2. 研究の目的

子どもの脳には、経験に応じて神経回路を柔軟に形成する「臨界期」がある。これまでに申請者は、ホメオ蛋白質 Otx2 が経験によって大脳視覚野に運ばれ、視覚の臨界期を制御することを明らかにした。胚発生期に脳を作るホメオ蛋白質が生後の脳の発達を促すこと、さらに脳内を移動することを示したこの発見は、世界的にも驚きであった。本研究では、Otx2 の標的遺伝子としてホメオ蛋白質および転写因子に注目し、臨界期への関与を明らかにする。ホメオ蛋白質は、生後の脳においても発現することが知られているが、未だ生後脳における役割が明らかになった遺伝子は数少ない。Otx2 のように、特定の回路の発達・可塑性に関与するホメオ蛋白質（転写因子）を同定し、生後の脳における遺伝子カスケードの役割を追求する。

3. 研究の方法

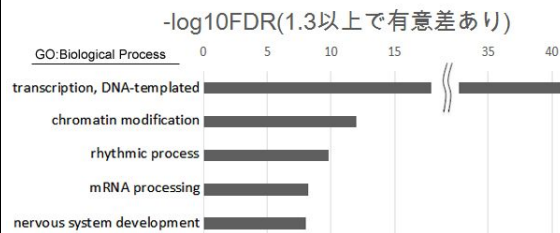
本研究は Otx2 の下流因子としてホメオ蛋白質および転写因子に注目する。

ChIP-seq 解析（クロマチン免疫沈降次世代シーケンス解析）より得られた Otx2 標的遺伝子の中から、Otx2 変異マウスなどを用いて発現解析（RNA-seq, qPCR, 免疫染色）を行い、臨界期に関与するホメオ蛋白質を同定する。同定されたホメオ蛋白質の量を増減させた変異マウスにおいて、臨界期への関与を電気生理学的に明らかにする。

Otx2 の標的遺伝子として転写因子にも注目し、Otx2 が制御し得る遺伝子カスケードの役割を検討する。胎生期と同様に、生後の脳においてもホメオ蛋白質がマスター遺伝子として下流の転写因子群を制御し、臨界期を誘導するのか検討する。

4. 研究成果

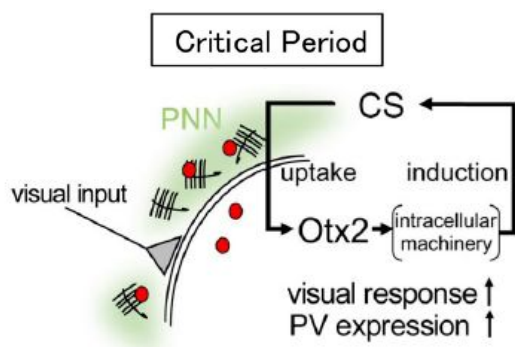
Otx2 は転写因子として良く知られており、臨界期の遺伝子カスケードを誘導すると期待される。これまでに Otx2 の標的遺伝子を網羅的に探索するため、ChIP-seq を行ってきた。3 種類の抗 Otx2 抗体（市販 & 自作：数回作製し、最良の物を精製）を用い、2 種類以上の抗体によって認識される Otx2 結合部位を解析すると、半分以上が転写開始点（TSS）の上流・下流 5 kb 以内に検出された。すなわち、Otx2 は生後の脳においても転写因子として標的遺伝子のプロモーター領域に結合すると考えられた。さらに、得られた標的遺伝子の中には転写関連因子が多く含まれており（図）、特に 23 種類のホメオ蛋白質ファミリーが検出された。この中には、抑制性介在ニューロンの分化や移動に必要とされる Arx や Pax6 などが含まれている。そこで、臨界期に関与する標的遺伝子を絞り込むため、FACS（fluorescence activated cell sorting）により分取した皮質介在ニューロン（内 5 割が PV 細胞）を用いて発現解析（RNA-seq）を行い、臨界期に関与するホメオ蛋白質をスクリーニングした。その結果、いくつかのホメオ蛋白質は、GSEA（gene set enrichment analysis）解析において Otx2 依存的に発現を制御されることが分った。特に、その中の 1 つのホメオ蛋白質については、変異マウスを用いた解析から、視覚の臨界期に異常があることが分ってきている。すなわち、Otx2 以外のホメオ蛋白質が、臨界期に寄与することが示唆された。



Otx2 の結合部位を持つ標的遺伝子について gene ontology (GO) 解析を行うと、転写制御・クロマチン制御因子が最も多かったことから、Otx2 は胎生期と同様、臨界期脳においても転写カスケードを制御すると考えられた（図）。さらに、Otx2 の標的遺伝子には、概日リズムおよび臨界期に関与する転写因子（Clock）も含まれていた。Clock の標的遺伝子は既に公表されており、Otx2 の標的遺伝子と比較すると、ミトコンドリア関連遺伝子などの共通の遺伝子カテゴリーを標的とすることが分った。また、Otx2 の標的遺伝子として、神経活動依存的に発現が増減する最初期遺伝子群が、Otx2 による発現調節を受けることが明らかになった。最初期遺伝子の多

くは、シナプス結合の強度や可塑性に關与することが示唆されている。Otx2 は最初期遺伝子の発現制御領域において「待機状態（神経活動により即転写を開始できる状態）」を作り出す可能性が推測される。このことは、Otx2 と標的となる転写因子カスケードが、臨界期だけでなく、回路の可塑性に広く關与することを示唆している。

一連の解析において、Otx2 の標的遺伝子が臨界期に寄与するのかを検証するにあたり、これまでに臨界期への關与が報告されている遺伝子群にも焦点を当てた。Otx2 は抑制性介在ニューロンの発達を促進することにより、臨界期を制御すると考えられている。GABA 合成酵素 (Gad1/2) やカリウムイオントランスポーター (Kv3.1 等) が Otx2 の標的遺伝子として検出されるなど、Otx2 が転写因子として抑制性介在ニューロンの機能遺伝子の発現制御に關与することが分った。さらに、Otx2 は以前からコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの発現を促進し、抑制性介在ニューロン (PV 細胞) の周囲を取り巻く細胞外基質 (PNN) を構築することが示唆されていたが、本研究により、実際に Otx2 がコンドロイチン硫酸 (CS) 転移酵素 (CSGalNAcT1) を標的遺伝子とすることが分った。その結果、抑制性介在ニューロンの視覚応答が高まり、臨界期が誘導されることが分った。他にも、臨界期に關与することが示唆されている遺伝子群が、Otx2 の標的遺伝子となることから、確かに Otx2 は転写因子として下流の遺伝子カスケードを誘導し、臨界期を制御することが明らかになった。



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 2 件)

原著論文(査読有り)

Hou X., Yoshioka N., Tsukano H., Sakai A., Miyata S., Watanabe Y., Yanagawa Y., Sakimura K., Takeuchi K., Kitagawa H., Hensch TK., Shibuki K., Igarashi M. and Sugiyama S*. (2017) Chondroitin Sulfate Is Required for Onset and Offset of Critical Period Plasticity in Visual Cortex. *Sci.Rep.*

in press.

Sakai A., Nakato R., Ling Y., Hou X., Hara N., Iijima T., Yanagawa Y., Kuwano R., Okuda S., Shirahige K. and Sugiyama S*. (2017) Genome-Wide Target Analyses of Otx2 Homeoprotein in Postnatal Cortex. *Front.Neurosci.*
DOI:10.3389/fnins.2017.00307

[学会発表](計 10 件)

シンポジウム主催 & 招待講演

Sugiyama S: Transcriptional regulation of homeoprotein in postnatal cortical plasticity. The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2017 年 7 月 20 日 ~ 23 日幕張メッセ (千葉県千葉市)

Sugiyama S and Hou X.:

Experience-dependent maturation of inhibitory circuits in ocular dominance plasticity. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2016 年 7 月 20 日 ~ 22 日パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Sugiyama S.: Ocular dominance plasticity regulated by Otx2-inducible molecules. The 58th Annual Meeting of the Japan Society for Neurochemistry 2015 年 9 月 11 日 ~ 13 日大宮ソニックシティ (埼玉県大宮市)

Sugiyama S.: Inhibitory maturation regulates the critical period plasticity for binocular vision. The 120th Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists 2015 年 3 月 21 日 ~ 23 日神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

杉山清佳: コンドロイチン硫酸による量依存的な臨界期制御 第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 1 日 ~ 4 日神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

杉山清佳: コンドロイチン硫酸とホメオ蛋白質による臨界期制御 第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15 日 ~ 18 日国立京都国際会館 (京都府京都市)

杉山清佳: コンドロイチン硫酸による抑制性ニューロンの機能発達と臨界期制御 第 57 回日本神経化学学会大会 2014 年 9 月 29 日 ~ 10 月 1 日奈良県新公会堂 (奈良県奈良市)

杉山清佳: 臨界期の時期を制御する分子たち 第 18 回視覚科学フォーラム 特別企画シンポジウム 2014 年 8 月 18 日 ~ 19 日前橋工科大学 (群馬県前橋市)

学会発表

酒井晶子ら (他 6 名) 杉山清佳: 臨界期におけるホメオタンパク質 Otx2 の活

動依存的な遺伝子発現への関与 第 38 回
日本神経科学会 2015 年 7 月 28 日 ~ 31 日
神戸コンベンションセンター (兵庫県神
戸市)

酒井晶子ら (他 5 名) 杉山清佳: ホメ
オタンパク質 Otx2 の ChIP-seq およびト
ランスクリプトーム解析による臨界期制
御因子の同定 第 37 回日本神経科学会
2014 年 9 月 11 日 ~ 13 日パシフィコ横浜
(神奈川県横浜市)

[図書] (計 3 件)

酒井晶子、杉山清佳 (2017) 臨界期の機
構 - 子どもの脳の柔軟性を紐解く 生体
の科学 68, 54-58.

杉山清佳 (2015) 第 23 章脳発達の臨界期
「分子脳科学」化学同人

杉山清佳 (2015) 臨界期 脳科学辞典
DOI:10.14931/bsd.6426

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等
準備中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 清佳 (SUGIYAMA, Sayaka)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号 : 10360570

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

酒井 晶子 (SAKAI, Akiko)