

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640012

研究課題名(和文) 発生期のエピジェネティック制御による神経細胞の多様化

研究課題名(英文) Developmental epigenetic regulation for neuronal diversity

研究代表者

豊田 峻輔 (TOYODA, Shunsuke)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：10727415

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)：発生初期の胚から生後の脳にわたってのDNAメチル化解析、胎生致死マウスからのiPS細胞株の樹立とキメラマウスの作製、及び単一神経細胞レベルでの遺伝子発現解析と形態解析を行うことで、DNAメチル化酵素Dnmt3b依存的な発生初期の差次的なDNAメチル化がプルキンエ細胞におけるクラスター型プロトカドヘリンの確率的な発現を制御し、樹状突起のパターン形成に関わっていることを世界に先駆けて明らかにした。さらに共同研究として、キメラマウスの脳におけるダブルホールセル記録を行うことで、大脳皮質の細胞系譜依存的な双方向性シナプス結合の形成にも発生期のエピジェネティック制御が関与していることを発見した。

研究成果の概要(英文)：By conducting DNA methylation analysis from the embryo to the postnatal brain, establishment of the iPS cell line from the embryonic lethal mouse and generation of the chimeric mouse, and gene expression analysis and morphological analysis at the single neuron level, we revealed that differential DNA methylation dependent on DNA methylation enzyme Dnmt3b regulates the stochastic expression of the clustered protocadherin genes in Purkinje cells and that it is involved in pattern formation of dendrites. In addition, as a collaborative research, we found that the epigenetic regulation at the developmental stage is also involved in the formation of reciprocal synaptic connections dependent on the cell lineage of the cerebral cortex by performing double whole cell recording in the brain of chimeric mice.

研究分野：神経科学、分子生物学

キーワード：神経細胞 エピジェネティクス 多様性 神経回路 iPS細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

個々の神経細胞は異なる回路特性を持ち個性的な振る舞いをするが、同一の遺伝情報からいかにして独自の個性を獲得するのかは明らかになっていない。クラスター型プロトカドヘリン (*cPcdh*) 分子群は約 60 種の多様化した膜タンパク質で構成されており、個々の神経細胞ごとに異なる *cPcdh* アイソフォームがランダムに発現している (Esumi et al. 2005 Nat Genet; Kaneko et al. 2006 JBC; Hirano et al. 2012 Front Mol Neurosci) (図 1)。また、同一アイソフォーム間でホモフィリックな接着活性が認められ (Schreiner and Weiner 2010 PNAS)、神経回路形成に関与していることが示唆されている (Lefebvre et al. 2012 Nature)。

cPcdh 遺伝子は、 α 、 β 、 γ の 3 つの遺伝子クラスターが縦列したゲノム構造をしており、各クラスターごとに独自のプロモーターを持つ多様化した可変領域エクソン (標的認識を行う細胞外領域をコード) の中から 1 つが選択され、定常領域エクソンとスプライシングされることで選択的に発現している (図 1)。また、対立遺伝子ごとに独立して制御されており、個々の神経細胞ごとに異なる組み合わせの分子種が発現することにより、神経細胞の多様化に関与していることが示唆されている。

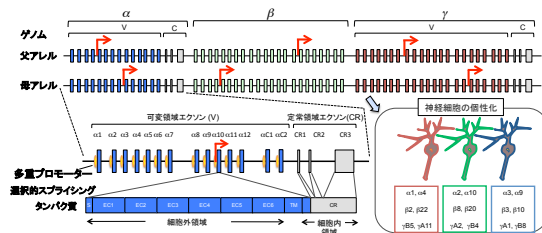


図 1. α, β, γ の 3 つの遺伝子クラスターにより、約 60 種類の遺伝子が縦列したゲノム構造をしている (上図)。独自のプロモーターを持つ多様化した可変領域エクソン (標的認識を行う細胞外領域をコード) の中から 1 つが選択され、定常領域エクソンとスプライシングされることで発現する (左下図)。アレルごとに独立して制御されており (上図)、個々の神経細胞ごとに異なる組み合わせ発現により、神経細胞に多様性を与える (右下図)。

2. 研究の目的

cPcdh 分子種の確率的な発現をもたらす機構として、培養細胞において遺伝子発現とプロモーター領域の DNA メチル化状態が相関していることが以前の研究により報告されている (Tasic et al. 2002 Mol Cell; Kawaguchi et al. 2008 JBC)。しかしながら、生体におけるメチル化機構とその役割についてはあまりよく分かっていない。そこで本研究では、生体における *cPcdh* 遺伝子の DNA メチル化機構とその遺伝子発現に

おける役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

マウス発生過程におけるメチル化パターンを明らかにするために、野生型マウスの胚及び脳を用いたバイサルファイトシークエンス法による解析を行う。また、DNA メチル化関連因子の遺伝子操作を行うことで、メチル化に必須の分子を同定するとともに、定量的 RT-PCR 法を用いることで神経細胞における確率的な遺伝子発現における役割についても明らかにする。これにより、神経細胞の多様化に重要な発生過程のエピジェネティック制御機構の解明を試みる。

4. 研究成果

(1) 生体内における *cPcdh* 遺伝子群の DNA メチル化制御メカニズムを明らかにするために、マウス発生過程における DNA メチル化解析を行った。バイサルファイトシークエンス法を用い調べた結果、*cPcdh* プロモーター領域は、胎生 3.5 日目の胚盤胞ではほとんどメチル化されていなかったのに対し、発生が進むにつれ、主な神経細胞の産生が見られる以前の胎生 9.5 日目にかけてメチル化が亢進し、細胞ごとに異なるメチル化パターンを形成することを見出した (図 2)。

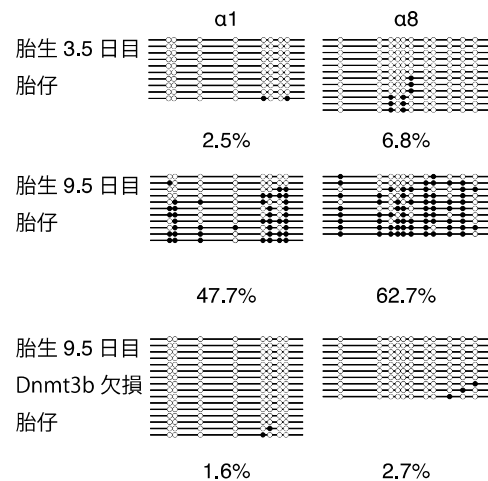


図 2. *cPcdh* 遺伝子のプロモーター領域は胎生 3.5 日目の胎仔ではほとんど DNA メチル化されていないが、発生が進んだ胎生 9.5 日目では DNA 鎖ごとに異なるメチル化パターンが形成されている。一方、*Dnmt3b* 欠損マウスではほとんどメチル化されない。メチル化レベルをパーセントで表示。(横棒: DNA 一本鎖、白丸: 非メチル化シトシン、黒丸: メチル化シトシン)。

(2) 発生過程において、ゲノム全体のグローバルな DNA メチル化は、受精後減少し、着床後 *de novo* DNA メチル基転移酵素 *Dnmt3a* と *Dnmt3b* によって新たなメチル化

パターンが形成される。そこで、胎生 9 日目の各欠損胚の解析を行ったところ、*cPcdh* プロモーター領域は、*Dnmt3a* 欠損胚では野生型と比べ顕著な違いは認められなかったのに対して、*Dnmt3b* 欠損胚ではほとんどメチル化されておらず、*Dnmt3b* が *cPcdh* プロモーター領域の DNA メチル化に必須であることが明らかになった(図 2)。そこで、細胞ごとにランダムな *Dnmt3b* による DNA メチル化が何によって制御されているのかを明らかにするために、クロマチン免疫沈降法を行った。その結果、*cPcdh* 遺伝子のクラスター構造に依存して形成されるヘテロクロマチン状態を目印として、*Dnmt3b* が *cPcdh* プロモーター領域を DNA メチル化していることが明らかになった。

(3) *Dnmt3b* は発生初期に強く発現しており、また、*Dnmt3b* 欠損マウスは胎生 15 日付近で致死となる。そこで、生後の神経細胞における解析を行うために、モザイク実験を試みた。*Dnmt3b* 欠損 ES 細胞における *cPcdh* プロモーター領域はすでに高度にメチル化されていたため、研究代表者らはまず、グリーンマウスとの交配により全身で EGFP を発現している *Dnmt3b* 欠損マウスを作製した。その後、東京大学医科学研究所の中内啓光教授らの研究グループとの共同研究によって、このマウスから iPS 細胞を樹立し、野生型の胚に導入することでキメラマウスを作製した(図 3)。得られたマウスは生後も生きており、脳において EGFP 陽性の *Dnmt3b* 欠損細胞が観察された。平面状に分枝した複雑な樹状突起を伸ばしている小脳プルキンエ細胞の形態を詳細に解析したところ、野生型細胞に比べ *Dnmt3b* 欠損細胞では樹状突起の重なりや束が多く認められ、*Dnmt3b* が樹状突起のパターン形成に必須であることが明らかになった(図 3)。

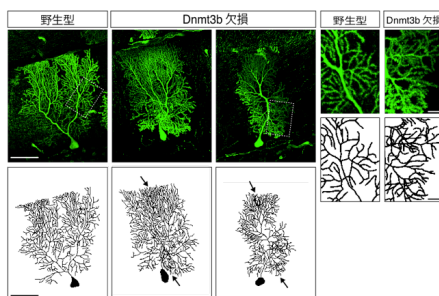
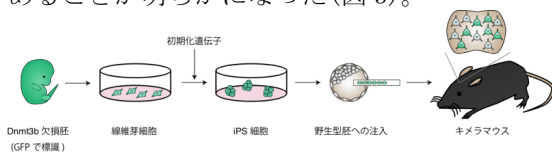


図 3 (上図) *Dnmt3b* 欠損マウスからの iPS 細胞株の樹立とキメラマウスの作製。(下左図) 野生型および *Dnmt3b* 欠損プルキンエ細胞の 3 次元構築像とトレース像。 *Dnmt3b* 欠損により樹状突起の分枝のクロスや束の増加が認められ(矢印)、樹状突起面積が減衰した細胞も観察される。スケールバー 50 μm 。(下右図)拡大図。スケールバー 10 μm 。

(4) 個々のプルキンエ細胞における *cPcdh* アイソフォームの発現を解析するために、キメラマウスの小脳の細胞を分散し、細胞の形態を指標にプルキンエ細胞をピックアップして、ナノデバイスを用いた集積微小流体回路を用いた遺伝子発現解析を行った(図 4)。その結果、野生型のプルキンエ細胞では細胞ごとに異なる *cPcdh* アイソフォームが確率的に発現していたのに対し、個々の *Dnmt3b* 欠損プルキンエ細胞では *cPcdh* アイソフォームの発現頻度が増加し、すべての *cPcdh* アイソフォームを発現している細胞も観察された(図 4)。*cPcdh* 遺伝子は特異的なエンハンサーによって選択されて発現されることが知られている (Yokota et al. 2011 JBC) ことから、*Dnmt3b* 依存的な DNA メチル化は個々の神経細胞におけるエンハンサー依存的な *cPcdh* 遺伝子の確率的な発現の頻度を制御していることが明らかになった。

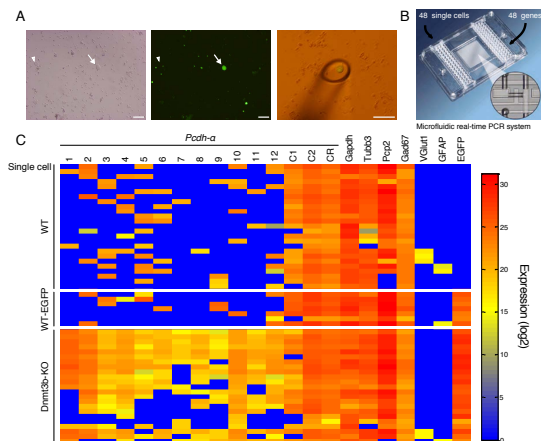


図 4 (A) *Dnmt3b* 欠損キメラマウスの小脳を分散後、EGFP 陽性 (*Dnmt3b* 欠損; 矢印) および陰性 (野生型; 矢頭) プルキンエ細胞のピックアップを行う。(B) 微小集積流体アレイを用いたリアルタイム PCR。(C) 単一プルキンエ細胞 (*Pcp2* 陽性) における *cPcdh* 遺伝子の発現。 *Dnmt3b* 欠損により単一細胞において発現する *cPcdh* 遺伝子の数が増加する。

(5) これらの結果により、発生初期の DNA 修飾が、神経細胞の個性化や樹状突起のパターン形成を制御している新たなエピジェネティック機構が示された(図 5)。*Dnmt3b* はヒト遺伝病 ICF (免疫不全、セントロメア不安定性、顔貌異常) 症候群の原因遺伝子であり、精神疾患との関連性も報告されているが、脳神経系における役割の多くは謎のままであり、これらの疾患の原因解明に貢献することが期待される。この成果については、代表者を筆頭著者として *Neuron* 誌に掲載され (Toyoda et al. 2014 *Neuron*)、Issue Highlight に選ばれるとともに、F1000 にも取り上げられるなど高い評価を得た。国内においては、神経学会及び大阪大学のホームページ上で紹介されるとともに、日刊工業新聞と日経バイオテックにて

報道された。これに関連し、実験医学誌、ライフサイエンスレビュー、再生医療シリーズ (分担著書)にて解説を行った。また、2015年に井上研究奨励賞を受賞した。

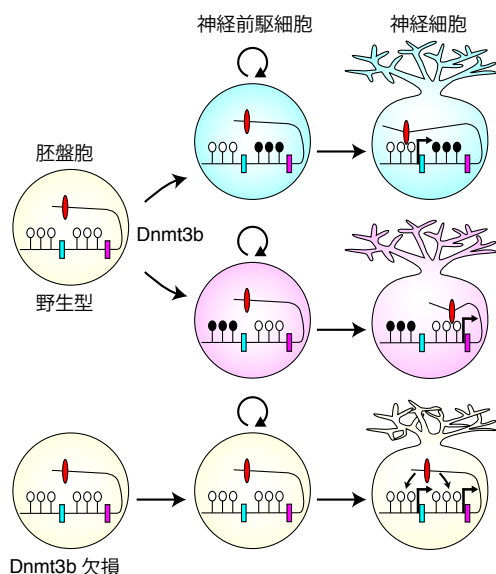


図5 胚盤胞において *cPcdh* プロモーターはメチル化されていない(白丸)が、初期の胚発生時に *Dnmt3b* によって細胞ごとに異なるメチル化パターンが形成される(黒丸)。それにより、細胞系譜ごとに異なる *cPcdh* 遺伝子がエンハンサーによって選択されて発現し、神経細胞の個性化が起こる。一方で *Dnmt3b* 欠損細胞はメチル化されず、すべての *cPcdh* 遺伝子を発現してしまうため、神経細胞の個性化が起きず、局所回路に異常を生ずる。

(6) エピジェネティック修飾は細胞分裂を経ても維持される機構があるため、神経細胞の産生以前に起こる *cPcdh* 遺伝子群のエピジェネティックな多様化が、細胞系譜に依存的な神経回路の特異化に関与している可能性が考えられる。そこで、このことを検証するために、iPS細胞を用いた細胞系譜のラベルを試みた。58種の *cPcdh* 遺伝子群すべてを欠損させた *cPcdh* 全欠損マウス由来の iPS細胞と、野生型及び *Dnmt3b* 欠損の各 iPS細胞を用いて、それぞれキメラマウスの作製を行い、急性スライス標本のバレル皮質第4層において、2つの星状細胞から同時ホールセル記録を行った。その結果、野生型 iPS細胞由来の星状細胞同士では、生後1週齢から3週齢にかけて細胞系譜依存的に双方向性の神経結合の確率が増加するのに対して、*cPcdh* 全欠損または *Dnmt3b* 欠損の iPS細胞由来の星状細胞ではこのような増加が認められなかった。したがって、双方向性の神経結合は細胞系譜に依存して形成され、その過程には *cPcdh* 分子群及び *Dnmt3b* による DNAメチル化が関与することが示唆された(Tarusawa, Toyoda et al. 2016 BMC Biol.)。

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)

- ① Tarusawa E., Sanbo M., Okayama A., Miyashita T., Kitsukawa T., Hirayama T., Hirabayashi T., Hasegawa S., Kaneko R., Toyoda S., Kobayashi T., Kato-Itoh M., Nakauchi H., Hirabayashi M., Yagi T., Yoshimura Y. “Establishment of high reciprocal connectivity between clonal cortical neurons is regulated by the *Dnmt3b* DNA methyltransferase and clustered protocadherins.” *BMC Biology*, 14, 103, 2016. 査読有.
DOI: 10.1186/s12915-016-0326-6
- ② Toyoda S., Kawaguchi M., Kobayashi T., Tarusawa E., Toyama T., Okano M., Oda M., Nakauchi H., Yoshimura Y., Sanbo M., Hirabayashi M., Hirayama T., Hirabayashi T., Yagi T. “Developmental epigenetic modification regulates stochastic expression of clustered Protocadherin genes, generating single neuron diversity.” *Neuron*, 82, pp.94-108. 2014. 査読有.
DOI: 10.1016/j.neuron.2014.02.00. Issue Highlights 及び F1000 に選抜.

[学会発表] (計 5件)

- ① Akiko Ueda, Noriyuki Sugo, Kohei Ohnishi, Shunsuke Toyoda, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto. “Involvement of DNA polymerase β in postnatal development of cortical neurons.” 第39回日本神経科学大会, 2016年7月20日~22日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
- ② Kohei Ohnishi, Noriyuki Sugo, Shunsuke Toyoda, Teruyoshi Hirayama, Takeshi Yagi, Nobuhiko Yamamoto. “DNA polymerase β function in neural progenitors is required for postmitotic neuronal survival and differentiation in the developing cortex” 第39回日本神経科学大会, 2016年7月20日~22日. パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).
- ③ 豊田峻輔, 「Developmental epigenetic regulation for neuronal diversity」 BMB2015 第38回日本分子生物学会年

会, 2015年12月1日~4日, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市). 招待講演.

- ④ Etsuko Tarusawa, Makoto Sanbo, Takahiro Hirabayashi, Sonoko Hasegawa, Ryosuke Kaneko, Shunsuke Toyoda, Toshihiro Kobayashi, Masumi Hirabayashi, Takeshi Yagi, Yumiko Yoshimura. "High reciprocal connectivity between clonal cortical neurons is based on epigenetic regulation" 第38回日本神経科学大会, 2015年7月28日~31日. 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
- ⑤ Shunsuke Toyoda, Takeshi Yagi. "Developmental epigenetic modification regulates stochastic expression of clustered Protocadherin genes, generating single neuron diversity" 9th FENS Forum of Neuroscience, 2014年7月5日~9日, ミラノ(イタリア).

[図書] (計 1件)

- ① 豊田峻輔, 八木健. 「神経回路形成機構」診断と治療社 再生医療シリーズ 脳神経系の発生・再生の融合的新展開, 2015年 (分担共著).

[その他]

- (1) 解説
- ① 豊田峻輔, 八木健. 「発生期におけるエピジェネティックな修飾はクラスター型プロトカドヘリン遺伝子の確率的な発現を制御し個々のニューロンを多様化する」ライフサイエンス新着論文レビュー, 2014年
- ② 豊田峻輔, 八木健. 「神経細胞の多様化に重要な発生初期のエピジェネティック制御」実験医学, 2014年
- ③ 豊田峻輔, 八木健. 「世界に先駆け発見! 神経細胞の個性化と精緻な回路形成に必要な発生初期のDNA修飾メカニズムを解明」大阪大学ホームページ Research at Osaka University "RESOU", 2014年
- ④ 豊田峻輔. 「神経細胞の個性化と精緻な回路形成に必要な発生初期のDNA修飾メカニズムを解明~iPS細胞を用いたキメラマウスの実験で証明~」日本神経科学学会ホームページ, 2014年

(2) ホームページ
研究代表者ホームページ
<http://researchmap.jp/toyoda02/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 峻輔 (TOYODA Shunsuke)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号: 10727415