

## 日本神経化学会奨励賞受賞者研究紹介

### ゲノム高次構造変動による中枢神経回路形成制御

藤田 幸

(大阪大学大学院医学系研究科分子神経科学)

#### はじめに

神経細胞が緻密なネットワークを作る過程は、様々な遺伝子の発現変動によって制御され、遺伝子の発現は環境要因によって変化し得るものである。発生のタイミングに応じて、複数の遺伝子の発現を包括的に制御する仕組みとして、エピジェネティックな発現調節機構が重要な役割を果たす<sup>1)</sup>。エピゲノム制御機構の破綻は様々な神経発達障害群との関連が示唆されており、実際にこれらの病態モデルや病理学的な解析から、DNAメチル化や、ヒストン修飾の異常が見つかっている。これらの知見から、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤などのエピゲノム治療薬の臨床応用も期待されている。このように、DNAメチル化やヒストンアセチル化など、ゲノムを一本の紐状に捉えた場合のエピゲノム修飾機構と脳発生の関連については研究が進んでいる。一方で、ゲノムはタンパク質と同様に、階層的な立体構造をとることが知られている。すなわち、アミノ酸配列としての一次構造が $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ シートなどの二次構造を形成するように、ゲノムもクロマチンループの様な高次構造を形成する。クロマチンループは、エンハンサーなどの制御配列をプロモーターの近傍に配置し、空間的な相互作用を可能にすることで、遺伝子の転写を調節する。中枢神経回路形成過程において、直鎖状ゲノムに対するエピゲノム修飾の重要性が広く認知されつつあるのに対して、ゲノム高次構造と中枢神経回路形成の関連は未だ十分に明らかになっていない。著者は、クロマチンループの形成に重要な染色体接着因子コ

ヒーシンに着目し、ゲノム高次構造による中枢神経回路形成の制御メカニズムの解明に取り組んできた。本稿では、コヒーシンによる中枢神経回路形成制御機構を紹介し、中枢神経回路形成におけるゲノム高次構造の重要性について考察したい。

#### 1. 染色体接着因子コヒーシン

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、ヒトでは、Smc1、Smc3、Rad21、Stag1/2という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(図1)。このリングの中に、細胞周期S期での複製により生じた姉妹染色分体を束ねて接着し(コヒージョン形成)、染色体を正確に分配するという、細胞の分裂・増殖に必須の役割を担っている<sup>2)</sup>。一方で、コヒーシンは染色体分配以外にも、DNA組換え、修復、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。特に転写制御に関しては、染色体上でインスレーター因子CTCFと共局在し、遺伝子間の「区切り」として機能すると考えられている<sup>3)</sup>。すなわち、コヒージョン形成を介してゲノムをループ状に束ね、一つの遺伝子発現制御単位を形成するとともに、離れたエンハンサーを空間的にプロモーターの近傍に配置し、適切な相互作用を可能にする(図1)。

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かかわらず、精神遅滞や四肢の形成異常、心奇形などの分化発生異常を伴うことが知ら

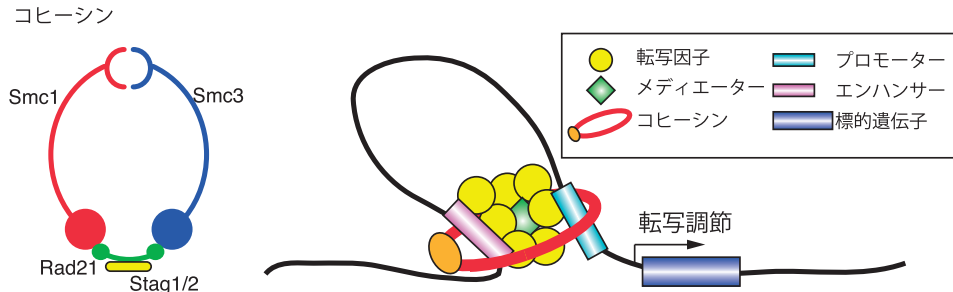


図1 コヒーシンの構造

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、ヒトでは、Smc1, Smc3, Rad21, Stag1/2 という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。

れている<sup>4)~6)</sup>。ヒトでは、コヒーシンの機能低下により精神遅滞などの分化発生異常を伴うことが知られているが、神経系におけるその機能は明らかになっていない。

コヒーシンの転写を調節するという役割をも担うことから、包括的な遺伝子発現調節により、コヒーシンの分化制御に働く可能性が示唆される。特に、細胞周期の停止した分化後の細胞において、コヒーシンによる遺伝子発現調節の重要性が示唆される。酵母や不死化細胞株などの細胞周期が進行している細胞では、コヒーシンの遺伝子発現制御機能に関する研究が進んでいるが、哺乳類神経細胞における細胞周期非依存的なコヒーシンの機能解析は遅れていた。そこで、コヒーシンによる遺伝子発現調節を介した神経細胞の分化制御機構を明らかにすることを目的として研究を進めた<sup>7)</sup>。

## 2. 中枢神経系におけるコヒーシンの発現パターン

マウスでは、大脳皮質の神経細胞は胎生11日目あたりから産生され始める。胎生期～成体期の大脳皮質において、コヒーシンサブユニットのひとつである Smc3 の発現を検証した。まず、胎生期～成体までの各発生段階における Smc3 の発現を Real-time PCR を用いて定量的に検証した。その結果、胎生期～生後にかけて高い発現量が見られ、その後徐々に発現が減少することを見出した。

成体マウスにおいてもその発現が認められており、神経細胞マーカーである NeuN と Smc3 の組織免疫染色によって、大脳皮質 I~IV 層の全層の神経細胞で Smc3 の発現が確認された。Smc3 は脳の局所に発現しているわけではなく、脳の全層の細胞に発現していることが示された。以上の結果から、分化後の神経細胞においてもコヒーシンが発現していることが示された。

## 3. コヒーシンによるシナプス形成制御

中枢神経回路形成におけるコヒーシンの機能を明らかにするため、Cre-LoxP システムを用いて、Smc3 のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。Smc3+/Flox マウスと Wild-type マウスの交配では、Smc3+/+ と Smc3+/Flox がおよそ同数生まれ、メンデルの法則に従った産仔数を示すことがわかった。しかしながら、CAG-Cre マウスとの交配によって得られたヘテロ欠損マウス (Smc3+/-マウス) 同士の交配から、ホモ欠損マウス (Smc3-/-マウス) が産まれることはなかった。コヒーシンの機能が欠損したことによって、全身の細胞で細胞分裂などが障害された結果、胎生致死となった可能性が考えられる。脳の高次機能に関わる大脳皮質において、Smc3 の発現を認めたことから、大脳皮質におけるコヒーシンの機能について検証した。大脳皮質は脳の表面から I~VI 層に分かれた層構造を示す。発生期、神経前駆細胞は脳室付近で産生され、深層 (第 VI 層) か

野生型マウス

コヒーシン機能低下マウス

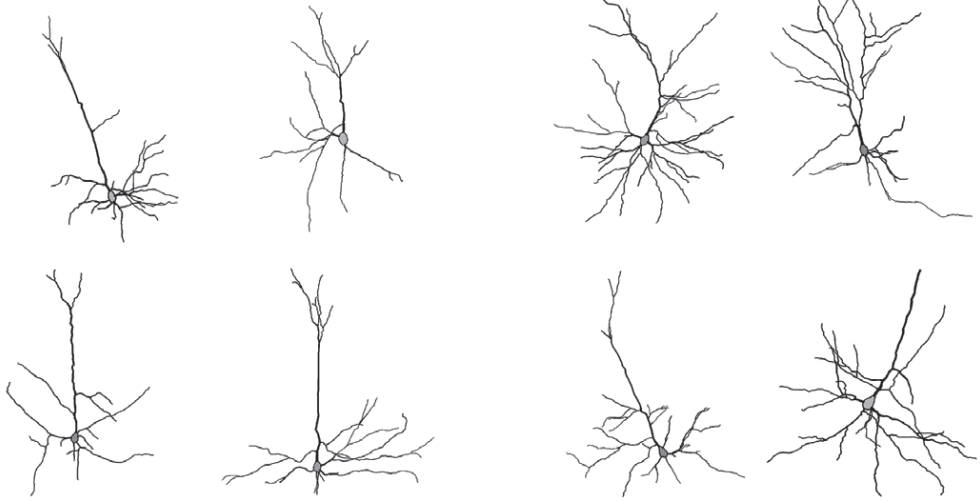


図2 コヒーシン機能低下による樹状突起の複雑化

ゴルジ染色後の大脳皮質第II/III層の神経細胞のトレース像。野生型と比較し、コヒーシン機能低下マウス(Smc3ヘテロ欠損マウス)では、樹状突起の複雑化が見られた。

ら表層(第I層)へと遊走し、層構造が形成される。コヒーシンが大脳皮質の発生における細胞遊走に関わるか検証するため、主に神経細胞を染色するNissl染色を行い、野生型マウス、コヒーシン欠損マウスの大脳皮質の層構造を調べた。胎生期から成体までの各発生段階において、大脳皮質の層構造を検証したが、野生型マウスと比較してSmc3ヘテロ欠損マウスでは大脳皮質の層構造の変化は認められなかった。このことは、コヒーシンは大脳皮質の層構造形成に大きな影響を与えないことを示唆している。

Smc3ホモ欠損マウスは、胎生致死(胎生9日以前)であるのに対し、ヘテロ欠損マウスではReal-Time PCR法によりSmc3の発現が野生型マウスの約50%に減少していることが確認されたが、体重や脳の大きさなど、外見上の異常は検出されなかった。そこで、神経細胞の形態を詳細に調べるため、ゴルジ染色を行った。得られた染色像のトレース像を作成し、Sholl analysisによる解析を行った結果、Smc3ヘテロ欠損マウスでは野生型マウスと比較して、大脳皮質第II/III層の神経細胞の樹状突起の複雑化が認められた(図2)。この

細胞において、樹状突起スパインを観察した結果、Smc3ヘテロ欠損マウスでは、成熟スパインであるキノコ型スパインが減少し、thin型、filopodia型など未熟なスパインが増加していた(図3)。また、Smc3ヘテロ欠損マウスでは、大脳皮質における興奮性後シナプスマーカーPSD-95の発現低下が認められた。これらの結果は、コヒーシンが樹状突起やシナプスの調節など、神経細胞の形態形成や機能的な神経回路形成に寄与することを示唆している。TLCN-Creマウス<sup>8)</sup>を用いて神経細胞特異的にSmc3を欠損させた場合においても、ヘテロ欠損マウスと同様に神経細胞の形態異常が認められた。これらの結果から、コヒーシンは分化後の神経細胞において、細胞周期非依存的に転写を調節し、樹状突起やシナプスの形成を制御していると推察された。

#### 4. コヒーシン機能低下による不安様行動の亢進

コヒーシンの機能が低下すると、脳機能にどのような影響を与えるのか検証するため、Smc3ヘテロ欠損マウスの行動試験を行った。感覚・知覚、

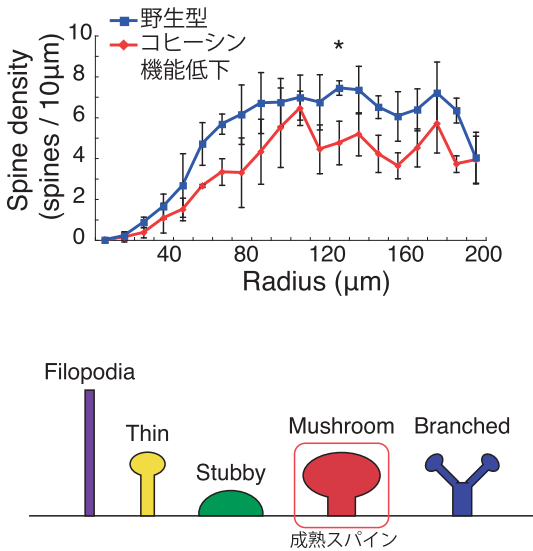


図3 コヒーシン機能低下による成熟スパインの減少  
 ゴルジ染色後の大脳皮質第II/III層の神経細胞の成熟スパインの数を sholl analysis により解析した。野生型と比較し、コヒーシン機能低下マウスでは成熟スパインの密度が減少していた。

運動、情動、学習などの複数の機能評価試験を用いた行動バッテリー試験を行った結果、正常なマウスと比較して Smc3 ヘテロ欠損マウスでは不安様行動が亢進していた。例えば、novelty induced hypophagia test では、マウスを通常飼育しているケージから新しいケージに移すと、環境変化に慣れないため、好物のミルクを飲むまでの時間が延長するが、コヒーシンの機能が低下したマウスでは、正常マウス以上にその時間が延長することから、新規環境の不安様行動が高まっていると考えられた(図4)。神経細胞特異的にコヒーシンの機能を低下した遺伝子改変マウスにおいても同様の結果が得られた。従って、コヒーシンの機能低下により、不安様行動の亢進という脳の高次機能の破綻がもたらされることが示された。

### 5. コヒーシン機能低下による遺伝子発現変動

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、RNA-seq

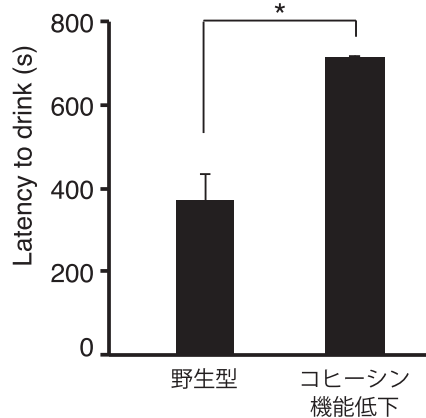


図4 コヒーシン機能低下による不安様行動の亢進

Novelty induced hypophagia test によって、マウスが好物であるミルクを飲み始めるまでの時間を計測した。マウスを通常飼育しているケージから新しいケージに移すと、環境変化に慣れないためにミルクを飲むまでの時間が延長する。コヒーシンの機能が低下したマウスでは、正常マウス以上にその時間が延長した。

を行い検証した。正常マウスと比較してコヒーシンの機能が低下したマウスの脳内で発現が変化する遺伝子を網羅的に調べた結果、免疫系を制御するインターフェロンに関連する遺伝子の発現の増加、特に、Stat1 の発現の増加が見られた。コヒーシンの機能が低下した脳由来の神経細胞を培養した場合、正常なものと比較してシナプス形成が抑制されたが、Stat1 の発現を阻害すると抑制は緩和された。この結果、コヒーシンは一部には Stat1 を介してシナプス形成を調節していることが示唆された。

### おわりに

本研究から、マウスの脳内でのコヒーシンの機能低下によってシナプスの成熟に障害が起こり、不安が高まることが明らかになった(図5)。コヒーシンは遺伝子発現の調整役として働いており、特に免疫応答に関連する遺伝子の制御不全が、この結果を招くと推察された。本研究は、中枢神

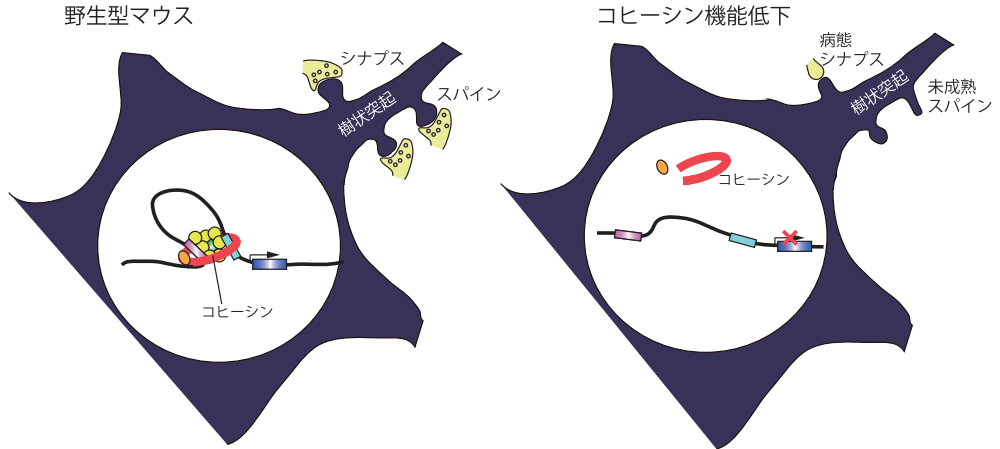


図5 コヒーシンの機能低下による中枢神経回路形成障害

マウスの脳内でのコヒーシンの機能が低下すると、ゲノム高次構造を介した転写調節機序が破綻し、シナプスの成熟が障害される。これにより、不安が高まると考えられる。

経回路形成におけるゲノム高次構造制御の重要性を示唆している。今後は、ゲノム高次構造の変動と神経回路形成・再編成過程の各イベントがどのように連動するのか検証し、正常な脳機能の維持や病態脳における神経回路の破綻・修復のメカニズムを明らかにしていきたいと考える。

## 謝 辞

この度は伝統と名誉ある日本神経化学会奨励賞を賜り、選考委員会の先生方、学会関係者の先生方に厚く御礼申し上げます。また、本稿執筆の機会を与えて下さいましたことに感謝申し上げます。

本研究は、著者が現所属研究室に大学院生として在学中に開始したテーマであり、長い間にわたってご指導戴いております山下俊英教授（大阪大学）に深く感謝申し上げます。また、多くの先生方にご指導、ご協力戴きながら本研究を遂行することができたことは、大変幸運なことであり、厚く御礼申し上げます。特に、白髭克彦先生、坂東優篤先生、中戸隆一郎先生、加藤由起先生、増田晃士先生（東京大学）には、次世代シーケンサーを用いた最先端のゲノム解析方法をご指導戴きました。また、マウスの行動解析につきましては、高雄啓三先生（富山大学）、宮川剛先生（藤田医科大

学）、橋本均先生、吾郷由希夫先生（大阪大学）、田中貴士先生（金沢医科大学）、組織解析には中山雅弘先生（大阪府立母子保健総合医療センター）にご指導戴きました。本研究では条件的ノックアウトのために様々な遺伝子改変マウスを使用しました。これらのマウスは、影山龍一郎先生、今吉格先生（京都大学）、岡部勝先生、原田彰宏先生（大阪大学）、吉原良浩先生（理化学研究所）より分与戴きました。本研究の遂行を経て出会うことのできた先生方との繋がりや知見を大切にしながら、生命現象の根源に近づけるような新しい発見を楽しみたいと考えておりますので、今後ともご指導ご鞭撻を賜りますよう何卒宜しくお願い申し上げます。

## 文 献

- 1) Hirabayashi Y, Gotoh Y. Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. *Nat Rev Neurosci*, 11, 377-388 (2010).
- 2) Nasmyth K. Cohesin: a catenase with separate entry and exit gates? *Nat Cell Biol*, 13, 1170-1177 (2011).
- 3) Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, Tsutsumi S, Nagae G, Ishihara K, Mishiro T, Yahata K, Imamoto F, Aburatani H,



- Nakao M, Imamoto N, Maeshima K, Shirahige K, Peters JM. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*, 451, 796-801 (2008).
- 4) Krantz ID, McCallum J, DeScipio C, Kaur M, Gillis LA, Yaeger D, Jukofsky L, Wasserman N, Bottani A, Morris CA, Nowaczyk MJ, Toriello H, Bamshad MJ, Carey JC, Rappaport E, Kawauchi S, Lander AD, Calof AL, Li HH, Devoto M, Jackson LG. Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nat Genet*, 36, 631-635 (2004).
  - 5) Tonkin ET, Wang TJ, Lisgo S, Bamshad MJ, Strachan T. NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nat Genet*, 36, 636-641 (2004).
  - 6) Gil-Rodríguez MC, Deardorff MA, Ansari M, Tan CA, Parenti I, Baquero-Montoya C, Ousager LB, Puisac B, Hernandez-Marcos M, Teresa-Rodrigo ME, Marcos-Alcalde I, Wesselink JJ, Lusa-Bernal S, Bijlsma EK, Braunholz D, Bueno-Martinez I, Clark D, Cooper NS, Curry CJ, Fisher R, Fryer A, Ganesh J, Gervasini C, Gillessen-Kaesbach G, Guo Y, Hakonarson H, Hopkin RJ, Kaur M, Keating BJ, Kibaek M, Kinning E, Kleefstra T, Kline AD, Kuchinskaya E, Larizza L, Li YR, Liu X, Mariani M, Picker JD, Pie A, Pozojevic J, Queralt E, Richer J, Roeder E, Sinha A, Scott RH, So J, Wusik KA, Wilson L, Zhang J, Gomez-Puertas P, Casale CH, Strom L, Selicorni A, Ramos FJ, Jackson LG, Krantz ID, Das S, Hennekam RC, Kaiser FJ, FitzPatrick DR, Pie J. De novo heterozygous mutations in SMC3 cause a range of Cornelia de Lange syndrome-overlapping phenotypes. *Hum Mutat*, 36, 454-462 (2015).
  - 7) Fujita Y, Masuda K, Bando M, Nakato R, Katou Y, Tanaka T, Nakayama M, Takao K, Miyakawa T, Tanaka T, Ago Y, Hashimoto H, Shirahige K, Yamashita T. Decreased cohesin in the brain leads to defective synapse development and anxiety-related behavior. *J Exp Med*, 214, 1431-1452 (2017).
  - 8) Mitsui S, Saito M, Mori K, Yoshihara Y. A transcriptional enhancer that directs telencephalon-specific transgene expression in mouse brain. *Cereb Cortex*, 17, 522-530 (2007).