

博士論文（要約）

大脳新皮質ニューロンの分化過程における
クロマチン凝集状態の解析

坂井 星辰

【序論】

記憶や学習、運動など重要な機能を司る大脳新皮質の興奮性ニューロンは神経系前駆細胞より生み出される。神経系前駆細胞は分化過程を通じ、神経突起の伸長やシナプス形成を経て成熟したニューロンへと形態的、機能的に成熟することが知られているが、生体内の分化過程においてこのニューロンの初期分化過程がどのような転写因子により制御されているかについては統合的には理解されていない。その理由の一つとして、大脳新皮質では多くの種類のニューロンが異なる時期に次々と生み出されているため、組織レベルの解析では生体内におけるニューロン分化過程での性質の変化を追跡できないことが挙げられる。

そこで本研究では大脳新皮質下層ニューロンの細胞系譜に注目し、生体内の分化過程における転写状態の推移を調べた。さらに、分化したニューロンにおいて特にクロマチンが脱凝集し、オープンになっていた領域に着目することで、ニューロン分化過程において転写状態の制御を担う因子の解析を行った。

【実験方法・結果】

1. 大脳新皮質下層ニューロンの細胞系譜を蛍光標識した

まず大脳新皮質下層ニューロンの細胞系譜に注目し、蛍光標識することを試みた。未成熟ニューロンにおいて一過的に発現する NeuroD1 に着目し、胎生 13 日目に NeuroD1 陽性の未成熟ニューロンを蛍光標識した。標識された細胞は胎生 18 日目において大脳新皮質下層に定着しており (図 1)、将来大脳新皮質下層ニューロンに分化する細胞を蛍光標識することができた。

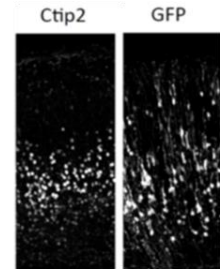


図1: 胎生18日目大脳新皮質において、蛍光標識されたニューロンの多くは大脳新皮質下層ニューロンマーカーのCtip2陽性であった。

2. 大脳新皮質下層ニューロンの生体内の分化過程において多数の遺伝子の発現量が変化した

続いて、標識した大脳新皮質下層ニューロンの生体内での分化過程において、ニューロンが次々と獲得する機能の基盤となる転写状態の変化に着目した。蛍光標識した細胞を様々なステージで単離し、RNA-seq を行うことで分化過程における転写状態の変化を調べた。その結果、胎生 12 日目の神経系前駆細胞から胎生 16 日目のニューロンにかけて発現していた 14,286 個のタンパク質コード遺伝子のうち、その半数以上にあたる 8,403 個の遺伝子の発現量が有意に変化していることが見出された (図 2)。これより、大脳新皮質下層ニューロンの生体内の分化過程においてゲノムワイドに転写状態が制御されている可能性が示唆された。

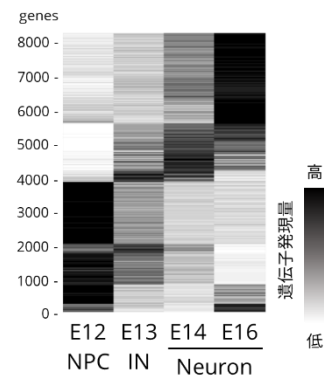
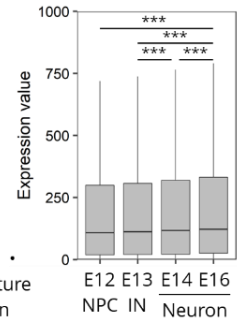


図2: 大脳新皮質下層ニューロンの分化過程で、8,403個の遺伝子の発現量が有意に変化していた。

3. 大脳新皮質下層ニューロンの分化過程においてプロモーター領域のクロマチンの脱凝集と転写の活性化が対応していた

このようなゲノムワイドな遺伝子の転写状態の制御には、「統合的に多数の遺伝子の発現を制御する転写因子」が寄与している可能性がある。そのような転写因子群を同定するため、ニューロン分化過程において活性化度合が変化する転写因子を網羅的に同定することを目指した。

転写因子結合領域のクロマチン凝集状態は、転写因子の活性化度合を反映することが知られている。そこで私は DNase-seq 法により単離した様々なステージの神経系前駆細胞、ニューロンのクロマチン凝集状態を調べた。転写開始点上流 1 kb から下流 0.5 kb で定義したプロモーター領域のクロマチン凝集状態に着目したところ、ニューロン分化過程において新たにプロモーター領域がオープンになった遺伝子の発現量は有意に増加する傾向が観察された (図 3)。これより、大脳新皮質下層ニューロンの分化過程においてクロマチン凝集状態の制御を介して標的遺伝子の転写状態を制御する転写因子が存在する可能性が示唆された。



※IN・・・Immature neuron
Wilcoxon's signed rank test *** p<0.001

図3: ニューロン分化過程においてプロモーター領域がオープンになる遺伝子の発現量が有意に増加した。

4. 大脳新皮質下層ニューロンの分化過程において、NPC において”bivalent”なヒストン修飾が導入されていた領域が特にオープンになっていた

続いて、これまでに ChIP-seq で調べられた、様々な転写因子の結合領域のデータベースである ChIP-atlas を用いて、ニューロンにおいてオープンな領域に特に結合する転写因子を網羅的に探した。するとそのような領域には、ES 細胞において Trithorax 複合体や Polycomb 複合体といったヒストン修飾の導入に関わる複合体の構成因子の結合領域が特に濃縮していたことがわかった (図 4)。これらの複合体は”bivalent”修飾という、促進性の H3K4me3 修飾と、抑制性の H3K27me3 修飾の両方を併せ持つ修飾の導入に寄与していることが知られており、また、プロモーター領域に bivalent な修飾が導入された遺伝子の中には発生関連遺伝子が特に濃縮していることが知られている (Bernstein et al., 2006)。そこで私は胎生 12 日目の神経系前駆細胞において ChIP-seq を行い、神経系前駆細胞の段階で”bivalent”な修飾が入っている領域を同定した。すると、この”bivalent”領域はニューロン分化過程で特にオープンになっており、また、近傍の遺伝子の発現が有意に増加していることがわかった (図 5)。これよりニューロン分化過程において、特に”bivalent”な修飾が導入されている領域において、クロマチン凝集状態の制御を介して転写状態を制御する転写因子が重要な役割を果たしていることが示唆された。

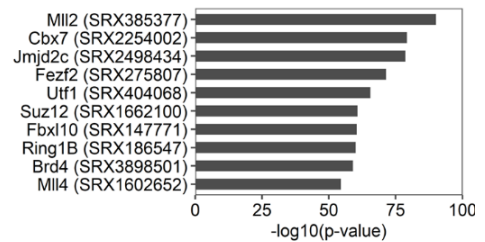
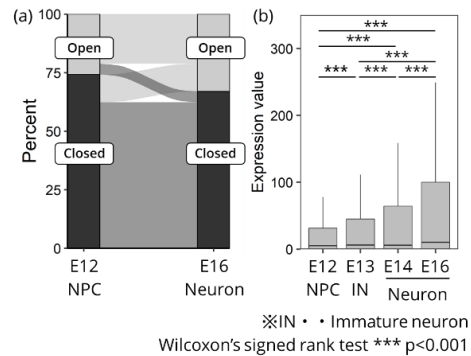


図4: 胎生12日目の神経系前駆細胞においてオープンだった領域と比較して、胎生16日目ニューロンにおいてオープンだった領域に結合領域が濃縮していた上位10転写因子。



※IN・・・Immature neuron
Wilcoxon's signed rank test *** p<0.001

図5: 神経系前駆細胞において”bivalent”な修飾が導入されていた領域のニューロン分化過程における (a) クロマチン凝集状態の変化および (b) 近傍の遺伝子の発現量の変化

5. Dmrt3/a2 は神経系前駆細胞において”bivalent”な修飾が導入された遺伝子の抑制に必要である

ニューロン分化過程において神経系前駆細胞の段階で”bivalent”な修飾が入っていた領域の脱凝集に寄与する転写因子を探すため、そのような領域に特に多く含まれる DNA 配列モチーフを探した。すると、そのような領域には Dmrt3 の結合モチーフに似た DNA 配列モチーフが濃縮していた。Dmrt3 は同じファミリーに属する Dmrt2 と協調して標的遺伝子を抑制する転写抑制因子であり (Sauliner et al., 2013)、大脳新皮質下層ニューロンの分化過程ではどちらも発現量が有意に減少していた。これより、Dmrt3 および Dmrt2 が神経系前駆細胞においてその後のニューロン分化過程において活性化する遺伝子の抑制に寄与している可能性が考えられる。

そこでプロモーター領域に”bivalent”なヒストン修飾およびこの配列モチーフを持つ遺伝子に注目した。するとこれらの遺伝子の中にはイオン輸送やシナプス伝達などニューロンに深く関わる機能に関連した遺伝子が濃縮しており、分化過程において発現量が有意に増加していた (図 6)。さらにこれらの遺伝子の発現量は、胎生 12 日目の終脳において Dmrt3/a2 ダブルノックアウト個体で有意に増加していた (図 7)。これらの結果より、神経系前駆細胞において Dmrt3/a2 がプロモーター領域に”bivalent”な修飾が導入された遺伝子の抑制に必要であることが示唆された。

【まとめと今後の展望】

本研究において大脳新皮質下層ニューロンの生体内での分化過程を追跡することで、分化過程において非常に多くの遺伝子の発現量が変化していることを見出した。また同時期にクロマチン凝集状態も変化しており、特に神経系前駆細胞において”bivalent”なヒストン修飾状態が導入された領域がオープンになり、近傍に存在する遺伝子の発現量が有意に増加することを見出した。この分化過程にクロマチンがオープンになる領域には Dmrt family の結合配列に似た DNA 配列モチーフが濃縮しており、Dmrt3/a2 のダブルノックアウトにより終脳においてこの領域の近傍に存在する遺伝子の発現量が上昇することから、Dmrt3/a2 が神経系前駆細胞において”bivalent”な修飾が導入された遺伝子の抑制に寄与している可能性が示唆された。

これらの結果から、現在「Dmrt3/a2 の発現量の減少が生体における大脳新皮質下層ニューロンへの分化のトリガーとなる」という仮説を考えている。これまでの先行研究において、ニューロン分化過程に神経系前駆細胞において Polycomb 複合体により H3K27me3 修飾が導入された遺伝子が、Utx や Jmjd3 といったヒストン脱メチル化酵素の機能を介して活性化することが報告されている (Dhar et al., 2016; Tang et al., 2017)。しかし、これらの遺伝子の活性化は同時には起こらず、ニューロン分化の過程で特定の遺伝子群のみを特定の時期に活性化するメカニズムについては不明であった。今後本研究において見出した Dmrt3/a2 と Polycomb 複合体の転写抑制における協調関係をさらに解析することにより、生体内のニューロン分化過程におけるニューロン関連遺伝子の活性化メカニズムの一端が解明されることが期待される。

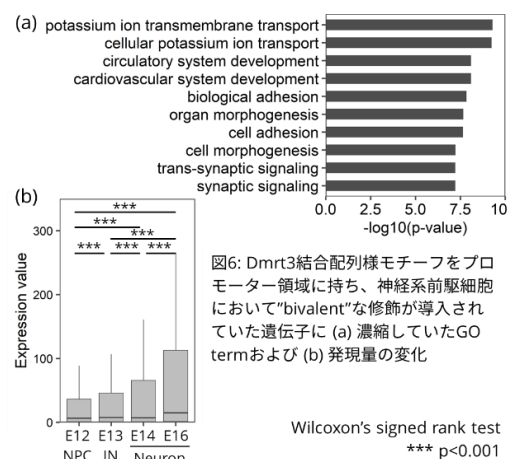
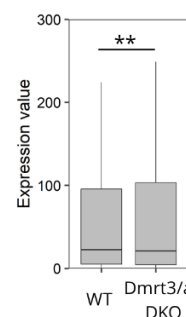


図6: Dmrt3結合配列様モチーフをプロモーター領域に持ち、神経系前駆細胞において”bivalent”な修飾が導入されていた遺伝子に (a) 濃縮していたGO termおよび (b) 発現量の変化

Wilcoxon's signed rank test
*** $p < 0.001$



Wilcoxon's signed rank test ** $p < 0.01$

図7: Dmrt3/a2 ダブルノックアウトマウスの胎生12日目終脳における、Dmrt3結合配列様モチーフをプロモーター領域に持つ”bivalent”遺伝子の発現量