

博士論文

発生期マウス脳における
ニューロン成熟に対する HP1 γ ならびに
HP1 γ リン酸化の機能解析

大城 洋明

目次

略語一覧	2
緒言	4
序論	5
材料と実験方法	15
結果	23
結論および考察	57
結言	64
参考文献	65
発表履歴	71
謝辞	73

略語一覽

5hmC	5-hydroxymethylcytosine
5mC	5-methylcytosine
aCSF	artificial cerebrospinal fluid
ATP	Adenosine triphosphate
BAC	Bacterial artificial chromosome
Baf	Brg/Brahma-associated factor
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BrdU	Bromodeoxyuridine
Brn2	Brain-specific homeobox/POU domain protein 2
BSA	Bovine serum albumin
CaMK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
CHD	Chromodomain
CP	Cortical plate
CREST	Calcium-responsive transactivator
CSD	Chromoshadow domain
Ctip2	COUP-TF interacting protein 2
Cux1	Cut-like homeobox 1
~DIV	~ days in vitro
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
Dnmt	DNA methyltransferase
E~	Embryonic day ~
EdU	Ethynyldeoxyuridine
EGFP	Enhanced GFP
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	Green fluorescent protein
HAT	Histone acetyltransferase
HDAC	Histone deacetylase

HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMT	Histone methyltransferase
HP1	Heterochromatin protein 1
IMZ	Intermediate zone
IRES	Internal ribosome entry site
JHDM	Jumonji domain-containing histone demethylase
JNJD	Jumonji domain-containing protein
Luc	Luciferase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBD	methyl-CpG-binding domain protein
MeCP2	Methyl CpG binding protein 2
MEK	Mitogen/extracellular signal-regulated kinase
MSK	Mitogen and stress activated protein kinase
P~	Postnatal day ~
Pax6	paired box 6
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protein kinase A
Pol II	RNA Polymerase II
RNAi	RNA interference
SDS	Sodium dodecyl sulfate
shRNA	short hairpin RNA
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
Suv39h1	Suppressor of variegation 3–9 homologue 1
SVZ	Subventricular zone
SWI/SNF	Switch/sucrose nonfermentable
TBS	Tris-buffered saline
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
VZ	Ventricular zone

緒言

私達の脳は、体全体を機能的にコントロールするだけでなく、思考や情動など精神活動にも重要な役割を担っている。脳がこのような高次機能を司るためには、膨大な数のニューロンやグリアが作り出す、複雑且つ秩序だったネットワークの形成が必須である。このネットワーク網を形成するには、個々のニューロンがその成熟過程において、正しく突起を伸長し、他のニューロンと正確に連結することが欠かせない。では、個々のニューロンはどのようにして正しく成熟するのだろうか。また、ニューロンは多数の独特な形質を発現するが、ニューロン成熟過程において、どのようにして多数の形質を獲得することができるのだろうか。

本研究において、私はネットワークの主たる構成要素であるニューロンに関して、その成熟の調節について解析を試みた。そして、ニューロンが数多くの独特な形質を協調的に獲得するメカニズムの解明を目指した。特に遺伝子発現に重要だと考えられるクロマチン制御因子に着目し、HP1 γ ならびにそのリン酸化がニューロン成熟に寄与することを明らかにした。

本博士論文においては、この結果について報告する。

序論

ニューロンの分化、成熟

我々の脳は、外界からの情報を処理し生物の複雑な思考や行動を司るといふ、非常に高度な機能を有する器官である。脳は主に、様々な種類のニューロンと、アストロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞から構成されている。中でもニューロンは、外界からの情報を処理するために中心的な役割を果たす細胞であり、ニューロンが適切な神経回路網を形成することが脳の機能発揮に重要であると考えられている。一般に、ニューロンは他のニューロンからの入力を多数の樹状突起や細胞体上で受容する。受容された様々な入力は細胞体で統合され、入力 of 総和に応じて軸索から他のニューロンにシグナルを出力する。このようにして、ニューロンは神経回路網の素子として機能していると考えられる。ニューロン同士のシグナルの入出力の場となる接合部はシナプスと呼ばれ、分子的、形態的に非常に特徴的な構造を有している。また、ニューロンは情報伝達の手段として、膜電位変化による電氣的信号を用いている。ニューロンは分極した膜電位を保持し、また興奮時には脱分極反応を生じる。実際には、定常状態において細胞内は細胞外に比べておよそ -70 mV 負の電位 (静止膜電位)を示す。また、外部刺激などによる興奮時には膜電位は $+40\text{ mV}$ 程度まで上昇する。このような膜電位確立や膜電位変化を起こすために、ニューロンの細胞膜上にはナトリウムチャンネルやカリウムチャンネル、ナトリウム-カリウム交換イオンポンプなど、膜電位を変化させるために必要な多種のチャンネルやポンプなどが存在する。

このように、ニューロンは軸索や樹状突起、シナプス、分極した細胞膜など、分子的、形態的に独特な形質を有している。これらの形質の多くは、ニューロンが産生され、適切な場所へと移動した後に獲得されると考えられている。本研究で着目する発生期大脳新皮質においては、ニューロンは脳室帯 (Ventricular zone, VZ) と呼ばれる脳室に面した領域に存在する未分化な神経系前駆細胞から産生される。産生されたニューロンはVZを離れ、脳室下帯 (Subventricular zone, SVZ)、中間帯 (Intermediate zone, IMZ) を通って、皮質板 (Cortical plate, CP) へと到達する。脳表層へと到達したニューロンは移動を停止し、定着する

(Gupta *et al.* 2002)。そして、軸索、樹状突起形成や膜電位の変化に必須なチャネル類の発現、シナプス構成因子群の発現など、多くの形質を移動完了後に獲得し、複雑で緻密な神経回路網が形成される。

ニューロンの成熟過程においては、各々の形質に関わる多数の遺伝子の転写状態が変化することが重要であると考えられる。ここで、本研究におけるニューロンの成熟過程とは、神経系前駆細胞がニューロンに運命決定し最終分化し、移動停止後に様々なニューロン特異的形質を獲得していく過程である。実際に、マイクロアレイを用いた解析から、ニューロンの成熟過程において、7,000個近い遺伝子の発現様式が変化することが知られている (Kaur *et al.* 2014)。しかしながら、ニューロンの成熟過程において、どのようにして多数の遺伝子群が協調的に制御されるかについては、ほとんど明らかにされていない (Figure 1)。

ニューロンは様々な外部からの情報を処理し、伝達していく。外部からのシグナルは、ニューロンの成熟を調節することが良く知られている。マウス大脳新皮質においても、外部シグナルが、ニューロンの軸索、樹状突起などの伸展に寄与することが報告されている (Cancedda *et al.* 2007; Mizuno *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007)。また、神経活動や神経栄養因子などの外部シグナルの下流で活性化するシグナル伝達経路が、ニューロンの成熟に寄与することも報告されている (Dijkhuizen & Ghosh 2005; Ageta-Ishihara *et al.* 2009)。このような外部シグナルによるニューロン成熟においても、多数の遺伝子の転写状態の変化することが知られている (Lin *et al.* 2008)。

クロマチンと遺伝子の発現

真核生物においては、非常に長いゲノムが核内に収納されている。これを可能にするために、ゲノムはクロマチンと呼ばれる構造をとっている。クロマチンは、およそ146 bpのDNAがコアヒストン8量体に巻きついたヌクレオソーム構造を最小単位とする。それがさらに折りたたまれて、30 nmファイバーなど、様々な高次構造をとる。このようにヌクレオソームが折りたたまれる際には、ヒストンH1などのリンカータンパク質やその他の構成因子が寄与する。

クロマチンの構造は、その部位に存在する遺伝子の転写状態と密接に関係している。例えば、クロマチンの凝集が少ない部位に存在する遺伝子は、転写因子などがよりDNAに接近しやすいために転写されやすくなっている。逆に、クロマチンがより凝集した部位では、転写されにくくなっていることが知られている。(Figure ii)。このように、遺伝子の発現制御にクロマチンの凝集状態が深く関与していると考えられる。クロマチンの凝集状態は、コアヒストンN末端の修飾やDNAのメチル化、さらにそれらを認識するクロマチンリモデリング因子やDNA結合タンパク質、ヒストン結合タンパク質などによって制御される。

クロマチン状態の制御

ヌクレオソームを構成するコアヒストンのN末端は、ヒストン8量体から突き出ているため、様々な修飾を受けることが知られている。具体的には、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO化などである (Kouzarides 2007)。なかでも、メチル化、アセチル化に関して遺伝子の転写制御への寄与が数多く報告されている。

ヒストンのメチル化は、主にリジン残基 (K)とアルギニン残基 (R)に起こる。非常に多く報告されているが、例えば、ヒストンH3のK4、K9、K27やヒストンH4のR3、K20などである。(Portela & Esteller 2010) (Figure iii)。ヒストンのメチル化は、ヒストンメチル化酵素 (Histone methyltransferase, HMT) によって付与され、脱メチル化酵素 (Histone Demethylase) によって外されることが知られている。それぞれのリジン残基、アルギニン残基に対して、特異的なヒストンメチル化酵素、脱メチル化酵素が存在する。例えば、H3K9のメチル化酵素としてSUV39H1,2やG9a、脱メチル化酵素としてJumonjiファミリータンパク (JHDM2AやJMJD2A、JMJD2C)が知られている (Zhang & Reinberg 2001)。

ヒストンのアセチル化は、リジン残基に起こることが知られている。例えば、ヒストンH3のK9、K14やヒストンH4のK16、K20などである (Figure iii)。これらのアセチル化は、ヒストンアセチル基転移酵素 (Histone acetyl transferase, HAT) によって付与され、ヒストン脱アセチル化酵素 (Histone deacetylase, HDAC) によって外されることが報告されている。

DNAのメチル化は、遺伝子のプロモーター領域に存在するCpG配列上のシトシン5位の炭素 (C)にメチル基が付与され、5-メチルシトシン (5-methylcytosine, 5mC)となることで起こる。この反応は、DNAメチル化酵素 (DNA methyltransferase, DNMT) DNMT1、DNMT3A、DNMT3Bによって触媒される。また、近年Tetファミリータンパク質がメチル化シトシンをヒドロキシメチルシトシン (5-hydroxymethylcytosine; 5hmC)へと変化させる働きがあることが報告されている (Ito *et al.* 2010)。この5hmCは、5mCと局在が異なり、ユークロマチンのような転写が許容されている領域に起こっていることが知られている (Mellen *et al.* 2012)。

DNAのメチル化、ヒドロキシメチル化は、MeCP2やMBDといった分子に認識され、遺伝子の転写を抑制すると考えられている。MeCP2は、BDNFなど多くのニューロン関連遺伝子のメチル化されたDNAに結合し、HDACなどの様々なco-repressorを誘導することで転写を抑制することが知られている。

その他にも、ATP依存性クロマチンリモデリング複合体がクロマチン状態を制御することが知られている。この複合体は、ATP加水分解によって得られるエネルギーを用いてクロマチン構造を変化させていると考えられている (Mohrmann & Verrijzer 2005)。

ニューロン成熟とクロマチン状態の制御因子

これまでに、前述のクロマチン状態を制御する因子とニューロンの分化・成熟との関連が報告されている。例えば、Class II HDACの一つであるHDAC9は、神経活動によってリン酸化され、核外へと移行する。リン酸化変異体を用いた実験から、この神経活動依存的なHDAC9の核外移行は、c-fosの発現に重要であること、また樹状突起の伸展に寄与することがわかっている (Sugo *et al.* 2010)。

また、DNAメチル化の一つである5hmCは、大脳新皮質のニューロン成熟に従い、核全体で増加することが観察されている (Hahn *et al.* 2013)。5mC、5hmCに結合することが知られているMeCP2は、ゲノム上複数の場所に存在し、グローバルにクロマチン状態、遺伝子の転写状態を制御することが示唆されている (Mellen *et al.* 2012; Baker *et al.* 2013)。さらに、MeCP2は神経活動依存的にリ

ン酸化され、そのリン酸化が樹状突起形成やシナプス伝達に影響を与えることが報告されている (Cohen *et al.* 2011)。

さらに、ニューロンの成熟過程において、SWI/SNFクロマチンリモデリング複合体の構成因子の発現が変化することがわかっている。ニューロンに分化する際に、Baf45b, Baf45c, Baf53bの発現が増加する。また、Baf53bを含むnBaf複合体は、CRESTと共役し、Ephexin1の発現量を調節することにより神経活動依存的な樹状突起の伸長に寄与している(Wu *et al.* 2007)。また、神経活動依存的なSWI/SNF複合体の働きには、Ca²⁺シグナルにより活性化するCRESTが重要な働きを果たすことがわかっている (Qiu & Ghosh 2008)。

このように、多くのクロマチン制御因子がニューロン成熟に寄与することが示唆されている。しかし、ここに挙げた以外のクロマチン構成因子や制御因子に関しても、ニューロン成熟に寄与する可能性は十分考えられる。

Heterochromatin protein 1 (HP1)

Heterochromatin protein 1 (HP1)は、非ヒストン染色体タンパク質であり、構成的ヘテロクロマチンの構成因子として同定された (Eissenberg *et al.* 1990)。HP1ファミリータンパクは、出芽酵母を除くほぼ全ての真核生物で保存されており、ヘテロクロマチンの形成や維持、染色体分配、遺伝子発現の調節に寄与することが知られている (Fanti & Pimpinelli 2008)。一般的に、HP1ファミリータンパクは2つのよく保存されたドメインを保持している。N末端側に存在するchromodomain (CHD)はクロマチンへの結合に必要であり、C末側に存在するchromoshadow domain (CSD)はタンパク間の結合に重要であると考えられている (Paro & Hogness 1991; Aasland & Stewart 1995; Bannister *et al.* 2001)。また、これら2つのドメイン間にあるhinge regionは多様であり、クロマチンやDNA、RNAなどとの結合に重要であると考えられている (Zhao *et al.* 2000; Meehan *et al.* 2003)。HP1は、CHDによってH3K9のメチル化を認識する。また、HP1はH3K9メチル化のHMTであるSuv39H1と結合することが知られており、H3K9のメチル化ドメインの調節に重要な役割を果たす (Stewart *et al.* 2005)。また、HP1はDNMTと結合することも報告されており、DNAのメチル化を介して転写抑制に寄与することも可能だと考えられる (Fuks *et al.* 2003)。さらに、HP1はLaminB

などの核膜の構成因子や、ヒストンH1との結合も知られており、核内でのクロマチンの局在や構造の制御に重要な役割を担うことが示唆されている (Kourmouli *et al.* 2000; Nielsen *et al.* 2001; Kwon & Workman 2008)。

マウスには、HP1 α 、HP1 β 、HP1 γ (*cbx5*、*cbx1*、*cbx3*)の3つのアイソフォームが存在する (Figure iv)。HP1ファミリータンパクは、アイソフォームに共通の機能だけではなく、アイソフォーム特異的な機能を有することが示唆されている。特に、HP1 α 、HP1 β がヘテロクロマチンに局在する一方で、HP1 γ がユークロマチンに局在することが示唆されている (Minc *et al.* 2000; Kwon & Workman 2011)。また、アイソフォーム間で結合タンパクが異なることが知られている (Lomberk *et al.* 2006)。特にHP1 γ は、転写を正に制御する因子として注目されている。ゲノムワイドな解析から、HP1 γ が転写活性化している遺伝子領域に結合していること、HP1 γ の欠失によって標的遺伝子の発現が減少することが報告されている (Smallwood *et al.* 2012)。 *Drosophila*においては、マウスのHP1 γ に相当するHP1cに関して、その変異体に神経関連遺伝子の発現様式に異常がみられることや、アイソフォームの中でHP1cがNeurotrophin 1などいくつかの神経関連遺伝子を標的としていることが知られている (Font-Burgada *et al.* 2008; Lee *et al.* 2013)。このことは、HP1ファミリーの中でも、HP1c、HP1 γ が神経系において何らかの機能を有していることを示唆する。しかしながら、マウスにおけるHP1 γ の神経系における機能については、ほとんど明らかにされていない。

HP1 γ とリン酸化

コアヒストンやヒストンH1などのクロモソームを構成するタンパク質において、翻訳後修飾の重要性が考えられている。前述のように、ヒストン修飾は様々なタンパク質との結合に重要である。また、H1のリン酸化はH1とクロモソームとの結合を制御することがわかっている。HP1に関しても、これまでいくつかの翻訳後修飾に関する報告がある。

本研究で着目するHP1 γ に関しては、Hela細胞にてPKAの下流でHP1 γ がリン酸化され、ユークロマチン上に局在することやPol IIと今日局在すること、また、リン酸化HP1 γ がスプライシングに正に関わることが示唆されている (Lomberk

et al. 2006; Saint-Andre *et al.* 2011)。さらに、マクロファージにおいてリン酸化 HP1 γ が転写伸長に寄与することなどが報告されている (Thorne *et al.* 2012)。これらの報告は、他のクロマチン構成タンパクと同様に、HP1 γ のリン酸化が、その機能調節に重要である可能性を示唆している。しかしながら、神経系におけるHP1 γ のリン酸化やその機能に関しては、全くわかっていない。

そこで本研究ではまず、発生期マウス大脳新皮質におけるHP1 γ の機能について解析を行った。さらに、ニューロン成熟に寄与することが良く知られている外部シグナルとHP1 γ 、HP1 γ リン酸化の関連について検討した。本論文では、HP1 γ ならびにHP1 γ リン酸化に関して得られた結果を報告する。

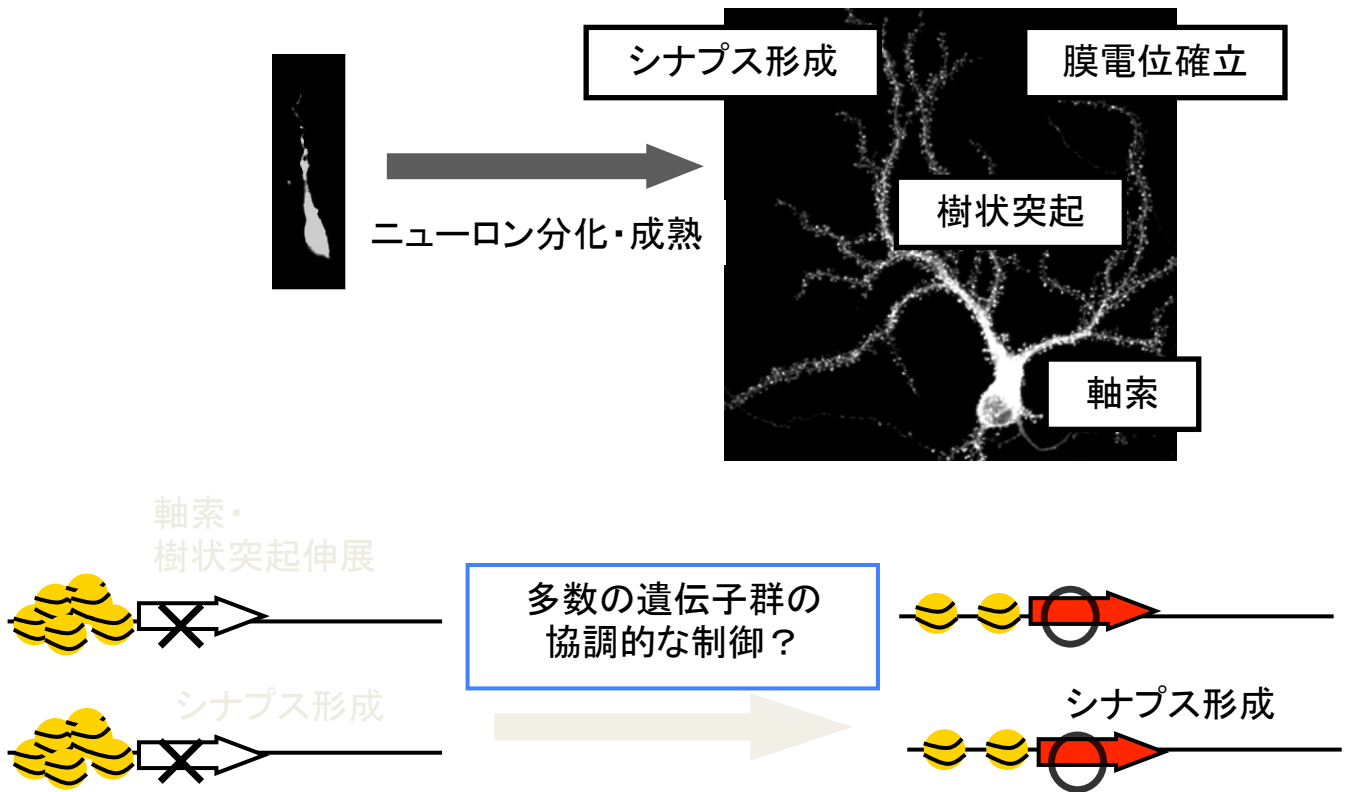
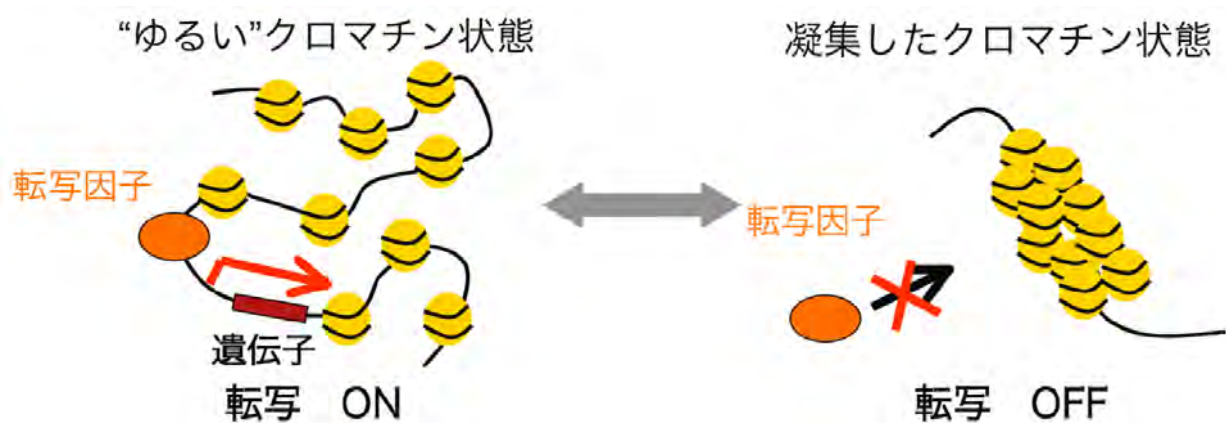


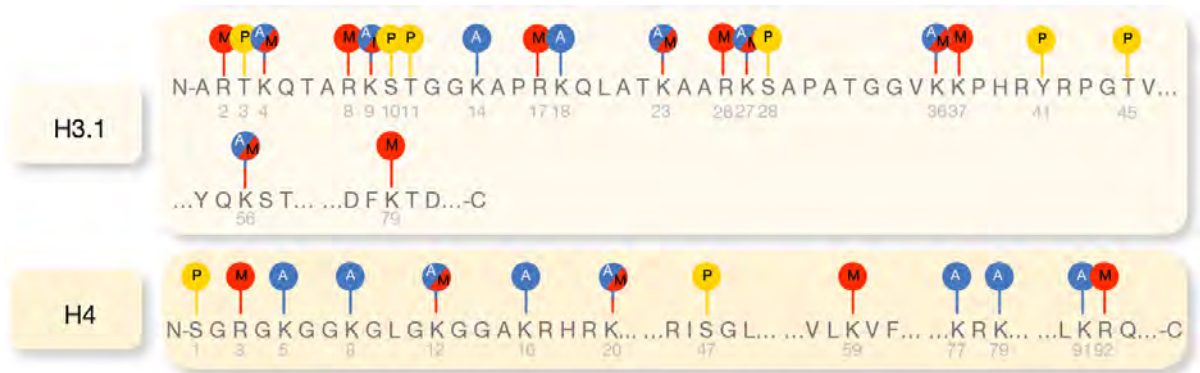
Figure i. ニューロン成熟に伴い、多数の遺伝子群の発現様式が変化する



(藤井佑紀、博士論文より抜粋)

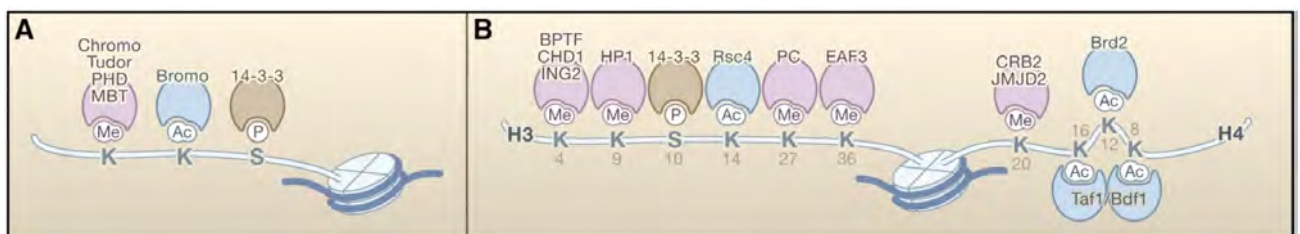
Figure ii. ある遺伝子座におけるクロマチン状態と遺伝子の発現制御

(a)



(Portela and Esteller, 2010より抜粋)

(b)

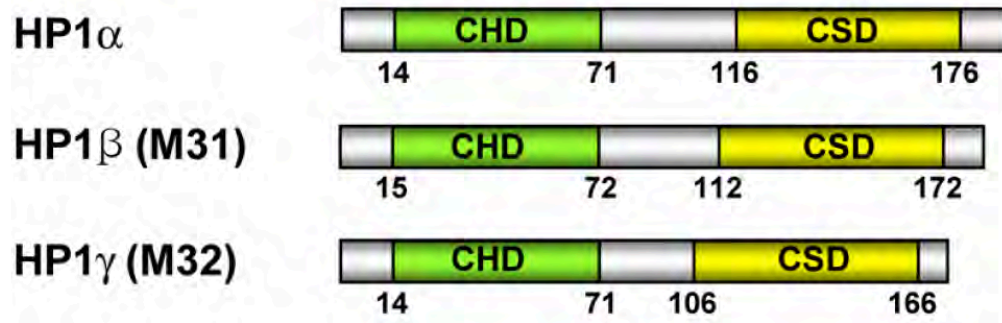


(Kouzarides, 2007より抜粋)

Figure iii. ヒストンには様々な修飾が起こり、これらを認識して結合するタンパク質が存在する

(a) コアヒストンには様々な修飾が入ることが報告されている。A, アセチル化、M, メチル化、P, リン酸化を示す。

(b) それぞれのヒストン修飾を認識するドメインとタンパク質。



(Kwon and Workman, 2008より抜粋)

Figure iv. マウスにおけるHP1アイソフォーム

材料と実験方法

ノックアウトマウス作成および動物の取り扱い

HP1 γ (*cbx3*)^{fl/fl}マウス (Accession No. CDB0558K: <http://www.cdb.riken.jp/arg/mutant%20mice%20list.html>)は以下の手順で作成を行った。*Cbx3* DNAは、マウスR1ゲノムライブラリのバクテリア人工染色体 (BAC)クローンより取得した。標的ベクターは、*cbx3*の第3 エクソンの上流から第4 イントロンまでを含有する約12 kbのDNA断片を用いた。陽性、陰性の選別には、ネオマイシン耐性遺伝子、ジフテリアトキシンAサブユニット遺伝子をそれぞれ使用した。条件的ノックアウトを行うために、ネオマイシン耐性遺伝子の両側にflippase標的配列を、*cbx3*第3 エクソンの両側にloxP 配列を、それぞれ配置した。マウスES細胞への標的ベクターの導入およびスクリーニングは、以前の報告通り行った(<http://www.cdb.riken.jp/arg/Methods.html>)。ネオマイシン耐性遺伝子は、flippase発現マウス(019100; The Jackson Laboratory)との交配により除去した。野生型のICR マウスは日本クレア、チャールズリバー、三協ラボより購入した。マウスの飼育および実験は、全て東京大学実験動物取り扱い基準に基づいて行った。

発現ベクター

pCAG-IRES-EGFP (pCAGIG)は、Drs. C.L. Cepko and T. Matsudaよりご供与いただいた。pCaMKII-Creは、Drs. S. Takemoto–Kimura and H. Bitoよりご供与いただいた。pCAG2-IRES-EGFP (pCAG2IG)は、pCAGIGを元に当研究室にて制限酵素サイトを改変し作成した。pCAG-mCherryは、pCAGIGを元に当研究室にて作成した。pSirenはClontechより購入した。pCAG2IG-HP1 γ は、FANTOM2よりHP1 γ (*cbx3*, AK083957)のCDSをクローニングし、pCAG2IGに導入し作成した。pCAG2IG-HP1 γ -S93Aは、pCAG2IG-HP1 γ を鋳型にS93のコドンTCTがGCTになるようプライマーを設計し、PCR法にて変異を導入した。Myc標識を付加したHP1 γ 、HP1 γ S93Aは、pCAG2IG-HP1 γ 、pCAG2IG-HP1 γ -S93Aよりサ

ブクローニングし、pCS4-2Mycに移し替えて作成した。Myc標識を付加したHP1 γ 、HP1 γ S93Aは、レンチウイルス作成のために、cFUGWに載せ替えた。cFUGWは、Dr. H. Songよりご供与いただいた (Lois *et al.* 2002; Duan *et al.* 2007)。

RNA 干渉法

pSIREN-shLuc (Control shRNA)、pSIREN-shHP1 γ (HP1 γ shRNA)はBD BioscienceとClontechの説明書通りに行った。ターゲット配列は以下の通りである。shHP1 γ , 5'—GAAGAAGAGAGATGCTGCTGA—3'; shLuc, 5'—GTGCGTTGCTAGTACCCAC—3'

抗体

本研究で用いた抗体と希釈倍率を以下に示す。

<一次抗体>

細胞免疫染色ならびに組織免疫染色

chick polyclonal anti-GFP	1:2000, (Chemicon, ab16901)
goat polyclonal anti-Brn2	1:200, (Santa Cruz, sc-6029)
mouse monoclonal anti-HP1 γ	1:1000, (Chemicon, MAB3450)
rabbit polyclonal anti-GFP	1:1000, (MBL, 598)
rabbit polyclonal anti-DsRed	1:500, (Clontech, 632496)
rabbit polyclonal anti-Pax6	1:1000, (Millipore, ab2237)
rabbit polyclonal anti-Cux1	1:200, (Santa Cruz, sc-13024)
rat monoclonal anti-BrdU	1:100, (Abcam, ab6326)
rat monoclonal anti-Ctip2	1:200, (Abcam, ab18465)

ウェスタンブロット

mouse monoclonal anti-HP1 γ	1:500, (Chemicon, MAB3450)
mouse monoclonal anti- β III-tubulin	1:1000, (Covance, MMS-435P)
mouse monoclonal anti- β -actin	1:1000, (Sigma, A2228)
mouse monoclonal anti-GAPDH	1:500, (Millipore, MAB374)
rabbit monoclonal anti-CREB	1:500, (Cell Signaling, #9197)
rabbit monoclonal anti-phospho-CREB (S133)	1:500, (Cell Signaling, #9198)

rabbit monoclonal anti-Akt 1:1000, (Cell Signaling, #4691)
 rabbit polyclonal anti-phospho-Akt (S473)
 1:1000, (Cell Signaling, #9271)
 rabbit polyclonal anti-ERK1/2 1:1000, (Promega, V1141)
 rabbit polyclonal anti-phospho-ERK1/2 (T183,T185)
 1:1000,(Promega, V8031)
 rabbit polyclonal anti-phosphoS93-HP1 γ
 1:500, (Cell Signaling, #2600)

<二次抗体>

細胞免疫染色ならびに組織免疫染色

Alexa Fluor 488, 546, 555, 594, 633, 647
 1:500, (Molecular Probes)

ウェスタンブロット

Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody
 1:10000, (GE Healthcare)

レンチウイルス作成

Cre リコンビナーゼならびに Cre リコンビナーゼ欠損変異体 (control)を発現するレンチウイルスベクターは、Drs. M. Shimojo and A. Maximov よりご供与いただいた。HIV-1 パッケージングベクター (Δ 8.9)ならびに VSVG (vesicular stomatitis viral envelope)ベクターは、Dr. H. Song よりご供与いただいた (Lois *et al.* 2002; Duan *et al.* 2007)。レンチウイルスの作成には、293FT 細胞を用いた。293FT 細胞は、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco)に、10% FBS (JRH Biosciences)、1% penicillin-streptomycin (Invitrogen)を添加した培地を用いて、37°Cインキュベータ内で培養した。まず、レンチウイルスベクター (10 μ g)、 Δ 8.9 ベクター (5 μ g)、VSVG ベクター (10 μ g)を、Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いて 6.0×10^6 個の 293FT 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入は、説明書の通り行った。8~10 時間後、DMEM/F12 混合培地 (1:1, v/v, Gibco)に 2% B27 supplement (Invitrogen)を添加した培地に交換した。60~72 時

間後、培養上清を 4°C、2,500 rpm で 5 分間遠心し、0.45 μm フィルターを用いて濾過することで上清中の塵を除いた。濾過液を、4°C、25,000 rpm で 90 分間超遠心し濃縮した後、PBS (phosphate-buffered saline) で再懸濁した。

細胞培養

NIH3T3 細胞は、DMEM (Sigma) に 10% FBS、1% penicillin-streptomycin を添加した培地を用いて培養した。NIH3T3 細胞への遺伝子導入は、Lipofectamine Plus (Invitrogen) を用いて、説明書の通り行った。

In vitro 初代培養

胎生14.5 日目のICR マウスもしくは胎生15.5日目のHP1 $\gamma^{fl/fl}$ マウスより、表皮、頭蓋、脳髄膜、嗅球、大脳基底核、海馬を取り除き、大脳新皮質を単離した。得られた大脳新皮質を、0.1% trypsin、DNase I (0.1 mg/ml, Roche)、hyaluronidase (0.67 mg/ml, Sigma) を含むartificial cerebrospinal fluid (aCSF: 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.1 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 1.3 mM MgCl₂, 10 mM glucose) 中で37°C、10 分間温浴し、その後trypsin inhibitor (0.7 mg/ml, Sigma) を含むaCSF を等量加えた。遠心分離により処理した大脳新皮質を収集し、Neurobasal (Gibco) 中で細胞を分散した。得られた細胞を、Neurobasalに1% penicillin-streptomycin、2% B27 supplement、1% GlutaMAX (Gibco) を添加した培地を用いて、poly-D-lysine でコートされた培養皿にて単層培養した。

高濃度カリウム処理、BDNF (Sigma, B3795) 処理を行う際には、処理前に培地を Control tyrodes 溶液に置換し、5 分間 37°Cにて平衡化した。その後、90 mM K⁺となるように調製した Tyrodes 溶液、BDNF を含む Control tyrodes 溶液にて処理を行った。各阻害剤を用いる際は、平衡化前30分培地に各阻害剤を添加し、その後の処理中も各阻害剤を含む溶液にて処理を行った。Control、90 mM K⁺ tyrodes 溶液の組成は以下のとおり。Control tyrodes 溶液 (25 mM Hepes (pH 7.4) (nacalai, 17546-34)、0.1% BSA (Sigma, A2153)、30 mM glucose (Kanto chem., 10017-00)、129 mM NaCl (Kanto chem., 37144-00)、5 mM KCl (Wako,

163-03545)、1 mM MgCl₂ (Kanto chem., 07058-00)、2 mM CaCl₂ (Kanto chem., 25009-00)); 90 mM K⁺ tyrodes 溶液 (25 mM Hepes (pH 7.4)、0.1% BSA、30 mM glucose、44 mM NaCl、90 mM KCl、1 mM MgCl₂、2 mM CaCl₂)

子宮内電気穿孔法 (*In utero electroporation*)

子宮内電気穿孔法は、以前の報告通りに行った (Itoh *et al.* 2007; Tabata *et al.* 2009)。各発生時期の妊娠マウスにペントバルビタール酸ナトリウムを用いて麻酔をかけた後、腹中線に沿って開腹し、子宮を取り出した。子宮壁の外よりキャピラリーを用いてプラスミド溶液を胎仔の側脳室へ注入した。プラスミド溶液は、Hanks Buffer 中に、細胞標識のための pCAGIG もしくは pCAG-mCherry を 1 μg/μl 含む計 5 μg/μl で調製し、Fastgreen で着色し可視化した。エレクトロポレーター (CUY21E, Tokiwa Science)を用いて、35 V、50 ms の電気パルスで 950 ms 間隔で 2~4 回流した。その後、子宮を母体中に戻して腹部を縫合し、発生を引き続き進行させた。各時期において、新生仔の脳を単離し、組織免疫染色にて解析した。

BrdU, EdU 投与

PBS 中に調製した BrdU、EdU をそれぞれ 50 mg/kg、5 mg/kg となるように、各発生時期の妊娠マウスに腹腔注射にて投与を行った。BrdU の検出は免疫染色を用いて、EdU の検出は Click-iT EdU Imaging kit (Invitrogen)を用いて行った。

細胞免疫染色

細胞免疫染色は、以前の報告通りに行った (Hirabayashi *et al.* 2009)。細胞を 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS を用いて室温で 20 分間固定し、続いて 0.2% Triton X-100/PBS を用いて室温で 10 分間細胞透過処理を行った。3% Bovine serum albumin (BSA, Sigma)/PBS でブロッキングを行った後、3% BSA/PBS 中

で一次抗体反応を 4°C にて一晩行った。PBS で洗浄後、3% BSA/PBS 中で二次抗体反応と Hoechst 33342 (Molecular Probes) による核染色を室温で 30 分間行い、Mowiol を用いて封入した。共焦点顕微鏡 LSM510 (Zeiss) または TCS-SP5 (Leica) により染色像を取得し、Photoshop CS software (Adobe) を用いて画像処理を行った。

組織免疫染色

組織免疫染色は、以前の報告通りに行った (Hirabayashi *et al.* 2009)。ICR マウス胎仔または新生仔を、4% PFA/PBS を用いて灌流固定した後、終脳を取り出した。取り出した終脳を、4% PFA/PBS を用いて 4°C にて 2~6 時間、後固定した。固定した終脳を PBS で洗浄した後、30% sucrose/PBS (w/v) 中に浸し、4°C にて一晩放置した。その後、OCT compound (Sakura Finetek) 中に終脳を包埋し、ドライアイスを用いて冷凍した。包埋した終脳より、厚さ 14 もしくは 50 μm の組織切片を作成した。作成した組織切片を室温にて数時間風乾した後、0.1% Triton X-100 を含む TBS (Tris-buffered saline) (TBS-T) 中に 30 分間浸し、切片周囲の OCT compound を除去した。3% BSA/TBS-T を用いてブロッキングを行った後、3% BSA/TBS-T 中で一次抗体反応を 4°C にて一晩行った。TBS で 2 回洗浄した後、3% BSA/TBS-T 中で二次抗体反応と Hoechst 33342 による核染色を室温で 1~2 時間行った。TBS-T で 3 回洗浄した後、Mowiol を用いて封入した。EdU を用いた標識、検出は、Click-iT EdU Imaging kit (Invitrogen) を用いて、説明書の通り行った。共焦点顕微鏡 LSM510 (Zeiss) または TCS-SP5 (Leica) により染色像を取得し、Photoshop CS software (Adobe) を用いて画像処理を行った。

ウェスタンブロット

細胞または脳組織を液体窒素により急速冷凍した後、Lysis buffer (20mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10mM β -glycerophosphate, 5mM EGTA, 1mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 5mM NaF, 0.5% Triton X-100, 1mM Na_3VO_4 , 1mM dithiothreitol, 1mg/ml aprotinin) を用いて溶解した。脳組織については、溶解時に 27G 注射針に

て注意深く組織を破壊した。溶解液にSample buffer (62.5mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% BPB, 5% β -mercaptoethanol)を加えて懸濁し、95°Cにて10分間処理した。回収したサンプルをSDSポリアクリルアミド電気泳動によって分離し、ニトロセルロース膜またはポリフッ化ビニリデン膜に転写した。転写した膜を3% BSA/TBS-T (0.05% Triton X-100)を用いて室温で1時間ブロッキングした。その後、5% BSA/TBS-T中で一次抗体反応を4°Cにて一晩行った。TBS-Tで洗浄後、0.5% スキムミルク/TBS-T中で二次抗体反応を室温にて1時間行った。TBS-Tで洗浄後、Western Lightning Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer) を用いて検出を行った。

逆転写(Reverse transcription; RT)-PCR

RNA は、TRIzol (Invitrogen)を用いて、説明書通りに精製した。逆転写は、2 μ g の RNA と oligo d(T)₁₂₋₁₈ プライマー (Invitrogen)、ReverTra Ace (TOYOBO)を用いて行った。得られた cDNA は、SYBR *Premix Ex Taq* (Takara)を用いて、Roche LightCycler にて定量 PCR によって定量した。各遺伝子の mRNA 量は β -actin の mRNA 量で標準化した。以下に、定量 PCR に用いたセンス、アンチセンスプライマーを示す。

HP1 γ , 5'- AAG TTG AAG AGG CAG AGC -3',
5'- ATT ATC AGC ATC TGT GAA CCC -3',
 β -actin, 5'- AAT AGT CAT TCC AAG TAT CCA TGA AA -3',
5'- GCG ACC ATC CTC CTC TTA G -3',

画像解析

画像解析には ImageJ を使用した。核内における HP1 γ の蛍光輝度の定量において、Hoechst 像により核を定義し、その領域での単位面積当たりの HP1 γ 蛍光輝度を測定した。脳室帯、脳室下帯、中間帯、皮質板は、Hoechst 像での核の配向、分布などを考慮して定義した。*In vitro* 初代培養系における神経突起の定量において、ImageJ プラグインである NeuronJ を使用した (Meijering *et al.*

2004)。定量に際して、一番長い突起を軸索と定義した。手作業により突起をトレースし、その後 **excel** を用いて処理を行い、突起の合計長や先端の数などを測定した。死細胞については、**Hoechst** 像において核の凝縮が見られる細胞の割合を定量した。*In vivo* での軸索蛍光輝度の定量において、脳梁へ進入、正中線を交差、脳梁を通過する場所にそれぞれ幅が等しい長方形を定義し、長方形内の蛍光輝度を測定した。約 **250 μm** 間隔の連続切片を用い、体性感覚野において測定を行った。

統計処理

定量データのエラーバーは標準偏差あるいは標準誤差である。値の比較は、Student の *t* 検定、Mann-Whitney *U* 検定、One-way ANOVA、Tukey-Kramer 検定のいずれかで比較し、**P** 値が **0.05** より小さい場合有意に差があるとした。グラフ中において、* : **P** < **0.05**、** : **P** < **0.01** を示す。

結果

発生期マウス大脳新皮質において、ニューロン成熟に伴ってHP1 γ の発現量が増加する

発生期のマウス大脳新皮質でのHP1 γ の発現様式を検討するために、マウス脳切片を用いてHP1 γ 抗体による免疫染色を行った。胎生14.5日目(Embryonic day 14.5; E14.5)、またはE16.5マウス胎仔より作成した脳切片を、HP1 γ 抗体を用いて免疫染色した。その結果、大脳新皮質においてHP1 γ 抗体によるシグナルが検出されたことから、発生期大脳新皮質においてHP1 γ が発現していることがわかった (Fig. 1A-B)。そこで、大脳新皮質内でのHP1 γ の発現様式をさらに検討するために、E16.5マウス胎仔より作成した組織切片を用いて、HP1 γ 抗体、Pax6抗体による免疫染色を行った。Pax6は、神経系前駆細胞で発現していることが知られている。Pax6陽性領域とHoechstによる核染色から、大脳新皮質を脳室帯 (ventricular zone; VZ)、脳室下帯 (subventricular zone; SVZ)、中間帯 (intermediate zone; IMZ)、皮質板 (cortical plate; CP)の領域に分割した。そして各領域において、核内での単位面積当たりのHP1 γ 染色輝度を定量した。その結果、ニューロンが存在するCPにおいて、未分化な細胞が存在するVZやSVZ、移動中の細胞が存在するIMZに比べてHP1 γ 染色輝度が高くなっていた (Fig. 1C-D)。また、IMZにおいてVZ、SVZに比べてHP1 γ 染色輝度が高く、いくつかの細胞はCPでの染色輝度と同等の輝度を有していた。ここで、HP1 γ 抗体を用いた免疫染色については、HP1 γ の条件的遺伝子破壊によってシグナルが検出されなくなることを確認している (Fig. 11C)。以上の結果は、HP1 γ の発現量がニューロン移動や成熟に伴って増加することを示唆している。

マウス大脳新皮質は、層構造をとり、それぞれの層には特定の種類のニューロンが存在することが知られている。そこで次に、HP1 γ の発現量がニューロンの種類によって異なるのか検討を行った。生後7日目 (postnatal day 7; P7)マウス新生仔より脳切片を作成し、HP1 γ 抗体といくつかのマーカー分子抗体を用いて免疫染色を行い、核内での単位面積当たりのHP1 γ 染色輝度を定量した。その結果、Brn2陰性かつCux1陽性の第IV層ニューロンに比べて、Brn2陽性かつCux1

陽性の第II/III層ニューロンにおいてHP1 γ 染色輝度が高くなっていた (Fig. 2A-B)。さらに、Ctip2陽性の第V層ニューロンにおいて、Cux1陽性の第II~IV層ニューロンに比べて、HP1 γ 染色輝度が高くなっていた(Fig. 2C-D)。これらの結果は、HP1 γ の発現量がニューロンの種類によって異なること、さらに言えば、第II/III層、第V層の錐体ニューロンにおいて第IV層ニューロンよりも発現量が高いことを示唆している。

では、HP1 γ の発現量はどのようなタイミングで増加するのか。HP1 γ の発現量増加のタイミングをより詳細に検討するために、Birthdate解析を行った。本研究では、E12.5にbromodeoxyuridine (BrdU)を、E16.5にethynyldeoxyuridine (EdU)をそれぞれ妊娠マウスの腹腔内に投与した。BrdU、EdUはそれぞれ、分裂を繰り返す神経系前駆細胞では希釈されていくが、投与後すぐに最終分化したニューロンでは保持されると考えられる。P0またはP5にて新生仔の脳切片を作成しHP1 γ 抗体、BrdU抗体で免疫染色を行った。EdUの検出には、Click-iT EdU Imaging Kitを用いた。P0においては、核の形状から判断するに、BrdU保持細胞は移動を完了している一方でEdU保持細胞は移動中であると考えられる。この時、核内での単位面積当たりのHP1 γ 染色輝度を定量したところ、EdU保持細胞に比べてBrdU保持細胞で染色輝度が高くなっていた (Fig. 3A, C)。また、EdU保持細胞の中でも、VZからIMZに存在する細胞に比べて、CPへと侵入した細胞ではHP1 γ 染色輝度が高かった (Fig. 3C)。これに対して、BrdU保持細胞、EdU保持細胞共に移動を完了したと考えられるP5においては、HP1 γ 染色輝度は同程度に観察された (Fig. 3B)。以上の結果は、HP1 γ の発現量がニューロンの移動に伴って徐々に増加し、大脳新皮質表層に到達する時に高くなるということを示唆する。

次に、*in vitro*初代培養系の細胞を用いて、ニューロン分化・成熟におけるHP1 γ の発現量の変化を検討した。E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調製したニューロンを培養皿に播種し、数日間培養 (days *in vitro*; DIV)した後に細胞溶解液を調製した。本研究で使用した培養系においては、培養日数が長くなるに従ってニューロンの成熟が進んでいくと考えられる。1日から7日間培養した細胞から調製した溶解液を用いて、HP1 γ 抗体、 β III-tubulin抗体によるウェスタンブロットを行った。その結果、HP1 γ のバンドは培養日数を経るに従って増加していた

(Fig. 4)。このことは、HP1 γ 発現量の増加は、頂低極性などの大脳新皮質における三次元構造や髄膜などの表層に存在する特別な細胞や構造体、血管などが存在せずとも起こりうる現象である可能性を示唆する。

***In vitro*初代培養系において、HP1 γ は軸索、樹状突起の発達を調節する**

これまでの結果より、ニューロンの成熟過程においてHP1 γ の発現量が増加することが示唆された。では、HP1 γ はニューロン成熟過程において何らかの役割を果たしているのか。軸索、樹状突起の発達は、ニューロンの成熟過程において基本的、特徴的な現象である (Jan & Jan 2003; Parekh & Ascoli 2014)。そこで本研究では、HP1 γ が軸索、樹状突起の発達に寄与する可能性について検討を行った。まず、HP1 γ のニューロン成熟に対する必要性を検討するために、*in vitro*初代培養系の細胞において、short hairpin RNA (shRNA)によるRNA干渉法を用いたノックダウンの影響を検討した。ここで用いたHP1 γ に対するshRNA (shHP1 γ)は、NIH3T3細胞において、内在性のHP1 γ と異所的に発現させたMyc標識を付加したHP1 γ の発現を十分に減少させることを確認している (Fig. 5)。E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調製したニューロンを培養皿に播種し、培養1日目にshHP1 γ を発現するプラスミドまたはLuciferase (Luc)に対するshRNAを発現するプラスミド (control)をリポフェクションにより遺伝子導入した。この時、ニューロンの形態を観察するために、蛍光タンパク質 (GFPまたはmCherry)を発現するプラスミドを共に遺伝子導入した。培養1日目から5日目にかけて培養液中にEdUを添加したところ、EdUを保持するニューロンはほとんど観察されなかったことから、大多数のニューロンは遺伝子導入の段階で分裂を終えていると考えられる (Fig. 6)。遺伝子導入したニューロンは培養5日目に固定し、免疫染色により形態を観察した。コントロールのshRNAを導入したニューロンでは発達した突起が観察されるのに対して、shHP1 γ を導入したニューロンでは突起の発達が未熟になっていた (Fig. 7A)。ここで、突起の発達を評価するために、軸索、樹状突起の合計長、先端の数、細胞体から出ている樹状突起 (一次樹状突起)数について定量を行った。本研究では、最も長い突起を軸索と定義した。その結果、shHP1 γ を導入したニューロンでは、コントロールに比べて、軸索、樹状突起の合計長が減少していた (Fig. 7B)。さらに、HP1 γ のノックダウンによ

り軸索、樹状突起の先端の数も減少した (Fig. 7C)。しかしながら、shHP1 γ の導入によって一次樹状突起数に変化がみられなかった (Fig. 7D)。これは、HP1 γ が樹状突起の伸長、分岐には影響するが、初期の樹状突起形成には寄与しないことを示唆する。ここで、核が異常に凝集した死細胞の割合はshHP1 γ の導入によって変化しなかったことから、HP1 γ のノックダウンが細胞の生存能力を損なっていないことが示唆される (Fig. 7E)。以上の結果は、HP1 γ が軸索、樹状突起の発達に必要であることを示唆する。

次に、HP1 γ の過剰発現がニューロン成熟にどのような影響を与えるか検討した。E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調製したニューロンを培養皿に播種し、培養1日目にHP1 γ を発現するプラスミドまたはGFPを発現するプラスミド (control)をリポフェクションにより遺伝子導入した。この時、ニューロンの形態を観察するために、蛍光タンパク質 (GFPまたはmCherry)を発現するプラスミドを共に遺伝子導入した。遺伝子導入したニューロンは培養5日目に固定し、免疫染色により形態を観察した。その結果、HP1 γ の過剰発現によって、軸索、樹状突起の合計長が有意に増加した (Fig. 8A, B)。また、樹状突起の先端の数が増加し、軸索の先端の数も増加傾向にあった (Fig. 8C)。これらの結果は、HP1 γ が軸索、樹状突起の伸長、分岐を促進したことを示唆する。ここで、HP1 γ の過剰発現は一次樹状突起数、死細胞の割合には影響しなかった (Fig. 8D, E)。以上の結果は、HP1 γ が軸索、樹状突起の発達に重要な役割を担うことを支持し、また観察されたHP1 γ の発現量の増加が大脳新皮質におけるニューロン成熟に重要であることを示唆する。

生体内において、HP1 γ は交連ニューロンの対側への軸索伸長を調節する

では、HP1 γ は生体内においてもニューロンの成熟に寄与しているのだろうか。これを検討するため、体性感覚野第II/III層に存在する交連ニューロンに着目した。このニューロン群は、その軸索を対側の半球に投射することが既に知られている (Wang *et al.* 2007)。E15.5のマウス胎仔に対して、子宮内電気穿孔法を用いてコントロール、shHP1 γ を発現するプラスミドをそれぞれ、軸索を観察するためのGFP発現プラスミドと共に遺伝子導入した。P3にてマウス新生仔を灌流固

定して脳切片を作成し、免疫染色を行い交連ニューロンの軸索を観察した。P3において、コントロールの脳では、大多数の軸索が正中線を交差し、対側の半球に軸索を伸ばしていた。しかしこの時、HP1 γ のノックダウンによって正中線を交差する軸索、対側の半球に到達している軸索の減少がみられた (Fig. 9A)。ここで、軸索の伸長を評価するため、体性感覚野を含む連続切片を用いて、正中線を交差する軸索、脳梁を通過する軸索の染色輝度を測定し、脳梁に侵入する軸索の染色輝度に対する割合を定量した (Fig. 9B)。その結果、正中線を交差する軸索、脳梁を通過する軸索共に、HP1 γ のノックダウンによって染色輝度の割合が著しく減少した (Fig. 9C)。これは、生体内において、HP1 γ が正常な交連軸索の伸長に必要であることを示唆している。

ここで注意すべきは、子宮内電気穿孔法を用いた際には、未分化な神経系前駆細胞に遺伝子導入が行われる点である。このため、観察された交連軸索に対するHP1 γ ノックダウンの影響は、分裂後のニューロンのみではなく、未分化な神経系前駆細胞でのHP1 γ の機能を反映している可能性を含む。分裂後のニューロンにおけるHP1 γ の機能をさらに検討するため、またHP1 γ ノックダウンの効果がshHP1 γ による副次的影響である可能性を排除するため、HP1 γ の条件的遺伝子破壊を行った。HP1 γ の条件的遺伝子破壊には、当研究室の平林が作成したHP1 γ 変異マウス (HP1 γ ^{fl/fl})を使用した。このマウスでは、HP1 γ 遺伝子 (*cbx3*)の第3エクソンがloxP配列により挟まれており、Creリコンビナーゼ依存的に遺伝子破壊が起こると考えられる。E15.5 HP1 γ 変異マウス胎仔より調製したニューロンを培養皿に播種し、培養1日目にCreリコンビナーゼまたはCreリコンビナーゼ変異体 (control)を発現するレンチウイルスを感染させた。培養5日目にRNAを回収し、RT-PCRによりmRNA量を測定した。その結果、Creリコンビナーゼの発現によりHP1 γ のmRNA量が著しく減少した (Fig. 10)。このことは、HP1 γ 変異マウスにおいて、Creリコンビナーゼ依存的な遺伝子破壊が正しく起きていることを示唆する。E16.5 HP1 γ 変異マウス胎仔に対して、GFPを発現するプラスミド (control)、またはGFPを発現するプラスミドと共にカルシウム-カルモジュリン依存キナーゼ (CaMK) II α プロモーターの下流でCreリコンビナーゼを発現するプラスミド (HP1 γ KO)を子宮内電気穿孔法により遺伝子導入し、P4にてマウス新生仔を灌流固定して脳切片を作成し、免疫染色を行った (Fig. 11A)。CaMKII α プロモーターは分裂後のニューロンにおいて活性化することが知られており

(Sunyer & Sahyoun 1990)、加えてCreリコンビナーゼの導入によりHP1 γ 抗体による染色輝度の現象が観察されたことから (Fig. 11C)、本実験においてHP1 γ の条件的遺伝子破壊が分裂後のニューロンで起きていると考えられる。この時、ノックダウン実験と同様の解析を行った結果、正中線を交差する軸索、脳梁を通過する軸索共に、HP1 γ の条件的遺伝子破壊によって染色輝度の割合が著しく減少した (Fig. 11B)。これは、HP1 γ が実際に生体内の分裂後ニューロンにおいて、正常な交連軸索の伸長に必要であることを示唆している。

次に、HP1 γ の発現量の増加が交連ニューロンの軸索伸長を促進するか検討した。E15.5のマウス胎仔に対して、子宮内電気穿孔法を用いてGFP発現プラスミドのみ (control)またはHP1 γ 発現プラスミドとGFP発現プラスミドを共に遺伝子導入した。P2にてマウス新生仔を灌流固定して脳切片を作成し、免疫染色を行い交連ニューロンの軸索を観察した。P2において、コントロールの脳では、交連軸索は正中線を交差する付近まで伸長している。この時、HP1 γ の過剰発現によって、正中線を交差する軸索の染色輝度の割合が増加した (Fig. 12)。これは、生体内において、HP1 γ が正常な交連軸索の伸長に寄与することを示唆する。

外部シグナルによって、HP1 γ がリン酸化される

発生期大脳新皮質において、神経活動や神経栄養因子といった外部シグナルがニューロンの成熟に寄与することが知られている。では、このような外部シグナルはHP1 γ に対してなんらかの影響を与えるのだろうか。この可能性を検討するため、*in vitro*初代培養系を用いて、まず神経活動を模倣し、HP1 γ に与える影響を調べた。本研究では、神経活動を模倣するために、高濃度カリウム溶液による処理を行った。E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調製したニューロンを培養皿に播種し、5日間培養した後に、高濃度カリウム溶液で5分間、1時間、3時間、6時間処理し、細胞溶解液を調製した。調製した溶解液を用いて、神経活動が惹起された指標の一つであるCREBの活性化、すなわちリン酸化CREB量の変化をウェスタンブロット法により検討した。その結果、高濃度カリウム溶液による処理によって、リン酸化CREB量が増加したことから、神経活動の模倣が正しく起こっていると考えられる (Fig. 13)。この条件下において、HP1 γ の全

体量に大きな変化は見られなかった。しかし、HP1 γ 抗体で検出されるバンドのシフトが観察された。シフトしたバンドは、検出されたバンドの内高い割合で起こっていた。また、Hela細胞でリン酸化されることが知られている93番目のセリン残基 (S93)に着目したところ、S93リン酸化HP1 γ 抗体で検出されるバンドが増加した。ここで観察されたバンドシフトやS93リン酸化は、CREBのリン酸化と比較して刺激後遅い時間で観察された。

ここで観察されたバンドシフトが、本当にリン酸化に依存したものであるか検討するため、Phosphatase処理を行った。E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調製したニューロンを培養皿に播種し、5日間培養した後に、高濃度カリウム溶液で3時間処理し、細胞溶解液を調製した。調製した溶解液を、phosphataseにより2時間処理し、ウェスタンブロット法を行った。その結果、phosphatase処理によって、高濃度カリウム溶液処理によるHP1 γ のバンドシフトが消失した (Fig. 14)。このことは、HP1 γ 抗体で検出されるバンドのシフトは、リン酸化に依存したものであることを示唆する。

次に、ニューロンの成熟に寄与すると考えられている外部シグナルとして、神経栄養因子による影響を検討した。本研究では、神経栄養因子の一つである脳由来神経栄養因子 (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF)を用いて実験を行った。E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調製したニューロンを培養皿に播種し、5日間培養した後に、BDNF溶液で1時間、3時間、6時間処理し、細胞溶解液を調製した。BDNF溶液中での処理により、リン酸化CREBが一過的に増加したことから、BDNFによる刺激は正しく起きていると考えられる (Fig.15)。この条件下において、BDNF処理によってHP1 γ 抗体で検出されるバンドのシフトが観察された。シフトしたバンドは、検出されたバンドの内高い割合で起こっていた。また、S93リン酸化HP1 γ 抗体で検出されるバンドが増加した。ここで観察されたバンドシフトやS93リン酸化は、CREBのリン酸化と比較して長時間維持されていた。

ここで、S93のリン酸化がHP1 γ 抗体で検出されるバンドのシフトに寄与しているか検討を行った。E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調製したニューロンを培養皿に播種し、1日間培養した後、GFP (Control)、野生型HP1 γ (HP1 γ WT-Myc) またはS93をアラニンに置換した変異型HP1 γ (HP1 γ S93A-Myc)を発現するレンチウイルスをそれぞれ感染させ、遺伝子導入した。ここでは、内在のHP1 γ タン

パクと区別するためにMyc標識を付加している。培養5日目にBDNF溶液にて3時間処理し、細胞溶解液を調製した。調製した溶解液を用いてウェスタンブロット法を行った。この時、内在のHP1 γ タンパクでは、BDNF処理によってHP1 γ 抗体で検出されるバンドのシフトが観察された(Fig.16)。しかし、HP1 γ WT-Mycではバンドシフトが観察された一方で、HP1 γ S93A-Mycではバンドシフトが観察されなかった。このことは、HP1 γ 抗体で検出されるバンドのシフトは、大部分がS93のリン酸化に依存していることを示唆する。

以上の結果は、ニューロンにおいて外部シグナルによってHP1 γ のS93リン酸化が起こること示唆している。これまでニューロンにおいて、HP1 γ のリン酸化は報告されておらず、非常に新規性が高い。

HP1 γ は、PKA経路、MAPK経路の下流でリン酸化される

HP1 γ は、外部シグナル以下どのようなシグナル伝達経路によりリン酸化されるのだろうか。本研究では、BDNF処理によるHP1 γ リン酸化に関して、どのようなシグナル伝達経路が関与するか検討を行った。BDNFはTrkB受容体に結合し、その下流の細胞内シグナル伝達経路を活性化することが知られている。TrkB受容体の下流としては、主に、PI3K経路、MAPK経路、PLC γ 経路が知られている。E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調製したニューロンを培養皿に播種し、3日間培養した後に、BDNF溶液で3時間処理し、細胞溶解液を調製した。この条件下で、リン酸化CREB、HP1 γ のバンドシフト、リン酸化HP1 γ の増加が観察された(Fig. 17)。ここで、TrkBの下流のシグナル伝達経路として機能するキナーゼに対する阻害剤を用いて、HP1 γ リン酸化に対する影響を検討した。まず、PKA阻害剤としてH-89を用いて実験を行った。BDNF処理の30分前よりH-89を添加し、BDNF処理を3時間行った後に細胞溶解液を調製した。H-89の添加によって、PKAの下流で活性化することが知られているCREBのリン酸化が抑制されていた。この時、BDNF処理によって起こるHP1 γ のバンドシフト、S93リン酸化HP1 γ の増加が抑制されていた。この結果は、BDNFの下流でPKA経路がHP1 γ のリン酸化に寄与することを示唆する。次に、PI3K阻害剤としてLY294002を用いて、同様に実験を行った。LY294002の添加によって、PI3Kの下流で活性化すること

が知られているAktのリン酸化が抑制されていた。この時、BDNF処理によって起こるHP1 γ のバンドシフト、S93リン酸化HP1 γ には変化は見られなかった。この結果は、BDNFの下流でPI3K経路はHP1 γ のリン酸化に寄与していないことを示唆する。次に、MEK阻害剤としてU0126を用いて、同様に実験を行った。U0126の添加によって、MEKの下流で活性化することが知られているERK1/2のリン酸化が抑制されていた。この時、BDNF処理によって起こるHP1 γ のバンドシフト、S93リン酸化HP1 γ の増加が抑制されていた。この結果は、BDNFの下流でMAPK経路がHP1 γ のリン酸化に寄与することを示唆する。以上の結果は、HP1 γ がPKA経路、MAPK経路の下流でリン酸化される可能性を示唆する。

生体内において、神経活動によりHP1 γ のリン酸化が増加する

では、生体内においてもHP1 γ は外部シグナルによってリン酸化されるのだろうか。これを検討するため、本研究ではカイニン酸投与による検討を行った。カイニン酸の投与により、カイニン酸受容体を介した神経活動の亢進が見られることが報告されている(Okamoto *et al.* 2003)。P40のマウスにカイニン酸を腹腔内投与し、3時間後に大脳新皮質または海馬組織の溶解液を調製した。カイニン酸投与により、以前に報告されているてんかん様の痙攣が確認された。また、カイニン酸投与マウスより調製した組織溶解液において、リン酸化CREBの増加が確認された (Fig. 18)。この時、HP1 γ 抗体で認識されるバンドのシフト、S93リン酸化HP1 γ の増加が観察された。これは、生体内においても、神経活動によってHP1 γ がリン酸化されることを示唆する。生体内において、神経活動などの外部シグナルによりHP1 γ リン酸化の増加が観察されたのは、非常に新規的で興味深い。

*In vitro*初代培養系において、HP1 γ リン酸化は、外部シグナル依存的な軸索、樹状突起の発達を調節する

これまでの結果より、外部シグナルによってHP1 γ のリン酸化が増加することが示唆された。では、HP1 γ のリン酸化は外部シグナル依存的なニューロン成熟

において役割を果たしているのか。本研究では、HP1 γ の遺伝子欠損を行い、その細胞に野生型HP1 γ (HP1 γ WT)またはS93をアラニンに置換した変異型HP1 γ (S93A)を発現させることにより、S93リン酸化の外部シグナル依存的なニューロン成熟に対する寄与について検討した。外部シグナル依存的なニューロン成熟として、BDNF処理によるニューロン成熟について観察を行った。BDNFは、これまでに*in vitro*、生体内の両方において、ニューロン成熟への寄与が報告されている (Gorski *et al.* 2003; Dijkhuizen & Ghosh 2005)。まず、HP1 γ の遺伝子欠損とWT、S93Aの過剰発現によって、HP1 γ の染色輝度が回復するか検討を行った。E15.5 HP1 γ ^{fl/fl}マウス胎仔大脳新皮質より調製したニューロンを培養皿に播種し、1日間培養した後、Creリコンビナーゼを発現するベクターを遺伝子導入した (HP1 γ KO)。この時、HP1 γ WTまたはHP1 γ S93Aを発現するプラスミドをそれぞれ遺伝子導入した。また、遺伝子導入された細胞を識別するためにGFPを発現するプラスミドを共に遺伝子導入した。その後、6日間培養し、固定した後、免疫染色を行った。その結果、HP1 γ の遺伝子欠損によってHP1 γ 蛍光輝度が減少した (Fig. 19)。また、HP1 γ WTまたはHP1 γ S93Aの過剰発現により蛍光輝度の回復が観察された。これは、HP1 γ の遺伝子欠損とHP1 γ WTまたはHP1 γ S93Aによるレスキューが正しく行われていることを示唆する。本実験では、樹状突起の発達をニューロン成熟の指標として検討を行った。E15.5 HP1 γ ^{fl/fl}マウス大脳新皮質より調製したニューロンを培養皿に播種し、培養1日目にCreリコンビナーゼを発現するプラスミドと共に、GFPまたはHP1 γ WT、HP1 γ S93Aを発現するプラスミドの何れかをリポフェクションにより遺伝子導入した。この時、ニューロンの形態を観察するために、mCherryを発現するプラスミドを共に遺伝子導入した。培養3日目に、BDNF溶液による処理を6時間行い、その後固定して免疫染色によりニューロンの形態を観察した。神経突起の形態の評価には、sholl analysis法を用いた。この方法は、細胞体中心から同心円を想定し、その円と突起との交差数を数えることによって突起発達の複雑度を評価する解析方法である。コントロールの細胞において、BDNF処理した細胞群では、BDNF処理しなかった細胞群に比べてsholl analysis法による交差数が増加していたことから、本研究の実験系において、BDNF依存的なニューロン成熟の亢進が起きていると考えられる (Fig. 20)。この条件下において、BDNF処理をしていない場合、前述のノックダウンの結果と矛盾せず、HP1 γ の遺伝子欠損によって、コントロールと比べて交差数が減少した (Fig. 20A, C)。これは、ノックダウン実験

からも示唆された通り、ニューロン成熟においてHP1 γ が重要な役割を果たすことをさらに支持する。この時、HP1 γ の遺伝子欠損に対してHP1 γ WT、HP1 γ S93Aをそれぞれ発現した細胞では、交差数がコントロールと同程度に回復した。BDNF処理を行った場合にも、HP1 γ の遺伝子欠損によって、コントロールと比べて交差数が減少した (Fig. 20B, D)。また、HP1 γ の遺伝子欠損に対して、HP1 γ WTの発現によっては交差数がコントロールと同程度に回復した。その一方で、HP1 γ WT との有意差は得られなかったが、HP1 γ S93Aの発現では交差数の回復は見られない傾向にあった。以上の結果は、前述の項と合わせて、HP1 γ S93のリン酸化がBDNF依存的なニューロン成熟に寄与する可能性を示唆する。また、BDNF非存在下においては、HP1 γ WT、HP1 γ S93Aともに遺伝子欠損の表現系を回復できたことは興味深い。HP1 γ がニューロン成熟に寄与する際に、リン酸化非依存的なメカニズムとリン酸化に依存したメカニズムの二つがある可能性が考えられる。

生体内において、HP1 γ のリン酸化は交連ニューロンの対側への軸索伸長を調節する

次に、生体内においてもHP1 γ のリン酸化がニューロン成熟に寄与するのか検討を行った。前述の実験と同様に、E15.5のマウス胎仔に対して、子宮内電気穿孔法を用いてHP1 γ S93A発現プラスミドとGFP発現プラスミドを共に遺伝子導入した。これまでの報告から、体性感覚野において交連ニューロン軸索の正中線交差は、神経活動依存的であることが知られている (Wang *et al.* 2007)。P2にてマウス新生仔を灌流固定して脳切片を作成し、免疫染色を行い交連ニューロンの軸索を観察した。その結果、HP1 γ S93Aの過剰発現によって、HP1 γ WTの過剰発現で観察された正中線を交差する軸索の染色輝度の割合の増加は起こらなかった (Fig. 21)。これは、生体内においても、HP1 γ のリン酸化が正常な交連軸索の伸長に寄与することを示唆する。

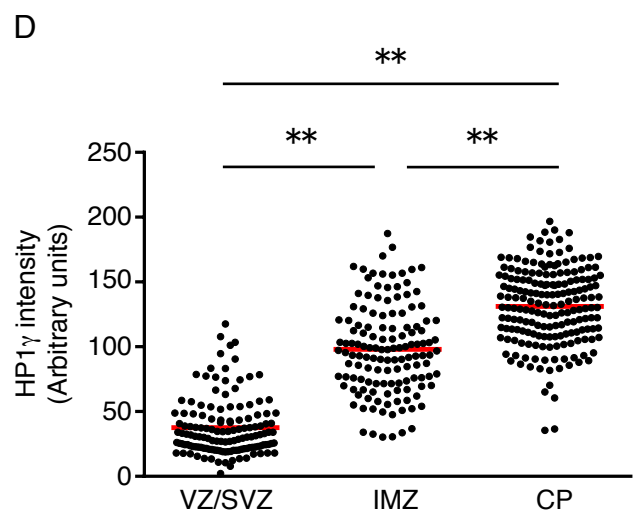
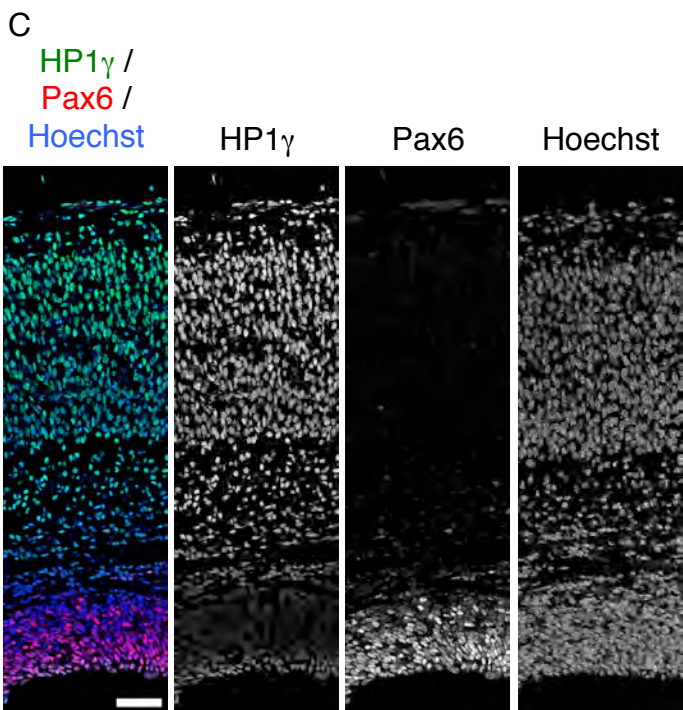
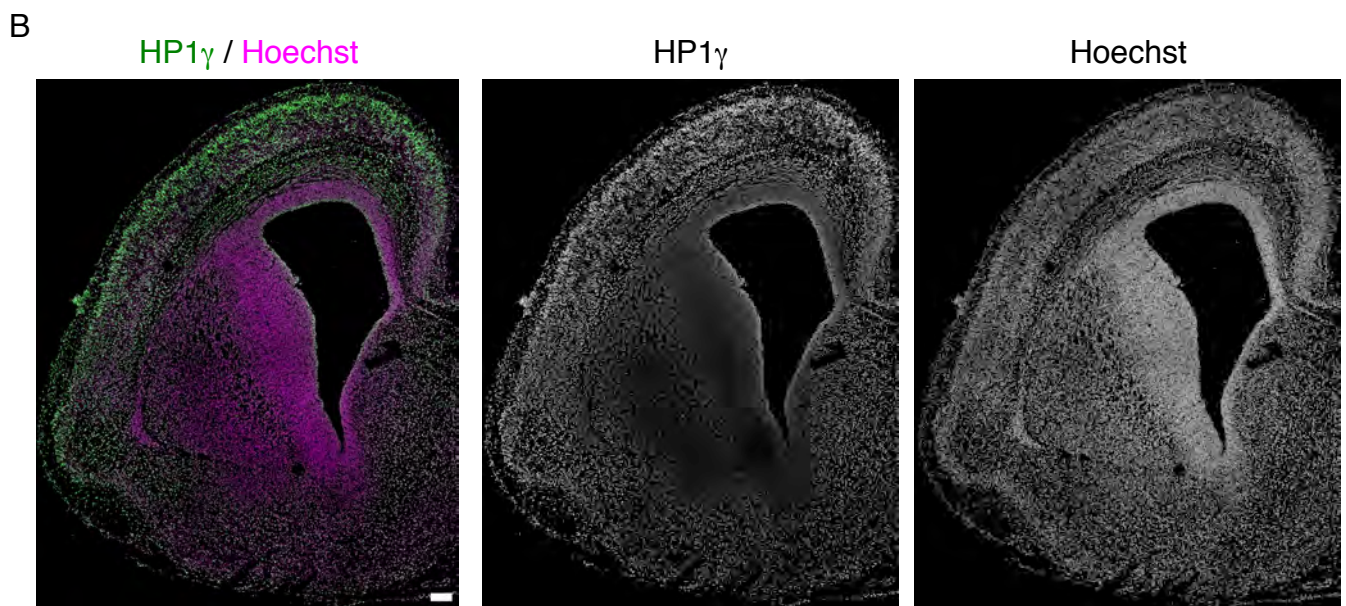
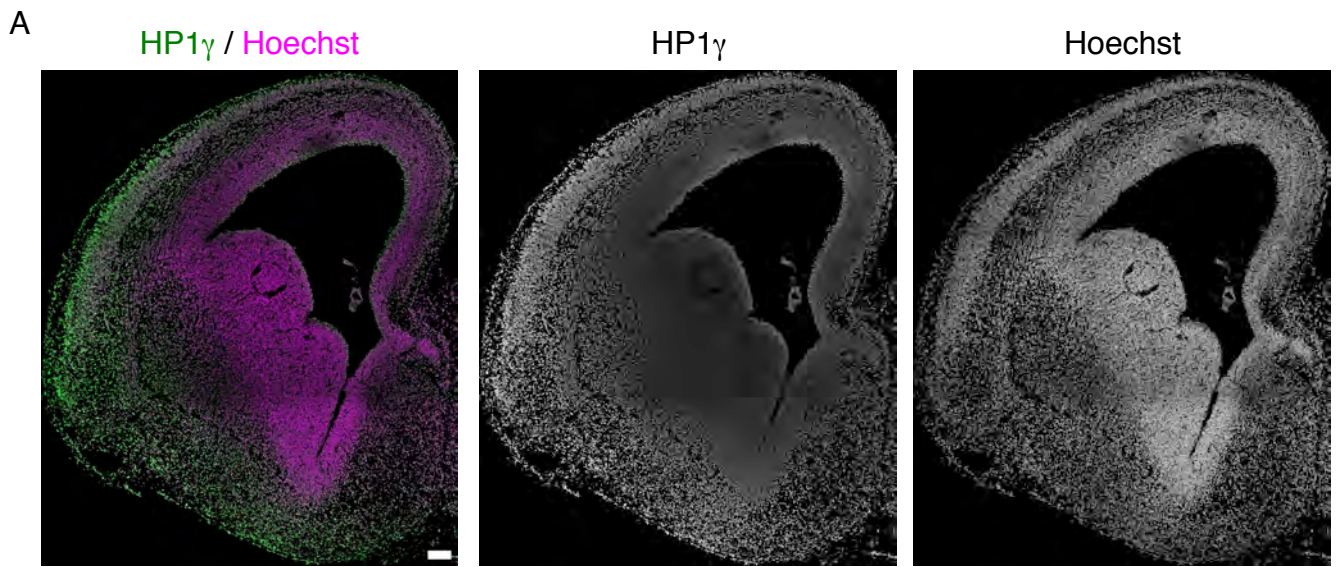


Figure 1. HP1 γ は発生期大脳新皮質において、皮質板に強く発現している

(A, B) E14.5 (A)あるいはE16.5 (B)のマウス胎仔終脳組織切片を作成し、HP1 γ 抗体で免疫染色を行った (緑)。核はHoechstにて染色した (赤紫)。**(C, D)** E16.5のマウス胎仔大脳新皮質組織切片を作成し、HP1 γ 抗体 (緑)、Pax6抗体 (赤)で免疫染色を行った。核はHoechstにて染色した (青) (C)。大脳新皮質の各領域において、核内での単位面積当たりのHP1 γ 染色輝度を測定した (D)。黒点は細胞毎の輝度を、赤の水辺線は各領域での輝度の平均値を表す。定量結果は、VZ/SVZ、IMZ、CPにて、それぞれ137 細胞、134 細胞、186 細胞より得た。スケールバーは100 μ m (A, B)、50 μ m (C)。VZ, 脳室帯; SVZ, 脳室下帯; IMZ, 中間帯; CP, 皮質板。**, $P < 0.01$ (Mann-Whitney U test)。

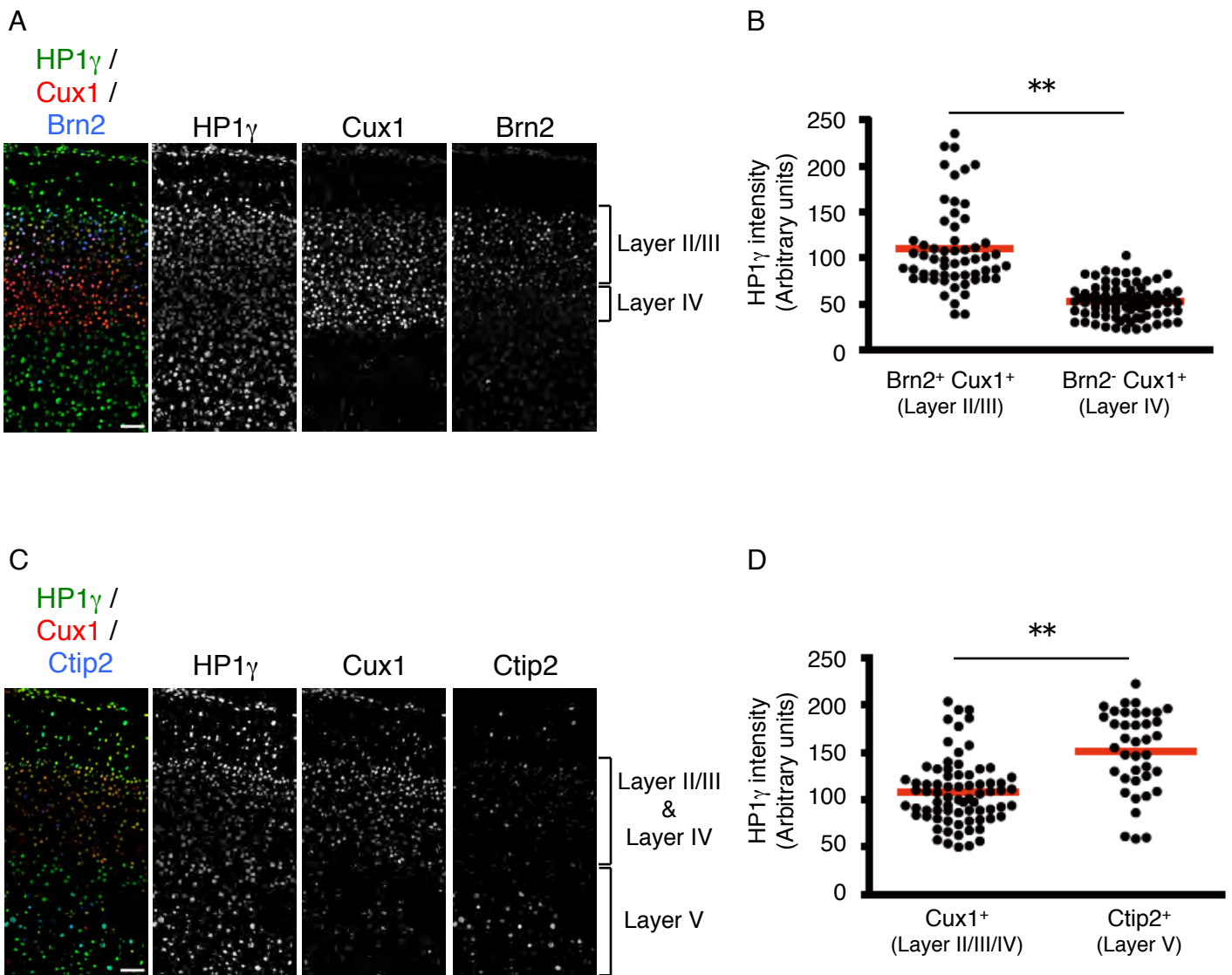


Figure 2. 大脳新皮質内において層間でHP1 γ の発現量が異なる

(A, B) P7のマウス終脳組織切片を作成し、HP1 γ 抗体 (緑)、Cux1抗体 (赤)、Brn2抗体 (青)で免疫染色を行った (A)。核はHoechstにて染色した (未記載)。Cux1陽性かつBrn2陽性の領域を第II/III層、Cux1陽性、Brn2陰性の領域を第IV層として、核内での単位面積当たりのHP1 γ 染色輝度を測定した (B)。 **(C, D)** P7のマウス終脳組織切片を作成し、HP1 γ 抗体 (緑)、Cux1抗体 (赤)、Ctip2抗体 (青)で免疫染色を行った (C)。核はHoechstにて染色した (未記載)。Cux1陽性第II/III層と第IV層、Ctip2陽性の領域を第V層として核内での単位面積当たりのHP1 γ 染色輝度を測定した (D)。黒点は細胞毎の輝度を、赤の水辺線は各領域での輝度の平均値を表す。定量結果は、Brn2⁺Cux1⁺ (B)、Brn2⁻Cux1⁺ (B)、Cux1⁺ (D)、Ctip2⁺ (D)にて、それぞれ58細胞、84細胞、74細胞、39細胞より得た。スケールバーは50 μ m。**, $P < 0.01$ (Mann-Whitney U test)。

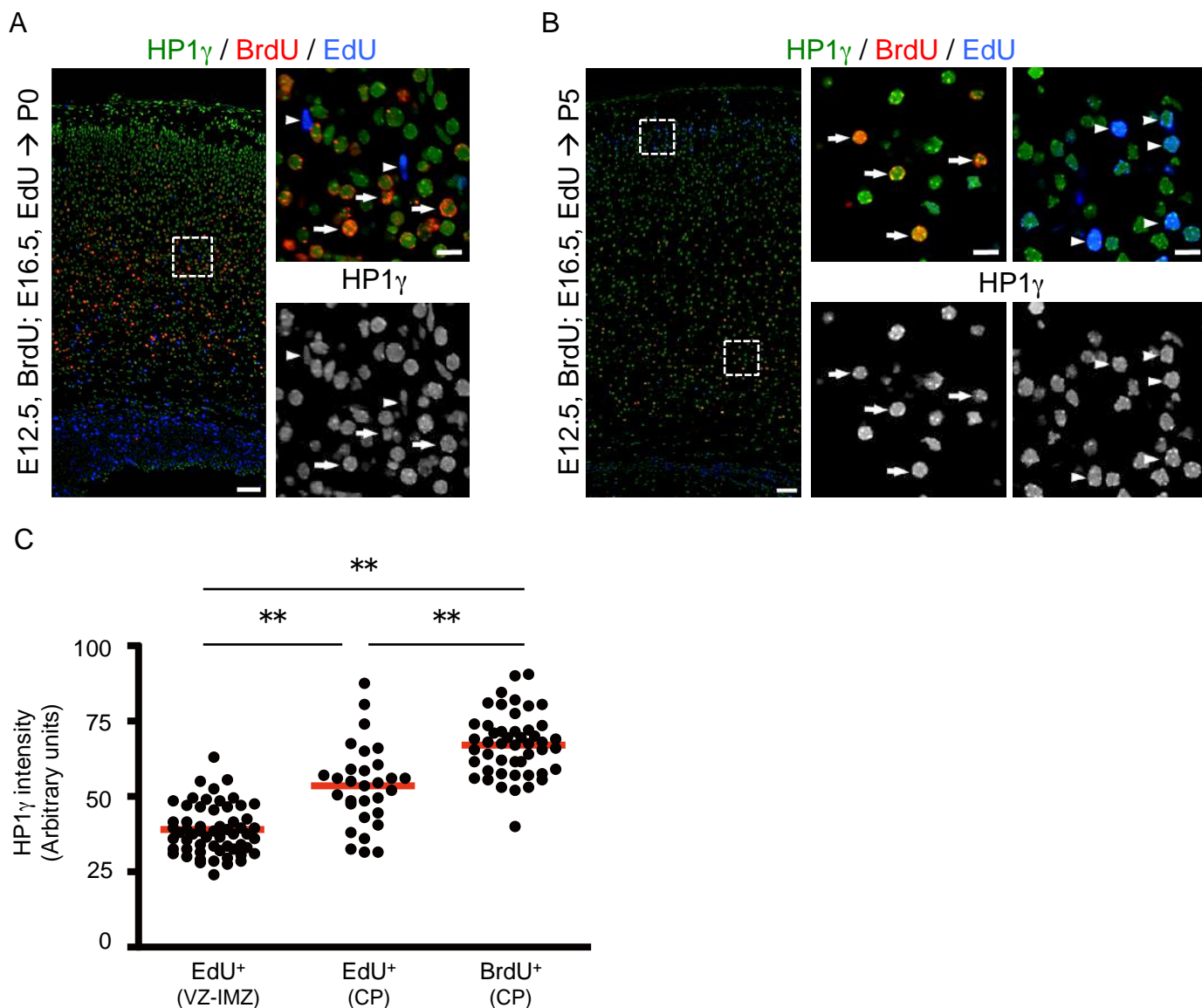


Figure 3. HP1 γ の発現量は、ニューロン移動に伴って増加する

(A-C) 妊娠マウスに対して、E12.5にBrdUをE16.5にEdUをそれぞれ腹腔内投与し、P0 (A)またはP5 (B)にて固定した。大脳新皮質切片を作成し、HP1 γ 抗体 (緑)、BrdU抗体 (赤)で免疫染色を行った。EdUの検出にはEdU detection kitを用いた (青)。核はHoechstにて染色した (未記載)。P0の切片において、BrdU保持細胞またはEdU保持細胞の各領域における、核内での単位面積当たりのHP1 γ 染色輝度を測定した (C)。黒点は細胞毎の輝度を、赤の水辺線は各領域での輝度の平均値を表す。定量結果は、EdU⁺ (VZ-IMZ)、EdU⁺ (CP)、BrdU⁺ (CP)にて、それぞれ58細胞、30細胞、48細胞より得た。スケールバーは50 μ m (A, B 左図)、10 μ m (A, B 右図(拡大図))。**, $P < 0.01$ (Mann-Whitney U test)。

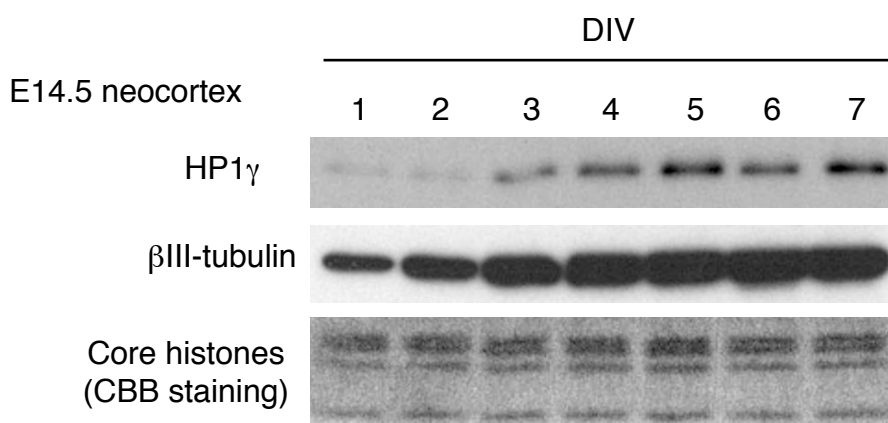


Figure 4. HP1 γ の発現量は、ニューロン成熟に伴って増加する

E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調整したニューロンを培養皿に播種し、各日数培養した後、細胞溶解液を作成した。各溶解液を用いて、HP1 γ 抗体、 β III-tubulin抗体でウエスタンブロットを行った。また、装填量のコントロールとして、コアヒストンをCBB染色により検出した。

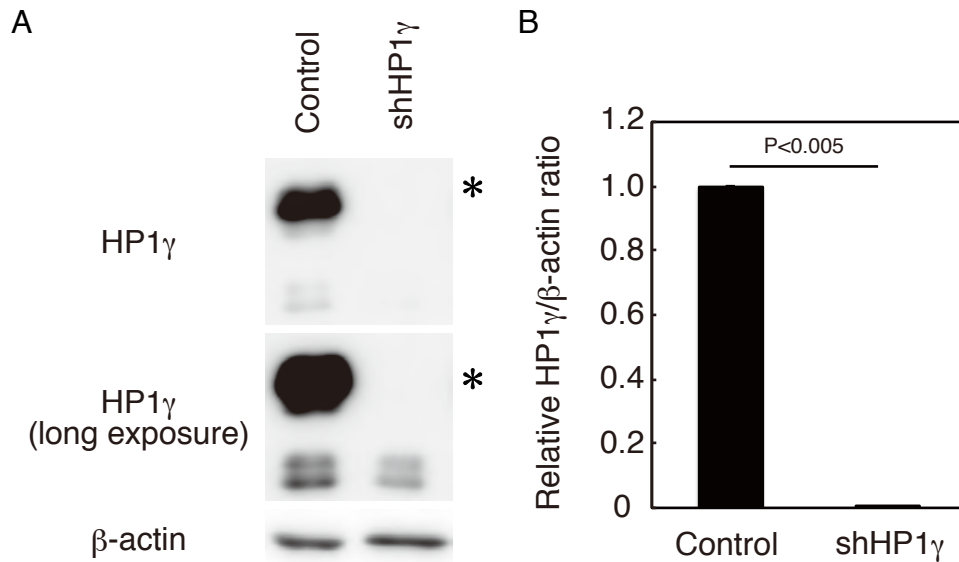


Figure 5. shHP1γの発現によって、HP1γのタンパク質量が減少する

(A, B) NIH3T3細胞に、示されたshRNAを発現するプラスミドを遺伝子導入した。2日後、細胞溶解液を調整し、HP1γ抗体、β-actin抗体でウエスタンブロットを行った(A)。また、各レーンにおける過剰発現したHP1γの検出バンドの輝度を測定した(B)。Student's *t* testにて検定を行った。*は異所的に過剰発現した、myc標識付加されたHP1γを示す。エラーバーは標準誤差を示す。P値は、Student's *t* testにより算出した。

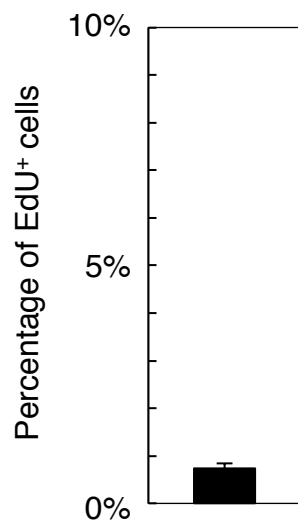


Figure 6. 播種後1日経過した条件下では、大多数の細胞が分裂後の細胞である

E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調整したニューロンを培養皿に播種し、1日間培養した後、培養液中にEdUを添加した。培養5日目に細胞を固定した。EdUの検出は、Click-iT EdU Imaging kitを使用した。核はHoechstにて染色した。3培養皿中、5137細胞より、EdU保持細胞の割合を得た。エラーバーは標準誤差を示す。

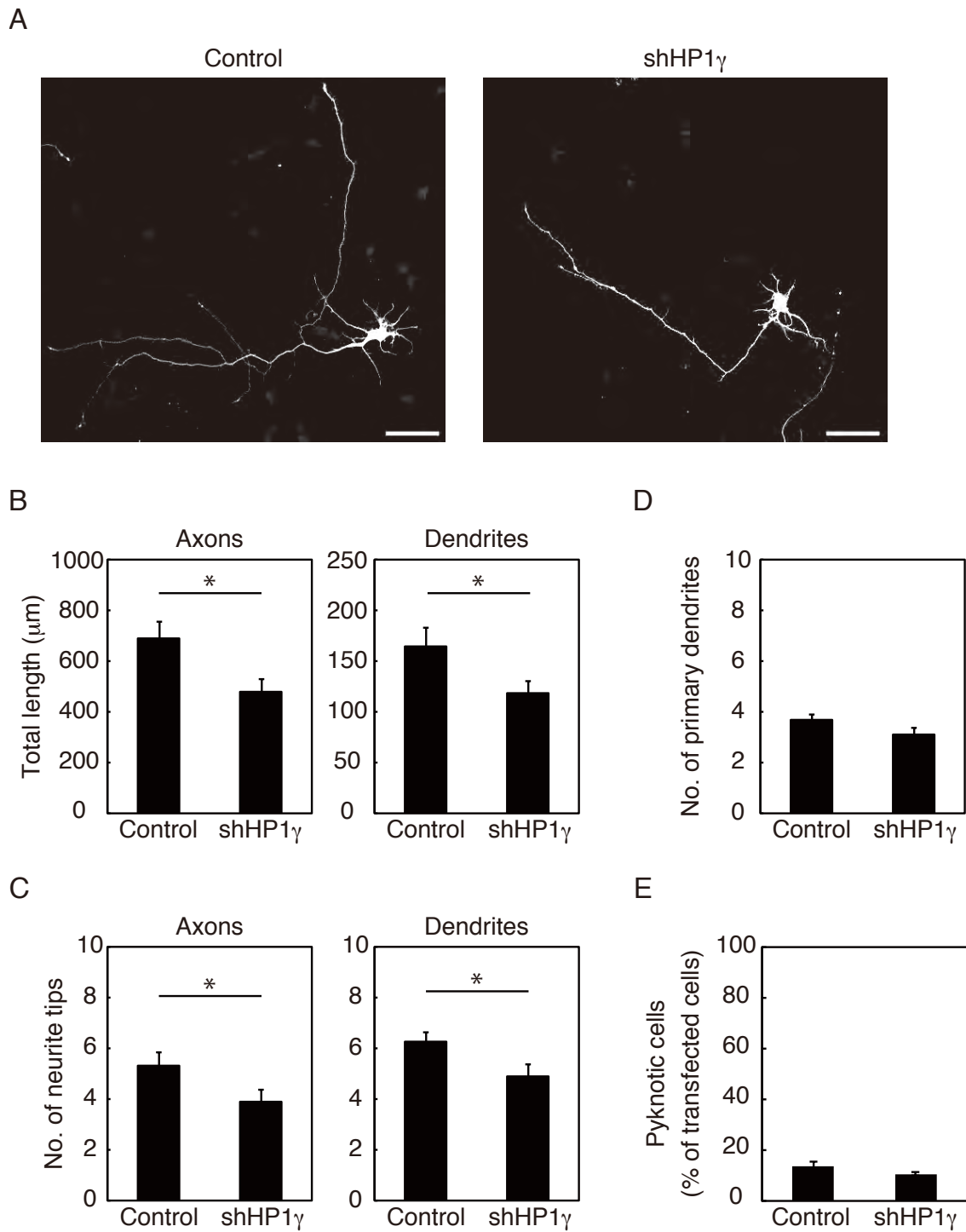


Figure 7. HP1 γ をノックダウンによりニューロンの神経突起の発達が抑制される

E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調整したニューロンを培養皿に播種し、1日間培養した後、示されたshRNAを発現するプラスミドを遺伝子導入した。この時、形態を観察するために蛍光タンパク質 (GFPもしくはdsRed)を発現するプラスミドを共に遺伝子導入した。その後、4日間培養し、固定した。固定した細胞を免疫染色し、形態を観察した。代表的なニューロンの写真を示す (A)。ニューロンの軸索・樹状突起の全長 (B)、軸索・樹状突起の先端の数 (C)、樹状突起の数 (D)を定量した。また、クロマチンが異常に凝集した死細胞の割合を定量した (E)。神経突起の内、最も長い突起を軸索と定義した。スケールバーは50 μm 。定量結果は、ControlまたはshHP1 γ それぞれ、40細胞または32細胞より得た。*, $P < 0.05$ (Mann-Whitney U test)。エラーバーは標準誤差を示す。

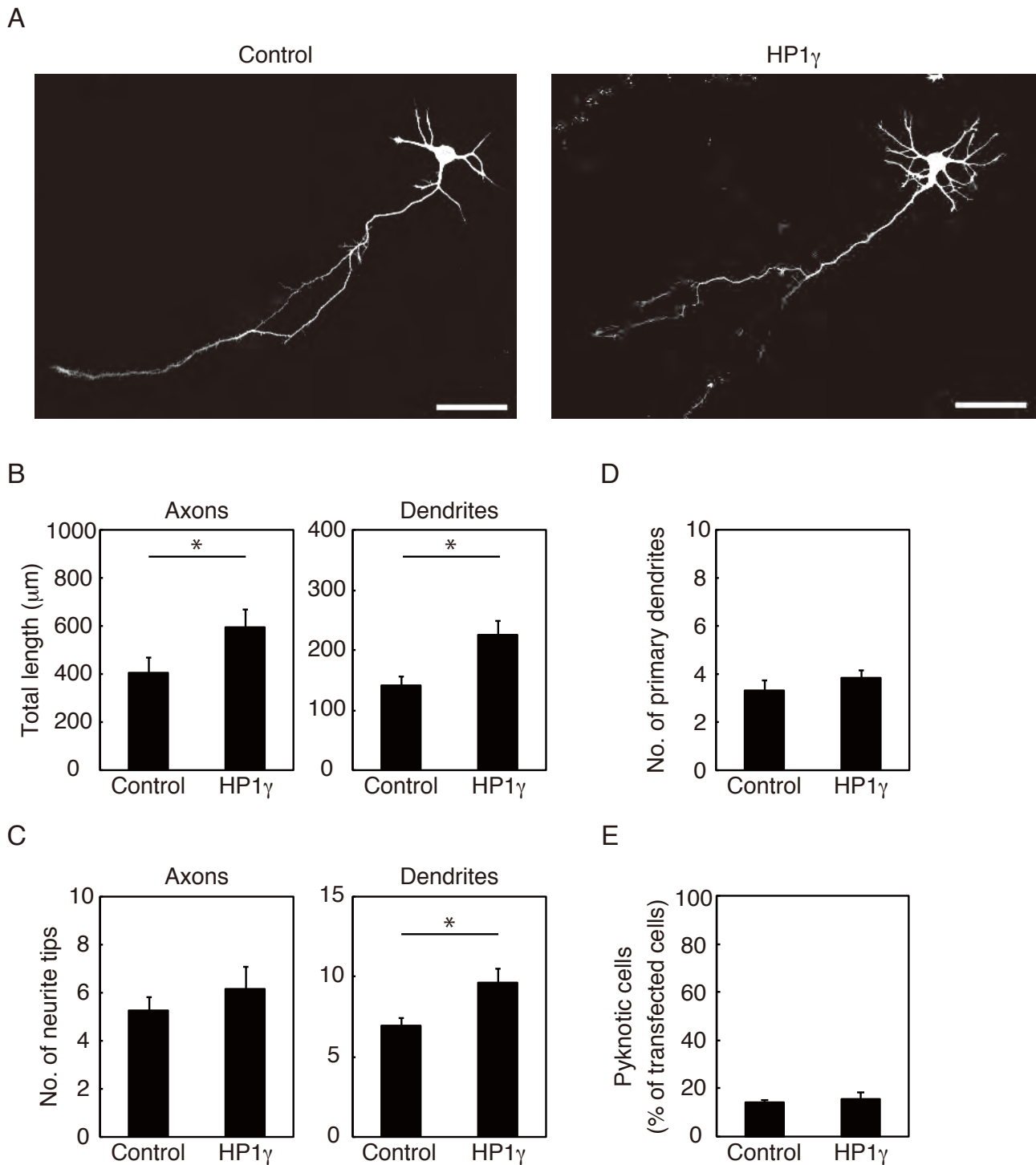


Figure 8. HP1 γ を過剰発現によりニューロンの神経突起の発達が促進される

E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調整したニューロンを培養皿に播種し、1日間培養した後、GFP (control)、HP1 γ を発現するプラスミドを遺伝子導入した。この時、形態を観察するために蛍光タンパク質(GFPもしくはdsRed)を発現するプラスミドを共に遺伝子導入した。その後、4日間培養し、固定した。固定した細胞を免疫染色し、形態を観察した。代表的なニューロンの写真を示す(A)。ニューロンの軸索・樹状突起の全長(B)、軸索・樹状突起の先端の数(C)、樹状突起の数(D)を定量した。また、クロマチンが異常に凝集した死細胞の割合を定量した(E)。神経突起の内、最も長い突起を軸索と定義した。スケールバーは50 μm 。定量結果は、ControlまたはHP1 γ それぞれ、39細胞または30細胞より得た。*, $P < 0.05$ (Mann-Whitney U test)。エラーバーは標準誤差を示す。

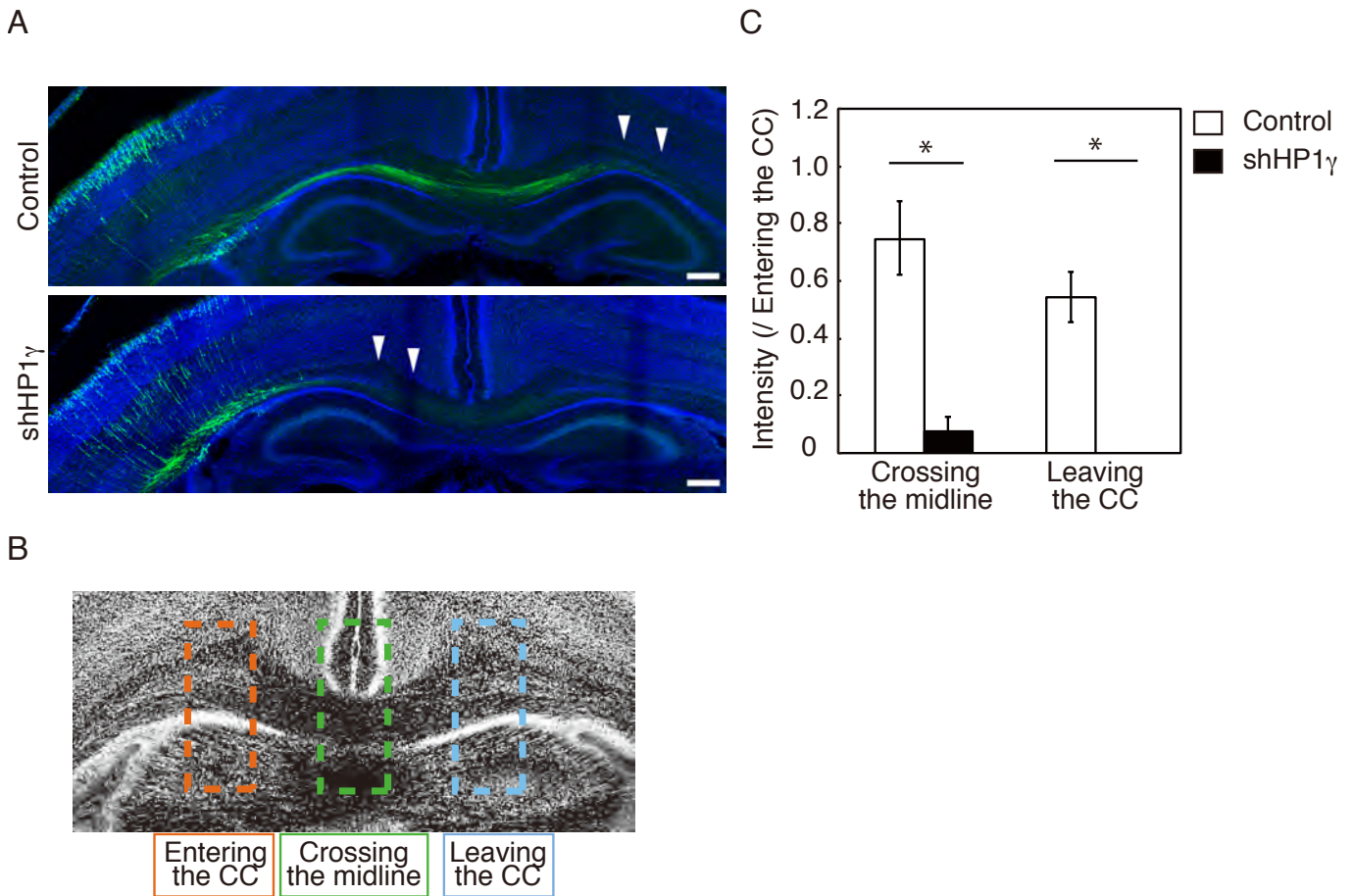


Figure 9. HP1 γ のノックダウンにより大脳新皮質第II/III層に存在する脳梁投射神経の軸索伸長が抑制される

(A) E15.5マウス胎仔に対して、示されたshRNAを発現するプラスミドとGFPを発現するプラスミドを子宮内電気穿孔法を用いて遺伝子導入した。P3の新生仔を灌流固定にて固定し、大脳新皮質組織切片を作成した後、免疫組織染色を行った。核はHoechstにて染色した(青)。最も伸長した軸索の先端を矢頭で示す。**(B)** 軸索伸長の評価のために、正中線を交差(緑枠)、脳梁を通過(青枠)する軸索の染色輝度を測定した。基準として、脳梁に侵入する(橙枠)軸索の染色輝度を用いた。**(C)** 脳梁に侵入する軸索に対する、正中線を交差または脳梁を通過する軸索の染色輝度の割合。体性感覚野を含む連続切片を用いて測定を行った。スケールバーは200 μ m。定量結果は、ControlまたはshHP1 γ それぞれ、4匹または3匹の新生仔より得た。*, $P < 0.05$ (Student's t test)。エラーバーは標準誤差を示す。

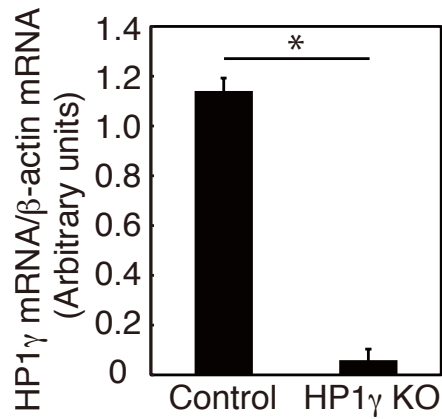


Figure 10. Creリコンビナーゼの発現によって、**HP1 γ mRNA**量が減少する (**HP1 γ** の条件的遺伝子破壊)

E15.5 **HP1 γ** 変異マウス (**HP1 γ ^{f/f}**)胎仔大脳新皮質より調整したニューロンを培養皿に播種し、1日間培養した後、**Cre**リコンビナーゼ (**HP1 γ KO**)または変異型**Cre**リコンビナーゼ (**Control**) を発現するレンチウイルスを感染させた。続けて、4日間培養した後、RNAを回収し、RT-qPCRによりmRNA量を測定した。 β -actinに対して標準化を行った。*, $P < 0.05$ (Student's *t* test)。エラーバーは標準誤差を示す。

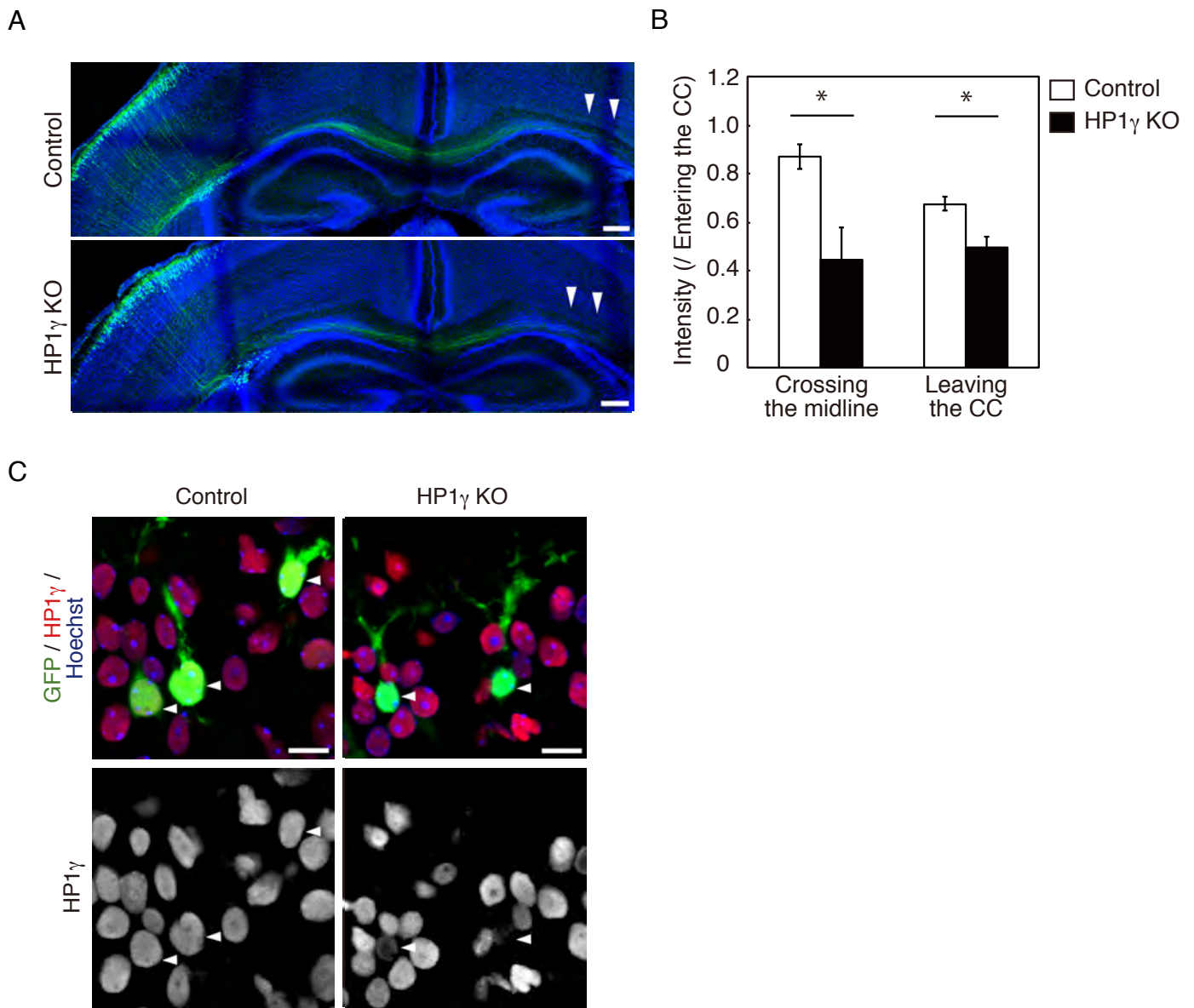


Figure 11. HP1 γ の条件的遺伝子破壊により大脳新皮質第II/III層に存在する脳梁投射神経の軸索伸長が抑制される

(A) E16.5 HP1 γ 変異マウス (HP1 $\gamma^{fl/fl}$)胎仔に対して、GFPを発現するプラスミド (control)、またはGFPを発現するプラスミドと共にCaMKIIプロモーターの下流でCreリコンビナーゼを発現するプラスミド (HP1 γ KO)を子宮内電気穿孔法を用いて遺伝子導入し、HP1 γ のニューロンにおける条件的遺伝子破壊を行った。P4の新生仔を灌流固定にて固定し、大脳新皮質組織切片を作成した後、免疫組織染色を行った。核はHoechstにて染色した (青)。最も伸長した軸索の先端を矢頭で示す。

(B) 脳梁に侵入する軸索に対する、正中線を交差または脳梁を通過する軸索の染色輝度の割合。体性感覚野を含む連続切片を用いて測定を行った。 **(C)** 上記のようにCreの遺伝子導入を行った大脳新皮質組織切片にて、GFP抗体 (緑)、HP1 γ 抗体 (赤)で免疫染色を行った。核はHoechstにて染色した (青)。矢頭は、GFP陽性細胞、すなわち遺伝子導入された細胞を示す。スケールバーは200 μm (A)、10 μm (C)。定量結果は、ControlまたはHP1 γ KOそれぞれ、4匹または3匹の新生仔より得た。*, $P < 0.05$ (Student's t test)。エラーバーは標準誤差を示す。

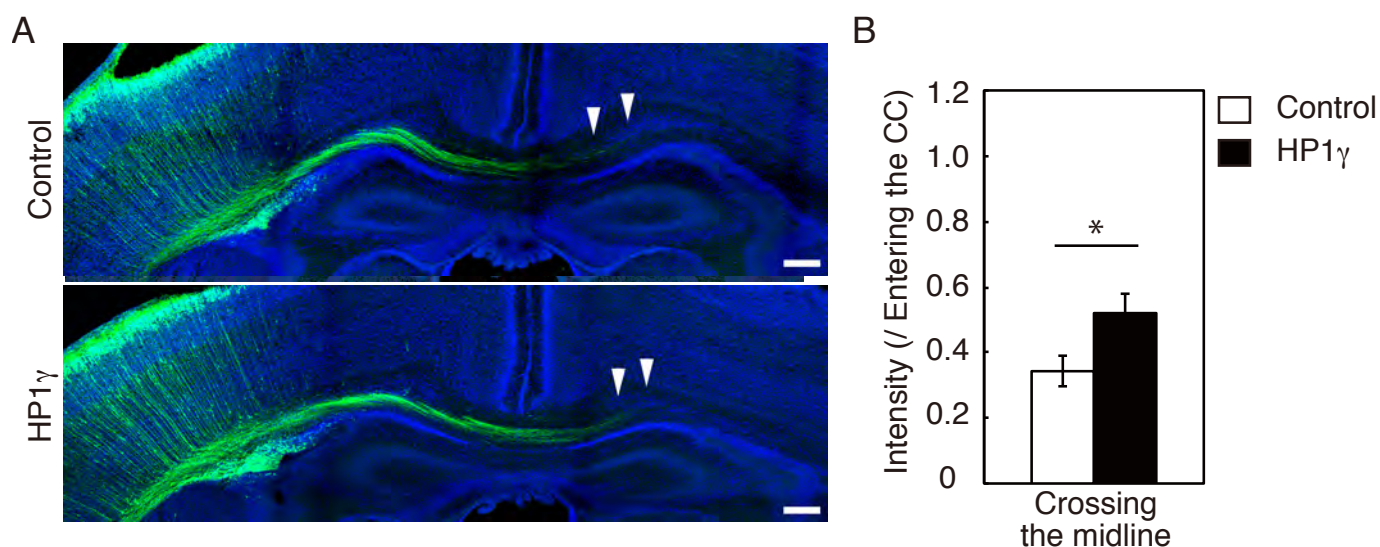


Figure 12. HP1 γ の過剰発現により大脳新皮質第II/III層に存在する脳梁投射神経の軸索伸長が促進される

(A) E15.5マウス胎仔に対して、GFP (control)またはHP1 γ を発現するプラスミドとGFPを発現するプラスミドを子宮内電気穿孔法を用いて遺伝子導入した。P2の新生仔を灌流固定にて固定し、大脳新皮質組織切片を作成した後、免疫組織染色を行った。核はHoechstにて染色した(青)。最も伸長した軸索の先端を矢頭で示す。**(B)** 脳梁に侵入する軸索に対する、正中線を交差または脳梁を通過する軸索の染色輝度の割合。体性感覚野を含む連続切片を用いて測定を行った。スケールバーは200 μ m。定量結果は、ControlまたはHP1 γ それぞれ、4匹または5匹の新生仔より得た。*, $P < 0.05$ (Student's *t* test)。エラーバーは標準誤差を示す。

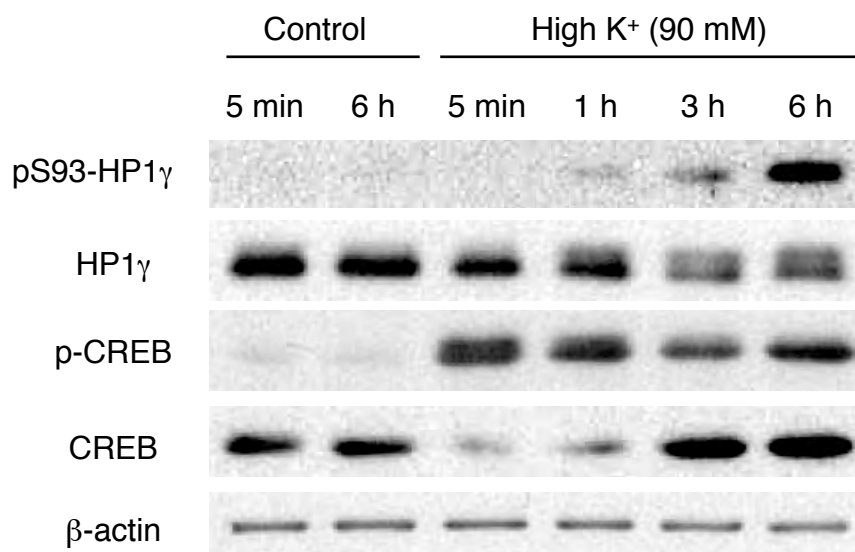


Figure 13. 高濃度カリウム溶液処理によって、HP1 γ のリン酸化が増加する

E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調整したニューロンを培養皿に播種し、培養5日目に高濃度カリウム溶液にて5分間、1時間、3時間、6時間処理し、細胞溶解液を調整した。調整した溶解液を用いて、S93リン酸化HP1 γ 抗体、HP1 γ 抗体、リン酸化CREB抗体、CREB抗体、 β -actin抗体にてウエスタンブロットを行った。

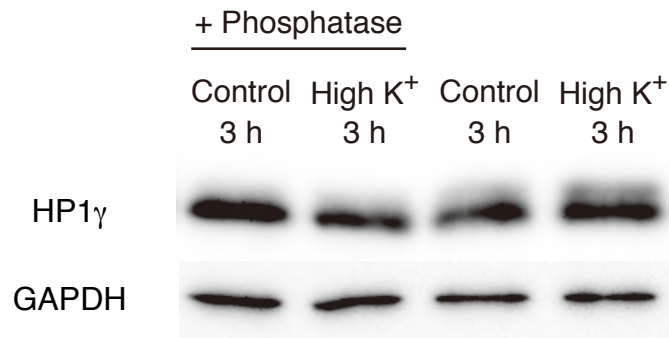


Figure 14. Phosphatase処理によって、高濃度カリウム溶液処理による**HP1 γ** のバンドシフトが消失する

E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調整したニューロンを培養皿に播種し、培養5 日目に高濃度カリウム溶液にて**3** 時間処理し、細胞溶解液を調整した。調整した溶解液を、**phosphatase**によって**2** 時間処理した。その後、**HP1 γ** 抗体、**GAPDH**抗体にてウエスタンブロットを行った。

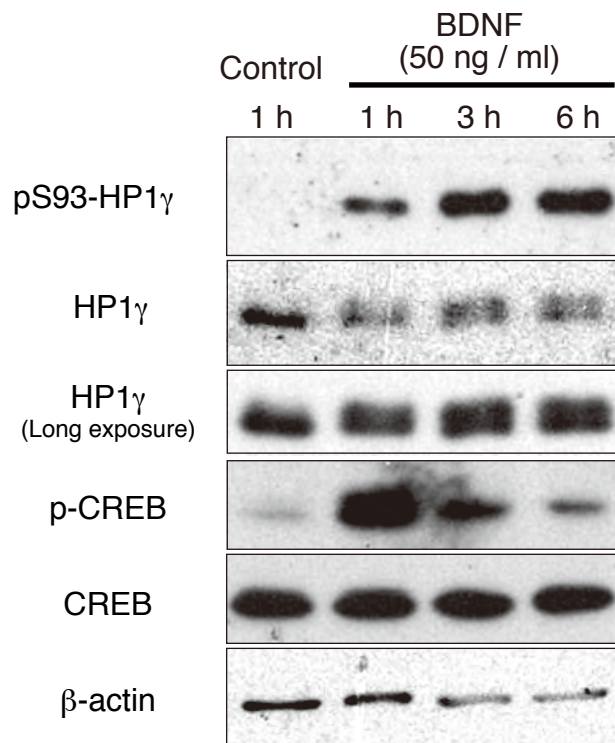


Figure 15. BDNF処理によって、HP1 γ のリン酸化が増加する

E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調整したニューロンを培養皿に播種し、培養5日目にBDNF溶液にて1時間、3時間、6時間処理し、細胞溶解液を調整した。調整した溶解液を用いて、S93リン酸化HP1 γ 抗体、HP1 γ 抗体、リン酸化CREB抗体、CREB抗体、 β -actin抗体にてウエスタンブロットを行った。

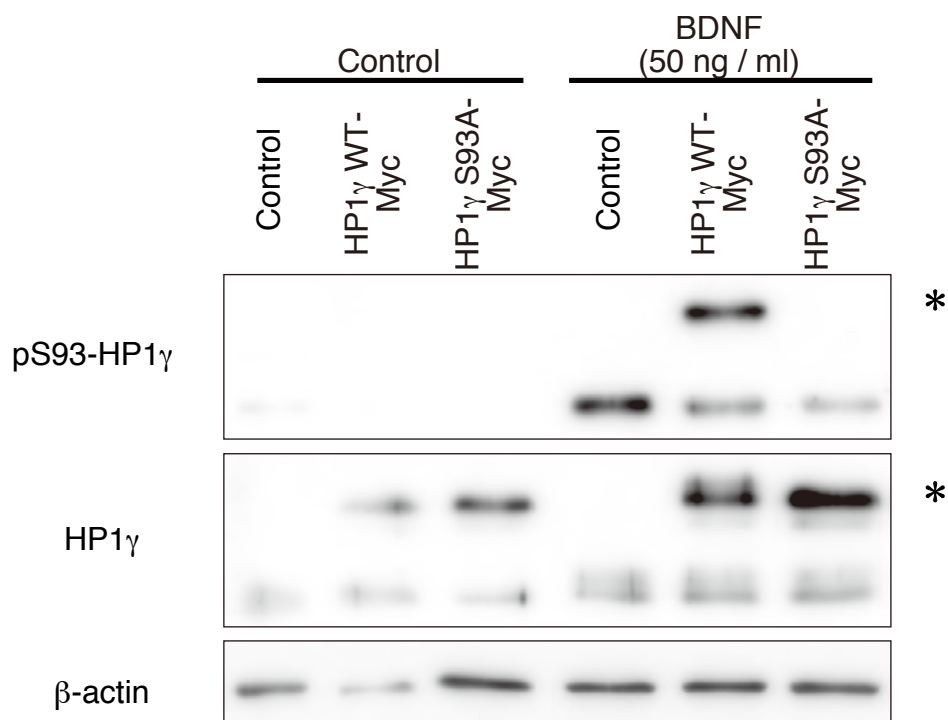


Figure 16. S93A変異体では、BDNF処理によってHP1 γ のバンドシフトは起こらない

E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調整したニューロンを培養皿に播種し、1日間培養した後、GFP (Control)、HP1 γ WT-MycまたはHP1 γ S93A-Mycを発現するレンチウイルスをそれぞれ感染させ、遺伝子導入した。培養5日目にBDNF溶液にて3時間処理し、細胞溶解液を調整した。調整した溶解液を用いて、S93リン酸化HP1 γ 抗体、HP1 γ 抗体、リン酸化CREB抗体、CREB抗体、 β -actin抗体にてウエスタンブロットを行った。*はレンチウイルスにより過剰発現した、myc標識付加されたHP1 γ WT、HP1 γ S93Aを示す。

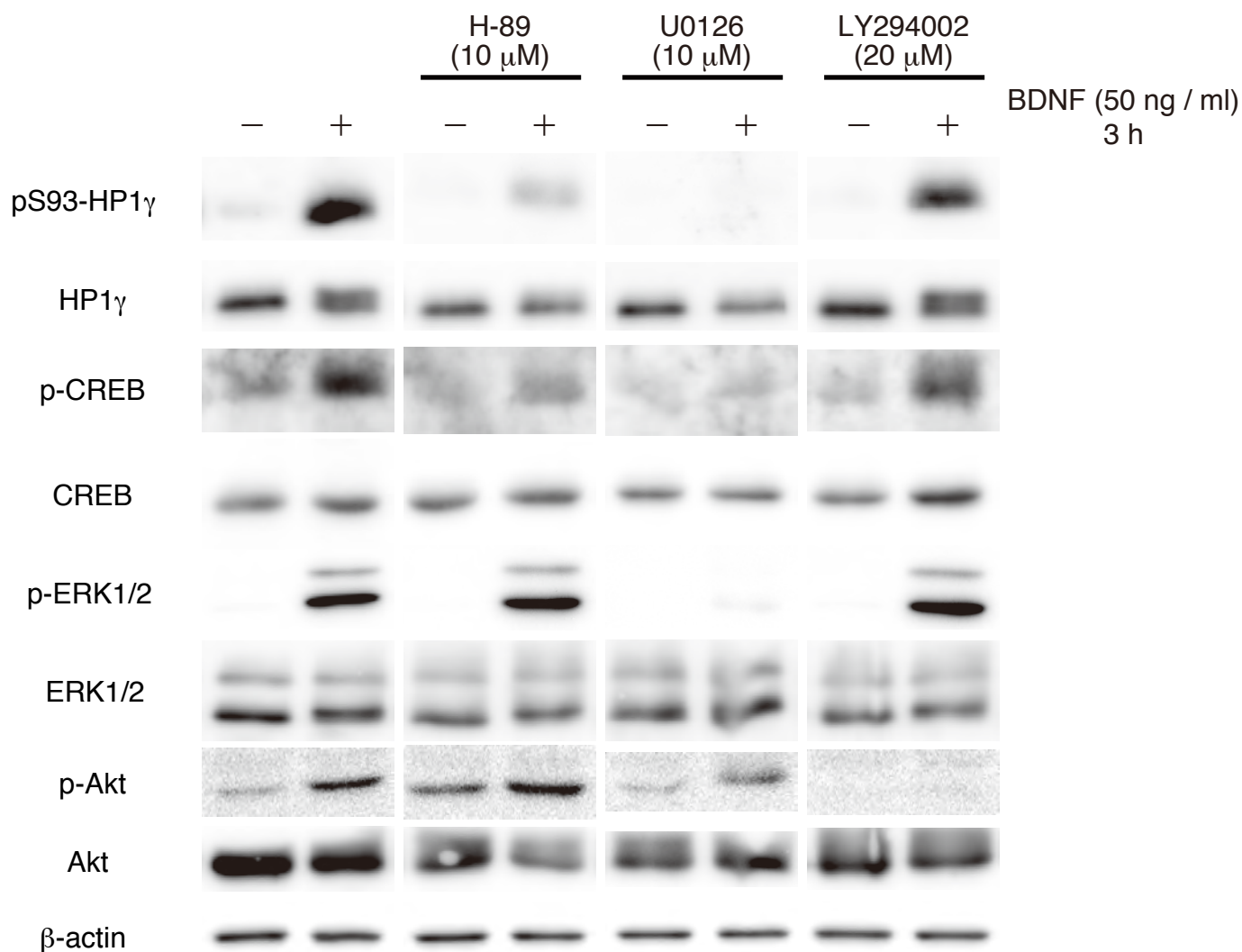


Figure 17. PKA阻害剤、MEK阻害剤によって、BDNFによるHP1 γ リン酸化の増加が抑制される

E14.5マウス胎仔大脳新皮質より調整したニューロンを培養皿に播種し、培養3日目にBDNF溶液にて3時間処理し、細胞溶解液を調整した。各阻害剤は、BDNF処理の30分前より培地に添加した。調整した溶解液を用いて、S93リン酸化HP1 γ 抗体、HP1 γ 抗体、リン酸化CREB抗体、CREB抗体、リン酸化ERK1/2抗体、ERK1/2抗体、リン酸化Akt抗体、Akt抗体、 β -actin抗体にてウェスタンブロットを行った。

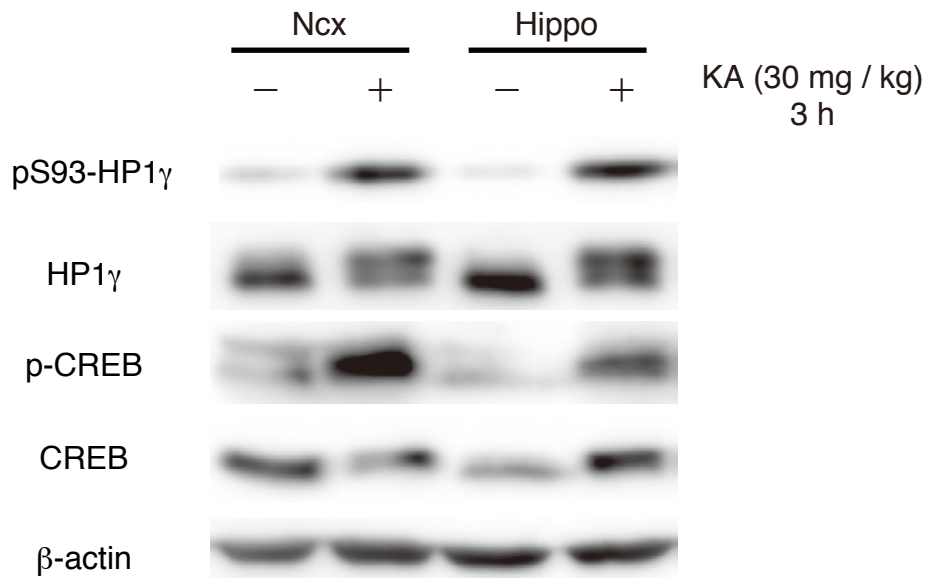


Figure 18. 大脳新皮質または海馬にて、カイニン酸投与によってHP1 γ リン酸化が増加する

P40マウスにカイニン酸 (KA)を腹腔内投与し、3 時間後に大脳新皮質 (Ncx)または海馬 (Hippo)より組織溶解液を調整した。調整した溶解液を用いて、S93リン酸化HP1 γ 抗体、HP1 γ 抗体、リン酸化CREB抗体、CREB抗体、 β -actin抗体にてウエスタンブロットを行った。

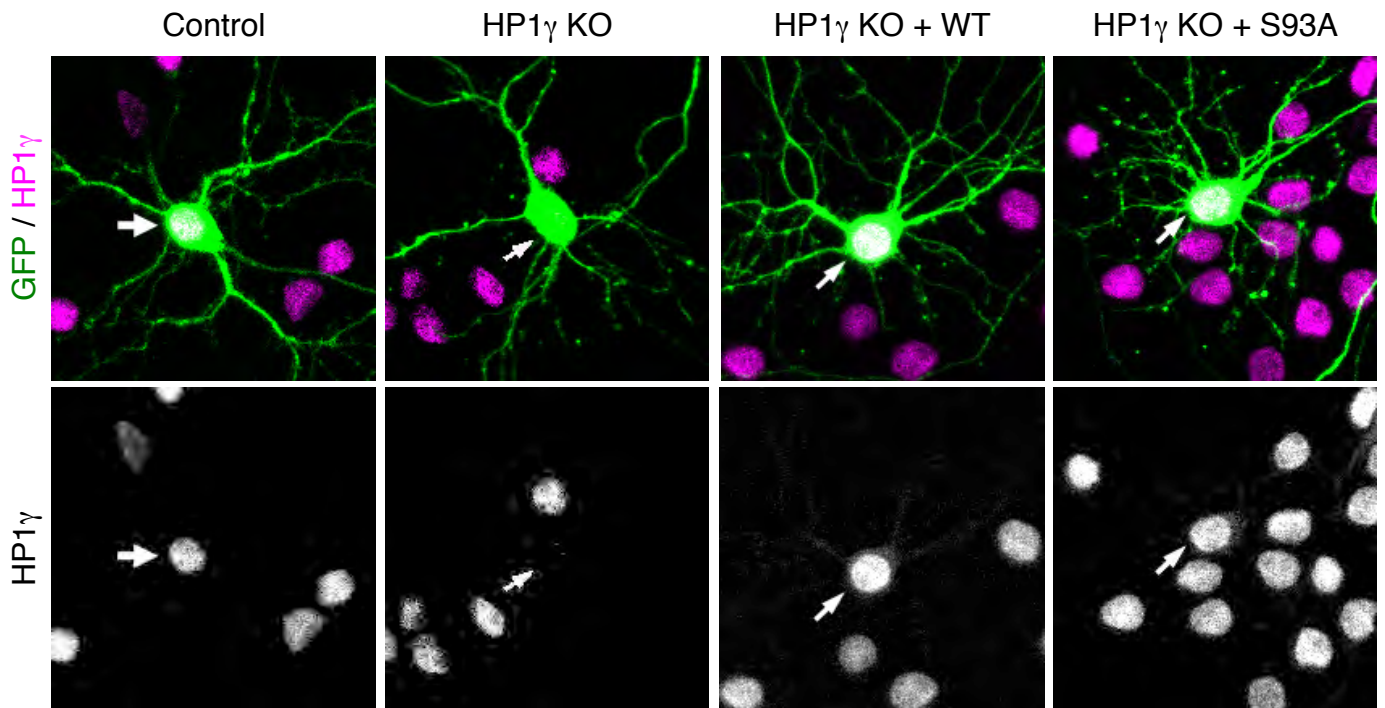
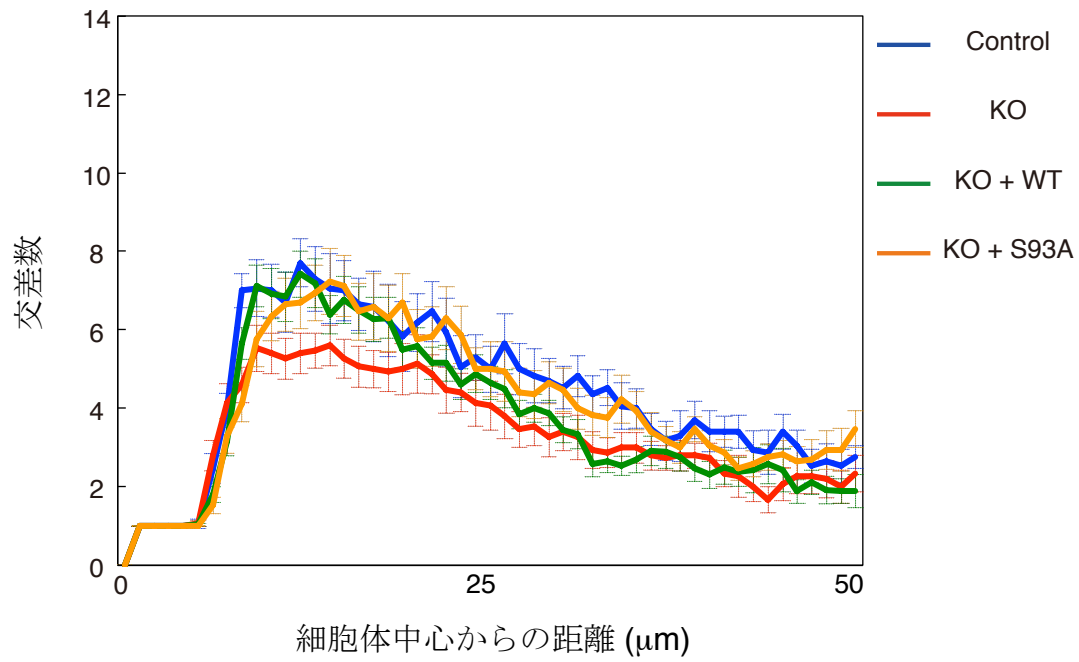


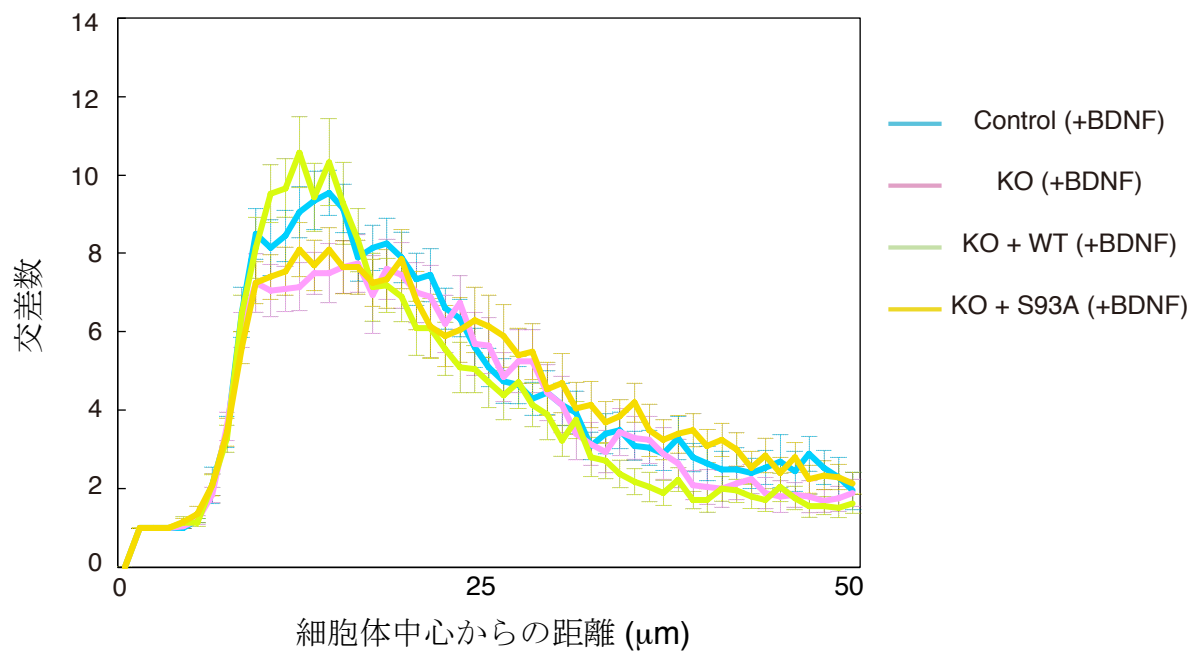
Figure 19. HP1 γ の遺伝子欠損による染色輝度の減少とHP1 γ WTまたはHP1 γ S93A過剰発現による染色輝度の回復

E15.5 HP1 $\gamma^{fl/fl}$ マウス胎仔大脳新皮質より調整したニューロンを培養皿に播種し、1日間培養した後、Creリコンビナーゼを発現するベクターを遺伝子導入した (HP1 γ KO)。この時、HP1 γ WTまたはHP1 γ S93Aを発現するプラスミドをそれぞれ遺伝子導入した。また、遺伝子導入された細胞を識別するためにGFPを発現するプラスミドを共に遺伝子導入した。その後、6日間培養し、固定した。固定した細胞をHP1 γ 抗体 (緑)、GFP抗体 (赤紫)を用いて免疫染色した。矢印は、遺伝子導入された細胞を示す。

A



B



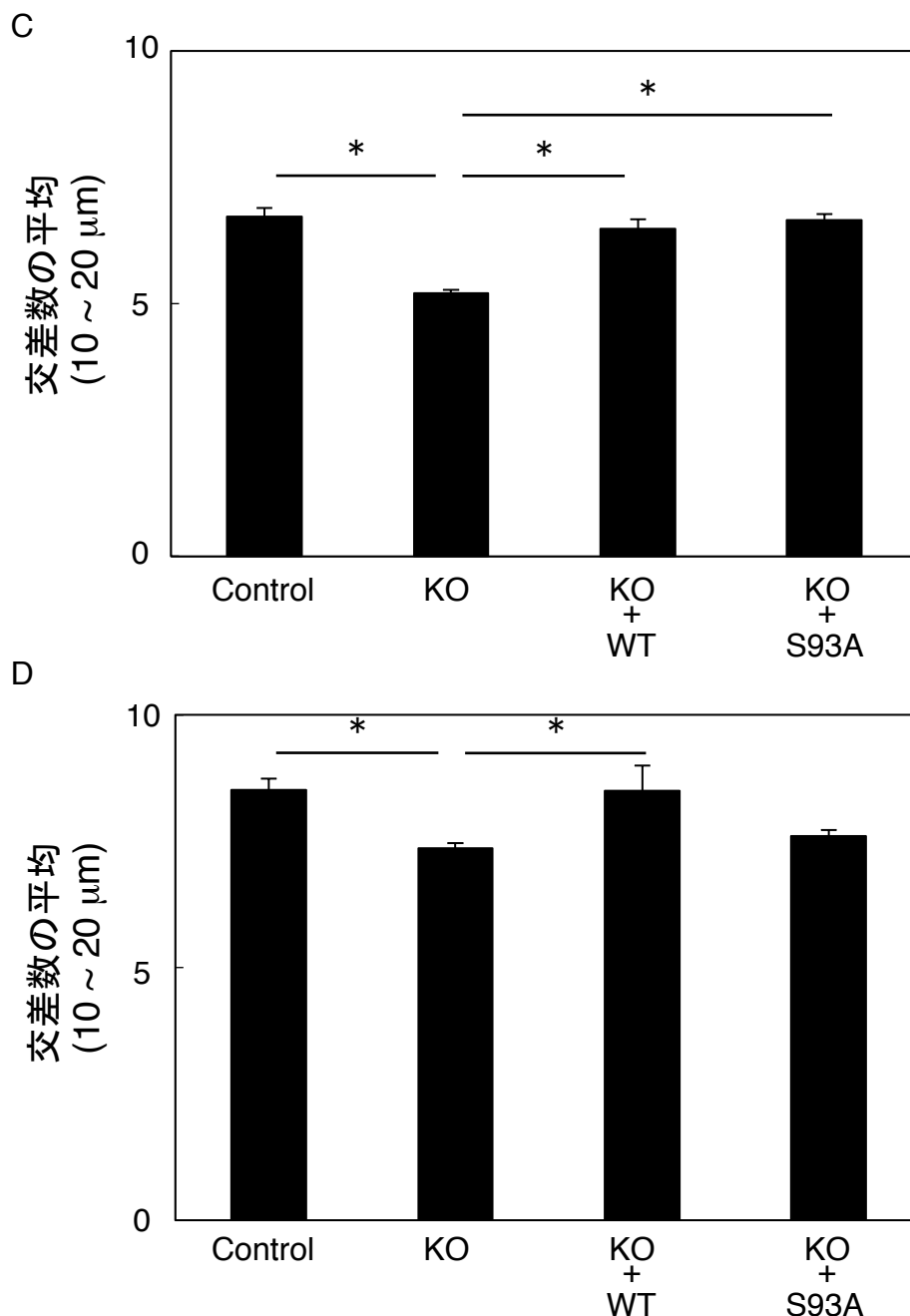


Figure 20. BDNF存在下において、HP1 γ S93AはKOの表現系を回復できない

(A, B) E15.5 HP1 $\gamma^{fl/fl}$ マウス胎仔大脳新皮質より調整したニューロンを培養皿に播種し、1日間培養した後、Creリコンビナーゼを発現するベクターを遺伝子導入した (HP1 γ KO)。この時、HP1 γ WTまたはHP1 γ S93Aを発現するプラスミドをそれぞれ遺伝子導入した。また、形態を観察するためにmCherryを発現するプラスミドを共に遺伝子導入した。その後、2日間培養し、BDNF非存在下 (A)または存在下 (B)で6時間処理した後、固定した。固定した細胞を免疫染色し、形態を観察した。ニューロン突起の複雑さを評価するために、sholl analysis法を用いて交差数を定量した。(C, D) 細胞体中心からの距離10~20 μ mにおいて、交差数の平均を算出した。定量結果は、BDNF非存在下 (C)において、ControlまたはHP1 γ KO、HP1 γ WT、HP1 γ S93Aそれぞれ、17細胞または15細胞、26細胞、17細胞より、BDNF存在下 (D)において、ControlまたはHP1 γ KO、HP1 γ WT、HP1 γ S93Aそれぞれ、20細胞または20細胞、21細胞、20細胞より得た。(C)、(D)いずれも、P < 0.05 (One-way ANOVA)、*, P < 0.05 (Tukey-Kramer test)。

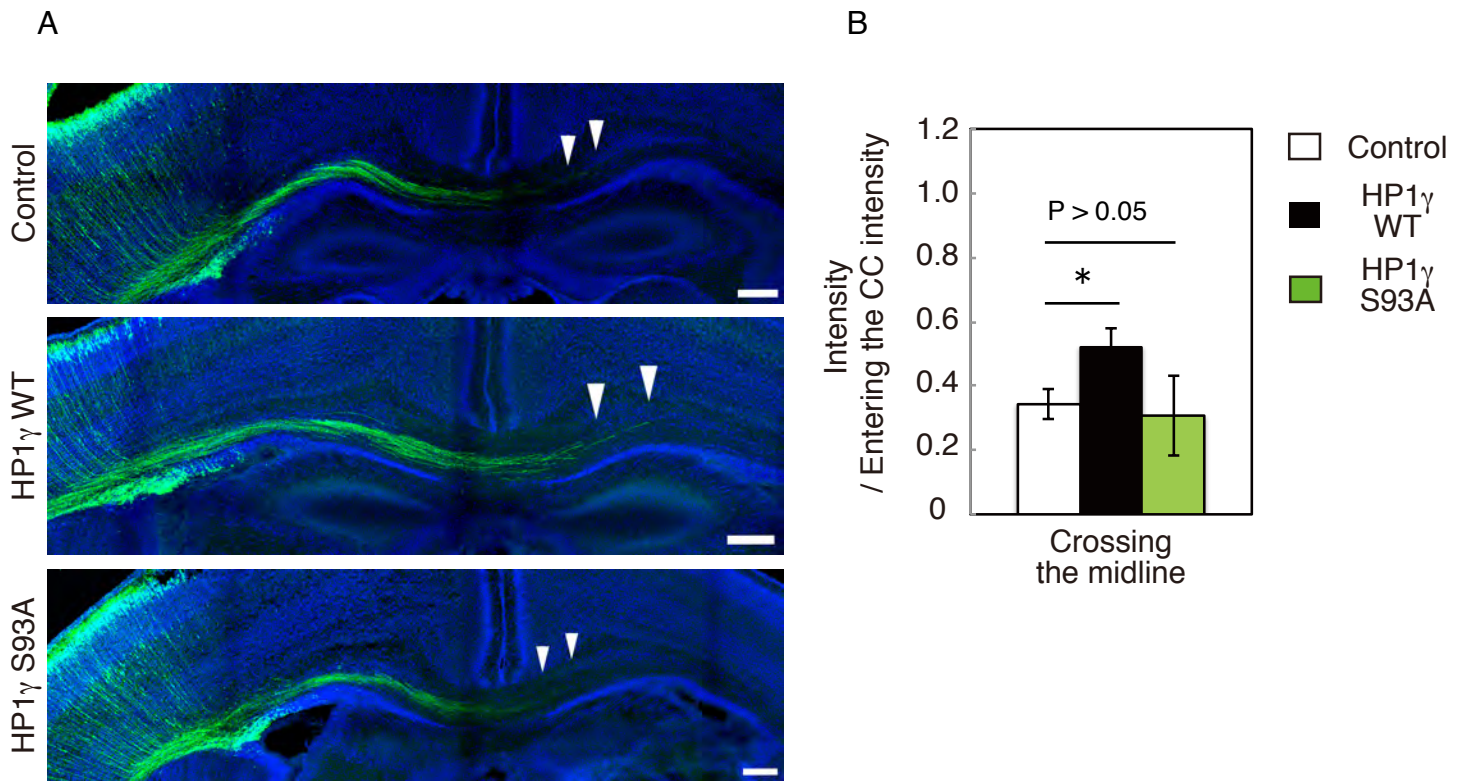


Figure 21. 体性感覚野において、HP1 γ S93Aは大脳新皮質第II/III層に存在する脳梁投射神経の軸索伸長を促進しない

(A) E15.5マウス胎仔に対して、HP1 γ S93Aを発現するプラスミドとGFPを発現するプラスミドを子宮内電気穿孔法を用いて遺伝子導入した。P2の新生仔を灌流固定にて固定し、大脳新皮質組織切片を作成した後、免疫組織染色を行った。核はHoechstにて染色した (青)。最も伸長した軸索の先端を矢頭で示す。**(B)** 脳梁に侵入する軸索に対する、正中線を交差または脳梁を通過する軸索の染色輝度の割合。体性感覚野を含む連続切片を用いて測定を行った。スケールバーは200 μ m。定量結果は、ControlならびにHP1 γ WTはFigure 12.と同データ、HP1 γ S93Aは3匹の新生仔より得た。*, $P < 0.05$ (Student's *t* test)。エラーバーは標準誤差を示す。

結論および考察

本研究では、発生期マウス大脳新皮質において、HP1 γ の発現量がニューロン成熟に伴って増加することを見いだした。また、HP1 γ がニューロン成熟を調節することが示唆された。加えて、HP1 γ が外部シグナルによってリン酸化されることが示唆された。生体内においても外部シグナルによってHP1 γ がリン酸化されたことは、非常に新規性が高い。そして、そのリン酸化が外部シグナル依存的なニューロン成熟に寄与することが示唆された。

ニューロン成熟に伴う、HP1 γ およびHP1 γ リン酸化の変化

本研究の結果から、発生期の脳新皮質において、ニューロンの分化、移動、成熟に伴ってHP1 γ の発現量が増加することが示唆された (Fig. 1C, Fig. 3)。この発現量の増加は、*in vitro*初代培養系においても観察されたことから (Fig. 4)、少なくとも脳の三次元構造を必要としない、外界からあるいは内在的な遺伝的要因によって、HP1 γ の発現量増加が起こっている可能性が考えられる。どのようにして、HP1 γ の発現量が調節されているかに関しては未だ分かっておらず、まだ検討すべき必要がある。ゲノム上でのHP1 γ 遺伝子座のプロモーター解析などを行えば、転写因子などの要因を検討できる可能性がある。また、本研究では外部シグナルによってHP1 γ の発現量の変化は観察されなかったが、より生理的な他の外部シグナルの関与も考える必要がある。例えば、生体内において幼若期のニューロンでは、GABAによるニューロン活性化がその後の樹状突起発達に重要であることが示されており (Cancedda *et al.* 2007)、GABAのような因子によってHP1 γ の発現量に影響があるか、*in vitro*、生体内共に検討できれば良い。HP1 γ の発現調節を行う要因が、時間的、空間的にニューロンの成熟を調節する鍵となっているだろう。

また、本研究では層構造構築後の大脳新皮質において、層間においてHP1 γ の発現量が異なっていることが示唆された (Fig. 2)。大脳新皮質は6層構造をとっており、各層毎に決まったサブタイプのニューロンが存在する。例えば、第IV層のニューロン群は視床からの入力を受け取る素子として、また、第III/III層や

第V層のニューロン群は、皮質内や皮質外にシグナルを伝える素子として機能していると考えられている。興味深いことに、第II/III層や第V層といった軸索を長距離にわたって伸張させるニューロンが存在する層において、HP1 γ の発現量が高くなっていることが示唆された。層間でのサブタイプごとにニューロンの形態は異なっており、より発達した突起を有するニューロンにおいて、HP1 γ が高発現していることが重要であるのかもしれない。ノックダウンや過剰発現を行うことにより、HP1 γ の発現量とニューロンサブタイプにおける形態との関係についても検討できれば興味深い。また、各層のマーカー分子や運命決定因子などの下流で、HP1 γ の発現量が制御されている可能性も考えられる。ニューロンのサブタイプによってHP1 γ の最終的な発現量が決まり、サブタイプに特徴的な形態が獲得されるのか、あるいは、HP1 γ の発現量によって形態が決定され、そのことがニューロンサブタイプの決定に影響しうるのか。HP1 γ が複雑な神経回路網を構築する上でどんな役割を担っているのか、さらに検討していければ興味深い。

一方で、神経活動の模倣や神経栄養因子などの外部シグナルによって、HP1 γ リン酸化が増加することが示唆された (Fig. 13, Fig. 15)。ここで興味深いのは、転写因子CREBのリン酸化と比べて、HP1 γ のリン酸化は増加のタイミングが遅く、かつ長期に渡って起きていることが観察された。これは、HP1 γ のリン酸化が、外部シグナルによる後期の遺伝子発現変化や核内での長期的な変化に寄与する可能性があると考えられる。

また、本研究ではBDNFの下流で、PKA経路、MAPK経路がHP1 γ のリン酸化に寄与することが示唆された (Fig.17)。しかしながら、それぞれの阻害剤の特異性には様々な議論があり、注意しなくてはならない。近年、大腸における自然免疫系において、MAPK経路の因子であるMSK1がHP1 γ のリン酸化に寄与することが報告された (Harouz *et al.* 2014)。MSK1は、成体マウス海馬でのニューロン新生において、樹状突起の発達に寄与することが知られている (Choi *et al.* 2012)。本研究の系でも、MSKがHP1 γ リン酸化を実行するキナーゼとして機能し、ニューロン成熟に寄与する可能性が考えられる。また、本研究で十分に検討できていない、CaMKなどのシグナル伝達経路についても検討できると良いと考えている。

本研究では、生体内においてカイン酸投与によるHP1 γ リン酸化の増加が観察された (Fig. 18)。しかし、発生期の大脳新皮質において、どのような領域で、どのような細胞で、どのようなタイミングでHP1 γ のリン酸化がみられるのかに関しては、現段階で検討できていない。当研究室の内藤によって、脳組織切片上でリン酸化HP1 γ を検出できる可能性を示唆する結果が得られたことから、発生期においてHP1 γ リン酸化がどのようなパターンで起こっているのか解析できれば興味深い。さらに、感覚刺激などの生理的な刺激によって、HP1 γ リン酸化がどのように変化するか、生体内で検討できれば良いと考えている。

ところで、Hela細胞においては、リン酸化HP1 γ はユークロマチン領域のみに局在しており、さらにリン酸化Pol IIと共局在することが報告されている (Lomberk *et al.* 2006)。また、いくつかの細胞種において、リン酸化HP1 γ が転写伸長やスプライシングに関わることが示唆されている。本研究で観察されたリン酸化HP1 γ がニューロンでどのような核内局在を示すのかは非常に興味深い。予備的な実験ではあるが、当研究室の内藤によって、リン酸化HP1 γ がスプライシングに関与する因子と共局在する可能性を示唆する結果が得られた。外部シグナルによって、リン酸化HP1 γ の量や局在がどのように変化するのか、Pol IIとの局在や核内構造体との関連について、核内でより詳細に解析できれば興味深い。

本研究では、HP1 γ S93のリン酸化について解析を進めてきた。S93はHP1 γ の hinge regionに位置する。S93の近傍にはセリンクラスターが存在しており、リン酸化部位予測などから、S93以外にもリン酸化が入ることは十分に考えられる。また、HP1 α においてはN末端部位のリン酸化がクロマチンとの結合に重要な働きをすることが示唆されており (Nishibuchi *et al.* 2014)、HP1 γ についてもhinge region以外の部位でリン酸化が入ることが考えられる。S93以外のリン酸化部位や、その機能について検討することで、ニューロンにおける残基特異的なリン酸化やその機能が明らかになるかもしれない。

ニューロン成熟におけるHP1 γ およびHP1 γ リン酸化の機能

本研究により、HP1 γ が軸索、樹状突起の発達を調製することが示唆された (Fig. 7, Fig. 8, Fig. 9, Fig. 11, Fig. 12)。HP1 γ のノックダウンまたは条件的遺伝

子破壊により、*in vitro*初代培養系、生体内の双方において、軸索、樹状突起の発達が抑制された。この時、細胞死には有意な差が見られなかったことから、これはHP1 γ が基本的な細胞の生存能力に影響を与えたためではないと考えられる。ニューロンの代謝状態への影響については、さらなる解析が必要であるが、この現象は、ニューロン成熟の調節におけるHP1 γ 特有の機能によるものであると考えている。さらに、HP1 γ の過剰発現によって軸索、樹状突起の発達が促進されたことは、HP1 γ の発現量の増加こそが脳新皮質におけるニューロン成熟の進行を調節する要因であることを示唆しており、非常に興味深い。HP1 γ の発現量の変化が、シナプス形成などのニューロン成熟の他の現象においてどのような役割を果たすのか、さらに検討していかると良い。

本研究で得られたHP1 γ のノックダウンまたは条件的遺伝子破壊による結果は、HP1 γ のリン酸化に依存した機能、依存していない機能、どちらを反映したものだろうか。予備的ではあるが、本研究で用いている*in vitro*初代培養系において、HP1 γ のリン酸化が培養5日目近辺から増加することを示唆する結果を得ている。また、体性感覚野において交連ニューロン軸索の正中線交差は、神経活動依存的であることが知られている (Wang *et al.* 2007)。以上のことから、本研究でのHP1 γ のノックダウンまたは条件的遺伝子破壊による結果は、リン酸化依存的、非依存的両方の機能による影響を含んでいる可能性が考えられる。リン酸化依存的、非依存的なHP1 γ の機能については、さらなる解析が必要である。

本研究では、HP1 γ のリン酸化が外部シグナル依存的なニューロン成熟に寄与することが示唆された (Fig. 20, Fig. 21)。BDNF存在下においては、S93A変異体でHP1 γ 遺伝子欠損の表現系の回復が見られない傾向にあった。このことは、BDNFによるニューロンの突起発達に、HP1 γ のリン酸化が重要であることを示唆する。また、BDNF非存在下においては、S93A変異体でHP1 γ 遺伝子欠損の表現系の回復が見られた。このことは、リン酸化依存的、非依存的な機能を正確に区別することはできてはいないが、HP1 γ はS93リン酸化に依存せずにニューロン成熟を制御し得ることを示唆しており興味深い。生体内において、視覚野では交連軸索の正中線交差は神経活動依存的でないという報告がある (Mizuno *et al.* 2007)。この領域において、S93A変異体が野生型と同様の表現系を示せば、

神経活動に依存していないニューロン成熟において、HP1 γ のS93リン酸化に依存しない機能をさらに示唆することができるかもしれない。

また、例えば眼優位性カラムの確立など、生理的条件下で起きている感覚刺激によるニューロン成熟に関しても、HP1 γ やそのリン酸化の役割について検討していきたい。

HP1 γ およびHP1 γ リン酸化がニューロン成熟に寄与するメカニズム

では、HP1 γ やHP1 γ リン酸化はどのようなメカニズムでニューロン成熟を制御しているのか。HP1 γ はクロマチンを調製することができる因子であることから、クロマチン状態の制御を介してニューロン成熟を調節していると考えている。先に述べた通り、HP1 γ は複数のドメインを介して、ヌクレオソームやDNA、RNA、様々なタンパク質と相互作用することが知られている。HP1 γ がニューロン成熟に寄与する際に、CHD、CSD、hinge regionのうちどのドメインが重要になるのか検討したい。特に、HP1ファミリータンパク質のCHDはH3K9me3に選択的に結合することが知られているため、この結合部位の変異体を用いることで、HP1 γ のニューロン成熟への寄与がヒストン修飾を介したものであるか検討したい。同時に、転写伸長やスプライシングなど、どのようなタンパク質群と結合しているのかも解析できると面白い。

また、HP1 γ がどのような遺伝子群を制御しているのか検討することは非常に重要であり、マイクロアレイを用いた解析などによって検討していきたい。さらに、HP1 γ やリン酸化HP1 γ がゲノム上、遺伝子上のどのような位置に結合しているかは興味深い。これまでに、Hela細胞において、HP1 γ がCD44遺伝子のgene body領域に結合することが報告されている (Saint-Andre *et al.* 2011)。我々の系においても、HP1 γ の標的遺伝子のどの部位にHP1 γ が結合しているか、リン酸化HP1 γ はどのように結合しているのか、検討できれば良いと考えている。加えて、ゲノム全体でのHP1 γ やリン酸化HP1 γ の結合に関して、ChIP-seq法などにより網羅的に解析できれば興味深い。

これまでの報告でニューロン関連遺伝子群は、エクソン、イントロンを含めた遺伝子長が長いことが示唆されている (Polymenidou *et al.* 2011)。加えて、予備的ではあるが、BDNF処理によって変動する遺伝子群の遺伝子長が長い傾向に

あることを示唆する結果を得ている。HP1 γ が結合している遺伝子は長いということが報告されていることから (Smallwood *et al.* 2012)、HP1 γ やリン酸化HP1 γ が長い遺伝子群の発現調節に重要な役割を担っており、長い遺伝子群の発現調節を介してニューロン成熟に寄与している可能性も考えられる。また、自閉症スペクトラム障害 (Autism spectrum disorder, ASD)の候補遺伝子群に関して、その遺伝子長が長いということが示唆されており (King *et al.* 2013)、HP1 γ と疾患との関連に関しても調べていけると興味深い。

発生期の脳新皮質において、ニューロンが標的領域へと突起を伸展させ、緻密で正確なネットワークを形成する際に、クロマチン構造タンパクであるHP1 γ の量や修飾の変化が重要であることが示唆された。HP1 γ はゲノム上の広い領域に結合する可能性があり、ニューロン成熟に関連する遺伝子群を協調的に制御するメカニズムの一つである可能性が考えられる。HP1 γ およびそのリン酸化が、核内での協調的な変化、ニューロンの成熟を引き起こすメカニズムの一員となり得るのではないかと考えている (Figure I)。

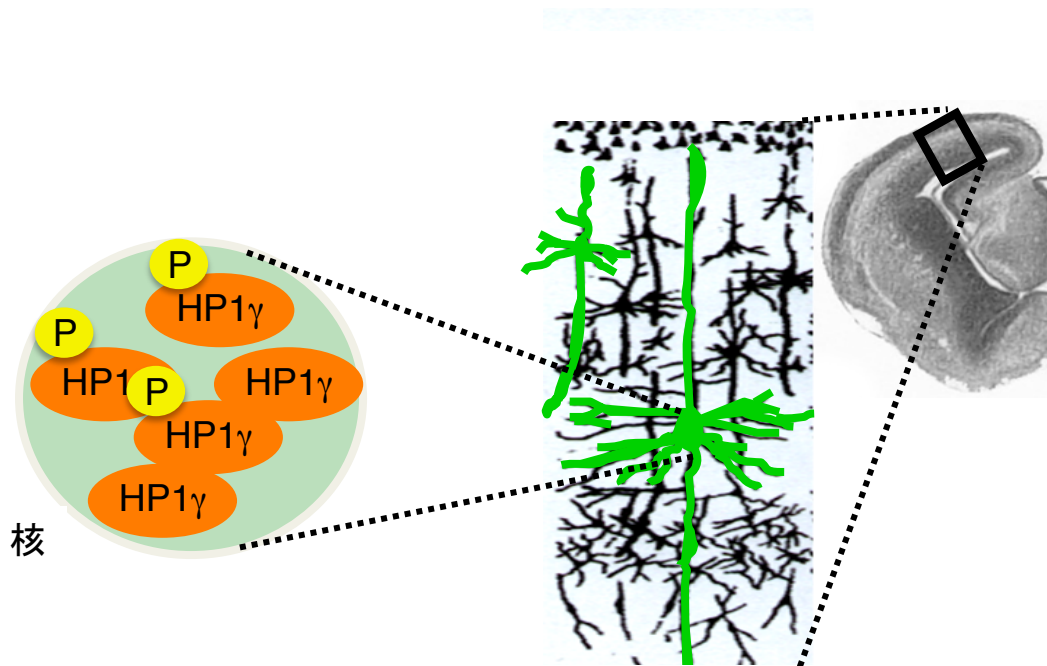


Figure I. HP1 γ およびHP1 γ リン酸化が発生期大脳新皮質においてニューロン成熟に寄与する

結言

本研究では、発生期の脳新皮質において、クロマチン構造タンパクであるHP1 γ の量や修飾の変化がニューロン成熟に寄与することが示唆された。HP1 γ はゲノム上の広い領域に結合する可能性があり、ニューロン成熟に関連する遺伝子群を協調的に制御するメカニズムの一つである可能性が考えられる。HP1 γ およびそのリン酸化が、核内での協調的な変化、ニューロンの成熟を引き起こすメカニズムの一員となり得るのではないかと考えている。

脳の機能に重要である複雑且つ秩序立ったネットワークの形成には、個々のニューロンが正しく成熟していくことが必要であると考えられる。本研究で得られた結果は、脳の回路素子であるニューロンの成熟の調節がどのように行われているか、その一端を明らかに出来たのではないかと考えている。

参考文献

- Aasland, R. & Stewart, A.F. (1995) The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Res* **23**, 3168-3173.
- Ageta-Ishihara, N., Takemoto-Kimura, S., Nonaka, M., Adachi-Morishima, A., Suzuki, K., Kamijo, S., Fujii, H., Mano, T., Blaeser, F., Chatila, T.A., Mizuno, H., Hirano, T., Tagawa, Y., Okuno, H. & Bito, H. (2009) Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J Neurosci* **29**, 13720-13729.
- Baker, S.A., Chen, L., Wilkins, A.D., Yu, P., Lichtarge, O. & Zoghbi, H.Y. (2013) An AT-hook domain in MeCP2 determines the clinical course of Rett syndrome and related disorders. *Cell* **152**, 984-996.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. & Kouzarides, T. (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**, 120-124.
- Cancedda, L., Fiumelli, H., Chen, K. & Poo, M.M. (2007) Excitatory GABA action is essential for morphological maturation of cortical neurons in vivo. *J Neurosci* **27**, 5224-5235.
- Choi, Y.S., Karelina, K., Alzate-Correa, D., Hoyt, K.R., Impey, S., Arthur, J.S. & Obrietan, K. (2012) Mitogen- and stress-activated kinases regulate progenitor cell proliferation and neuron development in the adult dentate gyrus. *J Neurochem* **123**, 676-688.
- Cohen, S., Gabel, H.W., Hemberg, M., Hutchinson, A.N., Sadacca, L.A., Ebert, D.H., Harmin, D.A., Greenberg, R.S., Verdine, V.K., Zhou, Z., Wetsel, W.C., West, A.E. & Greenberg, M.E. (2011) Genome-wide activity-dependent MeCP2 phosphorylation regulates nervous system development and function. *Neuron* **72**, 72-85.
- Dijkhuizen, P.A. & Ghosh, A. (2005) BDNF regulates primary dendrite formation in cortical neurons via the PI3-kinase and MAP kinase signaling pathways. *J Neurobiol* **62**, 278-288.
- Duan, X., Chang, J.H., Ge, S. *et al.* (2007) Disrupted-In-Schizophrenia 1

regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell* **130**, 1146-1158.

Eissenberg, J.C., James, T.C., Foster-Hartnett, D.M., Hartnett, T., Ngan, V. & Elgin, S.C. (1990) Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 9923-9927.

Fanti, L. & Pimpinelli, S. (2008) HP1: a functionally multifaceted protein. *Curr Opin Genet Dev* **18**, 169-174.

Font-Burgada, J., Rossell, D., Auer, H. & Azorin, F. (2008) *Drosophila* HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and Relative-of-WOC to regulate gene expression. *Genes Dev* **22**, 3007-3023.

Fuks, F., Hurd, P.J., Deplus, R. & Kouzarides, T. (2003) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **31**, 2305-2312.

Gorski, J.A., Zeiler, S.R., Tamowski, S. & Jones, K.R. (2003) Brain-derived neurotrophic factor is required for the maintenance of cortical dendrites. *J Neurosci* **23**, 6856-6865.

Gupta, A., Tsai, L.H. & Wynshaw-Boris, A. (2002) Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet* **3**, 342-355.

Hahn, M.A., Qiu, R., Wu, X., Li, A.X., Zhang, H., Wang, J., Jui, J., Jin, S.G., Jiang, Y., Pfeifer, G.P. & Lu, Q. (2013) Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis. *Cell Rep* **3**, 291-300.

Harouz, H., Rachez, C., Meijer, B.M., Marteyn, B., Donnadieu, F., Cammas, F., Muchardt, C., Sansonetti, P. & Arbibe, L. (2014) *Shigella flexneri* targets the HP1gamma subcode through the phosphothreonine lyase OspF. *Embo j* **33**, 2606-2622.

Hirabayashi, Y., Suzuki, N., Tsuboi, M., Endo, T.A., Toyoda, T., Shinga, J., Koseki, H., Vidal, M. & Gotoh, Y. (2009) Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. *Neuron* **63**, 600-613.

Ito, S., D'Alessio, A.C., Taranova, O.V., Hong, K., Sowers, L.C. & Zhang, Y. (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466**, 1129-1133.

Itoh, Y., Masuyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I. & Gotoh, Y. (2007) The cyclin-dependent kinase inhibitors p57 and p27 regulate neuronal migration in the developing mouse neocortex. *J Biol Chem* **282**, 390-396.

Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (2003) The control of dendrite development. *Neuron* **40**, 229-242.

Kaur, P., Karolina, D.S., Sepramaniam, S., Armugam, A. & Jeyaseelan, K. (2014) Expression Profiling of RNA Transcripts during Neuronal Maturation and Ischemic Injury. *PLoS One* **9**, e103525.

King, I.F., Yandava, C.N., Mabb, A.M., Hsiao, J.S., Huang, H.S., Pearson, B.L., Calabrese, J.M., Starmer, J., Parker, J.S., Magnuson, T., Chamberlain, S.J., Philpot, B.D. & Zylka, M.J. (2013) Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism. *Nature* **501**, 58-62.

Kourmouli, N., Theodoropoulos, P.A., Dialynas, G., Bakou, A., Politou, A.S., Cowell, I.G., Singh, P.B. & Georgatos, S.D. (2000) Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope. *Embo j* **19**, 6558-6568.

Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705.

Kwon, S.H. & Workman, J.L. (2008) The heterochromatin protein 1 (HP1) family: put away a bias toward HP1. *Mol Cells* **26**, 217-227.

Kwon, S.H. & Workman, J.L. (2011) The changing faces of HP1: From heterochromatin formation and gene silencing to euchromatic gene expression: HP1 acts as a positive regulator of transcription. *Bioessays* **33**, 280-289.

Lee, D.H., Li, Y., Shin, D.H., Yi, S.A., Bang, S.Y., Park, E.K., Han, J.W. & Kwon, S.H. (2013) DNA microarray profiling of genes differentially regulated by three heterochromatin protein 1 (HP1) homologs in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* **434**, 820-828.

Lin, Y., Bloodgood, B.L., Hauser, J.L., Lapan, A.D., Koon, A.C., Kim, T.K., Hu, L.S., Malik, A.N. & Greenberg, M.E. (2008) Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4. *Nature* **455**, 1198-1204.

Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J. & Baltimore, D. (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by

lentiviral vectors. *Science* **295**, 868-872.

Lomberk, G., Wallrath, L. & Urrutia, R. (2006) The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol* **7**, 228.

Meehan, R.R., Kao, C.F. & Pennings, S. (2003) HP1 binding to native chromatin in vitro is determined by the hinge region and not by the chromodomain. *Embo j* **22**, 3164-3174.

Meijering, E., Jacob, M., Sarria, J.C., Steiner, P., Hirling, H. & Unser, M. (2004) Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A* **58**, 167-176.

Mellen, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S. & Heintz, N. (2012) MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell* **151**, 1417-1430.

Minc, E., Courvalin, J.C. & Buendia, B. (2000) HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* **90**, 279-284.

Mizuno, H., Hirano, T. & Tagawa, Y. (2007) Evidence for activity-dependent cortical wiring: formation of interhemispheric connections in neonatal mouse visual cortex requires projection neuron activity. *J Neurosci* **27**, 6760-6770.

Mohrmann, L. & Verrijzer, C.P. (2005) Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim Biophys Acta* **1681**, 59-73.

Nielsen, A.L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J.A., Remboutsika, E., Chambon, P. & Losson, R. (2001) Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell* **7**, 729-739.

Nishibuchi, G., Machida, S., Osakabe, A., Murakoshi, H., Hiragami-Hamada, K., Nakagawa, R., Fischle, W., Nishimura, Y., Kurumizaka, H., Tagami, H. & Nakayama, J. (2014) N-terminal phosphorylation of HP1alpha increases its nucleosome-binding specificity. *Nucleic Acids Res* **42**, 12498-12511.

Okamoto, M., Sakiyama, J., Mori, S., Kurazono, S., Usui, S., Hasegawa, M. & Oohira, A. (2003) Kainic acid-induced convulsions cause prolonged changes in the chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan in the limbic structures. *Exp Neurol* **184**, 179-195.

Parekh, R. & Ascoli, G.A. (2014) Quantitative Investigations of Axonal and

Dendritic Arbors: Development, Structure, Function, and Pathology. *Neuroscientist*.

Paro, R. & Hogness, D.S. (1991) The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 263-267.

Polymenidou, M., Lagier-Tourenne, C., Hutt, K.R. *et al.* (2011) Long pre-mRNA depletion and RNA missplicing contribute to neuronal vulnerability from loss of TDP-43. *Nat Neurosci* **14**, 459-468.

Portela, A. & Esteller, M. (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* **28**, 1057-1068.

Qiu, Z. & Ghosh, A. (2008) A calcium-dependent switch in a CREST-BRG1 complex regulates activity-dependent gene expression. *Neuron* **60**, 775-787.

Saint-Andre, V., Batsche, E., Rachez, C. & Muchardt, C. (2011) Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1gamma favor inclusion of alternative exons. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 337-344.

Smallwood, A., Hon, G.C., Jin, F., Henry, R.E., Espinosa, J.M. & Ren, B. (2012) CBX3 regulates efficient RNA processing genome-wide. *Genome Res* **22**, 1426-1436.

Stewart, M.D., Li, J. & Wong, J. (2005) Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol Cell Biol* **25**, 2525-2538.

Sugo, N., Oshiro, H., Takemura, M., Kobayashi, T., Kohno, Y., Uesaka, N., Song, W.J. & Yamamoto, N. (2010) Nucleocytoplasmic translocation of HDAC9 regulates gene expression and dendritic growth in developing cortical neurons. *Eur J Neurosci* **31**, 1521-1532.

Sunyer, T. & Sahyoun, N. (1990) Sequence analysis and DNA-protein interactions within the 5' flanking region of the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II alpha-subunit gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 278-282.

Tabata, H., Kanatani, S. & Nakajima, K. (2009) Differences of migratory behavior between direct progeny of apical progenitors and basal progenitors in the developing cerebral cortex. *Cereb Cortex* **19**, 2092-2105.

Thorne, J.L., Ouboussad, L. & Lefevre, P.F. (2012) Heterochromatin protein 1 gamma and IkappaB kinase alpha interdependence during tumour

necrosis factor gene transcription elongation in activated macrophages. *Nucleic Acids Res* **40**, 7676-7689.

Wang, C.L., Zhang, L., Zhou, Y., Zhou, J., Yang, X.J., Duan, S.M., Xiong, Z.Q. & Ding, Y.Q. (2007) Activity-dependent development of callosal projections in the somatosensory cortex. *J Neurosci* **27**, 11334-11342.

Wu, J.I., Lessard, J., Olave, I.A., Qiu, Z., Ghosh, A., Graef, I.A. & Crabtree, G.R. (2007) Regulation of dendritic development by neuron-specific chromatin remodeling complexes. *Neuron* **56**, 94-108.

Zhang, Y. & Reinberg, D. (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* **15**, 2343-2360.

Zhao, T., Heyduk, T., Allis, C.D. & Eisenberg, J.C. (2000) Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA in vitro. *J Biol Chem* **275**, 28332-28338.

発表履歴

発表論文

Oshiro, H., Hirabayashi, Y., Furuta, Y., Okabe, S. and Gotoh, Y.

Up-regulation of HP1 γ expression during neuronal maturation promotes axonal and dendritic development in mouse embryonic neocortex.

Genes to Cells., Nov 30. doi: 10.1111/gtc.12205. (2014)

学会発表

Hiroaki Oshiro, Yusuke Hirabayashi, Hiroko Koretsune and Yukiko Gotoh

The role of heterochromatin proteins in neurite arborization during neocortical development

ENS de Lyon – Todai Workshop,

口頭発表、ポスター発表 Lyon, France, 2010 年 11 月

大城洋明、平林祐介、是常裕子、後藤由季子

The role of heterochromatin proteins in neurite arborization during neocortical development

東京大学グローバルCOE 『統合生物学』 第5回リトリート

ポスター発表 山梨 2012 年 3 月

大城洋明、平林祐介、是常裕子、後藤由季子

The role of heterochromatin proteins in neurite arborization during neocortical development

第5 回神経発生討論会

口頭発表 福井 2012 年 3 月

大城洋明、平林祐介、是常裕子、後藤由季子

The role of heterochromatin proteins in neurite arborization during neocortical development

包括型脳科学研究推進支援ネットワーク「夏のワークショップ」

ポスター発表 宮城 2012 年 7 月

謝辞

本研究を行うにあたり、後藤由季子教授に深く御礼申し上げます。真摯に実験に取り組み、誰とでもディスカッションができる環境を与えてくださり、大変感謝しております。研究についての悩みから、日常の研究室生活に関してまで、幅広く相談にのってくださり、また一人の研究者としての姿勢を学ばせていただきました。ありがとうございます。

平林祐介助教、岸雄介助教には、実験手法や生物学の基礎など様々なことを教えていただきました。また、同じ部屋での生活を通じ、サイエンスに対する様々な良き姿勢を学ばせていただきました。お互いに意見を言い合える関係を築いていただき、研究に取り組みやすい環境をつくっていただいたことで、研究室での生活を、研究そのものを楽しむことができました。ありがとうございます。

後藤研究室の皆様には、いつも励まされ、勇気とパワーを分けてもらいました。時にはお互いの研究内容について話し合い、疑問や意見をぶつけ合うことができ、お互いに成長できたと思っています。また、日々の研究室生活からスポーツや研究室旅行の行事など、大変お世話になりました。皆さんと明るく、楽しく話せることで、大変充実した研究室生活になりました。ありがとうございます。

岡部繁男先生、岡部研究室の皆様には、学位取得にあたりいろいろとご配慮いただきました。ありがとうございます。

最後になりましたが、快く副査を引き受けてくださいました、青木先生、大矢先生、尾藤先生、松本先生、本当にありがとうございます。

皆様への感謝を忘れず、これからも一科学者として精進していく所存です。本当にありがとうございました。

平成27年1月20日 大城 洋明