

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 大城 洋明

【序論】

発生期の脳新皮質において、脳室帯に存在する神経系前駆細胞から分化したニューロンは、表層へと移動し成熟していく。ニューロンは、分化・成熟の過程で、軸索・樹状突起の伸展、シナプスの形成、膜電位の確立など、その形質を大きく変化させる。この時、それぞれの形質獲得に重要な多数の遺伝子の発現様式が変化すると考えられる(図 1)。実際に、マイクロアレイを用いた解析から、ニューロン成熟過程において 7,000 個近い遺伝子が発現様式を変化させることが知られている(Kaur et al., 2014)。

また、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寄与することが知られており、これらのシグナルによっても多数の遺伝子の発現様式が変化する(Lin et al., 2008)。しかし、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、ほとんど明らかになっていない。

遺伝子発現の制御には、クロマチン状態の調節が重要であると考えられる。近年、ニューロンの分化・成熟過程において、Methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2)などのいくつかのクロマチン調節因子が、ゲノム上の複数の場所に影響し、よりグローバルに機能することが示唆されつつある。これまで報告されていない他のクロマチン調節因子に関しても、ニューロン成熟過程に寄与することは十分考えられる。

Heterochromatin protein 1 (HP1)は、非ヒストン染色体タンパク質であり、マウスには α 、 β 、 γ の3つのアイソフォームが存在する。これらのアイソフォームはそれぞれに異なる機能を有す

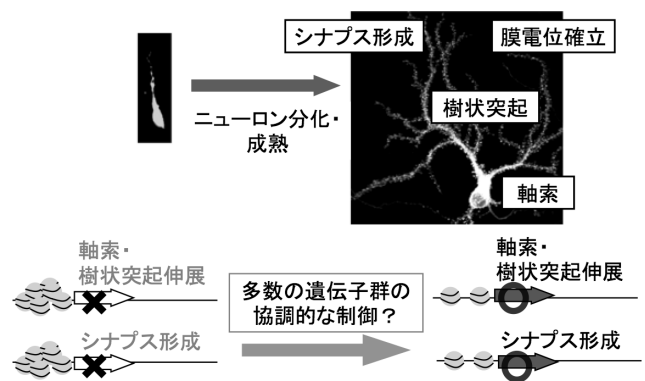


図1. ニューロン成熟に伴い、多数の遺伝子群の発現様式が変化する

ることが示唆されており、中でも HP1 γ は転写を正に制御する因子として注目されている。しかし、発生期の脳における HP1 γ の機能については、これまで全く分かっていない。

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。その結果、HP1 γ は発生期大脳新皮質で強く発現しており、ニューロン成熟に対して重要な役割を担うことを示唆する結果を得た。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 との関連とを調べた結果、外部シグナルによって HP1 γ がリン酸化されるといふ、極めて新しい知見を得た。加えて、この 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重要であることを示唆する結果を得た。

【結果】

1. HP1 γ の発現量がニューロン成熟に伴って増加する

発生期大脳新皮質における HP1 γ の発現様式を検討した。胎生 16.5 日目マウス大脳新皮質組織切片において HP1 γ 抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、大脳新皮質において HP1 γ のシグナルが検出された。特に、未分化な神経系前駆細胞が存在する脳室帯や移動中のニューロンが存在する中間帯と比較して、分化後のニューロンが存在する皮質板において HP1 γ の強いシグナルが観察された。さらに、HP1 γ の発現上昇のタイミングを、bromodeoxyuridine (BrdU)、ethynyldeoxyuridine (EdU)を用いた birthdate analysis により検討したところ、HP1 γ の発現量はニューロンの移動に伴って徐々に増加することを示唆する結果を得た。また、*in vitro* 初代培養系を用いて HP1 γ の発現量を調べた結果、培養日数に伴って HP1 γ の発現量が増加した。以上の結果は、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示唆する。

2. HP1 γ はニューロン成熟を調節する

ニューロン成熟期に発現が増加する HP1 γ が、ニューロン成熟にどのように寄与しているか検討した。*In vitro* 初代培養系にて、HP1 γ のノックダウンを行った。本研究では、軸索、樹状突起の長さや分岐数などを成熟の指標とし解析を行った。その結果、HP1 γ のノックダウンによって、軸索、樹状突起の長さ、分岐数が減少した。次に、同様にして HP1 γ の過剰発現について検討した。その結果、HP1 γ の過剰発現によって、軸索、樹状突起の長さや分岐数が増加した (図 2)。以上の結果は、HP1 γ がニューロンの突起成熟に対して重要な役割を果たすことを示唆する。

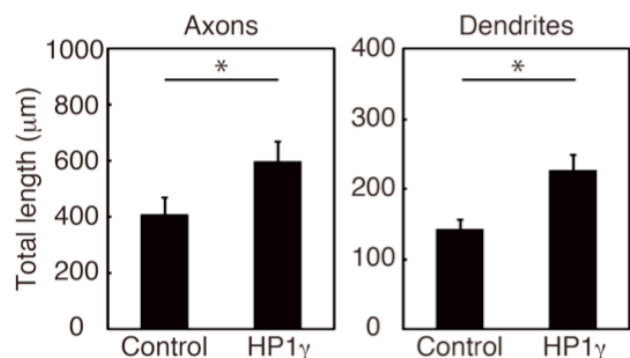


図2. HP1 γ 過剰発現により、軸索、樹状突起の合計長が増加する

では、生体内においても HP1 γ はニューロン成熟に寄与しているのだろうか。これを検討するために、子宮内電気穿孔法を用いて体性感覚野に存在する交連ニューロンをラベルし、脳梁周辺における軸索伸長に対する HP1 γ の役割について調べた。HP1 γ のノックダウンを行ったところ、脳梁を交差する軸索の蛍光輝度が減少した。ここで、HP1 γ の分化後のニューロンでの機能をさらに検討するため、HP1 γ ^{fl/fl}マウスにおいて、カルシウム-カルモジュリン依存キナーゼプロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを発現させることにより、ニューロン特異的な条件的遺伝子欠損を行った。その結果、ノックダウン実験と同様に脳梁を交差する軸索の蛍光輝度が減少した。また、HP1 γ の過剰発現についても検討を行った。その結果、HP1 γ の過剰発現によって脳梁を交差する軸索の蛍光輝度が増加した。以上の結果は、HP1 γ が生体内においてもニューロン成熟に対して役割を果たすことを示唆している。

3. HP1 γ は外部シグナルによってリン酸化される

ニューロンは様々な外部からのシグナル、例えば神経活動や神経栄養因子などによって、成熟することが知られている。では、ニューロン成熟に寄与する外部シグナルは、HP1 γ に対して何らかの影響を与えるのだろうか。これを検討するため、*in vitro* 初代培養系において、高濃度カリウム溶液の処理によって神経活動を模倣し、

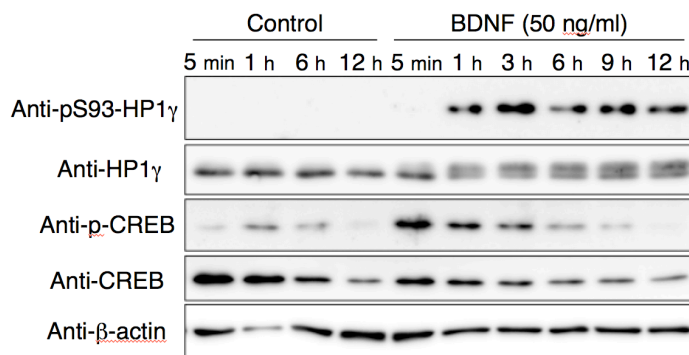


図3. BDNF処理によって、HP1 γ S93のリン酸化が増加する

HP1 γ の発現量に変化がみられるか調べた。その結果、HP1 γ の発現量に大きな変化はなかった。しかし、興味深いことに、ウェスタンブロット法により検出された HP1 γ のバンドに関して、バンドシフトが観察された。そこで、HP1 γ のリン酸化について、93 番目セリン残基(S93)のリン酸化抗体を用いて検討したところ、高濃度カリウム溶液処理によって HP1 γ S93 のリン酸化が増加した。次に、神経栄養因子の一つとして知られている脳由来神経栄養因子(BDNF)処理について同様に検討したところ、BDNF 処理によって HP1 γ の S93 リン酸化が増加した (図 3)。以上の結果は、外部シグナルによって HP1 γ がリン酸化されるということを示唆する。

次に、生体内においても HP1 γ が外部シグナルによってリン酸化されるか検討を行った。これまでの報告で、カイニン酸の投与によって神経活動が亢進することが示されている。生後 40 日のマウス腹腔内にカイニン酸を投与し、大脳新皮質または海馬溶解物中の HP1 γ リン酸化についてウェスタンブロット法による解析を行った。その結果、カイニン酸の投与によって HP1 γ のリン酸化が増加した。このことは、生体内においても HP1 γ が神経活動によってリン酸化されることを示唆する。HP1 γ のリン酸化が、生理的条件下においても観察されたことは、非常に新規性

が高く興味深い。

4. HP1 γ S93 のリン酸化は外部シグナル依存的なニューロン成熟を調節する

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か、S93 をアラニンに置換した変異体 (S93A)を用いて検討を行った。*In vitro* 初代培養系のニューロンにおいて、sholl analysis を用いて樹状突起発達の複雑度を調べた。HP1 γ の遺伝子欠損により、BDNF 存在下において樹状突起の複雑度が減少した。この条件下で、

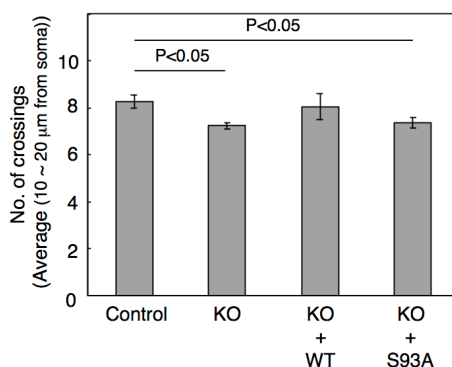


図4. BDNF存在下において、HP1 γ S93AはKOの表現系をレスキューできない

野生型(WT)、S93A をそれぞれ遺伝子導入し、レスキュー実験を行った。その結果、BDNF 存在下において、WT では複雑度が回復しコントロールと同等に観察されたのに対し、S93A では回復は観察されず KO と同程度であった (図 4)。これは、HP1 γ の S93 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を示唆する。

次に、生体内における HP1 γ リン酸化の機能を検討した。前述の通り、HP1 γ WT の過剰発現によって、脳梁で観察される軸索の蛍光輝度が増加した。一方で、HP1 γ S93A の過剰発現においては、蛍光輝度の増加は観察されなかった。この結果は、HP1 γ S93 のリン酸化が生体内においてもニューロン成熟に寄与することを示唆する。

【結論】

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、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

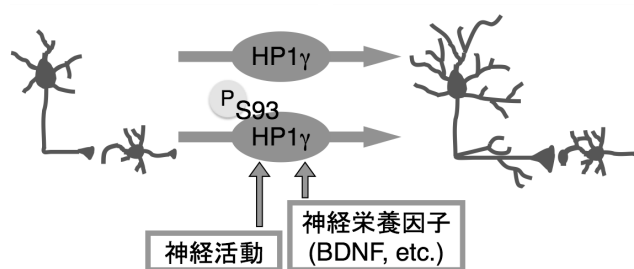


図5. 本研究のまとめ

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ことが考えられる。以上の研究結果より、ニューロン成熟における多数の遺伝子の協調的な制御、多数の遺伝子座のクロマチン状態の制御に関して、そのメカニズムの一端を明らかに出来たのではないかと考えている。