

ゲノム高次構造の破綻がもたらす中枢神経発達障害の メカニズム解明

(中間報告)

大阪大学大学院 医学系研究科 藤田 幸

The role of cohesin in the developmental central nervous system

Graduate school of Medicine, Osaka University, FUJITA, Yuki

要 約

染色体接着に関わるコヒーシンは、4つのサブユニットからなる複合体で、リング状の構造を形成する。コヒーシンは、その環状構造の中に姉妹染色分体を束ねて接着し、細胞周期の進行を制御する。また、ゲノムをループ状に束ね、遺伝子間の「区切り」として働くことから、遺伝子の転写を制御すると考えられている。コヒーシン変異により生じるコルネリア・デ・ランゲ症候群と呼ばれる疾患では、染色体分配に大きな異常を呈さないにも拘らず、精神遅滞、四肢の形成異常などの分化発生異常を伴う。そこで本研究では、コヒーシンの機能低下が中枢神経の分化・発生に及ぼす影響について検証するため、コヒーシンのコンディショナルノックアウトマウスを作成し、解析を行う。

【キー・ワード】 コヒーシン, 染色体, 中枢神経

Abstract

Cohesin complex is composed of four subunits, including Smc1, Smc3, Rad21 and Stag. These proteins form a ring structure that is considered to holding sister chromatids. Cohesin complex has diverse functions such as DNA damage response and regulation of gene expression, whereas it has been well established that cohesin complex mediates sister chromatid cohesion during cell cycle. Cornelia de Lange syndrome (CdLS) is multiple malformation disorder characterized by cognitive and growth retardation. This disease caused by mutations in the cohesin complex itself or its loader to DNA. These observations suggest that cohesin complex seems to be important for neuronal development. However, the role of cohesin in the central nervous system is unknown. Here, we generated cohesin conditional knockout mouse and investigated cohesin function in the central nervous system.

【Key words】 cohesion, chromosome, central nervous system

背景・目的

本研究は、ゲノム高次構造の破綻により生じる中枢神経系の発達異常のメカニズムを明らかにすることを目的とする。細胞の個性を決定するとも言うべき分化の過程には、遺伝子発現調節機構が密接に関与している。細胞はひとつの受精卵から細胞分化の過程を経て産まれたもので、全て同一なゲノム DNA 配列を持つ。それにも関わらず、形態・機能などが大きく異なる、多様な種類の細胞が存在する。これは、それぞれの細胞によって、発現している遺伝子が異なるためである。即ち、細胞の多様性は、各細胞のゲノムの違いによるものではなく、遺伝子発現の違いにより生み出されている。分化の過程における重要な遺伝子発現調節には、エピジェネティックな機構が重要な役割を果たす。エピジェネティック因子はゲノムの塩基配列に影響することなく、遺伝子の発現を調節する。申請者は、ゲノム上で遺伝子間の“区切り”として、エピジェネティックな遺伝子発現調節機能を有するコヒーシンに着目した (Wendt et al., 2008)。申請者はこれまでに染色体接着因子コヒーシンがゲノム高次構造を調節し、遺伝子転写制御に働くことに着目し、研究を行ってきた。コヒーシンは環状構造を利用して輪ゴムのようにゲノムを束ね、空間的に離れたエンハンサーとプロモーターの適切な相互作用を可能にすることがわかってきた (Nasmyth, 2011; Ong and Corces, 2011)。

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コルネリア・デ・ランゲ症候群 (CdLS) では、姉妹染色体分配に異常を呈さないにも拘らず、精神遅滞や自閉症様行動、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れている (Krantz et al., 2004; Tonkin et al., 2004; Kaur et al., 2005; Gil-Rodriguez et al., 2015)。このことから、コヒーシンが中枢神経系の発生・発達を制御することを示している。さらに、姉妹染色体分配機能と遺伝子転写調節機能は根本的に異なるものであると推察される。また、ショウジョウバエでは神経回路形成段階における、過剰に形成された軸索の刈り込み (axon pruning) にコヒーシンが必要であることが 2 つの研究グループから報告されている (Pauli et al., 2008; Schuldiner et al., 2008)。これは、分化後の細胞においても、染色体分配機能とは別で、コヒーシンが機能することを示す有力な証拠である。

本研究ではコヒーシン欠損マウスを用いて、中枢神経系発達障害のメカニズムを探索する。コヒーシン欠損マウスにおける神経細胞の組織学的異常、及び遺伝子発現変動について検証することにより、コヒーシンによる遺伝子発現制御の破綻が中枢神経系の発生・発達障害を引き起こすことを明らかにする。中枢神経系におけるコヒーシンの機能低下によって、染色体高次構造に変化がもたらされた結果、遺伝子発現調節に破綻を来たし、中枢神経機能に異常がもたらされるのではないかという仮説を検証し、中枢神経系の発達におけるゲノム高次構造制御の重要性を明らかにすることが、本研究の到達目標である。

計 画

1. 発生期中枢神経系におけるコヒーシンの発現

コヒーシンサブユニットのひとつである Smc3 の発生期脳における発現を、組織免疫染色により検

証する。妊娠 12, 14, 16, 18 日目のマウスから胎児を摘出し、4% PFA 中で脳を取り出した。摘出した脳は 4% PFA 中で一晩浸漬固定した。脳組織を 30% sucrose 液中に浸漬後、凍結ブロックを作成し、クライオスタットで薄切して厚さ 20 μ m の切片とした。脳切片はスライドガラスに貼り付け、乾燥後、0.1% Triton X-100, 5% Bovine serum albumin (BSA) / PBS 中に浸漬した。その後、抗 Smc3 抗体 (ウサギ由来ポリクローナル抗体) を 1 次抗体として用いて 4°C、一晩染色した。続いて、2 次抗体として、Alexa 568 Goat anti Rabbit IgG を用いて、室温、1 時間染色した。封入後、蛍光顕微鏡下で観察し、各発生段階における Smc3 の発現を検証した。

2. コヒーシ欠損マウスの作成

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成した。Smc3 の exon 1, 2 の両端に loxP 配列を挿入した Smc3 Flox/Flox マウスを作成した。神経細胞特異的な Smc3 欠損マウスを作成するために、神経細胞に Cre リコンビナーゼを発現する tau-Cre マウスと Smc3 Flox/Flox マウスを交配した。得られた tau-Cre; Smc3 +/Flox マウス (ヘテロ欠損マウス) と、Smc3 Flox/Flox マウスを交配し、tau-Cre; Smc3 Flox/Flox マウス (ホモ欠損マウス) を作成した。

3. 動物の飼育条件

マウスは大阪大学医学部付属動物実験施設の SPF 室にて、温度 23.5 \pm 1.5°C、湿度 45 \pm 15%、12 時間照明 (明期 8:00-20:00, 暗期 20:00-8:00) の条件下で飼育している。動物の取扱いについては所属機関の指針に基づいて、所属機関の動物実験委員会の承認を得たうえでやっている。

結果

1. 発生期中枢神経系におけるコヒーシンの発現

マウスでは、大脳皮質の神経細胞は生後 11 日目あたりから産生され始める。生後 12, 14, 16, 18 日目の全てのマウス胎児脳で Smc3 陽性細胞が検出された。Smc3 は脳の局所に発現しているわけではなく、脳全体の細胞に発現していることが判った。

2. コヒーシ欠損マウスの解析

Smc3 +/Flox マウスと Wild-type マウスの交配ではマウスの交配では、Smc3 +/+ と Smc3 +/Flox がおよそ同数生まれ、メンデルの法則に従うことが判った。一方、tau-Cre; Smc3 +/Flox マウス (ヘテロ欠損マウス) と、Smc3 Flox/Flox マウスを交配した場合、tau-Cre; Smc3 Flox/Flox マウス (ホモ欠損マウス) の匹数はメンデルの法則により予測される数よりも少ない傾向にあった。また、tau-Cre; Smc3 Flox/Flox マウスは、他の genotype の同腹仔と比較して小さく、生後 4 週齢前後で死亡した。

今後の課題

神経細胞特異的にコヒーシンを欠損した tau-Cre; Smc3 Flox/Flox マウスは成長が遅滞する可能性が示唆された。今後の研究では、組織学解析を行い細胞や神経ネットワークレベルでの異常を検証すると共に、コヒーシン欠損による発生障害のメカニズムを明らかにする。

引用文献

- Gil-Rodriguez MC et al. (2015). De novo heterozygous mutations in SMC3 cause a range of Cornelia de Lange syndrome-overlapping phenotypes. *Human mutation*, 36(4), 454-462.
- Kaur M, DeScipio C, McCallum J, Yaeger D, Devoto M, Jackson LG, Spinner NB, Krantz ID (2005). Precocious sister chromatid separation (PSCS) in Cornelia de Lange syndrome. *American journal of medical genetics Part A*, 138(1), 27-31.
- Krantz ID et al. (2004). Cornelia de Lange syndrome is caused by mutations in NIPBL, the human homolog of *Drosophila melanogaster* Nipped-B. *Nature genetics*, 36(6), 631-635.
- Nasmyth K (2011). Cohesin: a catenase with separate entry and exit gates? *Nature cell biology*, 13(10), 1170-1177.
- Ong CT, Corces VG (2011). Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nature reviews Genetics*, 12(4), 283-293.
- Pauli A, Althoff F, Oliveira RA, Heidmann S, Schuldiner O, Lehner CF, Dickson BJ, Nasmyth K (2008). Cell-type-specific TEV protease cleavage reveals cohesin functions in *Drosophila* neurons. *Developmental cell*, 14(2), 239-251.
- Schuldiner O, Berdnik D, Levy JM, Wu JS, Luginbuhl D, Gontang AC, Luo L (2008). piggyBac-based mosaic screen identifies a postmitotic function for cohesin in regulating developmental axon pruning. *Developmental cell*, 14(2), 227-238.
- Tonkin ET, Wang TJ, Lisgo S, Bamshad MJ, Strachan T (2004). NIPBL, encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly Nipped-B, is mutated in Cornelia de Lange syndrome. *Nature genetics*, 36(6), 636-641.
- 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 (2008). Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*, 451(7180), 796-801.