

学位論文題名

Roles of DNA methylation on regulation mechanism in neuronal differentiation

(神経分化の制御機構における DNA メチル化の役割)

学位論文内容の要旨

神経の発達において神経伝達物質の選択は重要な過程である。C6 グリア細胞腫の条件培地(GCM)およびビタミンAの誘導体であるレチノイン酸(RA)を PC12 細胞に作用させると、アセチルコリンの合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)の活性が増加する。また、PC12 細胞は神経成長因子(NGF)により突起を伸張しカテコールアミン合成系の律速酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ(TH)の活性が増加する。しかし神経系のすべての細胞がこれらの分化因子に応答するわけではない。例えば神経芽細胞腫 N-18 は伝達物質合成能が極めて低く、分化因子に対する感受性が極めて低い。特定の分化因子が作用するかどうかを決定する機構を解明することは、神経分化の機構を研究する上で重要な鍵となる。

近年、DNA シトシン残基のメチル化が遺伝子の発現および細胞の分化を調節することが報告されている。N-18 細胞が分化因子に応答しない要因の一つとして、分化の誘導に関する遺伝子の発現が DNA のメチル化により抑制されていることが考えられる。そこで本研究では、DNA 脱メチル化剤として知られる 5-アザデオキシシチジン(5-azaCdR)を N-18 細胞に作用させ、神経分化因子の作用発現機構における DNA メチル化の役割を検討した。さらに、TH 遺伝子を発現する細胞と発現しない細胞の TH 遺伝子 5' 上流領域のシトシンメチル化状態を調べ、TH 遺伝子の発現に関与するメチル化部位の特定を行った。この結果、神経伝達物質合成酵素の発現調節機構に DNA メチル化が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

N-18 細胞に RA および GCM を各々単独で作用させても、ChAT 活性に顕著な変化はなかった。これに対し、N-18 細胞を 5-azaCdR で 6 日間前処理し、その後 RA を 2 日間作用させると ChAT 活性が顕著に増加した。5-azaCdR と同じく DNA 脱メチル化剤として知られる 5-アザシチジン(5-azaCR)を用いた場合も、RA により ChAT 活性が増加した。しかし RA で前処理した後に 5-azaCdR を作用させても、ChAT 活性に変化はなかった。GCM を作用させた場合の ChAT 活性の誘導についても RA と同様の結果を得た。以上の変化は Northern Blot 法による ChATmRNA 発現増加としても確認された。これらの結果より、N-18 細胞では RA および GCM による ChAT の発現誘導機構が、DNA のメチル化により抑制されていることが明らかになった。

高い TH 活性をもつ PC12 細胞では細胞内 cAMP 濃度の上昇により TH の発現が増加することが知られている。この現象が TH 活性の極めて低い N-18 細胞でも起こるかどうかを調べるために、N-18 細胞にアデニル酸シクラーゼの活性化剤として知られるフォルスコリン(FK)を作用させたところ、4 日間で TH 活性が 2.7 倍に増加した。これに対し、

5-azaCdR を作用させた後に FK を作用させると、1 日で TH 活性が 2 倍に増加し 6 日間では 4.4 倍になった。THmRNA 発現量についても同様の変化がみられた。これらの結果より、N-18 細胞では ChAT と同様に TH の発現誘導機構も DNA のメチル化により抑制されていることが明らかになった。

また PC12 細胞では RA により ChAT 活性が増加すると同時に TH 活性の減少がみられる。この RA による TH 発現抑制作用を、N-18 細胞について検討した。FK 単独で 6 日間作用および 5-azaCdR で前処理後に FK を 2 日間作用させることによる TH 活性増加および THmRNA の発現誘導は、RA によりともに抑制された。したがって、N-18 細胞における RA による TH の発現抑制作用は、DNA のメチル化に依存しないことが明らかになった。

N-18 細胞における FK による THmRNA 発現誘導に新たな遺伝子発現 (タンパク質合成) が関与しているかどうかを明らかにするために、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) の作用を解析した。5-azaCdR を 5 日間作用させた N-18 細胞に、FK とともに CHX を加え 24 時間培養した。しかし、FK による THmRNA 量の増加は CHX を作用させても消失しなかった。この結果より、N-18 細胞における 5-azaCdR と FK による THmRNA 発現誘導は、転写調節因子の *de novo* 合成に依存しない機構によることが明らかになった。したがって、5-azaCdR の前処理による FK の TH 発現誘導の増強作用は、TH 遺伝子自身が脱メチル化されることによる可能性が高い。

TH の発現調節機構を解析する上で、FK による THmRNA の発現誘導が CRE を介するのかどうか、さらに RA による THmRNA の発現抑制が TH 遺伝子 5' 上流領域のどの部分に作用するのかを明らかにすることが重要である。そこで、種々の長さの TH 遺伝子 5' 上流領域とルシフェラーゼ遺伝子の融合プラスミドを構築し、これをアドレナリン作動性神経芽細胞腫 N1E-115 に導入して TH プロモータ活性に対する FK および RA の作用を検討した。この結果、FK による転写活性化および RA による転写抑制に関与する部位は、いずれも TH 遺伝子 5' 上流領域中の CRE から転写開始部位までの 69bp 中に存在することが明らかになった。さらに、CRE 中に変異を導入したプラスミドを N1E-115 細胞に導入した場合、FK による転写活性化はみられなかった。したがって、FK による TH の発現誘導は CRE を介するものと考えられる。そこで、CRE を含む 25bp および 96bp の DNA フラグメントをプローブとし、FK および RA の存在下あるいは非存在下で培養した N-18 および N1E-115 細胞の核抽出液に対して Gel Shift Assay を行った。しかし、FK や RA を作用させることによる特異的バンドの変化はなかった。これらの結果は、FK による TH 発現誘導は CRE 結合タンパク質の発現量を変化させるためではないことを示唆する。一方 RA による TH の転写抑制に関与する部位も、CRE から転写開始部位までの 69bp 中に存在するが、Gel Shift Assay の結果からその作用は CRE あるいは CRE 結合タンパク質に結合する因子を介するものではなく、また CRE 結合タンパク質の発現を抑制するためでもないと考えられる。

N-18 細胞において、TH の発現が TH 遺伝子自身のメチル化により抑制されていることが示唆された。TH 遺伝子 5' 上流領域約 250bp 中に、シトシン-グアニンと並ぶメチル化を受ける可能性があるシトシン残基が 14 カ所存在する。TH 発現の組織特異性がこれらシトシン残基のメチル化により決定されている可能性がある。そこで、TH 遺伝子を発現する細胞、組織 (N1E-115、PC12、MAH、上頸神経節、副腎髄質) と発現しないあるいは極めて発現量の低い細胞、組織 (N-18、肝臓、腎臓、副腎皮質) について、TH 遺伝子 5' 上流領域のシトシンのメチル化状態を Bisulfite Sequencing 法により調べた。その結果、CRE 中のシトシン、CRE の 5' 側のシトシンおよび TATA box の 3' 側のシトシン残基の 3 カ所が TH を発現しない細胞、組織で高度にメチル化されており、TH を発現する細胞、組織ではメチル化されていなかった。他のメチル化を受ける可能性があるシトシン残基では、メチル化状態と TH の発現とは相関がなかった。さらに、これら 3 カ所のシトシンのうち下流の 2 カ所は、遺伝子導入の実験で明かとなった FK および RA

の TH 発現調節に対する作用点と重なった。以上のことから、これら 3 カ所のシトシン残基のメチル化が、TH 発現の組織特異性を決めていることが考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 栗 原 堅 三
副 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 助教授 三 宅 教 尚
副 査 助教授 加 藤 宏 幸

学 位 論 文 題 名

Roles of DNA methylation on regulation mechanism in neuronal differentiation

(神経分化の制御機構における DNA メチル化の役割)

申請者は長年にわたり神経分化の研究を行ってきたが、今回神経分化の制御機構における DNA メチル化の役割に関する研究成果がまとまったので、学位論文を提出した。

神経の発達において神経伝達物質の選択は重要な過程である。C6 グリア細胞腫の条件培地(GCM)およびビタミンAの誘導体であるレチノイン酸(RA)を PC12 細胞に作用させると、アセチルコリンの合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)の活性が増加する。また、PC12 細胞は神経成長因子(NGF)により突起を伸張しカテコールアミン合成系の律速酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ(TH)の活性が増加する。しかし神経系のすべての細胞がこれらの分化因子に応答するわけではない。例えば神経芽細胞腫 N-18 は伝達物質合成能が極めて低く、分化因子に対する感受性をもたない。特定の分化因子が作用するかどうかを決定する機構を解明することは、神経分化の制御機構を研究する上で重要な鍵となる。

近年、DNA シトシン残基のメチル化が遺伝子の発現および細胞の分化を調節することが報告されている。N-18 細胞が分化因子に応答しない要因として、分化の誘導に関する遺伝子の発現が DNA のメチル化により抑制されていることが考えられる。そこで本研究では、DNA 脱メチル化剤として知られる 5-アザデオキシシチジン(5-azaCdR)を N-18 細胞に作用させ、神経分化因子の作用発現機構における DNA メチル化の役割を検討した。さらに、TH 遺伝子を発現する細胞と発現しない細胞の TH 遺伝子 5' 上流領域のシトシンメチル化状態を調べ、TH 遺伝子の発現に関与するメチル化部位の特定を行った。この結果、神経伝達物質合成酵素の発現調節機構に DNA メチル化が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

N-18 細胞に RA および GCM を各々単独で作用させても ChAT 活性に顕著な変化はなかったが、N-18 細胞を 5-azaCdR で前処理しその後 RA または GCM を作用させると ChAT 活性および ChATmRNA 発現が顕著に増加した。これらの結果より、N-18 細胞では

RA および GCM による ChAT の発現誘導機構が、DNA のメチル化により抑制されていることが明らかになった。一方、PC12 細胞では細胞内 cAMP 濃度の上昇により TH の発現が増加する。N-18 細胞にアデニル酸シクラーゼ活性化剤のフォルスコリン (FK) を作用させたところ、5-azaCdR で前処理後に FK を作用させると TH 活性および THmRNA 発現が顕著に増加した。これらの結果より、N-18 細胞では ChAT と同様に TH の発現誘導機構も DNA のメチル化により抑制されていることが明らかになった。また RA は ChAT の発現を誘導するのと同時に、FK による TH の発現誘導を抑制した。

N-18 細胞における FK による THmRNA 発現誘導に対する新たな遺伝子発現の関与を調べるために、タンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミド (CHX) の作用を検討した。5-azaCdR で前処理した N-18 細胞に、FK とともに CHX を加えても FK の THmRNA 誘導能は消失しなかった。したがって、5-azaCdR の前処理による FK の TH 発現誘導の増強作用は、TH 遺伝子自身が脱メチル化されることによるものと考えられる。

FK による THmRNA の発現誘導および RA による THmRNA の発現抑制の作用点を明らかにするために、種々の長さの TH 遺伝子 5' 上流領域とルシフェラーゼ遺伝子の融合プラスミドを構築し、これをアドレナリン作動性神経芽細胞腫 N1E-115 に導入して TH プロモータ活性に対する FK および RA の作用を検討した。この結果、FK による転写活性化および RA による転写抑制に関与する部位は、いずれも TH 遺伝子 5' 上流領域中の cAMP 応答性配列 (CRE) から転写開始部位までに存在することが明らかになった。さらに、CRE 中に変異を導入したプラスミドを N1E-115 細胞に導入した場合、FK による転写活性化はみられなかったことから、FK による TH の発現誘導は CRE を介するものと考えられる。そこで、CRE を含む DNA フラグメントをプローブとし、FK および RA の存在下あるいは非存在下で培養した細胞の核抽出液に対して Gel Shift Assay を行ったが、FK や RA を作用させることによる特異的バンドの変化はなかった。これらの結果は、FK および RA による TH の発現調節は CRE 結合タンパク質の発現量を変化させるためではなく、転写調節因子のリン酸化状態の変化等によることを示唆した。

N-18 細胞において、TH の発現が TH 遺伝子自身のメチル化により抑制されていることが示唆された。TH 遺伝子 5' 上流領域約 250bp 中に、シトシン・グアニンと並ぶメチル化を受ける可能性があるシトシン残基が 14 カ所存在する。TH 発現の組織特異性がこれらシトシン残基のメチル化により決定されている可能性がある。そこで、TH 遺伝子を発現する細胞、組織と発現しない細胞、組織について、TH 遺伝子 5' 上流領域のシトシンのメチル化状態を Bisulfite Sequencing 法により調べた。その結果、CRE を中心とした 3 カ所のシトシン残基が TH を発現しない細胞で高度にメチル化されており、TH を発現する細胞ではメチル化されていなかった。さらに、これら 3 カ所のシトシンのうち下流の 2 カ所は、遺伝子導入の実験で明らかとなった FK および RA の TH 発現調節に対する作用点と重なった。以上のことから、これら 3 カ所のシトシン残基のメチル化が、TH 発現の組織特異性を決めていると推測された。

以上のように、申請者は神経分化の制御における DNA メチル化の役割に関し数多くの新しい知見を得ており、本論文は博士の学位を与えるにふさわしいものと判定した。