

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770231

研究課題名 (和文) 神経幹細胞におけるポリコム依存的運命決定のメカニズムの解析

研究課題名 (英文) Temporal regulation of cortical neural precursor cell fate by polycomb group proteins

研究代表者

平林 祐介 (Hirabayashi Yusuke)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：80447391

研究成果の概要 (和文)：

大脳皮質の発生において、神経系前駆細胞から発生時期依存的に特定の機能を持ったニューロンやグリア細胞が産生される。本研究ではその制御メカニズムについて明らかにすることを目的とした。遺伝子改変マウス等を用いた研究の結果、Polycomb が「幹細胞の時間を計り」、産生される細胞の運命転換を司る機構に、神経幹細胞の運命転換の複数のステップで共通に貢献している可能性を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

During neocortical development, neural precursor cells (NPCs, or neural stem cells) produce various types of neurons and glial cells in a sequential manner. Although the timing of the fate switch during this sequential process is critical for determining the number of each cell type, the mechanisms are not fully understood. The results obtained in this project show that the polycomb group complex (PcG) restricts the competence of NPCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：神経幹細胞、大脳皮質発生、ポリコム

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の大脳皮質においてニューロンの細胞体は層状に配列しており、それぞれの層を構成するニューロンは層特異的な機能を担う。従って、脳が正常に機能する為にはそれ

ぞれの層ごとのニューロン数は厳密に決まっていると考えられ、発生過程におけるニューロン産生数の制御は非常に重要である。大脳皮質神経系は様々なニューロンの他にアストロサイト、オリゴデンドロサ

イトから構成されるが、これらの細胞は全て神経系前駆細胞から産生される。この神経系前駆細胞は多分化能を有するが、その分化方向は発生過程の時期によって大きく変化する。即ち、まずそれぞれの層のニューロンが順次(6層→5層→4層→2/3層)産生され、その後アストロサイト、オリゴデンドロサイトといったグリア細胞が産生される、というように発生時期依存的に特定の機能を持ったニューロンやグリア細胞が産生されている(研究成果、図1参照)。従って、神経系前駆細胞が「どのタイミングで産生する細胞の種類を変化させるか」がそれぞれ細胞種の数の決定に重要であると考えられる。たとえ神経系前駆細胞を単離し培養してもこの分化方向の経時的な変化は観察されるので、細胞自律的な要素が大きく貢献していると考えられていたがそのメカニズムは全く不明であった。

2. 研究の目的

これまで申請者は、マウス胎児大脳皮質由来神経系前駆細胞において、Wntシグナルがニューロン分化を積極的に(instructiveに)誘導することを明らかにしてきた(Hirabayashi et al. 2004)。更にそのメカニズムとして、Wntシグナルの下流で β -catenin/TCF転写複合体がプロニューラル転写因子のNeurogenin(Ngn)1とNgn2の発現を誘導することを明らかにした(Hirabayashi et al. 2004; 2005)。しかし、非常に興味深いことに、Wntシグナルは発生段階の進んだ(周産期以降・アストロサイト分化期の)神経系前駆細胞に対してはNgn1, Ngn2の発現を誘導せず、ニューロン分化を誘導できなかった。その理由を検討したところ、発生が進むにつれて、Ngn1, Ngn2プロモーター領域のヒストンアセチル化量(開いたクロマチン状態に貢献)が低下し、逆にヒストンH3 Lys27トリメチル化量(閉じたクロマチン状態に貢献)が増加することを見出した。

また、ヒストンH3 Lys27トリメチル化を認識するPolycomb Repressor Complex 1 (PRC1)の必須構成因子Ring1Bのノックアウト(KO)マウスにおいては、アストロサイト分化期においてもNgn1の発現が維持されていた。さらにRing1B KOマウスにおいてニューロン分化からアストロサイト分化への転換のタイミングが遅れていた。すなわち、PolycombがNgn1とNgn2のプロモーターのクロマチン状態を時間経過と共に閉じることで、ニューロン分化期が終了しアストロサイト分化期へと転換することが明らかになった。非常に

興味深いことに、我々はある特定の時期からRing1Bをノックアウトすると早期のニューロン(5, 6層)が増え、後期のニューロン(2/3層)が減るという知見を最近得た。これはPolycombがニューロン分化からアストロサイト分化への転換のみならず、ニューロン分化期において時期依存的なニューロンの種類の転換にも関与している可能性を示唆している(図3)。そこで本研究では、Polycombがニューロン分化期内のいかなる神経系前駆細胞の運命転換に関与するかを調べ、そのメカニズムを検討する。これにより、大脳皮質神経系前駆細胞においてPolycombが「幹細胞の時間を計り」、産生される細胞の運命転換を司る機構に共通に貢献している可能性の検証を目指した。

3. 研究の方法

- (1) Ring1Bコンディショナルノックアウト(cKO)マウスを用い、Polycombが特定の層のニューロンの数を制御しているかを検討した。また、BrdUを用いたbirth date analysisにより、ニューロンの産生時期と産生されるニューロンのサブタイプに対するPolycombの関与を詳細に検討した。
- (2) Polycombはどのようにして時期依存的に産生される細胞の種類を制御しているのか、について検討した。既にニューロン分化からアストロサイト分化への転換についてはNeurogenin遺伝子のプロモーターがPRC1により制御されている事を見いだしている。そこでこれらの遺伝子プロモーターをモデルとして、Polycombによる発生時期依存的制御のメカニズムを検討した。

4. 研究成果

5層のSubcortical neuronの産生には転写因子Fezf2の発現が必要十分である事が知られており、Fezf2は5層ニューロン産生期が終わるとともに発現が低下する。そこで大脳発生前期から後期に渡ってそれぞれのステージにおける大脳皮質神経系前駆細胞を採取し、fezf2プロモーターにおけるヒストンH3 Lys27トリメチル化量の変化を調べた。その結果、fezf2プロモーターにおけるヒストンH3 Lys27トリメチル化量は発生時期依存的に増加していた。H3 Lys27トリメチル化はPolycomb群タンパク質によって付加され認識され

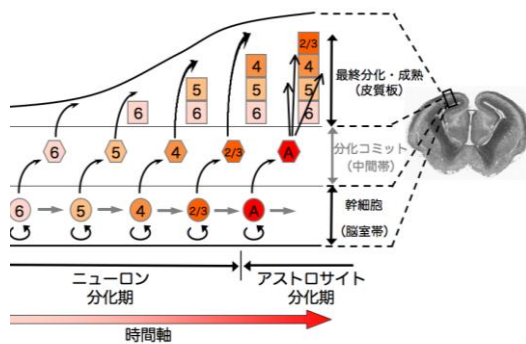


図1 大脳新皮質神経幹細胞の発生時期依存的な運命変化

ることから、Polycomb が Fezf2 の発生時期依存的発現低下に関与しているのではないかと考えた。polycomb の fezf2 発現抑制における必要性を調べる為に、Polycomb 群タンパク質である Ring1B あるいは Ezh2 の KO マウス由来神経幹細胞における Fezf2 の発現を調べたところ、野生型では fezf2 の発現が低下する 5 層ニューロン産生期以降においても KO マウス由来神経幹細胞においては fezf2 の発現が維持されていた。また、fezf2 により産生が制御される 5 層 subcortical neuron の産生の終了に polycomb が関与するかを次に調べた。その結果、Ring1B ノックアウトマウス由来の神経幹細胞はコントロールマウスにおいては 5 層の Subcortical neuron マーカーである Ctip2 陽性細胞の産生が終了する時期でも Ctip2 陽性細胞を産生し続けた。一方この時、2-4 層のニューロンに発現する Cux1 陽性細胞の数は Ring1B KO マウスにおいてコントロールと比べ減少していた。興味深いことに、5 層ニューロン産生終了後に Ring1B をノックアウトしても Cux1 陽性細胞の数の減少は見られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1) Yusuke Hirabayashi and Yukiko Gotoh
Epigenetic control of neural precursor cell fate during development.

Nature Reviews Neuroscience 11 (6) 377-388, 2010 査読有り

2) Atsushi Kuwahara¹, Yusuke Hirabayashi², Paul S. Knoepfler³, Makoto M. Taketo⁴, Juro Sakai⁵, Tatsuhiko Kodama⁶, and Yukiko

Gotoh⁷ (#co-correspondence)
Wnt signaling and its downstream target N-Myc regulate basal progenitors in the developing neocortex

Development 137, 1035-1044, 2010 査読有り

3) ポリコム複合体による神経系前駆細胞のニューロン分化能制御

平林祐介、後藤由季子 実験医学, Vol. 28 No. 3, 2010 査読無し

4) Yusuke Hirabayashi¹, Nao Suzuki¹, Masafumi Tsuboi¹, Takaho A Endo⁸, Tetsuro Toyoda⁹, Jun Shinga¹⁰, Haruhiko Koseki¹¹, Miguel Vidal¹¹ and Yukiko Gotoh⁷

Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition.

Neuron 63(5), 600-13, 2009 査読有り

5) 大脳皮質においてニューロンの数を決定するメカニズム

平林祐介、後藤由季子 細胞工学, Vol. 28 No. 1, 2009 査読無し

[学会発表] (計 10 件)

1) Yusuke Hirabayashi, Nao Suzuki, Masafumi Tsuboi, Miguel Vidal Haruhiko Koseki and Yukiko Gotoh
“Temporal regulation of cortical neural precursor cell fate by polycomb group proteins” **CDB Symposium** (神戸), 2011 年 3 月

2) Yusuke Hirabayashi, Nao Suzuki, Masafumi Tsuboi, Miguel Vidal Haruhiko Koseki and Yukiko Gotoh
“Temporal regulation of cortical neural precursor cell fate by polycomb group proteins” **Minisymposium on Developmental Neurobiology** (San Diego, CA), 2010 年 11 月

3) ポリコム群タンパク質による大脳皮質神経系前駆細胞の分化運命制御 (口頭発表) 2010 年 11 月

平林祐介、鈴木菜央、壺井將史、後藤由季子
分生研シンポジウム 2010、東京

4)ポリコム群タンパク質による大脳皮質神経系前駆細胞の分化運命制御
平林祐介、鈴木菜央、壺井将史、後藤由季子

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、札幌（ポスター発表） 2010年7月

5)○Yusuke Hirabayashi, Nao Suzuki, Masafumi Tsuboi, Miguel Vidal Haruhiko Koseki and Yukiko Gotoh “Temporal regulation of cortical neural precursor cell fate by polycomb group proteins” **2nd German-Japanese Neurogenesis Meeting 2010**, (Spreewald, Germany), 2010年7月

6)○Yusuke Hirabayashi, Nao Suzuki, Masafumi Tsuboi, Miguel Vidal Haruhiko Koseki and Yukiko Gotoh “Temporal regulation of cortical neural precursor cell fate by polycomb group proteins” **EuroEpiStem--2009 Meeting**, (Cambridge, UK), 2009年11月

7)ポリコム群タンパク質による大脳皮質神経系前駆細胞の分化運命制御(口頭発表)

平林祐介、鈴木菜央、壺井将史、Miguel Vidal,古関明彦、後藤由季子
第82回日本生化学会大会、神戸 2009年10月

8)Yusuke Hirabayashi, Nao Suzuki, Masafumi Tsuboi, Miguel Vidal Haruhiko Koseki and Yukiko Gotoh “Temporal regulation of cortical neural precursor cell fate by polycomb group proteins” **ISSCR 8th Annual Meeting**, (Barcelona, Spain) Poster presentation 2009年7月

9)Yusuke Hirabayashi, Nao Suzuki, Masafumi Tsuboi, Miguel Vidal Haruhiko Koseki and Yukiko Gotoh “Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition” **Keystone Symposia-Chromatin Dynamics and Higher Order Organization**, (Coeur d'Alene, ID) Poster presentation 2009年2月

10) Yusuke Hirabayashi, Tokushige

Nakano, Norihisa Masuyama and Yukiko Gotoh “Epigenetic modification regulates the termination of Wnt-dependent neurogenesis in the developing mouse neocortex” **ISSCR 8th Annual Meeting**, (Cairns, Australia) Poster presentation 2007年7月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平林祐介 (HIRABAYASHI YUSUKE)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：80447391

(2) 連携研究者

後藤由季子 (GOTOH YUKIKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
研究者番号：70252525

(2) 研究協力者

古関明彦 (KOSEKI HARUHIKO)

理化学研究所・免疫器官形成研究グループ・グループディレクター

研究者番号：40225446