

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14323

研究課題名(和文) 神経細胞の誕生日依存的遺伝子組換え系Birthdate Taggingの開発

研究課題名(英文) Development of neuronal birthdate tagging

研究代表者

平田 かつみ(Hirata, Tatsumi)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授

研究者番号：80260587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞は分化したタイミング(誕生日)によって異なる形質を持つ。したがって、神経細胞に誕生日のタグ付けができれば、誕生日が規定する神経細胞のサブセットやサブ回路特異的に実験操作を加える事が可能になる。本研究では神経細胞の誕生日依存的に遺伝子組換えを誘導できるトランスジェニックマウス系統を作成した。特に有望な4系統について特徴づけを行い、汎用性の高い誕生日タグづけシステム Birthdate Taggingとしてのリソース化をめざした。

研究成果の概要(英文)：Birth timing of neurons determines many characteristics in neurons and has been used for classification of neurons. This study developed transgenic mouse lines in which post-mitotic neurons can be genetically tagged in a birthdate-dependent manner. Four useful transgenic lines were selected and characterized in detail. Our results suggested that these lines can be used as powerful resource for neuronal classification and subsequent manipulation of the classified neuronal subset.

研究分野：神経発生学

キーワード：誕生日タグ トランスジェニックマウス 新規技術 神経発生 脳科学

1. 研究開始当初の背景

終末分化状態にある神経細胞にとって、その誕生日、すなわち最終分裂を終えたタイミングは特別な意味を持つ。その最もわかりやすい例は、大脳新皮質細胞だろう。誕生日に従って、細胞体の層分布が決まり、結合相手や電気化学的性質までも未来永劫的に決まってしまう。このような誕生日依存的な運命決定は、なにも新皮質神経細胞に限ったものではなく、他の神経細胞でもごく一般的に観察される現象である。さらに、運命決定とはいかないまでも、分化のタイミングが神経回路の特異性を決める例も知られている。例えば、誕生日の似通った神経細胞同士は、シナプス結合に最適な分化タイミングも一致するため、相互に連結しやすいといわれている。

神経細胞の誕生日解析は、これまで DNA 前駆体アナログを用いて行われてきた。古くは放射性標識チミジン、最近では BrdU やその派生体を用いたこの技術は、神経系の多くの原理を明らかにして、今なお廃れることなく多くの研究で使われている。しかしその一方で、これほど汎用される技術であるにもかかわらず、たいした技術革新は行われてこなかった。おそらく現手法の最大の欠点は、固定後の標本上で回顧的にしか誕生日を検出できないことであろう。もしも、生きた状態の神経細胞に誕生日でタグ付けできれば、誕生日が規定する神経細胞のサブセットやサブ回路に遺伝子操作や活動操作などの摂動を加える事が可能になる。

2. 研究の目的

本研究では、神経細胞の誕生日依存的に遺伝子組換えを誘導できるトランスジェニックマウス系統を作成した。特に有望な 4 系統について特徴づけを行い、汎用性の高い誕生日タグ付けシステム Birthdate Tagging としてのリソース化をめざした。

3. 研究の方法

(1) 誕生日タグづけ法のデザイン

この手法のデザインを図 1 に示す。神経運命決定に働く遺伝子の中には、神経細胞誕生直後に「一過的」に発現するものがいくつか知られている。これらの遺伝子群のエンハンサーを利用して、タモキシフェン誘導型 Cre 組換え酵素 (CreER) の発現を駆動するトランスジェニックマウスを作成すれば、多くの神経細胞において誕生後「一過的」に Cre-ER が発現すると期待できる。そのようなマウスの発生期にタモキシフェンを投与すれば、ちょうどその数時間前に最終分裂を終えたばかりの神経細胞特異的に、loxP 配列組換えをパルス誘導できるはずである。

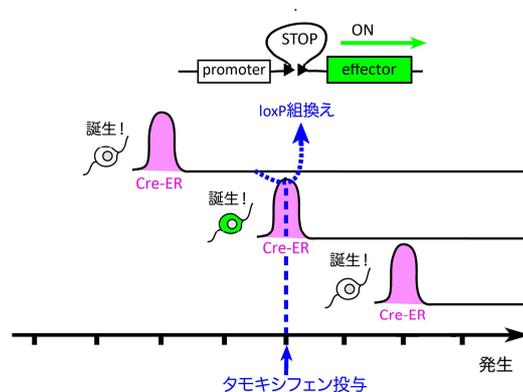


図 1 誕生日タグづけ法の原理

神経細胞は誕生後一過的に CreER を発現する。タモキシフェン投与により、ちょうどその時点で CreER を発現している神経細胞でのみ loxP 組換えが起こる。

(2) トランスジェニックマウスの作成と選択

文献や発現データベースを検索して、多くの神経細胞が誕生直後に一過的に強く発現する遺伝子として、Nerogenin1, Neurogenin2, NeuroD1, NeuroD4 の 4 つを選択した。各遺伝子をコードする複数のマウスゲノム BAC クローンを取り寄せ、BAC 上で各遺伝子を CreER におき換えた。理研 LARGE との共同開発により、得られた BAC コンストラクトをマウス

C57BL/6 受精卵に注入してトランスジェニックマウスを作出した。トランス遺伝子のゲノムへの組込は、ゲノム PCR により確認した。

得られたマウス系統は、全て loxP-STOP 配列をもつレポーター系統と交配して、胎生 11.5 日あるいは 13.5 日にタモキシフェンを投与し、胎生 18.5-19.5 日目で脳を摘出して組換え標識された細胞を染色して確認した。

(3) 誕生日タグ系統の特徴づけ

上記の過程で選抜された誕生日タグ 4 系統について、loxP-STOP 配列をもつレポーター系統と交配し、胎生 9.5 日目から 18.5 日目にかけて 1 日きざみで、タモキシフェンを腹腔内注射した。妊娠 19.5 日目に帝王切開して子マウスを回収し、その後は代理母に保育させた。生後 7 日目に子マウスを回収して、脳のサンプルを採取した。得られた脳サンプルについては、1 部はホルマウント染色を施して組換え細胞を検出した。残りの脳サンプルについては前額断連続凍結切片を作成し、レポータータンパク質に対する抗体染色を行い、組換え標識された神経細胞の核と軸索をそれぞれ可視化した。

4. 研究成果

CreER 組換え酵素遺伝子をゲノムに組みこんだトランスジェニックマウスとして、Neurogenin1 遺伝子 11 系統, Neurogenin2 遺伝子 5 系統, NeuroD1 遺伝子 2 系統, NeuroD4 遺伝子 5 系統の合計 23 系統が得られた。得られたマウス系統を、それぞれ全て loxP-STOP 配列をもつレポーター系統と交配して、タモキシフェン投与を行い、遺伝子組換えの頻度と組換え細胞の脳内分布を検討した。ほとんどの系統に置いてタモキシフェン依存的遺伝子組換えの誘導が確認されたが、組換え効率には大きな違いがあった。その結果を元に、使用した遺伝子ごとに特に有用な 4 系統 G1C, G2A, D1B, D4A を選抜した。各々の系統は、組換え酵素の発現領域の違い

から得意とする神経領域が異なり、研究目的に応じて使いわけが有効であると考えられる (図 2)。

系統名	使用したエンハンサー	特徴的な組換え領域
G2A	Neurogenin2	新皮質 神経系全般
G1C	Neurogenin1	中脳 後脳 延髄
D1B	NeuroD1	新皮質の一部 辺縁系
D4A	NeuroD4	延髄 末梢神経系

図 2 本研究で開発した誕生日タグづけマウス系統

上記の「誕生日タグづけ」マウス 4 系統について各種レポーター系統と交配して、1 日きざみに誕生日タグ標識した脳標本を作成した。脳全体にわたり誕生日タグづけされた神経細胞を多角度から観察できるように、レポーター遺伝子の使い分けを工夫し、下記の 3 種類の染色標本を作成した。

- 誕生日タグされた脳のホルマウント標本
- 脳の連続組織切片において、誕生日タグされた神経細胞の核を染色し、細胞体の位置がわかるようにしたもの
- 脳の連続組織切片において、誕生日タグされた神経細胞の軸索を標識し、投射域が確認できるもの

現在までに 8 割程度の作業が完了したところである。

誕生日による神経細胞の分類は、厳密で再現性が高く汎用性もある。近年盛んに行われている光遺伝学や神経機能操作法との組み合わせが容易なことも、今後の波及的利用を促進する力になるはずである。この技術はまだ未発表ながら、口コミでの問い合わせが多く、既にいくつかのマウス系統については分譲を開始した。神経系にはそれぞれの専門家がいる。今後は、本研究で得た情報を広く公開することで、「誕生日タグづけ」技術を気軽に使ってもらい、新たな知の創出と蓄積に貢献したい。新しい方

法論の導入が、神経科学の様々な分野を活性化し、思いもかけない発見につながると期待できる。

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 4 件)

de Frutos, C.A., Bouvier, G., Arai, Y., Thion, M.S., Lokmane, L., Maryama, K., Garcia-Dominguez, M., Charnay, P., Hirata, T., Riethmacher, D., Grove, E.A., Tissir, F., Casado, M., Pierani, A., and Garel, S., Reallocation of olfactory Cajal-Retzius cells shapes neocortex architecture. (2016) **Neuron** 92, 435-448. 査読有り
DOI: 10.1016/j.neuron.2016.09.02

Sasaki, A., Ide, S., Kawamoto, Y., Bando, T., Murata, Y., Shimura, M., Yamada, K., Hirata, A., Nokihara, K., Hirata, T., Sugiyama, H., and Maeshima, K., Telomere visualization in tissue sections using pyrrole-imidazole polyamide probes. (2016) **Sci. Rep.** 6, 29261. 査読有り
DOI: 10.1038/srep29261.

Mita, S., Monasterio-Schrader, P., Fünfschilling, U., Kawasaki, T., Mizuno, H., Iwasato, T., Nave, K.-A., Werner, H.B., and Hirata, T., Transcallosal projections require glycoprotein M6-dependent neurite growth and guidance. (2015) **Cerebral Cortex** 25, 4111-4125. 査読有り
DOI: 10.1093/cercor/bhu129

Kanatani, S., Honda, T., Aramaki, M., Hayashi, K., Kubo, K., Ishida, M., Tanaka, D.H., Kawauchi, T., Sekine, K., Kusuzawa,

S., Kawasaki, T., Hirata, T., Tabata, H., Uhlén, P., and Nakajima, K., The COUP-TFII/Neuropilin-2 is a molecular switch steering diencephalon-derived GABAergic neurons in the developing mouse brain. (2015) **Proc Natl Acad Sci USA** 112, E4985-4994. 査読有り
DOI: 10.1073/pnas.1420701112.

[学会発表] (計 2 件)

Hirata, T., Evolutionary conservation of neocortical neurogenetic program in the mammals and birds. 9th World Congress IBRO 2015, Symposium: Evolution of cerebral cortical development, 2015年7月7-11日, Rio de Janeiro (Brazil)

Hirata, T., Origin of the neurogenetic program in the mammalian neocortex .第48回日本発生生物学会 シンポジウム 2015年6月2-5日 つくば国際会議場 (茨城県 つくば)

[図書] (計 1 件)

Nomura, T., and Hirata, T., The neocortical homologues in nonmammalian amniotes: bridging the hierarchical concepts of homology through comparative neurogenesis. (2017) In: **Evolution of Nervous Systems, 2nd edition**, Jon Kaas (ed.), vol. 2, pp.195-204. Oxford: Elsevier. 査読有り
ISBN: 978-0-12-804096-6

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平田 かつみ (HIRATA, Tatsumi)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授

研究者番号：80260587

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし