

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20241044

研究課題名 (和文) 神経幹細胞の運命転換における核クロマチンの「グローバルな」状態変化の意義

研究課題名 (英文) Global regulation of the chromatin state of neural progenitors during development

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文)：

発生過程において、多分化能を持つ組織幹細胞が特定の形質のみを示す細胞へと分化する過程は、特定の遺伝子群の発現カスケードとして捉えられ、解析されてきた。しかし最近我々は、神経幹細胞の分化過程においてこのような「ローカルな」遺伝子座の制御に加えて、核ゲノム全体で起こる「グローバルな」クロマチン状態の変化が存在していることを示唆する結果を得た。すなわち、神経系前駆細胞がニューロン分化し成熟するときに、クロマチンが核全体で「ゆるく」なるという驚くべき結果である。今回観察された変化はたかだかゲノムの5%を占めるに過ぎない遺伝子コード領域の変化だけでは説明できない。さらに成熟に伴いクロマチン状態をゆるくする候補分子を得ており、そのノックダウンでニューロンの成熟が著しく阻害されるという予備的結果を得ている。従ってクロマチン状態がゆるくなるのが、ニューロン成熟のトリガーになっている可能性が考えられた。また、ニューロン成熟に伴って「ゆるく」なるクロマチン領域を調べ、リピート配列のひとつ major satellite を含む事、またニューロン成熟に伴って major satellite の転写が上昇する事、を見いだした。Major satellite 領域の転写はこれまで細胞周期に伴って起こる事が知られていたが、postmitotic な細胞における major satellite の役割はこれまで知られていなかったの、ニューロン成熟との関わりは興味深い。

研究成果の概要 (英文)：

Neurons, astrocytes and oligodendrocytes, three major cell types that consist the central nervous system, are derived from common neural stem cells (NSCs). Whereas NSCs generate neurons in the early stages of neocortical development, they lose the neurogenic potential and generate only glial cells in the late stages. In this study, we found “global” changes of the chromatin state in NPCs during neocortical development in addition to “local” changes at specific gene loci. Chromatins isolated from early-stage NSCs were less condensed compared to those from late-stage NSCs, as revealed by nuclease digestion and salt-extraction analyses, as well as by a fluorescent recovery after photobleaching (FRAP) analysis using histone H1-GFP. We also identified chromatin-binding proteins necessary for the “less condensed” state of the chromatin in early-stage NSCs. Importantly, knockdown of these proteins reduced the neurogenic capacity of early-stage NSCs, and conversely, their overexpression increased neurogenesis and suppressed astrogenesis of late-stage NSCs. These results suggest that global chromatin condensation might contribute to the fate restriction of NSCs during neocortical development.

Recent studies have revealed various biological functions for repetitive sequences, which make up about half of the human genome. One such sequence, major satellites, which are tandem repetitive sequences adjacent to the centromere, have been shown to be a kinetochore component that plays a role in the formation and function of the pericentric heterochromatin necessary for mitosis. However, it is unknown whether these regions also play a role in post-mitotic cells. Here, we show that, during neuronal differentiation, the heterochromatin domains that include major satellite regions become both enriched with the active histone modification lysine-4 trimethylation of

histone H3, and more sensitive to nuclease, both of which suggest increased activation of this area. Further supporting this notion, we also found that transcription from major satellite regions is significantly increased during neuronal differentiation both in vitro and in vivo. These results together suggest that the structural and transcriptional state of major satellite regions changes dramatically during neuronal differentiation, implying that this region might play a role in differentiating neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	13,900,000	4,170,000	18,070,000
2009年度	12,600,000	3,780,000	16,380,000
2010年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
年度			
年度			
総計	38,300,000	11,490,000	49,790,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：クロマチン、神経幹細胞

#### 1. 研究開始当初の背景

繰り返し配列は哺乳類ゲノムの約 50%を構成しており、様々な生命現象に関与することが示唆されている。セントロメア近傍にはメジャーサテライトと呼ばれる繰り返し配列が存在する。この繰り返し配列は、増殖中の細胞では構成的ヘテロクロマチンを形成し、染色体の分配に関与する。一方、ニューロンのような非分裂細胞でメジャーサテライトがどのような機能を持つかは、未だ明らかでない部分が多く残されている。

そこで本研究では、ニューロンにおけるメジャーサテライト領域の機能解析を試みた。メジャーサテライトのクロマチン状態に注目して実験を行い、従来ヘテロクロマチン化した静的な領域だと考えられていたメジャーサテライトが、ニューロン分化過程では大きく変化していることを見出した。

#### 2. 研究の目的

多細胞生物を構成する細胞は、同じ DNA の一次配列情報を持っているにもかかわらず発生の時期や組織ごとにその性質は大きく異なる。これを実現するには、非常に多くの遺伝子の転写状態を細胞ごとに制御することが重要となる。そして、これまで遺伝子の転写制御については個々の遺伝子の転写と、それを制御する転写因子の発現や活性に着目して多くの研究がなされてきた。しかしながら、細胞の状態変化に伴ってどのように数多くの遺伝子の転写を協調的に変化させているのかについてはほとんどわかってい

なかった。クロマチン構造は、転写因子の DNA への接近のしやすさを制御しているため、遺伝子の転写に非常に重要な要素の 1 つである。本研究では、このクロマチン構造の変化に注目して、ニューロン成熟におけるゲノムワイドな制御について検討をおこなった。

繰り返し配列は哺乳類ゲノムの約 50%を構成しており、様々な生命現象に関与することが示唆されている。セントロメア近傍にはメジャーサテライトと呼ばれる繰り返し配列が存在する。この繰り返し配列は、増殖中の細胞では構成的ヘテロクロマチンを形成し、染色体の分配に関与する。一方、ニューロンのような非分裂細胞でメジャーサテライトがどのような機能を持つかは、未だ明らかでない部分が多く残されている。そこで本研究では、ニューロンにおけるメジャーサテライト領域の機能解析を試みた。

#### 3. 研究の方法 4. 研究成果

発生過程のマウス大脳新皮質でニューロンが成熟していく過程において、ヒストン修飾への抗体の接近しやすさが上昇する

ニューロンの分化、成熟過程において、クロマチンの状態がどのように変化しているのかを調べるために、in vitro 初代培養系の細胞を用いてヒストン修飾を認識する抗体を用いた免疫染色をおこなった。胎生 11.5 日目 (Embryonic day 11.5; E11.5) マウス胎仔大脳新皮質より採取した神経系前駆細胞

を Fibroblast growth factor 2 (FGF2) と Epithelial growth factor (EGF) を添加した条件で 3 日間浮遊培養し (3 days in vitro; 3DIV)、その後単層培養した。そして、FGF2 存在下 (+FGF) あるいは非存在下 (-FGF) で 3 日間培養して、ヒストン修飾やヒストン H1 を認識する抗体を用いて免疫染色を行った。FGF2 は神経系前駆細胞の未分化維持因子であり、これを除くとニューロンへと分化することが知られている (Johe et al., 1996)。このため、+FGF ではより未分化/未成熟なニューロンが存在し、-FGF では分化/成熟した細胞が存在するようになる。この条件で培養した細胞を、H3K9K14Ac を認識する抗体を用いて免疫染色を行った。すると、驚いたことに -FGF において +FGF よりも染色強度が核全体で強くなることがわかった。アセチル化の状態は、ニューロンの分化、成熟による遺伝子の転写変化に伴って、それぞれの遺伝子座においてその状態が変化すると考えられる。しかし、いくつかの遺伝子座においてアセチル化の状態が変化しても、今回観察されたような核全体での染色強度の変化は起きないと考えられ、この結果は非常に興味深い。

さらに、H3K4Me3、H3K9Me3、H3K27Me3 を認識する抗体でも免疫染色を行ったところ、やはり H3K9K14Ac の結果と同様、いずれのヒストン修飾においても -FGF において +FGF よりも染色強度が上昇することがわかった (Fig. 1-1)。この結果は、転写の活性化に寄与するヒストン修飾でも抑制に寄与するヒストン修飾でも同様の染色パターンになることを示唆しており興味深い。さらに、この結果がヒストン修飾でのみ観察されるものなのか、あるいはクロマチンの構造タンパクの特徴であるのかを調べるために、リンカーヒストン H1 に対する抗体でも免疫染色を行った。すると、-FGF において +FGF よりも染色強度が上昇するというヒストン修飾のときと同様の結果が得られた。

ここで観察している *in vitro* 初代培養系の細胞では、FGF2 の有無でニューロンの分化、成熟状態を変化させている。FGF2 は細胞内の様々な状態を変化させる可能性があるため、ヒストン修飾やヒストン H1 の染色強度の変化は、FGF2 の有無そのものによる可能性がある。そこで、Ngn2 を神経系前駆細胞に過剰発現させ、+FGF で培養し、免疫染色を行った。Ngn2 を過剰発現させると、+FGF でも神経系前駆細胞はニューロンに分化することが知られている (Fode et al., 2000; Sun et al., 2001)。その結果、+FGF でも Ngn2 を過剰発現した細胞はコントロールの細胞に比べてヒストン修飾の染色強度が強くなることがわかった。この結果は、観察されたヒストン修飾の染色強度の変化は FGF2 の有無によるのではなく、ニューロンの分化、成熟そのもの

によるものであることを示唆している。

次に、*in vivo* においてもヒストン修飾やヒストン H1 の染色強度が同じように変化するのかどうかを、組織免疫染色によって検討した。E18.5 のマウス胎仔大脳新皮質の切片を、ヒストン修飾やヒストン H1 を認識する抗体を用いて免疫染色した。すると、移動中で未成熟なニューロンが存在する脳室下帯や中間帯に比べて、より成熟したニューロンが存在する皮質板でヒストン修飾やヒストン H1 の染色強度が核全体で強くなることがわかった。この結果は、*in vivo* においてもニューロンの成熟に伴ってヒストン修飾やヒストン H1 の染色強度が上昇することが示唆している。

ヒストン修飾とヒストン H1 の組織免疫染色の結果をよく見てみると、皮質板においても染色強度が弱い細胞がまばらに存在することがわかった。皮質板内には、脳表層に向かって移動中の未成熟なニューロンと、脳表層に到達してすでに移動を止めたより成熟したニューロンが存在する。これらのニューロン間で染色強度が違うのではないかと考え、移動中のニューロンと移動を止めたニューロンを区別するために Birth date analysis を行った。Birth date analysis では、DNA のチミジンの類似物である BrdU や CldU、IdU を用いて同じ時期に産まれたニューロンをラベルする手法である。BrdU などを妊娠マウスに腹腔注射すると、大脳新皮質では増殖中の神経系前駆細胞に DNA 複製依存的に取り込まれる。この BrdU などは、増殖を繰り返す神経系前駆細胞では DNA 複製によって薄まり、免疫染色によって検出できなくなるが、取り込まれた直後に分化し、細胞分裂を止めた細胞では検出できる。そのため、取り込まれた直後に分化したニューロンのみがラベルされる。CldU を E12.5 に、IdU を E16.5 に腹腔注射し、E18.5 に胎仔を固定し、組織免疫染色を行った。この実験では、CldU 陽性のニューロンはすでに脳表層に到達して移動を止めており、逆に IdU 陽性の皮質板内に存在するニューロンは移動中であると考えられる。すると、CldU 陽性の細胞の方が IdU 陽性の細胞よりもヒストン修飾の染色強度が強くなることがわかった。また、E12.5 に BrdU を取り込ませた胎仔と E16.5 に BrdU を取り込ませた胎仔を用意し、それぞれヒストン H1 で免疫染色した。すると、ヒストン修飾での結果と同様、E12.5 に BrdU を取り込ませた細胞では周りの細胞に比べて染色強度が強く、逆に E16.5 に BrdU を取り込ませた細胞では周りの細胞に比べて染色強度が弱いことがわかった。これらの結果から、移動中の未成熟なニューロンが移動を止めて成熟していく過程でヒストン修飾やヒスト

ンH1の染色強度が上昇することがわかった。

ただし、大脳新皮質においては、様々な種類のニューロンが時期依存的に産生され、それぞれの種類でだまかにII/III、IV、V、VIと呼ばれる層構造を作ることが知られている(McConnell, 1995)。このため、Birth date analysisで観察されたヒストン修飾の染色強度の変化はニューロンの種類による違いである可能性がある。しかし、すでに全てのニューロンの移動が止まった生後5日目(Postnatal day 5; P5)でヒストン修飾の組織免疫染色を行ったところ、II/III~VIまでいずれの層に存在するNeuN陽性ニューロンでもヒストン修飾の染色強度が脳室下帯や中間帯よりも強いことがわかった。このことから、観察されたヒストン修飾の染色強度の変化はニューロンの種類の違いによるものではないことが示唆された。

では、どうしてヒストン修飾の染色強度がニューロンの成熟に伴って上昇するのだろうか。ここでは、少なくとも2つの可能性があると考えた。1つは、ニューロンの成熟に伴ってヒストン修飾やヒストンH1の量が核全体で大きく増加した可能性である。2つ目は、例えばクロマチンの高次構造が核全体で大きく変化し、抗体の抗原への接近のしやすさが変化する可能性である。そこで、まずin vitro初代培養系の細胞を用いてウェスタンブロットを行い、ヒストン修飾の量を定量した。その結果、ヒストン修飾の量はニューロンの分化、成熟に伴って大きく上昇しないことがわかった。また、細胞内の高次構造がヒストン修飾やヒストンH1の染色強度の何らかの影響を与えている可能性を、抗原賦活(Antigen retrieval)を用いて検討した。これは、組織免疫染色を行う前に組織切片をオートクレーブすることで、クロマチンなどの細胞内の高次構造を壊し、抗原の露出具合を変化させて染色する手法である。その結果、免疫染色する前にオートクレーブすることでオートクレーブしないで免疫染色するより脳室下帯、中間帯と皮質板の間の染色強度の差が小さくなった。この結果は、観察された脳室下帯、中間帯と皮質板の間の染色強度の差は、クロマチンの高次構造の変化によるものであることを示唆しており、ニューロンの成熟過程ではクロマチン構造に何らかの大きな変化が起きている可能性が考えられる。

ニューロンの成熟に伴ってクロマチン状態がグローバルに脱凝集する

ヒストン修飾とヒストンH1の免疫染色の結果より、ニューロンの成熟過程ではクロマチン状態が核全体でグローバルに脱凝集しており、その結果抗体のヒストンへの接近し

やすさが上昇して染色強度が上昇するという仮説を立てた。この仮説をより直接的に検討するために、生化学的な実験を用いてクロマチンの凝集状態を検討した。

まず行ったのは、ヌクレアーゼによる切断実験である。この実験では、細胞から核を抽出した後に適当な濃度のヌクレアーゼで処理する。もし、クロマチンがあまり凝集していない状態であれば、ヌクレアーゼがDNAに接近しやすいためにより多くのDNAが切断されると考えられる。In vitro初代培養系の細胞から抽出した核を、DNaseIと呼ばれるヌクレアーゼ100U/mlで5分間処理したところ、溶液中に溶出されるヒストンの量が-FGFでは27%であったにも関わらず、+FGFでは6%であった。また、切断されるDNAの量も-FGFで多くなることがわかった。さらに、MNaseと呼ばれるヌクレオソームの間でDNAを切断するヌクレアーゼを用いても検討を行った。すると、やはり1U/mlのMNaseで5分間核を処理すると、-FGFでは84%ものDNAが2000bp以下に切断されたにも関わらず、+FGFでは46%しか切断されなかった。これらの結果は、ニューロンが分化、成熟する過程ではクロマチンが核全体で、グローバルにヌクレアーゼが接近しやすい状態になることを示唆している。

マウスのゲノムのうち遺伝子をコードしている領域はおよそ2%程度である(Waterston et al., 2002)。しかし、ニューロンの成熟に伴ってヌクレアーゼによって切断されるDNA量や溶出されたヒストンの量の割合の変化は20%~40%程度であることから、今回観察されたクロマチン状態の変化は遺伝子座におけるクロマチン状態の変化だけを反映しているわけではないと考えられる。そこで、クロマチンの状態が遺伝子座だけでなく、その他の遺伝子間領域でも脱凝集しているかを、ヌクレアーゼによって切断されたDNAの配列を読むことで検討した。Fig. 1-9でモノヌクレオソームまで切断されたと考えられる150bp~200bp程度のDNAを精製し、その配列を次世代シーケンサーによって読んだ。およそ $3.2 \times 10^7$ 、あるいは $3.5 \times 10^7$ のゲノム上でユニークなタグが、それぞれ+FGFと-FGFから得られ、これらの配列を、NCBI version 36 genome sequence assemblyにマップした。するとこれまでの報告通り、登録されている遺伝子の転写開始点(Transcription start site; TSS)付近で、読まれたタグが濃縮していることがわかった(Boyle et al., 2008; Crawford et al., 2006a; Crawford et al., 2006b; Gargiulo et al., 2009; Sabo et al., 2006)。また、+FGFと-FGFで遺伝子の発現状態を、マイクロアレイを用いて検討したところ、より多く発現している遺伝子ではTSS付近でタグが濃縮して

いる割合が高かった(Boyle et al., 2008)。これらの結果によって、MNase による切断実験がゲノムをランダムに切断しているわけではなく、より開いた、脱凝集したゲノム領域を切断していることが確認できた。このとき、遺伝子のエクソンとイントロン、2kbp 上流と下流を含む遺伝子領域と、それ以外の遺伝子間領域で読まれたタグの割合は+FGF と -FGF でほとんど変化しなかった。+FGF では 56%のタグが、-FGF では 54%のタグが遺伝子領域にマップされた。この結果は、ニューロンの成熟に伴って遺伝子領域に加えて遺伝子間領域でもクロマチンが脱凝集し、MNase が接近しやすくなったことを示唆している。よって、ヌクレアーゼによる切断実験で観察されたクロマチン状態の変化は、ニューロンの分化、成熟に関連する遺伝子座の変化だけではなく、遺伝子間領域も含んだよりゲノムワイドでグローバルな変化であると考えられる。

さらにクロマチンの状態を検討するために、塩によるヒストンの溶出実験を行った。この実験では、細胞から抽出した核を適切な塩濃度で処理をして溶出されるヒストンの量を定量する。これによって、ヒストンが静電的にどの程度強く DNA やその他のクロマチン分子と結合しているかを知ることができる。その結果、-FGF では H2A、H2B、H3、H4 のコアヒストンが+FGF よりも多く溶出されることがわかった。1M の塩化ナトリウムで溶出されたヒストン H2A とヒストン H2B の量は、-FGF では 42%であったにも関わらず、+FGF では 18%しか溶出されず、ヌクレアーゼによる切断実験同様、遺伝子座での変化だけでは説明できない程度にヒストンの溶出量に変化することがわかった。この結果は、ニューロンの成熟に伴ってクロマチンの静電的な結合状態が弱くなっていることを示唆している。

ES 細胞などの系では、クロマチン状態がグローバルに変化するのに伴って、核の大きさやクロモセンターの数や大きさが変化することが知られている。このため本研究でもそういった変化が観察されるかについて、Hoechst 染色を行って検討した。すると、予備的な結果ではあるが、核の大きさはほとんど変化しなかったのに対して、クロモセンターの数は 10 個から 12 個程度に増加することがわかった。

本研究で用いている *in vitro* 初代培養系では、+FGF では -FGF よりも細胞の増殖が盛んであるために、増殖細胞の割合の変化のためにクロマチン状態が異なるという可能性が考えられる。これは、M 期の細胞では染色体が非常に凝集しているからである。しかし、M 期の細胞の割合を Hoechst 染色によるクロ

マチンの凝集を指標に算出したところ、M 期の細胞は+FGF でも約 2%しかいなかった。このことは、ニューロンの成熟に伴ってヌクレアーゼによる切断のされやすさが変化するのは、少なくとも M 期の細胞の割合が変わったからではないことを示唆している。

次に、*in vitro* 初代培養系の細胞で観察されたようなクロマチン状態の変化が、*in vivo* でも観察されるかを検討した。E16.5 のマウス胎仔大脳新皮質を、顕微鏡下で皮質板と中間帯の間で分け、皮質板と脳室帯～中間帯の細胞の間でクロマチン状態を比較した。まず、この解剖によって皮質板と中間帯の間を適切に分けられているかを、解剖した直後の細胞を培養皿にまいて、脳室帯～中間帯あるいは皮質板のマーカーで染色して確認した。すると、脳室帯のマーカーである Nestin や Sox2、脳室帯～中間帯のマーカーである Ki67 や Tbr2 陽性細胞が脳室帯～中間帯に濃縮されていた。逆に、皮質板のニューロンのマーカーである Map2 や V 層ニューロンのマーカーである Ctip2 陽性細胞が皮質板に濃縮されていた。これらの細胞を用いて、ヌクレアーゼによる切断実験を行ったところ、皮質板由来の細胞において 5U/ml の MNase によって切断される DNA は 60%であったにも関わらず、脳室帯～中間帯由来の細胞では 23%であった。また、塩による溶出実験を行ったところ、皮質板由来の細胞で 1M の塩化ナトリウムで溶出されるヒストンは 67%であったにも関わらず、脳室帯～中間帯由来の細胞では 24%であった。これらの結果は、*in vivo* においても *in vitro* と同様、ニューロンの成熟に伴ってクロマチン状態がグローバルに脱凝集することを示唆している。

ニューロン分化過程でメジャーサテライトを含む領域はエンドヌクレアーゼに対する感受性が上昇する

メジャーサテライト領域は構成的ヘテロクロマチンを形成し凝集した構造を取ることが知られている。そこで、ニューロン分化過程でメジャーサテライト領域のクロマチン状態を *in vitro* 初代培養系を用いて検討した。胎生 11.5 日目 (E11.5) マウス大脳新皮質より採取した神経系前駆細胞を FGF2 と EGF 存在下で 3 日間浮遊培養した後、1 日 FGF2 を含む条件で単層培養した。その後、FGF2 存在下で 3 日間 (+FGF2, 3d) もしくは非存在下で 3 日間 (-FGF2, 3d) または 7 日間 (-FGF2, 7d) 培養した。この培養系において、FGF2 存在下では神経系前駆細胞は未分化性を保持したまま増殖する。一方 FGF2 非存在化では、神経系前駆細胞は細胞周期を停止しニューロン分化が促進される。

まず、最初に細胞より単離したクロマチン画

分を制限酵素 MvaI で処理し、エンドヌクレアーゼに対する感受性の検討を行った。メジャーサテライトはタンデムな反復配列により構成され、1 繰り返し単位中に MvaI による切断部位が 1 か所だけ存在する。したがってメジャーサテライト領域は MvaI によって切断されると、234 の整数倍のラダー状のバンドとして検出されると予想される。一般にクロマチンが凝集した構造を形成していると制限酵素による切断を受けにくくなると考えられることから、ラダー状のバンドの濃さからクロマチンの凝集状態を検討することができると考えられる。+FGF2, 3d、-FGF2, 3d、-FGF2, 7d の条件を比べると、-FGF2, 3d、-FGF2, 7d の分化条件時に+FGF2, 3d の時よりラダー状のバンドが濃く観察された (Figure 1-1-C)。メジャーサテライト領域は一般に凝集した構造を取るとされているが、この結果からニューロン分化に伴って、クロマチンが脱凝集する可能性が示唆された。

ニューロン分化過程でメジャーサテライトに由来する FISH のシグナルの変化は観察されなかった

クロマチンの構造を検討する手法としてはエンドヌクレアーゼを用いた生化学的な実験以外に、Fluorescence in situ hybridization (FISH) による方法も知られている。そこで、今度はニューロン分化に伴うメジャーサテライトのクロマチン構造の変化を FISH により検討した。メジャーサテライトに対する DNA プローブは digoxigenin (DIG) により標識し、抗 DIG 抗体にて検出した。+FGF2, 3d、-FGF2, 3d、-FGF2, 7d の各種条件で培養した細胞に対し FISH の実験操作を行った。その結果、顕微鏡下の観察では、各条件でニューロンマーカー  $\beta$  III-tubulin 陽性細胞と陰性細胞あるいは培養期間の長短による FISH のシグナルに違いはほとんど無かった。ニューロン分化過程では、少なくとも FISH で観察されるようなレベルではメジャーサテライトに変化は起きていないと考えられる。

ニューロン分化に伴いヒストン H3K4 トリメチル化修飾がクロモセーターに局在するようになる

次に、メジャーサテライト領域のクロマチンの状態がどのような因子により制御されるかを免疫細胞染色により調べた。一般に、メジャーサテライトはヘキストのシグナルが強く検出される領域 (クロモセーター) に含まれることが既に知られている (Solovei et al., 2009)。このことからクロモセーターをメジャーサテライトが存在する領域の指標として、メジャーサテライト領域のクロマチ

ンの状態を制御する因子を検討した。実際に染色を行ったのは、ヘテロクロマチン領域に局在することが知られているヒストン H3K9 トリメチル化修飾 (H3K9Me3)、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 $\alpha$ 、HP1 $\beta$ 、HP1 $\gamma$  と転写の活性化と関係のあるヒストン H3K4 トリメチル化修飾 (H3K4Me3) である。この実験ではニューロンマーカー doublecortin (DCX)、アストロサイトマーカー glial fibrillary acidic protein (GFAP) を共染色し個々の細胞の種類を特定したうえで目的タンパク質の局在を評価した。

まず H3K4Me3 に対する抗体を用いて、その局在の変化を調べた。すると H3K4Me3 は DCX、GFAP 共陰性の神経系前駆細胞では核全体に拡散して存在したのに対し、DCX 陽性のニューロンにおいては、クロモセーターに強く局在していた。このとき各培養条件中の各種細胞における H3K4Me3 の染色パターンを定量したところ、確かに、+FGF2, 3d の条件での DCX、GFAP 共陰性の神経系前駆細胞と考えられる細胞においては、そのほとんどで H3K4Me3 は、核全体に拡散して存在していた。一方、-FGF2, 3d、-FGF2, 7d の条件で DCX 陽性のニューロンにおいては、H3K4Me3 がクロモセーターに強く局在する傾向が見られた。また、GFAP 陽性細胞においても H3K4Me3 はクロモセーターに強く局在していた (data not shown)。ところで、増殖因子 FGF2 は rRNA の転写などに関わることが知られており (Zhao et al., 2003; Sheng et al., 2005)、H3K4Me3 の局在の変化は単に FGF2 の有無に起因する可能性も充分考えられる。しかしながら、+FGF2, 3d、-FGF2, 3d、-FGF2, 7d のいずれの培養条件でも、DCX 陽性のニューロンで、H3K4Me3 がクロモセーターに強く局在するという傾向が見られたことから、FGF2 の有無ではなくまさにニューロン分化により、H3K4Me3 の局在の変化が起きたと考えられる。一般にヒストン H3K4Me3 は、ユークロマチン領域に存在し転写の活性化と関係があると考えられている。一方で、メジャーサテライト領域を含むクロモセーターは、ヘテロクロマチンを構成し転写が抑制されている。したがって、H3K4Me3 がニューロンでクロモセーターに強く局在するという今回の結果は非常に驚きであった。

ニューロン分化過程で H3K9 トリメチル化修飾のクロモセーターへの局在は変化しない  
次にヘテロクロマチンのマーカーである H3K9Me3 について検討した。その結果、H3K9Me3 は+FGF2, 3d、-FGF2, 3d、-FGF2, 7d のいずれの条件でも DCX、GFAP の陽性陰性にかかわらず、クロモセーターに局在していた。したがって少なくとも免疫染色のレベルではニューロン分化過程において H3K9Me3 に局

在の変化は起きていないと考えられる。

FGF2 欠損条件で HP1  $\beta/\gamma$  がクロモセーター上に観察される細胞の割合が増加する。続いて、ヘテロクロマチンの制御因子 HP1  $\alpha$ 、HP1  $\beta$ 、HP1  $\gamma$  についても同様に検討した。HP1 タンパク質はクロモドメインにより H3K9Me を認識し、主にヘテロクロマチンに局在することから、元々は発現の抑制に関与すると考えられていた。しかしながら最近では転写の活性化にも寄与するという例も報告されている (Vakoc et al., 2005; Kwon et al., 2010)。これらのことから HP1 の局在の変化によってメジャーサテライト領域の凝集状態の変化がもたらされた可能性を検証した。

まず、HP1  $\alpha$  に対して染色を行ったところ、ニューロン分化で HP1  $\alpha$  の局在に大きな変化は観察されなかった。ただ、DCX 陽性細胞、陰性細胞どちらにおいても一部のシグナルはクロモセーター上に検出されたり、一部の DCX 陽性細胞では HP1  $\alpha$  は foci 状に染色されクロモセーターに共局在していたりしたことから、少なくとも一部の細胞集団では HP1  $\alpha$  がメジャーサテライト領域のクロマチン状態の変化を制御する可能性は十分に考えられる。

次に HP1  $\beta$  に関して染色を行ったところ、DCX、GFAP 共陰性細胞においてクロモセーターと排反であるのに対し、DCX 陽性細胞ではシグナルの一部がクロモセーターと重なって観察されるという傾向が見られた。また、一部の DCX 陽性細胞では HP1  $\beta$  は foci 状に染色されクロモセーターに共局在していた。このことから HP1  $\beta$  のクロモセーターへのリクルートが、ニューロン分化過程でのメジャーサテライト領域のクロマチン状態の変化を制御する可能性が示唆された。

最後に HP1  $\gamma$  についてその局在を検証したところ、DCX、GFAP 共陰性細胞において主にクロモセーター以外の領域からシグナルが検出された。一方 DCX 陽性細胞ではシグナルの一部がクロモセーターと重なって観察された。また、一部の DCX 陽性細胞では foci 状に染色されクロモセーターに共局在していた。このとき、クロモセーター上に HP1  $\gamma$  のシグナルが観察されるかどうかという基準で、各培養条件中の各種細胞における HP1  $\gamma$  の染色パターンを分類し定量した。すると -FGF2, 3d、-FGF2, 7d の DCX 陽性細胞と比べて +FGF2, 3d の培養条件での DCX 陽性細胞で、HP1  $\gamma$  がクロモセーター上に観察される細胞の割合が 25%程度少なかった。しかし +FGF2, 3d の条件で DCX、GFAP 共陰性細胞よりも DCX 陽性細胞で HP1  $\gamma$  がクロモセーター上に観察される細胞の割合が多かった。このことから、ニューロン分化で見られる HP1  $\gamma$  の局在の変化の少なくとも一部は FGF2 に依存せずに起

きていると考えられる。つまりニューロン分化により何らかのメカニズムで HP1  $\gamma$  がクロモセーターにリクルートされ、メジャーサテライト領域のクロマチン状態が変化した可能性が示唆された。また、DCX 陽性細胞の中でも HP1  $\gamma$  の染色のされ方が一通りでなかったことから、ニューロンのサブタイプによって HP1  $\gamma$  の機能が異なる可能性が考えられる。

ニューロン分化に伴い、メジャーサテライト由来の転写産物が増加する

一般的にヒストン H3K4 トリメチル化修飾は、転写の活性化と関係があるとされることから、次にメジャーサテライト領域の転写状態を調べた。

まず *in vitro* 初代培養系にて +FGF2, 3d、-FGF2, 3d、-FGF2, 7d の 3 種類の条件で培養した細胞より RNA を抽出し、メジャーサテライトの転写産物を定量的逆転写 PCR 法にて解析した。その結果 +FGF2, 3d と比べ -FGF2, 3d、-FGF2, 7d の条件でメジャーサテライトの転写量が増加することが分かった。

続いて *in vivo* での転写状態を検討した。妊娠 16.5 日目のマウス胎仔大脳新皮質より脳室帯から中間帯 (VZ-IMZ) と皮質板 (CP) を切り出した後、メジャーサテライトの転写産物を定量的逆転写 PCR 法にて解析した。すると神経系前駆細胞が多く存在する VZ-IMZ よりもニューロンが多く存在する CP で、メジャーサテライトの転写産物が多いということが分かった。このことから *in vitro*、*in vivo* 両方において、ニューロン分化に伴いメジャーサテライトの転写産物の量が増加することが示唆された。

ニューロン分化過程で、メジャーサテライトは向き特異的に転写される

初めに述べたように、メジャーサテライトは AT リッチなタンデムリピート配列である。したがって、そこから転写される RNA には、A リッチなものと U リッチなものが考えられる。また、転写されるユニット数もさまざまなものが想定される。しかしながら定量的逆転写 PCR の実験では実験の性質上、転写産物の向きと長さを調べるができなかった。そこで、向き特異的なリボプローブを設計しノザンプロットングによりこれらについて検討した。すると A リッチ、U リッチな転写産物はいずれも +FGF2, 3d と比べて -FGF2, 3d の条件の方でシグナルが強く検出された。このことは先ほどの定量的逆転写 PCR の結果と合致する。また A リッチ、U リッチな転写産物いずれもシグナルは 1.5kb 付近を中心にスメア状に観察された。つまりタンデムリピート配列の約 7 ユニット分程度が転写されていると考えられる。さらに転写産物の向きに関しては、U リッチな転写産物の方が A リッチ

なものより多く存在するということが分かった。この結果から、メジャーサテライトの転写が向き特異的に制御されている可能性が示唆された。

神経系前駆細胞にてメジャーサテライトの転写産物をノックダウンすると、DCX 陽性細胞の割合が増加する

メジャーサテライトの転写産物は初期発生に必要であることが示唆されている (Probst et al. 2010)。そこで大脳新皮質発生においても、転写産物が機能的かどうかを検討した。これまでの報告から転写産物は主に核内に存在すると考えられている。そこで核内の RNA のノックダウンに効果的であるとされているアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、ノックダウン実験を試みた。胎生 11.5 日目のマウスより採取した神経系前駆細胞を FGF2 と EGF 存在下で 3 日間浮遊培養した後 (3DIV)、エレクトロポレーション法によりアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に導入した。その後 2 日間浮遊培養し、定量的逆転写 PCR 法により解析を行った。用いたアンチセンスオリゴヌクレオチドは Probst et al., 2010 で用いられているものと同じ配列を設計した。またエレクトロポレーション時には、赤色蛍光タンパク質 mCherry の発現ベクターも同時に細胞に導入し、mCherry 陽性細胞をアンチセンスオリゴヌクレオチドが導入された細胞と判断した。このとき、A リッチな転写産物と相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドと U リッチな転写産物と相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを同時に導入した。その結果、一般に核内の RNA はノックダウンが容易ではないとされているが、メジャーサテライトの転写産物を細胞集団全体で 20~30%ほどノックダウンすることができた。エレクトロポレーションの効率が 40~80%程度であることを考慮すると、アンチセンスオリゴヌクレオチドが導入された細胞ではある程度ノックダウンされていた計算となる。このとき、神経系前駆細胞での発現が知られている遺伝子の転写量を同時にいくつか調べてみた。すると、予備的ではあるがメジャーサテライトの転写産物のノックダウンにより神経系前駆細胞マーカー Nestin、神経系前駆細胞の増殖・分化の制御因子 Pax6 の転写量が減少していた。このことは、メジャーサテライトの転写産物が何らかのメカニズムにより Nestin、Pax6 の転写を制御している可能性を示唆している。続いて、ノックダウンの影響を免疫細胞染色により検討した。胎生 11.5 日目のマウスより採取した神経系前駆細胞を FGF2 と EGF 存在下で 3 日間浮遊培養した後、エレクトロポレーション法によりアンチセンスオリゴヌクレオチドを細胞に導入した。その後、FGF2

と EGF 存在下で 2 日間浮遊培養し、FGF2 存在下で 3 日間単層培養した。そして細胞を固定し mCherry 陽性細胞中のニューロンマーカー DCX 陽性細胞の割合を調べた。このときも、先ほどと同様、A リッチな転写産物と U リッチな転写産物を同時にノックダウンすることを試みた。すると、コントロールと比べてメジャーサテライトの転写産物をノックダウンした細胞において、DCX 陽性細胞の割合が増加する傾向が見られた。このことは、メジャーサテライトの転写産物がニューロン分化を抑制する可能性を示唆している。以上のことから、メジャーサテライトの転写産物が神経系前駆細胞の未分化性に関与する可能性が示唆された。

#### 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 10 件)

① Watatani K, Hirabayashi Y, Itoh Y, Gotoh Y. PDK1 regulates the generation of oligodendrocyte precursor cells at an early stage of mouse telencephalic development. **Genes Cells.** , 査読有, 17, 326-335, 2012.

② Hirabayashi, Y. and Gotoh, Y. Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. **Nat. Rev. Neurosci.** , 査読有, 11, 377-388, 2010.

③ Kuwahara, A., Hirabayashi, Y., Knoepfler, P.S., Taketo, M.M., Sakai, J., Kodama, T. and Gotoh, Y. Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. **Development**, 査読有, 137, 1035-1044, 2010.

④ Hirabayashi, Y., Suzki, N., Tsuboi, M., Endo, T.A., Toyoda, T., Shinga, J., Koseki, H., Vidal, M. and Gotoh, Y. Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. **Neuron**, 査読有, 63, 600-613, 2009.

⑤ Oishi, K., Watatani, K., Itoh, Y., Okano, H., Guillemot, F., Nakajima, K. and Gotoh, Y. Selective induction of neocortical GABAergic neurons by the PDK1-Akt pathway through activation of Mash1. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** , 査読有, 106, 13064-13069, 2009.



⑥Higuchi, M., Onishi, K., Yoneyama, C. and Gotoh, Y. Scaffolding function of PAK in the PDK1-Akt pathway. **Nat. Cell Biol.** , 査読有, 10, 1356-1364, 2008.

⑦Kawaguchi, D., Yoshimatsu, T., Hozumi, K. and Gotoh, Y. Selection of differentiating cells by different levels of delta-like 1 among neural precursor cells in the developing mouse telencephalon. **Development**, 査読有, 135, 3849-3858, 2008.

⑧Mori, Y., Higuchi, M., Hirabayashi, Y., Fukuda, M. and Gotoh, Y. JNK phosphorylates Syt 4 and enhances Ca<sup>2+</sup>-evoked release. **EMBO J.**, 査読有, 27, 76-87, 2008.

[学会発表] (計 101 件)

1. 後藤由季子 : 神経幹細胞の運命制御、第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、山梨大学甲府キャンパス (甲府市)、平成 24 年 3 月 26-27 日

2. Shohei Furutachi, Matsumoto, Keichi Nakayama, Yukiko Gotoh: p57 controls adult hippocampal NSC quiescence and modulate the pace of neurogenesis, The 59th NIBB Conference(1st International Symposium), Neocortical Organization, Neocortical Organization, Okazaki Conference Center Okazaki, Japan, March 10-13, 2012

3. Yukiko Gotoh : Faithful Coupling of Neuronal Fate Commitment and the Onset of Neuronal Migration during Neocortical Development, International Symposium "Neocortical Organization" , Okazaki conference center, 2012. 3. 10-12

4. 後藤由季子 : GCOE の公開講座、脳を創る細胞の振舞い、東京大学小柴ホール (文京区)、平成 24 年 1 月 21 日

5. Yukiko Gotoh: DiSCUSS (Disease - Stem Cell - Unique Signaling - Standpoint) Meeting, Neural stem cell maintenance in the adult brain, Dresden, Germany, December 5-8, 2011

6. Yukiko Gotoh: Joint CSH Asia/ISSCR Conference, Neural stem cell maintenance in the adult brain, Suzhou Dushu Lake Conference Center (Suzhou), October 24-28,

2011

7. Tomohiko Okazaki and Yukiko Gotoh: Differential control of interferon and apoptotic responses to viral infection, Pascal Meier Lab, Institute of Cancer Research, London, United Kingdom, October 20, 2011

8. Tomohiko Okazaki, Maiko Higuchi, Kohsuke Takeda, Makoto Miyagishi, Atsushi Kato, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita, Hidenori Ichijo, and Yukiko Gotoh: ASK family kinases discriminate between interferon production and apoptosis in antiviral response, Todai Forum 2011, Forum on Systems Biology & Genomic Medicine, Institut Pasteur, Paris, FRANCE, October 17 - 18, 2011

9. 樋口麻衣子、後藤由季子 : Regulation and function of the proto-oncogene Akt、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場 (名古屋市)、平成 23 年 10 月 3-5 日

10. 岡崎朋彦、樋口麻衣子、後藤由季子 : 新規翻訳後修飾による抗ウイルス応答分子 IPS-1 の機能の使い分け (招待口演)、第 84 回日本生化学会大会、国立京都国際会館 (京都)、平成 23 年 9 月 21-24 日

11. 岡崎朋彦、樋口麻衣子、後藤由季子 : 新規翻訳後修飾による抗ウイルス応答分子 IPS-1 の機能の使い分け、第 20 回日本 Cell Death 学会学術集会、東京大学薬学総合研究棟 (東京都)、平成 23 年 7 月 29-30 日

12. 後藤由季子 : 日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム、神経幹細胞の運命制御、石川県立音楽堂 (石川県金沢市)、平成 23 年 5 月 25-26 日

13. Tomohiko Okazaki, Maiko Higuchi, Kohsuke Takeda, Makoto Miyagishi, Atsushi Kato, Mitsutoshi Yoneyama, Takashi Fujita, Hidenori Ichijo, and Yukiko Gotoh: The ASK family discriminates between interferon production and apoptosis in antiviral response (oral and poster), 13th International TNF Conference, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, JAPAN, May 15 - 18, 2011

14. 後藤由季子 : 幹細胞治療研究フォーラム、神経幹細胞の運命制御、東京大学医科研 (港区)、平成 23 年 5 月 12 日

15. Hirabayashi, Y., Suzuki, N., Tsuboi, M., Miguel Vidal, Koseki, H., and Gotoh, Y. : Temporal Regulation of Cortical Neural Precursor Cell Fate by Polycomb Group Proteins, CDB Symposium 2011, Kobe, Japan, March 14-15, 2011
16. 後藤由季子 : 大脳神経幹細胞の分化ポテンシャルの制御、第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会、神戸ポートアイランド (神戸市)、平成 22 年 12 月 7-10 日
17. Yukiko Gotoh : Temporal regulation of neural stem cell fate in the developing mouse neocortex, RIKEN BSI Seminar, 和光市、2010. 11. 29
18. 後藤由季子 : マウス大脳神経幹細胞の運命制御機構、第 26 回 Wako ワークショップ「幹細胞 iPS 細胞研究の最前線」、品川グランドセントラルタワー、東京、平成 22 年 11 月 26 日
19. Hirabayashi, Y., Suzuki, N., Tsuboi, M., & Gotoh, Y. : Temporal regulation of cortical neural precursor cell fate by polycomb group proteins, Minisymposium on Developmental Neurobiology, San Diego, USA, 2010. 11. 13-17.
20. Okazaki, T., Higuchi, M., Takeda, K., Miyagishi, M., Kato, A., Yoneyama, M., Fujita, T., Ichijo, H., and Gotoh, Y. : The ASK MAPKKK family mediates host defense responses against viral infection, 14th International Congress of Immunology, The Kobe Convention Center Complex, Kobe, Japan, August 16-20, 2010
21. 後藤由季子 : Embryonic and adult neural stem cells in mouse telencephalon、Neuro2010 (第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経科学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会)、神戸コンベンションセンター (神戸市)、2010 年 9 月 2-4 日
22. 後藤由季子 : Embryonic and adult neural stem cells in mouse telencephalon、第 6 回グローバル COE 国際会議・第 20 回生体防御医学研究所ホットスプリングハーバーシンポジウム、ザ・ルイガンズ (福岡市)、2010 年 8 月 19-20 日
23. Yusuke Kishi, Yuki Fujii, Hiroaki Oshiro, Yusuke Hirabayashi, Yukiko Gotoh : Global a go-go!, 2nd German-Japanese Bilateral Event on Neural Stem Cells and Mammalian Neurogenesis, Spreewald, Germany, July 16, 2010
24. Gotoh, Y. : Embryonic and adult neural stem cells in mouse telencephalon, 3rd International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, Dresden, Germany, 2010. 7. 11-14.
25. Hirabayashi, Y., Suzuki, N., Tsuboi, M., & Gotoh, Y. : Temporal regulation of cortical neural precursor cell fate by polycomb group proteins, 3rd International Congress on Stem Cells and Tissue Formation, Dresden, Germany, 2010. 7. 11-14.
26. Hirabayashi, Y., Suzuki, N., Tsuboi, M., Miguel Vidal, Koseki, H., Gotoh, Y. : Temporal regulation of cortical neural precursor cell fate by polycomb group proteins, Keystone Symposium - Dynamics of Eukaryotic Transcription during Development, Big Sky, USA, 2010. 4. 7-12.
27. 後藤由季子 : Regulation of neural stem cell fate during mouse neocortical development、第 57 回日本実験動物学会総会、京都テルサ、平成 22 年 5 月 12-14 日
28. Yukiko Gotoh, Masafumi Tsuboi, Yusuke Kishi, Nao Suzuki, Yusuke Hirabayashi: Temporal regulation of neural stem cell fate in the developing mouse neocortex, CSHL, Francis Crick Neuroscience Symposium, 中国、蘇州, April 12-17, 2010
29. Yukiko Gotoh: Chromatin-level regulations during neocortical development, Cold Spring Harbor Conferences Asia, Local Transport-Francis Crick Neuroscience Symposium, Suzhou Dushu Lake Conference Center, 上海, April 12-17, 2010
30. Yukiko Gotoh and Yusuke Hirabayashi : Temporal Regulation of Neural Stem Cell Fate in the Mouse Developing Neocortex, CDB Symposium 2010、Kobe, March 23-25, 2010.
31. Yusuke Hirabayashi . Nao Suzuki . Masafumi Tsuboi . Miguel Vidal . Haruhiko Koseki . Yukiko Gotoh: Temporal regulation of cortical neural precursor cell fate by polycomb group proteins, Cell Cycle and Development, 京都市、平成 22 年 3 月 15-17

日

32. Yukiko Gotoh: Regulation and functions of the Akt/PKB pathway, AACR/JCA Joint Conference, Hilton Waikoloa Village, Waikoloa, Hawaii, February 5-9, 2010

33. 後藤由季子: クロマチンレベルでの神経幹細胞運命制御、エピゲノム研究会、東京大学柏キャンパス生命棟会議室(柏市)、平成21年11月12日

34. Yusuke Hirabayashi . Nao Suzki . Masafumi Tsuboi . Miguel Vidal . Haruhiko Koseki . Yukiko Gotoh: Temporal regulation of cortical neural precursor cell fate by polycomb group proteins, EuroEpiStem--2009 Meeting, Cambridge, UK, November 3-4, 2009

35. Yusuke Kishi and Yukiko Gotoh : Global change of the chromatin state during neuronal maturation, Construction and Reconstruction of the Brain, 淡路夢舞台(淡路市)、平成21年10月8-10日

36. Daichi Kawaguchi and Yukiko Gotoh : Notch ligand regulation of adult neural stem cells, Construction and Reconstruction of the Brain, 平成21年10月8-10日淡路夢舞台(淡路市)

37. Yukiko Gotoh : Temporal regulation of neural stem cell fate in the mouse developing neocortex, The International Society for Stem Cell Research 8th Annual Meeting, Preinary lecture, Centre Convencions Internacional Barcelona, Spain, July 8-11, 2009.

38. Yukiko Gotoh : Keystone Symposia, Chromatin Dynamics and Higher Order Organization, Polycomb regulation of neural stem cell fate, Coeur d'Alene Resort ,Coeur d'Alene, Idaho, USA, February 25 - March 2 2009.

39. Yukiko Gotoh : Regulation of neural stem cell fate during the mouse neocortical development, Houston/SanFrancisco Joint Meeting on Vertebrate Organogenesis, November 25, 2008, SanFrancisco

40. Yukiko Gotoh : Gordon Research Conference "Molecular and Cellular Neurobiology", Temporal regulation of neocortical neural precursor cell fate、

The Hong Kong University of Science & Technology, Hong Kong, June 8-13 2008.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/celltech>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

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