

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06667

研究課題名(和文)新規光操作システムを用いた、神経幹細胞の分化制御メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of neural stem cell regulatory mechanisms using a novel light manipulation system

研究代表者

山田 真弓 (Yamada, Mayumi)

京都大学・医生物学研究所・特定准教授

研究者番号：50583457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞の細胞増殖・分化過程において、分化運命決定を制御する遺伝子群が、振動発現などのダイナミックな発現動態を示すことが明らかになってきており、それらが細胞増殖や細胞分化の正確さやタイミングを制御する重要な役割を担っていることが示唆されている。本研究では、光作動性Tetシステムの改良を行い、神経幹細胞において人為的に遺伝子発現を制御する系を確立した。さらに、この光操作技術を用いて、神経幹細胞において分化運命決定因子Ascl1の発現を光制御し、RNAシーケンス解析によって神経幹細胞の増殖およびニューロン分化過程におけるAscl1の下流遺伝子の探索、及び、それらの発現解析を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個々の遺伝子が示すダイナミックな発現変動の機能的意義が明らかになれば、神経幹細胞を対象とした再生医療の発展が期待される。しかし、これまでに報告されている既存の遺伝子発現操作技術では、分化運命決定因子が示す数時間周期の発現変動の機能的意義を検証することは不可能であった。本研究で改良した光作動性Tetシステムは優れた時空間分解能をもって遺伝子発現ダイナミクスを人工的に制御することができる。そのため、本研究の解析は神経幹細胞の制御メカニズムの解明だけでなく、ヒトの神経変性疾患・神経障害の治療や、再生医学に適応するための新規戦略の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：During cell proliferation and differentiation of neural stem cells, it has become clear that a group of genes that control differentiation fate exhibit dynamic expression changes, such as oscillatory expression, suggesting that they play an important role in controlling the accuracy and timing of cell proliferation and differentiation. In this study, I have improved the photo-activatable Tet system and established a system to artificially regulate gene expression in neural stem cells. Furthermore, I used such as light manipulation technique to optically control the expression of Ascl1, a differentiation fate determinant in neural stem cells and used RNA sequencing analysis to search for downstream genes of Ascl1 during neural stem cell proliferation and neuronal differentiation, and to analyze their expressions.

研究分野：神経発生

キーワード：神経幹細胞 光操作 ニューロン分化 転写因子 遺伝子発現 細胞増殖 RNA-seq解析 分化運命決定因子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

脳内に存在する神経幹細胞は自己複製能を持ち、さらに中枢神経系の主要な細胞であるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを生み出す多分化能を持っている。神経幹細胞の自己複製と細胞分化制御メカニズムの解明は、脳神経系の発生機構の解明だけではなく、脳障害や神経疾患に対する再生医療の実現に繋がると考えられる。しかし、神経幹細胞が、自己複製能と多分化能という異なる能力をどのようにして制御しているかは不明であった。

私の所属する研究グループでは、神経幹細胞における bHLH 型転写因子のダイナミックな発現変化に着目し、その機能的意義について、遺伝子発現の光操作技術を用いて検証・証明してきた (Imayoshi *et al.*, *Science* 2013; Imayoshi & Kageyama *Neuron* 2014)。その解析の過程で、bHLH 型転写因子 *Ascl1* が神経幹細胞において、振動発現することで、神経幹細胞の多分化能と自己複製の両立に貢献することを示してきた。一方で、*Ascl1* の振動発現のリズムが崩れて一過性の蓄積発現パターンに変化することが、ニューロンへの分化運命決定において必須の役割を担っていることを明らかにしてきた (Imayoshi *et al.*, 2013)。この研究成果から、*Ascl1* のダイナミックな発現変動が細胞増殖やニューロン分化の正確さやタイミングを制御する上で、重要な役割を担っていることが示唆された。しかしながら、*Ascl1* の発現変動が、どのようにして細胞増殖やニューロン分化の正確さやタイミングを制御しているのかは不明であった。

2. 研究の目的

神経幹細胞において、数分から数時間の間にダイナミックに変化する遺伝子発現動態の機能的意義を検証するには、薬剤濃度や温度変化を媒介にした既存の遺伝子発現操作技術では検証が不可能であり、優れた時間分解能を持つ遺伝子発現制御技術が必要であった。そこで、本研究では、単一細胞レベルで光制御可能な光作動性の Tet システムの開発・改良を目的とした。次に、光作動性 Tet システムを用いて、培養神経幹細胞において、分化運命決定因子 *Ascl1* のダイナミックな発現を人工的に光制御し、神経幹細胞の増殖およびニューロン分化過程における *Ascl1* の下流遺伝子を探索した。さらに、光作動性 Tet システムを用いて、*Ascl1* やその下流遺伝子の発現を体系的に光操作し、これらの因子がどのように協調的に機能して、細胞増殖やニューロン分化のタイミングを制御しているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

神経幹細胞において、*Ascl1* は 2-3 時間周期を持つ振動発現をしており、一過性にその発現が蓄積すると、ニューロンへと分化することが報告されている (Imayoshi *et al.*, *Science*, 2013)。そこで、本研究では、我々が開発した光作動性 Tet システム (PA-Tet システム) を用いて、様々な *Ascl1* の発現パターンを人工的に光操作し、神経幹細胞の増殖およびニューロン分化における、*Ascl1* の発現ダイナミクス of 機能的意義を解析した。Tet のターゲット配列である TRE の下流に *Ascl1* を配置したレンチウイルスベクターを作製し、PA-Tet システムとともに培養神経幹細胞に導入した。光照射により *Ascl1* 発現を光操作し、神経幹細胞の増殖やニューロン分化を効率良く誘導できる光照射条件を詳細に検討した。その結果、30 分周期のような短い光照射によって *Ascl1* 発現を継続すると、約 72 時間後にニューロン分化が誘導されることが分かった (図 1)。この過程で、*Ascl1* が神経幹細胞の増殖、ニューロン分化のタイミングを決定して

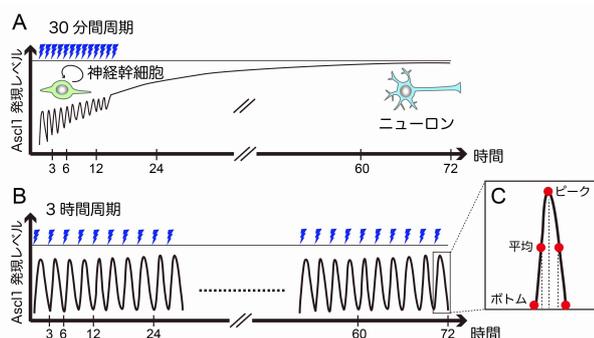


図 1 : 光操作技術を用いた、*Ascl1* の機能解析
(A) 30 分間周期、(B) 3 時間周期で光照射を行い、3, 6, 12, 24, 36, 60, 72 時間後等にサンプリングし、RNA-seq 解析を実施した。(C) 各サンプリング時間において、さらに各 5 点のサンプリング時間を設定した。

神経幹細胞の増殖、ニューロン分化のタイミングを決定して

いと考えられるが、Ascl1 の下流でどのような遺伝子発現変動が生じているのかは不明であった。そこで、Ascl1 発現を人工的に光操作し、様々なタイムポイントで細胞を回収して、RNA シーケンス (RNA-seq) 解析を実施した (図 1)。

また、神経幹細胞の増殖やニューロン分化メカニズムの解析には、神経幹細胞において bHLH 型転写因子と他の協調的に機能する因子を、複合的に光操作する必要がある。そのため、PA-Tet システムのバリエーションの拡充や他の活性化波長をもつ光作動性転写因子の開発を行った。

4. 研究成果

本研究では、光作動性 Tet システムの改良を行い、PA-Tet 2.0 の開発に成功した (図 2、山田、未発表)。神経幹細胞において Ascl1 のダイナミックな発現パターンを光操作により人工的に創出し、神経幹細胞の増殖およびニューロン分化過程における Ascl1 下流遺伝子の探索を実施した。具体的には、レンチウイルスベクターを用いて、Ascl1-floxed マウス由来の培養神経幹細胞に PA-Tet-ON 2.0 システムを導入し、センサー等を用いて、光操作によって Ascl1 発現を制御可能な細胞のクローン化に成功した。このクローン細胞を用いることによって、Ascl1 の遺伝子発現制御をこれまでよりも厳密に制御することができ、さらに長期の分化誘導実験を実施することも可能となった。異なる照射条件を用いることによって、Ascl1 の振動発現あるいは蓄積発現を誘導し、それぞれ細胞増殖とニューロン分化を促進させることができた (図 2)。このようにして、光操作により Ascl1 振動発現あるいは蓄積発現を誘導した細胞を用いて、RNA-seq 解析を実施し、新規の Ascl1 下流遺伝子を抽出した。細胞増殖やニューロン分化への移行に伴い、発現変動が大きい遺伝子に着目し、それぞれの過程における Ascl1 の下流遺伝子を探索した。Ascl1 の他に bHLH 型転写因子 Neurogenin1/2, NeuroD1 などの proneural 遺伝子の発現変動にも着目した。さらに、これらの bHLH 型転写因子に協調的に機能する因子として、ホメオボックス転写因子、エピゲノム制御因子、各種の細胞シグナル因子に着目した。さらには、Ascl1 やその下流遺伝子が構成する遺伝子ネットワークを推定することができた (図 3)。

PA-Tet-ON 2.0 は青色光作動性であるが、近赤外光で活性化することができるバクテリア由来の光依存的二量体形成システムである BphP1/Q-PAS1 系を内包した人工転写因子の開発を行った (山田&長崎、未発表)。さらに、Gal4/UAS システムを内包した、新規青色光作動性 eGAV の開発に成功した (Nagasaki, Yamada et al., 2023)。このような光操作技術を組み合わせて、体系的に駆使することで、様々な遺伝子発現動態を複合的に光操作することが可能となった。

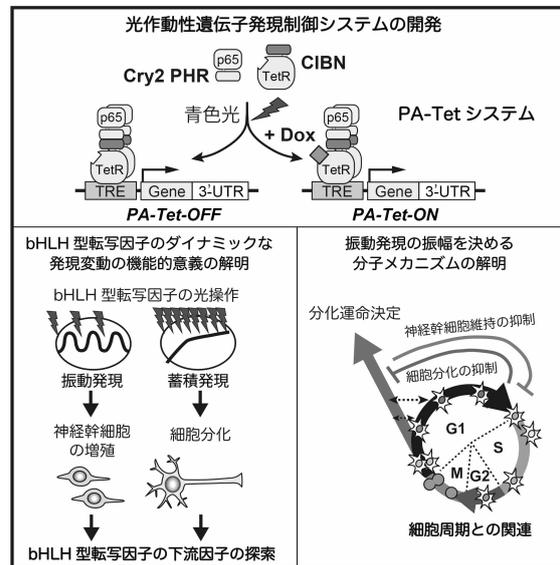


図 2: PA-Tet 2.0 を用いた、神経幹細胞の制御メカニズムの解明

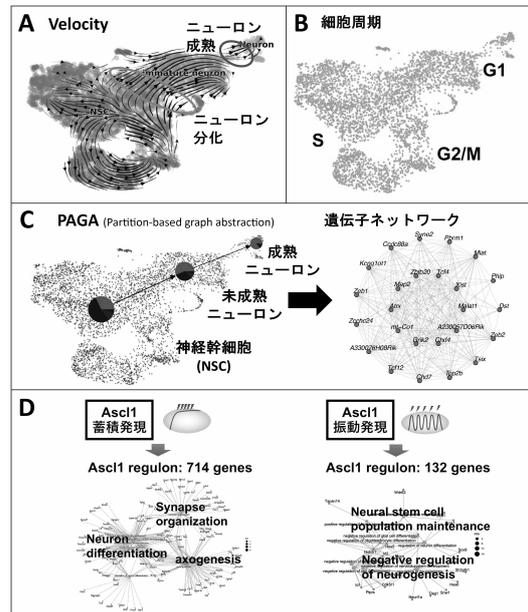


図 3: 遺伝子ネットワーク解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kaise T., Fukui M., Sueda R., Piao W., Yamada M., Kobayashi T., Imayoshi I., *Kageyama R.	4. 巻 36
2. 論文標題 Functional rejuvenation of aged neural stem cells by Plagl2 and anti-Dyrk1a activity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes and Development	6. 最初と最後の頁 23-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/gad.349000.121.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Harada Y., Yamada M., Imayoshi I., Kageyama R., Suzuki Y., Kuniya T., Furutachi S., *Kawaguchi D., *Gotoh Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Cell cycle arrest determines adult neural stem cell ontogeny by an embryonic Notch-nonoscillatory Hey1 module	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-26605-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 *Inoue YU., Morimoto Y., Yamada M., Kaneko R., Shimaoka K., Oki S., Hotta M., Asami J., Koike E., Hori K., Hoshino M., Imayoshi I., *Inoue T.	4. 巻 10
2. 論文標題 An Optimized Preparation Method for Long ssDNA Donors to Facilitate Quick Knock-In Mouse Generation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10051076.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamada M., Nagasaki C. S., Suzuki Y., Imayoshi I.	4. 巻 23
2. 論文標題 Optimization of light-inducible Gal4/UAS gene expression system in mammalian cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101506	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada M., Nagasaki C. S., Ozawa T., Imayoshi I.	4. 巻 152
2. 論文標題 Light-mediated Control of Gene Expression in Mammalian Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 66-77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2019.12.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayase Y., Amano S., Hashizume K., Tominaga T., Miyamoto H., Kanno Y., Inoue YU., Inoue T., Yamada M., ..., Nabeshima Y., Ihara N., Yamakawa K., Taya S., Hoshino M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Down syndrome cell adhesion molecule like-1 (DSCAML1) links the GABA system and seizure susceptibility	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-020-01082-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagasaki C. S., Fukuda D. T., Yamada M., Suzuki III. Y., Kakutani R., Guy. T. A., Imayoshi I.	4. 巻 48
2. 論文標題 Enhancement of Vivid-based photoactivatable Gal4 transcription factor in mammalian cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 31-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.22074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Oishi M., Stefan P., Yamazaki Y., Unekawa M., Adachi R., Yamada M., Imayoshi I., Abe Y., Steinhäuser C., Tanaka F. K.	4. 巻 71
2. 論文標題 Separate optogenetic manipulation of Nerve/glia antigen 2 (NG2) glia and mural cells using the NG2 promoter.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 317-333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.24273	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山田真弓
2. 発表標題 「青色光」による遺伝子スイッチの制御
3. 学会等名 バイオインダストリー協会 “未来へのバイオ技術” 勉強会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mayumi Yamada, Itaru Imayoshi
2. 発表標題 Analysis of neural stem cell regulatory mechanisms using optogenetics
3. 学会等名 第16回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田真弓
2. 発表標題 光操作技術とNGS解析を用いた、神経幹細胞の制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第18回成体脳新生ニューロン懇談会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田真弓
2. 発表標題 Dynamic transcriptional regulation of neural stem cells by bHLH factors
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田真弓
2. 発表標題 遺伝子発現の光操作技術の開発と応用
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田真弓、長崎真治、Seongchun Yang、今吉格
2. 発表標題 光操作技術を用いた神経幹細胞の制御メカニズムの解析
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap http://researchmap.jp/myamada
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------