

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間	： 2021～2025
課題番号	： 21H04976
研究課題名	： 短周期振動する遺伝子発現の生理学的意義について
研究代表者氏名（ローマ字）	： 影山 龍一郎（KAGEYAMA Ryoichiro）
所属研究機関・部局・職	： 国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・センター長
研究者番号	： 80224369

研究の概要：

多くの生命活動において、遺伝子発現が数時間という短周期で振動することが明らかになってきた。発生過程では、転写抑制因子 Hes1 の発現はネガティブフィードバックを介して自律的に短周期振動し、この振動を減弱させると組織形成に異常が起こるが、その分子機序については不明の点が多い。本研究では、ライブイメージングや光遺伝学的手法を用いて短周期振動の生理学的意義の解明を目指す。

研究分野：発生生物学、神経科学

キーワード：短周期振動、Hes1、神経幹細胞、ライブイメージング、光遺伝学

1. 研究開始当初の背景

体節は、椎骨、肋骨、骨格筋等の元になる節状組織で、未分節中胚葉の頭端部が数時間周期で分節することによって形成される。この周期性を制御する生物時計は、分節時計と呼ばれる。私達は、未分節中胚葉において転写抑制因子 Hes7 の発現がネガティブフィードバックで自律的に振動すること、この振動が止まると体節が全て癒合し、椎骨や肋骨も癒合して死に至ることを示し、Hes7 の発現振動が分節時計の本体であることを明らかにしてきた。このような短周期の発現振動は体節形成過程に特異的なことではなく、いろいろな細胞で Hes7 関連因子である Hes1 の発現がネガティブフィードバックで自律的に振動することを発見し、普遍的な現象であることを明らかにした。Hes1 の振動を減弱させると多様な組織形成に異常が起こることから、短周期発現振動の重要性が示唆された。しかし、なぜ短周期で遺伝子発現が振動しないといけないのかという疑問に対する明確な答えは無く、短周期発現振動の生理学的意義やその下流で起こる現象については不明の点が多い。

2. 研究の目的

神経幹細胞を中心に Hes1 の短周期振動の下流で起こる現象を明らかにする。また、未分節中胚葉では Hes7 の細胞間同期振動が必須であるが、Hes1 は神経幹細胞間で異なる位相で振動する。このような細胞間で振動位相が異なる意義は不明である。また、異なる因子間で振動位相に差がある意義や発現動態を振動から持続に変える分子機構も不明である。そこで、本研究ではライブイメージングや光遺伝学的手法を用いて神経発生過程を中心にこれらの疑問に答え、短周期振動の生理学的意義の解明を目指す。

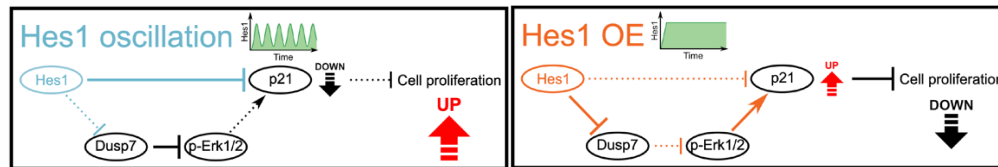
3. 研究の方法

- (1) 遺伝子発現振動と細胞周期との関係について：Hes1 の発現が振動すると活性化状態に、高レベルで持続すると静止状態になる。神経幹細胞で Hes1 の発現動態を変えることによって発現変化する遺伝子や Hes1 と一緒に振動する遺伝子を網羅的に探索し、Hes1 の発現振動による細胞周期制御機構を解析する。
- (2) 遺伝子発現振動の生物時計としての役割について：RNA-seq 解析から Hes1 の発現振動によって経時的に発現が上昇あるいは低下する因子群と神経幹細胞の分化との関係を明らかにする。
- (3) 遺伝子発現振動の細胞間位相差の生理学的意義について：未分節中胚葉では Hes7 は細胞間で同位相の振動が必須であるが、神経幹細胞間では Hes1 は異なる位相で振動する。マウス胚性幹細胞に光遺伝学的 Hes1 発現誘導システムを導入し、脳や神経管オルガノイドを誘導する。青色光のパルス照射によって細胞間で同位相の Hes1 発現振動を誘導し、脳形成に異常が見られるかどうかを検討する。
- (4) 遺伝子発現振動を可能にする細胞内環境について：振動が持続かという Hes1 の発現動態を制御する分子機構を明らかにするために、上流の遺伝子群を探索する。

4. これまでの成果

- (1) 遺伝子発現振動と細胞周期との関係について：神経幹細胞で Hes1 の発現が振動するときと高レベルで持続するときとで異なる発現を示す細胞周期制御遺伝子を探索した結果、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21 を同定した。Hes1 の発現が振動すると p21 の発現を抑制して神経幹細胞の増殖を活性化するのに対して、Hes1 の発現が高レベルで持続すると p21 の発現を増やして神経幹細胞の増殖を抑制することが分かった。前者の場合は、Hes1 が p21 プロモーターに直接結合することで p21 の発現を抑制した。後者

の場合は、Hes1 は Dusp7 の発現を抑制してリン酸化 Erk を増やすことで p21 の発現を増やした（下図）。したがって、Hes1 の発現動態に依存して異なる増殖制御を示す分子機構が明らかになった。さらに、光遺伝学的に Hes1 の発現を同期振動させた神経幹細胞での遺伝子発現変化を網羅的に解析したところ、417 遺伝子が同期振動した。この中に多くの細胞周期制御遺伝子が含まれることが明らかになった。



Hes1 の発現が振動（左）か持続（右）かで異なる増殖制御機構

(2)遺伝子発現振動の生物時計としての役割について：Hes1 の発現振動によってプロニューラル遺伝子 Neurog2 の発現が振動し、その下流で Hes1 抑制因子が徐々に蓄積すること、その結果、Hes1 の発現は抑制されて、神経幹細胞はニューロン分化を始めることが明らかになった。この結果から、Hes1 のパルス数がニューロン分化のタイマーの役割を持つことが示唆された。

(3)遺伝子発現振動の細胞間位相差の生理学的意義について：光遺伝学的 Hes1 発現誘導システムを導入したマウス胚性幹細胞を樹立し、脳や神経管オルガノイドの誘導系を作製した。

(4)遺伝子発現振動を可能にする細胞内環境について：活性状態神経幹細胞と静止状態神経幹細胞とで発現が異なる遺伝子を網羅的に探索した。その結果、Plagl2 の強制発現と Dyrk1a のノックダウンとの組合せ (inducing Plagl2 and anti-Dyrk1a = iPaD)によって老化神経幹細胞でプロニューラル遺伝子 Ascl1 の発現振動が誘導され、増殖能とニューロン分化能が復活することが明らかになった(Kaise et al. 2022)。

5. 今後の計画

Hes1 とともに短周期振動する細胞周期制御遺伝子群の発現動態を調べる。これらの解析から、Hes1 の発現振動によって神経幹細胞の増殖能が活性化する分子機構を明らかにする。また、光遺伝学的 Hes1 発現誘導システムを導入した ES 細胞から Hes1 を同期振動させながら脳や神経管オルガノイドを誘導し、分化ニューロンの種類にどのような変化があるのか解析する。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

発表論文：

*Kageyama R, Isomura A, Shimojo H. (2023) Biological significance of the coupling delay in synchronized oscillations. *Physiology* 38, 63-72. 査読有

*Kageyama R. (2022) In retrospect: 25 years of the segmentation clock gene. *Nature* 611, 671-673. 査読有

Sanaki-Matsumiya M, *Kageyama R. (2022) Time-lapse bioluminescent imaging of *Hes7* expression in vitro and ex vivo. *Methods Mol. Biol.* 2525, 321-332. 査読有

Kinoshita A, Shqirat M, Kageyama R, *Ohtsuka T. (2022) Modification of gene expression and soluble factor secretion in the lateral ventricle choroid plexus: analysis of the impacts on the neocortical development. *Neurosci. Res.* 177, 38-51. 査読有

*Ohtsuka T, Kageyama R. (2022) Dual activation of Shh and Notch signaling induces dramatic enlargement of neocortical surface area. *Neurosci. Res.* 176, 18-30. 査読有

Umemura Y, Koike N, Tsuchiya Y, Watanabe H, Kondoh G, Kageyama R, *Yagita K. (2022) Circadian key component CLOCK/BMAL1 interferes with segmentation clock in mouse embryonic organoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 119, e2114083119. 査読有

Kaise T, Fukui M, Sueda R, Piao W, Yamada M, Kobayashi T, Imayoshi I, *Kageyama R. (2022) Functional rejuvenation of aged neural stem cells by Plagl2 and anti-Dyrk1a activity. *Genes Dev.* 36, 23-37. 査読有

*Harada Y, Yamada M, Imayoshi I, Kageyama R, Furutachi S, Kawaguchi D, *Gotoh Y. (2021) Cell cycle arrest determines adult neural stem cell ontogeny by an embryonic Notch-nonoscillatory *Hey1* module. *Nat. Commun.* 12, 6562. 査読有

Zhang J, Uchiyama J, Imami K, Ishihama Y, Kageyama R, *Kobayashi T. (2021) Novel roles of small extracellular vesicles in regulating the quiescence and proliferation of neural stem cells. *Front Cell Dev Biol.* 9, 762293. 査読有

Sueda R, *Kageyama R. (2021) Oscillatory expression of *Ascl1* in oligodendrogenesis. *Gene Expr Patterns* 41, 119198. 査読有

受賞：令和3年度朝日賞、令和3年度第62回東レ科学技術賞

7. ホームページ等

<https://cbs.riken.jp/jp/faculty/r.kageyama/index.html>