

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06196

研究課題名(和文) Temporal Factorsが神経の運命を決定する分子基盤の理解

研究課題名(英文) Understanding the molecular basis how Temporal Factors determine neural fate

研究代表者

鈴木 匠 (Suzuki, Takumi)

茨城大学・基礎自然科学野・准教授

研究者番号：30623764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞が適切な時期に、適正量の多様な神経を生み出すことによって、機能的に正常な脳神経系が構築される。しかし、いかにして正しい種類の神経が、必要な量だけ生み出されるのかは未解明であった。神経幹細胞では、Temporal Factors(TFs)という転写因子群が特定の順序で発現し多様な神経を作り分けているが、TFsの下流でどのような遺伝子が制御され細胞運命が決まるのかは不明であった。我々は、TFsの一つであるSlpによってDan、Danrと呼ばれる遺伝子が制御されていることを見出した。また、神経の産生量の調節にJAK-STATシグナルが中心的な役割を担うことを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で行ったTFsのゲノムワイドなDNA結合パターン解析によって、TFsのひとつであるSlpの下流で機能している遺伝子の候補としてDanとDanrを同定した。これまで、TFsの下流で機能する遺伝子は同定されておらず、Dan、Danrの同定によって、神経幹細胞が多種多様な神経を生み出す分子機構の解明への糸口が得られた。また、JAK-STAT経路が神経の産生量の調節に極めて重要な役割を果たすことを突き止めた。ヒトと哺乳類の脳神経系は構造的・発生的な特徴を共有するため、哺乳類でも類似したメカニズムで機能している可能性が高く、動物界に共通した神経発生メカニズムの解明に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neural stem cells produce a sufficient amount of a wide variety of neurons at the right time to establish functionally correct neural circuits. However, the molecular mechanisms that regulate the production of correct types of neurons in the required amount have not yet been elucidated. In neural stem cells, a group of transcription factors called Temporal Factors (TFs) are expressed in a specific order to produce various types of neurons, but it is unclear what genes downstream of TFs are regulated to determine the cell fate. We found that Slp, a member of the TFs, regulates proteins called Dan and Danr. We also found that JAK-STAT signaling plays a central role in regulating neural production.

研究分野：分子発生学

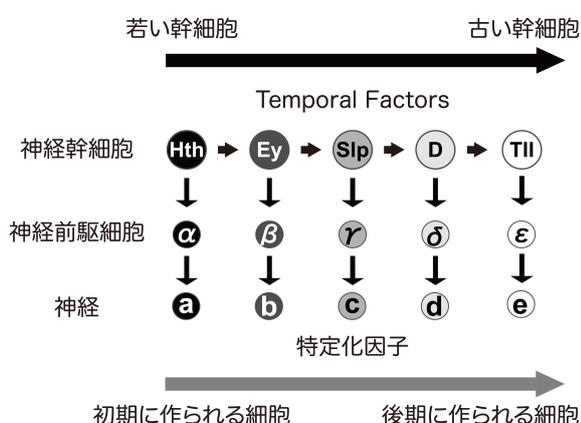
キーワード：神経幹細胞 DamID ショウジョウバエ 神経多様性 転写因子 視覚中枢

1. 研究開始当初の背景

正確な神経回路は、発生初期において生じる多種多様な神経の産生、成熟、移動、神経同士の結合、といった一連の過程によって形成される。なかでも、神経の産生は、最初にかかる最も基本的な要素である。神経産生に不具合が生じ、神経の過剰産生や産生不足が見られる自閉スペクトラム症やダウン症などでは、顕著な脳機能障害が起こっている。このように、正しく機能する神経回路の構築には、多様な神経が必要な数だけ生み出されることが極めて重要である。しかし、無数の神経から構成される哺乳類の脳において、個々の神経がどこで・どのように作り分けられ、どのようにして分化していくのか、を一貫して解析することは困難であり、神経産生の制御メカニズムは未解明のままである。

ハエ視覚中枢は、層・カラム構造などのような哺乳類の脳と共通した構造を持っており、約 100 種・4 万個の神経細胞から構成され解析可能な程度の複雑性を持つため脳神経系の解析モデルとして注目されている[Hasegawa et al., 2011]。さらにハエでは、分子遺伝学的技術が発展しており、他のモデル系では非常に困難な解析を効率良く行うことができる。我々はこれまでに、ハエ視覚中枢では、Temporal Factor と呼ばれる一連の転写因子群が決められた順序で一過的に発現することによって、1つの神経幹細胞が数十種類に及ぶ多様なタイプの神経細胞を生み出していることを報告した[Suzuki et al., 2013; 2014; 2016a、図 1]。同じ Temporal Factor を発現している間、神経幹細胞は同じタイプの神経を生み出し続ける。このため、多様な神経を適切な数だけ生み出すには、Temporal Factors の発現を正確に切り替える必要がある。このような発現の切り替えには、Temporal Factors 同士の相互作用による制御が知られているが、Hth-Ey 間[図 1]などでは相互作用が見られず、別の制御機構の存在が指摘されていた。しかし、Temporal Factors 自身以外に、Temporal Factors の発現に関与する分子は同定されておらず、別の制御機構の手がかりは全くなかった。

図 1. Temporal Factors による運命決定

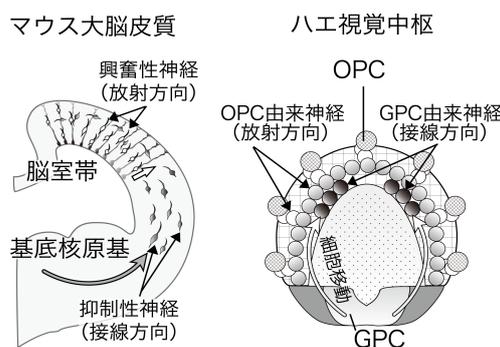


2. 研究の目的

哺乳類の脳皮質では、脳室帯と基底核原基と呼ばれる2つの独立した神経供給源が存在し、それぞれ興奮性神経、抑制性神経という異なるタイプの神経を生み出している。我々は、ハエ視覚中枢においても、独立した領域である表層の幹細胞集団(OPC)と後方のグリア前駆細胞(GPC)の2つが、それぞれ異なるタイプの神経を生み出すことを見出している[Bertet et al., 2014; Suzuki et al., 2016a、図 2]。

OPCとGPCは、転写因子 Ey, Slp, D など、ほぼ同じ遺伝子セットを Temporal Factors として用いているにも関わらず、異なる特定化因子によって全く異なるタイプの神経を生み出す[Suzuki et al., 2016a]。予備実験では、GPC

図 2. マウス脳とハエ脳の比較



において、BMP、JAK-STAT シグナルの操作した結果、特定のタイプの神経が増減した。この際、神経幹細胞の数は変化しないため、これらのシグナルは Temporal Factors の発現期間の変更を介して特定化因子を制御することが考えられた。

本研究では、以上の点に注目し、①OPCとGPCにおいて、DNA アデニンメチル基転移酵素(Dam)を利用した新規手法 DamID を適用し[Southal et al., 2013; Tang et al., 2022]、Temporal Factors の標的遺伝子を同定・機能解析することにより、Temporal Factors と特定化因子を結びつける遺伝子を特定する、②また、GPC において、BMP、JAK-STAT シグナルを伝達する受容体の発現解析、これらのシグナルを同時に操作した場合の神経数の変化を調べ、それぞれのシグナルの作用点を特定することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、OPC と GPC で共通する Temporal Factor に注目し、それぞれの転写因子が制御している遺伝子を探索し、それぞれの Temporal Factor の下流で機能する遺伝子を同定する、というストラテジーを採用した。

新規のアプローチとして DamID 法を用いた。DamID 法では、5'-GATC-3'配列を認識する DNA アデニンメチルトランスフェラーゼ(Dam)を目的の DNA 結合タンパク質に融合させ、特定の細胞でこの融合タンパクの発現を誘導する。すると、Dam は目的のタンパク質が結合した領域の近傍にある 5'-GATC-3'配列を認識しメチル基を転移させるので、目的のタンパク質が結合した領域付近はメチル基によってマークされる。DNA のゲノムワイドなメチル化パターンを解析することにより、DNA 結合タンパク質の結合領域を特定できる [Southall et al., 2013; Tang et al., 2022]。OPC、GPCのそれぞれについて、同じ Temporal Factor の DNA 結合パターンをゲノムワイドに解析し、両者で DNA 結合パターンに違いが見られる領域に注目し、それぞれの領域で特異的な Temporal Factor の標的遺伝子を探索した。

また、GPC は、Eya 神経など 7 種の神経を生み出す。予備実験において、Eya 神経の数は、JAK-STAT シグナルの活性化により増加し、抑制により減少した。また、BMP シグナルを抑制すると、Eya 神経は減少した。まず、それぞれのシグナル伝達経路における受容体、それぞれのシグナル伝達に重要な遺伝子の発現パターンを解析した。さらに、それぞれの遺伝子を発現抑制することによって、予備実験で得られた結果を検証した。

4. 研究成果

<OPC、GPC における Slp の標的遺伝子>

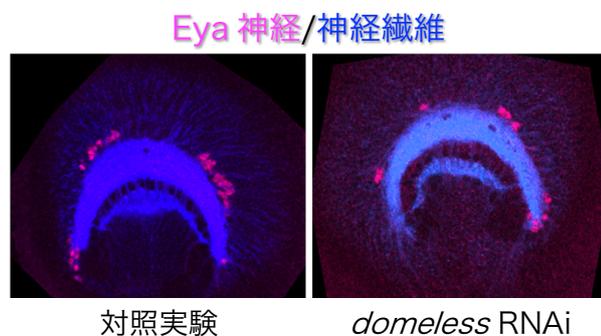
我々が樹立した Slp-Dam 系統を用いて、OPC、GPC における Slp の標的遺伝子を探索した。これまでの研究から、それぞれの TF 間には相互関係が見られることがわかっており、Slp は次に神経幹細胞で発現する D の発現を誘導することがわかっている。このため、D の遺伝子座に注目したところ、Slp が高頻度に結合していることがわかった。このことから、Slp は直接的に D の調節領域に結合し、その発現を制御していることが示唆された。次に OPC において Slp が強く結合する領域を探索したところ、*distal antenna (dan)* とよばれる遺伝子の調節領域に高度に結合していることがわかった。別の研究課題で行ったトランスクリプトーム解析でも、Dan は OPC の発現遺伝子リストに入っていた。さらに、実際に発現解析を行ったところ、Slp 発現時期の神経幹細胞での発現が確認された。GPC では、このような結合パターンは見られなかったため、Dan は OPC において特異的な Slp の標的である可能性が考えられた。さらに、*dan* に非常によく似た遺伝子である *distal antenna related (danr)* も神経幹細胞で発現しており、Dan と類似した発現パターンを示すことが見出された。Dan の機能解析を行うため RNAi 系統を用いて、Dan の発現抑制実験を行ったが、目立った変化は見られなかった。この原因として、Dan と Danr が冗長的に機能している可能性が考えられたことから、これらの遺伝子の機能を調べるためには、*dan* と *danr* の二重変異体の作出が必要不可欠であると考えられる。

<JAK-STAT シグナルによる GPC 由来神経の量的調節>

予備実験では、GPC 特異的に遺伝子発現操作が可能な *wg-gal4* 系統を用いて JAK-STAT シグナルを活性化せるリガンドとして知られる Upd1 を過剰発現させており、Eya 神経の爆発的な増加が見られた。Upd1 は分泌性のペプチドであるため、この実験からだけでは、実際に GPC の神経幹細胞において JAK-STAT が活性化しているのかは判断できない。そこで、まず初めに、JAK-STAT シグナルの活性化マーカーである STAT-GFP を用いて、JAK-STAT シグナルが活性化している細胞を可視化したところ、GPC では GFP の発現が確認されなかったが、Eya 神経において GFP の発現が見られた。続いて、Upd1 の受容体の発現パターンの解析を行った。Upd1 の受容体は、ハエでは Domeless と呼ばれるタンパク質のみが知られていたため、Domeless-GFP 融合タンパク質を発現する系統を用いて発現解析を行った。その結果、GPC 領域において Domeless-GFP の発現が確認された。

次に、Domeless が機能しない場合に、*upd1* 過剰発現とは逆、即ち Eya 神経の現象が見られることを確認するため、RNAi による *domeless* の発現抑制実験を行った。その結果、図 3 に示すように、対照実験と比較して、Eya 神経の数が顕著に減少した。なお、*domeless* の RNAi 実験には、それぞれ別々の配列を標的とする複数の RNAi 系統を用いており、off target 効果による可能性は低いと判断した。さらに、JAK-STAT シグナルの抑制分子である SOCS36E を GPC 領域で発現させた場合においても、*domeless* の発現抑制と同様の結果が得られた。

図 3. *domeless* RNAi の効果



以上のことから、Eya 神経の産生量の調節には、JAK-STAT シグナルが必要十分であることが示唆された。今後は、JAK-STAT シグナルがどのようにして Eya 神経の量的な調節に関与しているのかを明らかにするため、その作用点の特定に注力する必要がある。また、すでに報告している BMP シグナルとの関係性について検討することにより、神経産生量を調節する分子機構の全貌解明への道が開かれると考えられる。

【引用文献】

Bertet C, Li X, Erclik T, Cavey M, Wells B, Desplan C. Temporal patterning of neuroblasts controls Notch-mediated cell survival through regulation of Hid or Reaper. *Cell*, 158, 1173-1186, 2014.

Hasegawa E, Kitada Y, Kaido M, Takayama R, Awasaki T, Tabata T, Sato M. Concentric zones, cell migration and neuronal circuits in the Drosophila visual center. *Development*, 138, 983-993, 2011.

Southall TD, Gold KS, Egger B, Davidson CM, Caygill EE, Marshall OJ, Brand AH. Cell-type-specific profiling of gene expression and chromatin binding without

cell isolation: assaying RNA Pol II occupancy in neural stem cells. *Dev Cell*, 15, 101-112, 2013.

Suzuki, T., Hasegawa, E., Nakai, Y., Kaido, M., Takayama, R., Sato, M. Formation of neuronal circuits by interactions between neuronal populations derived from different origins in the *Drosophila* visual center. *Cell Reports*, 15, pp499-509, 2016b.

Suzuki, T., Kaido, M., Takayama, R., Sato, M. A temporal mechanism that produces neuronal diversity in the *Drosophila* visual center. *Developmental Biology*, 380, pp12-24, 2013.

Suzuki, T. and Sato, M. Neurogenesis and neuronal circuit formation in the *Drosophila* visual center. *Development, Growth & Differentiation*, 56, pp491-498, 2014.

Suzuki, T., Takayama, R., Sato, M. *eyeless/Pax6* controls the production of glial cells in the visual center of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 406, pp343-353, 2016a.

Tang, J.L.Y., Hakes, A.E., Krautz, R., Suzuki, T., Contreras, E.G., Fox, P.M., and Brand, A.H. NanoDam identifies Homeobrain (ARX) and Scarecrow (NKX2.1) as conserved temporal factors in the *Drosophila* central brain and visual system. *Developmental Cell*, 57, pp1193-1207, 2022.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato M., and Suzuki, T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Cutting edge technologies expose the temporal regulation of neurogenesis in the Drosophila nervous system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 fly	6. 最初と最後の頁 222-232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19336934.2022.2073158	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Akiba, c., Tsai, Y., Takezawa, A., Hirose, M., Suzuki, T.
2. 発表標題 TCF4/Daughterless is essential to complete differentiation from neuroepithelial cells into neural stem cells
3. 学会等名 APDNC3（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yuanchang Tsai, Aya Takezawa, Takumi Suzuki
2. 発表標題 Molecular mechanisms that regulate neuronal differentiation by Extramacrochaete
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chika Akiba, Misaki Izawa, Anna Saito, Aya Takezawa, Takumi Suzuki
2. 発表標題 Identifying genes that regulate the production of neurogenesis diversity in fly visual center
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aya Takezawa, Takumi Suzuki
2. 発表標題 Klumpfuss guarantees neuronal differentiation in two different stem cell pools in Drosophila visual center
3. 学会等名 The 7th Visual System Neuron Meeting
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Anna Saito, Takumi Suzuki
2. 発表標題 Snail family transcription factors are involved in the transition from neuroepithelial to neural stem cells
3. 学会等名 The 7th Visual System Neuron Meeting
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chika Akiba, Misaki Izawa, Anna Saito, Aya Takezawa, Takumi Suzuki
2. 発表標題 Identifying genes that regulate the production of neurogenesis diversity in fly visual center
3. 学会等名 第55回 日本発生生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 彩加里、蔡 源章、坪田 菜穂、鈴木 匠
2. 発表標題 Identifying genes that regulate neuronal diversity in Drosophila visual system
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------