

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570202

研究課題名（和文） ニューロン分化におけるシグナル統合因子としての *Sbno1*研究課題名（英文） Integration of signaling pathways by *Sbno1* in neurogenesis

研究代表者

勝山 裕 (KATSUYAMA YU)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10359862

研究成果の概要（和文）：

全胚で *Sbno1* ノックダウン実験を行いニューロン分化や脳の領域性が影響を受ける事を示した。*Sbno1* ノックアウトマウスを作製し *Sbno1* 機能を欠損させると、ニューロン分化が亢進し、神経幹細胞の枯渇がみられた。また分化時期が早まったニューロンのほとんどはアポトシスを起こしていた。yeast two hybrid screening を行い *Sbno1* に相互作用する分子として *Rbpj*、*Otub1* が単離した。免疫染色の結果から *Sbno1* タンパクは Wnt シグナルの制御化にある可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Maintenance of the neural stem cells and neuronal differentiation are precisely regulated during brain development, and molecular mechanisms involved in this regulation have not been fully understood yet. We found that the homologue of *Sbno1* is required for neuronal differentiation by gene-knockdown experiments in zebrafish. We next examined *in vivo* function of *Sbno1* during mouse brain development. We examined expression pattern of *Sbno1* protein using anti-*Sbno1* antibodies. In the developing cerebral cortex, *Sbno1* was observed in the nucleus of differentiating neurons near the marginal zone, and also in the cytoplasm of the cells in basal side including the ventricular zone. To achieve gene knockout specifically in the dorsal forebrain, we constructed *Sbno1*-floxed mice, and crossed these to *Emx1<sup>Cre</sup>* transgenic strain that expresses Cre-recombinase in the developing dorsal forebrain. *Sbno1* conditional knockout (cKO) mice had a very thin cerebral cortex, when examined at postnatal day 10. Proliferation of the neural stem cells was slightly in the E12.5 *Sbno1* cKO. We observed intermingling of the neural stem cells and differentiating neurons from E12 to E14 in *Sbno1* cKO embryos, suggesting premature differentiation of the neurons. Cell death detected by TUNEL method and active caspase3 or p53 immunoreactivity was robustly occurred in cKO cortex. Cell death was observed in the *Tuj1* positive differentiating neurons, but not in the *Pax6* positive neural stem cells. These observations suggest that *Sbno1* is essential for not only maintenance of the neural stem cells but also survival of differentiating neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2010 年度 | 1,800,000 | 540,000   | 2,340,000 |
| 2011 年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 2012 年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞分化

### 1. 研究開始当初の背景

脳中枢神経系発生過程におけるニューロン分化には様々なシグナル機構が働いている。しかし、それらシグナル経路やその下流で働く転写調節因子が協調して働きニューロンを秩序だてて産生する機構については十分に理解されていない。我々は脊椎動物の中枢神経系発生における脳形態形成機構に関与する新規遺伝子の同定を目的に遺伝子スクリーニングを行い、ショウジョウバエ strawberry notch (sno) のマウス相同遺伝子 Sbnol を同定した。Sno はショウジョウバエ遺伝学的解析から Notch シグナルの下流因子であると考えられている。しかし、線虫では sno 相同遺伝子は RAS 経路に関わっているとされ、また我々の解析では sbnol は Reelin シグナルによって制御されている可能性が示唆された。よって、strawberry notch ファミリー分子の機能は実験系によって、全く異なる働きをしている事が示されていた。

### 2. 研究の目的

Sbnol 遺伝子とそのタンパク質産物のマウス脳発生過程での働きの解明。Sbnol と相互作用する分子がニューロン分化において、どの様に関与しているかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

Sbnol 遺伝子座の第3エクソンを LoxP 配列で挟んだノックインマウスを作製し、Cre リコンビナーゼを発現するドライバーマウスとかけあわせることで組織、発生段階特異的な遺伝子欠損を行わせた。胚や新生児マウスの脳を摘出し、免疫組織学的解析を行った。

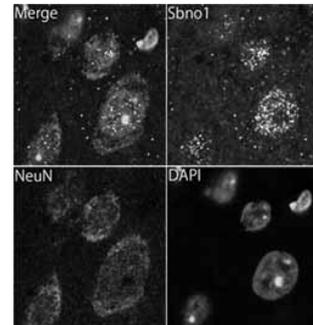
Sbnol の一部アミノ酸配列の合成ペプチドを作製し、ウサギに免疫しポリクローナル抗体を作製した。2つの異なる部位に対するペプチドを作製し、それぞれを3匹のウサギに免疫した。

Sbnol を培養細胞で強制発現させるプラスミドベクターを作製した。他のタンパク質との相互作用を免疫沈降法によって確認した。また Sbnol タンパクの局在を特異的抗体によって確認した。

### 4. 研究成果

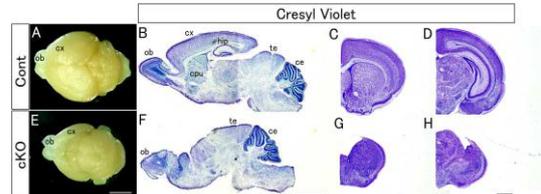
作製した抗 Sbnol ポリクローナル抗体は、どれもウェスタン解析では明瞭に Sbnol タンパクを検出する事が出来た。免疫組織染色を行った場合には便宜的に2番とした抗体で

は、脳組織で特異的な染色を示した(右図)。しかし1番では組織全体が染まったことから、1番の抗体は組織学的解析には用いることが出来ないことが分かった。2番の抗

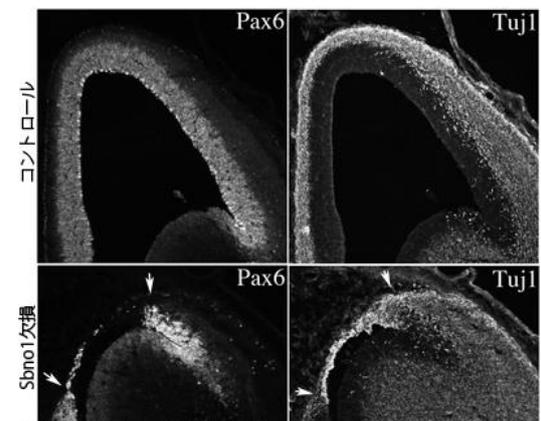


体で検出されるシグナルは、後述のノックアウトマウスでは消失することから、特異的な染色であると考えられる。

Emx1-Cre ドライバーマウスを floxed Sbnol マウスとかけあわせることで、Sbnol 欠損を大脳皮質発生で特異的に起こすことが出来た。生後10日で脳を摘出し、組織学的観察を行うと、大脳皮質が極めて薄くなっている事が分かった。また海馬は見られなかった(下図)。



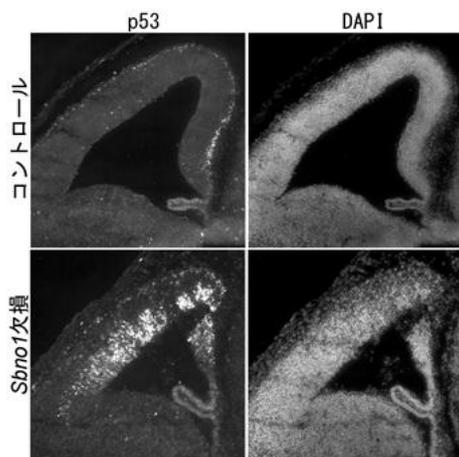
大脳皮質発生過程を観察すると、E14.5 で既に大脳皮質領域が非常に薄くなっており、Pax6 発現で標識される神経幹細胞が、大脳皮質領域で枯渇していた(下図)。



胎生14.5日マウス大脳皮質免疫組織像。コントロール胚(上段)で見られるPax6陽性神経幹細胞がSbnol欠損胚では失われ、同じ領域(矢印)にはニューロンマーカー(Tuj1)の強い発現が検出される。

E13.5 では、大脳皮質領域は、まだ薄くなってはなかったが、幹細胞の減少は始まっ

ていた。更には、この時期には TUNEL、活性化型カスパーゼ 3、p53 (下図) と言ったアポトシスを示す分子マーカーがノックアウトマウスにおいて検出された。



#### 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 Imai, H., Oomiya, Y., Kikkawa, S., Shoji, W., Hibi, M., Terashima, T., Katsuyama, Y. (2012). Dynamic changes in the gene expression of zebrafish Reelin receptors during embryogenesis and hatching period. *Development, Growth & Differentiation* 54(2), 253-263. doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01327.x. 査読有り
- ② Imai, H., Yamamoto, T., Katsuyama, Y., Kikkawa, S., Terashima, T. (2012). Subcortically and callosally projecting neurons are distinct neuronal pools in the motor cortex of the reeler mouse. *Kobe Journal of Medical Sciences* 58(3):E86-95. <http://www.med.kobe-u.ac.jp/journal/contents/58/E86.pdf>. 査読有り
- ③ 勝山裕. (2012). Reelin 欠損マウス大脳皮質細胞構築異常. 東北医学誌 124, 82-84. <http://www.igakukai.med.tohoku.ac.jp/journal/index.html> 査読無し
- ④ Takano, A., Zochi, R., Hibi, M.,

Terashima, T., Katsuyama, Y. (2011). Function of strawberry notch family genes in the zebrafish brain development. *Kobe Journal of Medical Sciences* 56(5) E220-230.

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/journal/contents/56/E220.pdf>. 査読有り

- ⑤ Bilasy SE, Satoh T, Terashima T, Kataoka T. (2011). RA-GEF-1 (rapgef2) is essential for proper development of the midline commissures. *Neuroscience Research* 71(3):200-9. doi: 10.1016/j.neures.2011.08.004. 査読有り
- ⑥ Dekimoto, H., Terashima, T., Katsuyama, Y. (2010). Dispersion of the neurons expressing layer specific markers in the reeler brain. *Development Growth & Differentiation* 52, 181-193. doi: 10.1111/j.1440-169X.2009.01153.x. 査読有り
- ⑦ Takano, A., Zochi, R., Hibi, M., Terashima, T., Katsuyama, Y. (2010). Expression of *strawberry notch* family genes during zebrafish embryogenesis. *Developmental Dynamics* 239, 1789-1796. doi: 10.1002/dvdy.22287. 査読有り
- ⑧ Kawaguchi, K., Katsuyama, Y., Kikkawa, S., Setsu, T., Terashima, T. (2010). PKH26 is an excellent retrograde and anterograde fluorescent tracer characterized by a small injection site and strong fluorescence emission. (2010). *Archives of Histology and Cytology* 73(2) 65-72. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/aohc/73/2/73\\_2\\_65/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/aohc/73/2/73_2_65/_pdf). 査読有り
- ⑨ Yoshihara, Y., Setsu, T., Katsuyama, Y., Kikkawa, S., Terashima, T., Maeda, K. (2010). Cortical layer V neurons in the auditory and visual cortices of normal, reeler and yotari mice. *Kobe Journal of Medical Sciences* 56(2) E50-E59. <http://www.med.kobe-u.ac.jp/journal/contents/56/E50.pdf>. 査読有り

[学会発表] (計 22 件)

- ①2013年3月13-14日  
第6回神経発生討論会埼玉 (和光)  
Prox1 expressing cells in the  
developing mouse dentate gyrus  
杉山拓、勝山裕、大隅典子
- ②2013年3月13-14日  
第6回神経発生討論会 (和光)  
Sbnol is involved in neuronal  
differentiation and survival of  
differentiating neurons in the  
cortical development  
勝山裕
- ③2012年9月21日  
第35回日本神経科学大会 (名古屋)  
マウス前頭前野内介在ニューロンの分  
布に対する Pax6 の影響について  
Pax6 affects distribution of  
GABAergic interneurons in prefrontal  
cortex of mice  
中村龍司、羽場美弥、勝山裕、吉崎嘉  
一、大隅典子
- ④2012年9月21日  
第35回日本神経科学大会 (名古屋)  
マウス大脳皮質の分子マーカーによる  
細胞構築の観察  
Characterization of  
cytoarchitecture in the cerebral  
cortex of the mouse brain with  
molecular markers  
高橋揚子、宮崎美香、杉山拓、大隅典  
子、勝山裕
- ⑤2012年9月20日  
第35回日本神経科学大会 (名古屋)  
Molecular features of dentate  
granule progenitors in the  
developing mouse hippocampus  
発生期マウス海馬歯状回における顆粒  
前駆細胞の発現分子解析  
杉山拓、勝山裕、大隅典子
- ⑥2012年9月19日  
第35回日本神経科学大会 (名古屋)  
哺乳類大脳皮質において Pax6 下流遺伝  
子の Dmrt1 は Neurogenin2 を制御する。  
Dmrt1, a transcription factor  
downstream to Pax6 regulates  
Neurogenin2 expression in the  
mammalian cortex  
吉川貴子、高橋将文、勝山裕、大隅典  
子
- ⑦2012年7月26日

包括型脳科学研究推進支援ネットワー  
ク 夏のワークショップ (仙台)  
Sbnol is required for neural stem  
cell morphogenesis and survival of  
differentiating neurons during  
cortical development  
Yu Katsuyama, Hideaki Imai, Taku  
Sugiyama, Noriko Osumi, Toshio  
Terashima

- ⑧2012年7月26日  
包括型脳科学研究推進支援ネットワー  
ク 夏のワークショップ (仙台)  
Expression pattern of transcription  
factors of dentate granule  
progenitors in the developing mouse  
hippocampus  
Taku Sugiyama, Yu Katsuyama, Noriko  
Osumi

- ⑨2012年7月26日  
包括型脳科学研究推進支援ネットワー  
ク 夏のワークショップ (仙台)  
胎生期由来介在ニューロンの発生に対  
する転写制御因子 Pax6 の関与  
R. Nakamura, Y. Katsuyama, K.  
Yoshizaki, H. Haba, N. Osumi

- ⑩2012年3月15日  
第5回神経発生討論会 (福井)  
Sbnol is required for neural stem  
cell morphology and survival of the  
differentiating neurons during  
corticogenesis  
Hideaki Imai, Toshio Terashima, Yu  
Katsuyama

- ⑪2012年2月20日  
脳科学若手の会 東北支部会 (仙台)  
網羅的行動テストバッテリー  
～大脳皮質細胞構築の脳機能における  
役割を例に～  
今井英明、勝山裕

- ⑫2012年2月19日  
東北脳科学ウィンタースクール (宮城)  
大脳皮質層構造の特異的な欠損は情動  
の低下を引き起こす  
今井英明、寺島俊雄、勝山裕

- ⑬2011年9月15日  
第34回日本神経科学大会 (横浜)  
Sbnol is required for growth of the  
cerebral cortex during embryogenesis  
Naoya Ryoyama, Hideaki Imai, Toshio

Terashima, Yu Katsuyama

⑭2011年9月15日  
第34回日本神経科学大会 (横浜)  
Essential function of Sbnol in Notch  
signal suppression during cortical  
neuron differentiation  
Yu Katsuyama, Ai Takano, Naoya  
Ryoyama, Hideaki Imai, Noriko Osumi,  
Masahiko Hibi, Toshio Terashima

⑮2011年6月3日  
Neurogenesis (Abcam) (神戸 CDB 理研)  
Negative regulation of Notch signal  
by Sbnol is essential for neuronal  
differentiation  
Yu Katsuyama, Ai Takano, Taku  
Sugiyama, Hideaki Imai, Masahiko  
Hibi, Toshio Terashima, Noriko Osumi

⑯2011年5月19日  
第44回日本発生生物学会 (沖縄、宜  
野湾)  
Notch signal inactivation by Sbnol is  
essential for mouse neuronal  
differentiation  
Yu Katsuyama, Ai Takano, Naoya  
Ryoyama, Hideaki Imai, Noriko Osumi,  
Masahiko Hibi, Toshio Terashima

⑰2010年12月10日  
BMB2010 (第33回日本分子生物学会大  
会) (神戸)  
Negative regulation of Notch signal  
by Sbnol is essential for neuronal  
differentiation  
ニューロン分化における Sbnol による  
Notch シグナルの抑制  
勝山裕

⑱2010年11月15日  
NEUROSCIENCE2010 (Society for  
Neuroscience) (San Diego, USA)  
Suppression of Notch signal by Sbnol  
is essential for differentiation of  
mouse cortical neurons.  
Ai Takano, Riyo Zochi, Naoya Ryoyama,  
Masahiko Hibi, Toshio Terashima, Yu  
Katsuyama

⑲2010年11月15日  
NEUROSCIENCE2010 (Society for  
Neuroscience) (San Diego, USA)  
Histological and behavioral analysis  
of telencephalic Dab1 deficient  
mice.  
H. Imai, A. Takano, N. Ryoyama, K.

Sakimura, K. Sugioka, T. Terashima,  
Y. Katsuyama

⑳2010年9月2日  
NEURO2010 (第33回日本神経科学会)  
(神戸)  
前脳特異的Dab1遺伝子機能欠損マウスを  
用いた組織学的・経行動学的解析  
今井 英明, 高野 愛, 獵山 直也, 崎  
村 建司, 杉岡 幸三, 寺島 俊雄、勝山  
裕

㉑2010年9月2日  
NEURO2010 (第33回日本神経科学会)  
(神戸)  
Sbnol による Notch の抑制はマウス大  
脳皮質ニューロン分化に必須である。  
高野愛、蔵地理代、今井英明、獵山直  
也、日比正彦、寺島俊雄、勝山裕

㉒2010年6月21日  
第43回日本発生生物学会 (京都)  
Sbnol promotes differentiation of  
cortical neurons in mouse brain  
development.  
Ai Takano, Toshio Terashima,  
Hideyuki Dekimoto, Masahiko Hibi, Yu  
Katsuyama.

[図書] (計1件)  
シグナル伝達キーワード事典 2012年 羊土  
社、編集:山本雅、仙波憲太郎、山梨裕司。  
勝山裕: Notch シグナリング p. 45-46.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

勝山 裕 (KATSUYAMA YU)  
東北大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 10359862

### (2) 研究分担者

寺島 俊雄 (TERASHIMA TOSHIO)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 20101892