

## 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24年 4月 2日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700334

研究課題名（和文） 神経幹細胞、神経堤細胞の発生における *Rest* の機能解析研究課題名（英文） Functional analysis of *Rest* during the development of neuronal stem cells or neural crest cells

研究代表者

青木 仁美 (AOKI HITOMI)

岐阜大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10550361

研究成果の概要（和文）：**Rest** は神経遺伝子の発現を抑制し、神経幹細胞の未分化性維持と非神経細胞の神経への分化抑制を担が、**Rest** ノックアウトマウスは胎生致死のため、**in vivo** での役割や機能は明らかでない。私は **Rest** 遺伝子改変マウスを用い、**Rest** が非神経組織では神経遺伝子の発現を抑制するが、神経発生/分化過程では **Rest** が単独で神経遺伝子を抑制するわけではなく、高度に制御された神経分化抑制機構が存在する事を解明した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we have generated *Rest* conditional knockout mice, which allow the effect of genetic ablation of *Rest* during embryonic neurogenesis to be examined *in vivo*. We show that *Rest* plays a role in suppressing the expression of neuronal genes in cultured neuronal cells *in vitro*, as well as in non-neuronal cells outside of the central nervous system, but that it is dispensable for embryonic neurogenesis *in vivo*. Our findings highlight the significance of extrinsic signals for the proper intrinsic regulation of neuronal gene expression levels in the specification of cell fate during embryonic neurogenesis *in vivo*. *Rest* is dispensable for the proper intrinsic regulations of neuronal gene expression in the specification of cell fate during neurogenesis *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			

総計	2,900,000	870,000	3,770,000
----	-----------	---------	-----------

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経科学一般

キーワード：分子・細胞神経科学、発生神経科学

### 1. 研究開始当初の背景

**Rest** は非神経組織において、神経関連遺伝子を抑制する転写調節因子として 1995 年に報告された遺伝子 (Cell 80, 949-957, 1995; Science 267, 1360-1363, 1995) で、**RE-1** と呼ばれる 21 塩基からなる DNA 配列に結合して転写を抑制する。その標的遺伝子には、神経分化に重要な遺伝子が多数含まれている。**Rest** の発現は分化した神経細胞で失われるのに対し、未分化な神経前駆細胞では発現が維持されることから、神経幹細胞の可塑性消失にも関与していることが示唆されている。しかしながら、**Rest knock out (KO)** マウスは胎生 11.5 日目までに致死性を示す (Nat Genet 20, 136-142, 1998) ため、個体レベルでの機能解析は不可能であった。これまでの **Rest** の神経分化における研究は *in vitro* での解析や野生型の個体での観察が主であり、**Rest** の *in vivo* での役割や能は不明なままである。

申請者は、これまでに共同研究により **Rest conditional KO ES** 細胞およびマウスを作製している (図 1 参照)。このマウスを用いることで、生体内において、時期特異的、部位特異的な **Rest** 遺伝子の不活性化が可能である。さらに申請者は、**Rest conditional** 強制発現 **ES** 細胞の作製にも成功しており、これを用いてマウスを作製すれば、**loss-of function**、**gain of function** 両アプローチでの機能解析が可能である。

また、**Rest** の発現は **ES** 細胞で高く、**Oct3/4-Sox2-Nanog** が調節するネットワーク

の標的である。しかしながら、**ES** 細胞の多能性維持における **Rest** の機能的役割は意見の分かれるところである (Nature 453, 223-227,

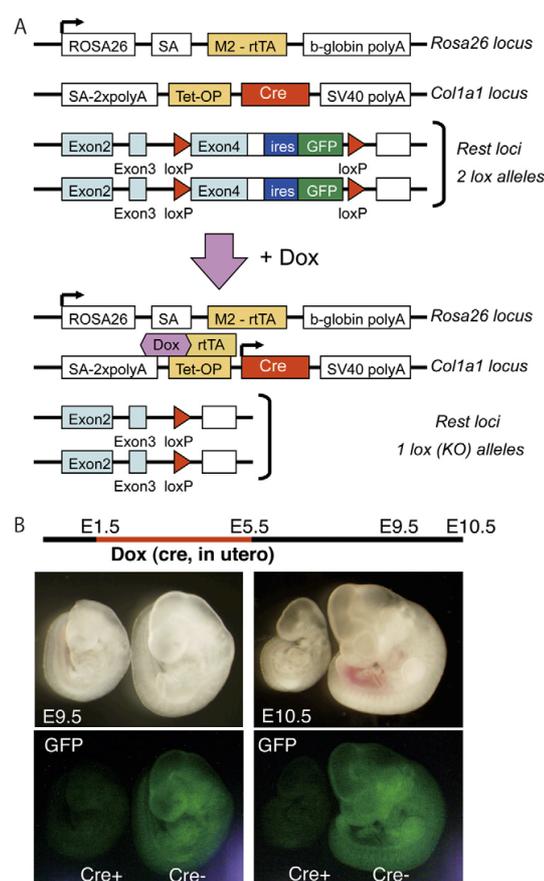


図 1. **Rest CKO** マウス。(A) ドキシサイクリンによって除去される **Rest** Exon 4 の概略図。(B) 胎齢 1.5 から 5.5 日までドキシサイクリンを投与され **Rest** を除去された、胎齢 9.5 ないしは 10.5 日マウス胚。**Rest** の発現は GFP で可視化され、**Rest** 欠損胚で成長遅延が観察される。

2008; Nature 457, E4-6, 2007)。申請者らはこれまでに、多能性 **ES** 細胞の未分化性維持と初期分化における **Rest** の役割に関して、**Rest**

遺伝子改変ES細胞を用い、**Rest**がES細胞の多能性の維持に重要でないことを証明し、さらに、**Rest** は多能性ES細胞の分化の初期段階で**Oct3/4-So**で**Oct3/4-Sox2-Nanog**が調節するネットワークを**Nanog**を介して抑制することを見いだした(Yamada, Aoki, et al., 2009, Cell Stem Cell)。

## 2. 研究の目的

神経幹細胞の分化決定機構における **Rest** の役割、および神経細胞、非神経細胞の分化決定機構における **Rest** の機能的役割を **Rest** 遺伝子改変 ES 細胞/マウスを用いて明らかにする。

## 3. 研究の方法

*in vivo* での機能解析を行うため、**Cre-LoxP** システムにより、全身性ないしは神経管あるいは神経堤細胞特異的な **Rest** 条件付き遺伝子欠損(**CKO**)マウスを利用して、**loss of function** での **Rest** の *in vivo* での機能解析を以下の3項目に関して行った。

(1) 全身性ないしは神経管あるいは神経堤細胞特異的な **Rest CKO** マウスを作製し、その形態学的解析を行う。

(2) 全身性ないしは神経管あるいは神経堤細胞特異的な **Rest CKO** マウスにおいて **Rest** 遺伝子欠損後の遺伝子発現を比較する。

(3) 全身性ないしは神経管あるいは神経堤細胞特異的な **Rest CKO** マウスから神経幹細胞及び神経堤細胞を単離し、その機能解析を *in vitro* にて行う。

## 4. 研究成果

培養下での **Rest CKO** マウス由来胎児線維芽細胞(**mEF**)や成体尾由来線維芽細胞(**TTF**)は **Rest** により神経遺伝子の発現が抑制され

ており、**Rest** 遺伝子の欠損により **Rest** 標的の神経遺伝子の亢進が見られた (図2参照)。

**Rest CKO** マウス胎児由来培養中ニューロスフェア(**NS**)でも、**mEF/TTF** 同様、**Rest** が **Rest** 標的の神経遺伝子を抑制しており、**Rest** の欠損により神経幹細胞が積極的に分化した (図3参照)。

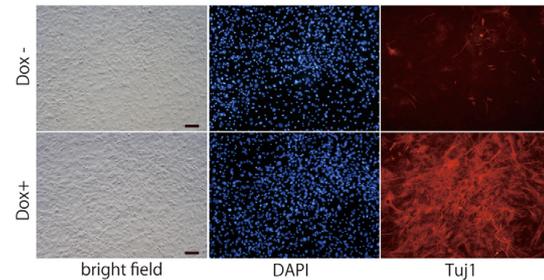


図2. MEF での **Rest** 遺伝子の除去は、**Rest** 標的の遺伝子である **Tuj1** の発現を誘導する。

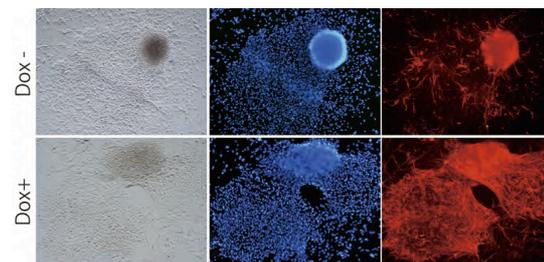


図3. NS での **Rest** 遺伝子の除去は、**Rest** 標的の遺伝子である **Tuj1** の発現を促進する。

**microarray** による網羅的遺伝子発現解析や **real-time RT-PCR** 解析において、**Rest CKO** マウス胎児及び成体由来非神経組織では、**Rest** の欠損により **Rest** 標的の神経遺伝子の亢進が見られた。一方で **Rest CKO** マウス胎児及び成体由来神経組織では、**Rest** 欠損後に **Rest** 標的の神経遺伝子の発現に変化を生じなかった (図4参照)。

また、神経特異的 **Rest CKO** マウスは正常に発生し、脳組織に形態的異常を示さず、発生過程においても異常な細胞分化を示さな

かった。さらに、生後半年ないしは一年以上たっても、神経特異的 **Rest CKO** マウスでは神経幹細胞が脳組織中に野生型マウスと同程度維持され、脳重量や脳体重比、各種神経ないしはグリア細胞の分布や数に関して、組織学的に優位な差は観察されなかった (図5参照)。

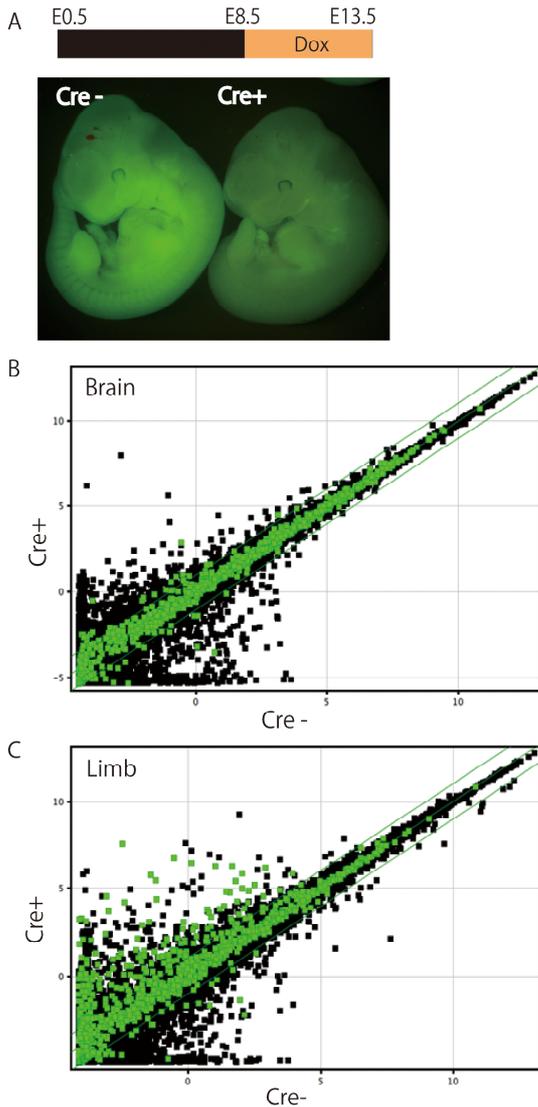


図4. マウス胚での**Rest**遺伝子の除去。(A) 胎齢8.5から13.5日までドキシサイクリンを投与され**Rest**遺伝子を除去された胎齢13.5日**Rest CKO**マウス胚(右)とcontrol胚(左)。(B, C) (A)の胎児の神経組織 (Brain;B) および非神経組織 (Limb;C) での**microarray**による網羅的遺伝子発現解析。**Rest**標的遺伝子(緑のドット)はLimbで発現が優位に増加するが、Brainでは脱抑制されず発現に差が無いことを示す。

これらのことから、神経分化抑制遺伝子 **Rest**は非神経組織で神経遺伝子の発現を抑制しているが、*in vivo*での神経発生においては、**Rest**が単独で高度に制御された神経細胞の

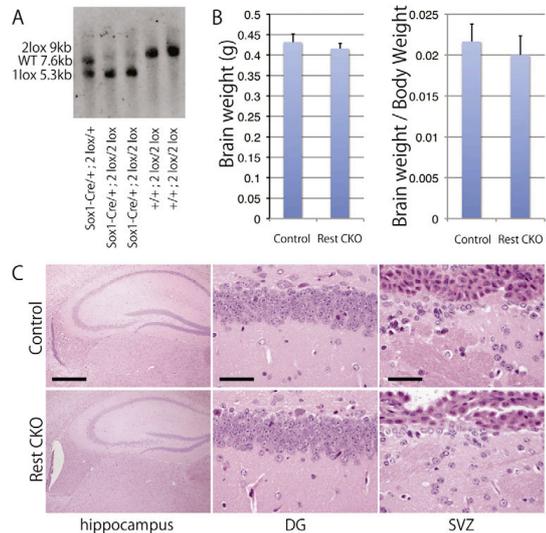


図5. 神経特異的**Rest CKO**マウスの表現型解析。(A) サザンプロット解析。神経特異的 (**Sox1-Cre**) **Rest CKO**による成体マウスの脳における遺伝的な**Rest**の除去を示す。(B) 脳重量(左)と脳体重比(右)。**Rest CKO**マウス(右)とcontrolマウス(左)の脳重量(左)と脳体重比(右)に差が無いことを示す。(C) 脳のHE染色。成体神経特異的**Rest CKO**マウス(下段)とcontrolマウス(上段)で、神経幹細胞が維持される海馬(hippocampus;左)の歯状回(DG;真ん中)と脳室下帯(SVZ;右)の脳組織に差が無いことを示す。

運命決定を障害しないことが示された。そのため、*in vivo*の神経組織においては、**Rest**の機能を代償する高度に調節された内在性の調節機構が作用していることが示唆された。

## 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1件)

Aoki H, Hara A, Era T, Kunisada T,

Yamada Y、 Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis、 Development、 2012年、 139巻、 667-677頁、 査読有り。

〔学会発表〕 (計1件)

青木仁美、 Rest is dispensable for the proper intrinsic regulations of neuronal gene expression in the specification of

cell fate during neurogenesis in vivo、 第44回日本発生生物学会年会、 2011年5月18日、 沖縄

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

青木仁美 (AOKI HITOMI)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10550361