

研究種目：若手研究 (S)

研究期間：2007～2011

課題番号：19670002

研究課題名(和文) 神経幹細胞アイデンティティの時空間制御による神経細胞多様化の分子戦略

研究課題名(英文) Strategy for producing a variety types of neurons by regulating spatial and temporal identities of neural stem cells

研究代表者 星野 幹雄 (Hoshino, Mikio)

国立精神・神経センター 神経研究所 診断研究部 部長

研究者番号：70301273

研究代表者の専門分野：

科研費の分科・細目：神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：神経発生・分化・異常

### 1. 研究計画の概要

多様な神経細胞を生み出す神経幹細胞には神経管での「場所(空間)」と「発生時期(時間)」によって規定される固有の形質があるが、その分子実体は未解明の部分が多い。本研究では、小脳をモデル系として、神経幹細胞の固有の形質、すなわち「神経幹細胞アイデンティティ」が発生途上の個体内でいかにして「時間的・空間的」に制御されているのかを、現象論からその分子機構まで明らかにし、神経細胞の多様性獲得の分子機構を個体レベルで理解する。

### 2. 研究の進捗状況

以下の研究方法で、神経幹細胞の空間および時間アイデンティティを支配する分子の同定とその機能解析を行い、上記研究計画の達成を目指してきた。

(1) Ptf1a および Math1 を異所性に発現させるために、それぞれの遺伝子座に相互の cDNA をノックインしたマウスを作成した。また、子宮内エレクトロポレーション法によって、それぞれの cDNA を異所性に小脳原基のサブドメインへと遺伝子導入し、そこからどのような種類の神経細胞が生み出されるのか調べた。その結果、Ptf1a および Math1 が神経幹細胞の空間アイデンティティを規定するのに必要かつ十分な分子であることを明らかにした。また、それが小脳原基のみならず、中央部後脳(蝸牛神経核)および尾側後脳(前小脳システム)でも成立する普遍性を持つことを示した。

(2) 小脳発生の各ステージから神経幹細胞を取り出して、様々な発生段階の小脳原基へ

と移植し、それぞれの神経幹細胞がどのような神経細胞種へと分化しうるのか、その細胞自律性と非自立性について調べた。その結果、神経幹細胞の分化しうる神経細胞の種類は、発生段階が進むと狭くなっていくこと(lineage restriction)を明らかにした。

(3) 時間アイデンティティ形成分子の探索のため、FACS ソーティングを用いて、各ステージの神経幹細胞を分離し、cDNA マイクロアレイによって、発生時期に特異的に発現する転写因子、エピゲノム関連分子をスクリーニングした。また、アフィニティクロマトグラフィー-LC-Ms/Ms によって、Ptf1a および Atoh1 との相互作用分子を同定した。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。」

小脳原基の神経幹細胞アイデンティティのうち、空間アイデンティティを規定する分子については、同定することができた。時間アイデンティティに関わる分子についてのスクリーニングも順調に推移しており、本研究はおおむね順調に進展していると言える。

### 4. 今後の研究の推進方策

(1) Ptf1a cDNA を Math1 ローカスへ入れたノックインマウスの解析。

ようやく、このマウスができてきたので、これを逆方向のノックインマウスと同様に解析する。これによって、神経幹細胞の空間アイデンティティ形成における Ptf1a の役割を確定させる。

(2) 小脳原基神経幹細胞の Lineage restriction の研究。

神経発生初期と後期の神経幹細胞には

lineage restriction による性質の違いが認められたが、この違いがどのようにしてもたらされるのかについて、細胞移植実験によって調べて行く。

(3) 神経幹細胞の時間アイデンティティを規定する分子の同定と機能解析。

小脳原基の各発生時期における神経幹細胞を、Ptf1a-YFPノックインマウスを用いる事で、セルソーターによって分離してきて、cDNAマイクロアレイによって、神経発生前期と後期の神経幹細胞で異なる発現をする遺伝子群(特に転写因子とエピゲノム関連因子)を抽出してきた。今後は、in situハイブリダイゼーションや抗体染色によって、発現を解析し、さらに候補を狭める。そして、それぞれの候補分子に対しては、子宮内エレクトロポレーション法を用いた強制発現、ノックダウン法を小脳原基の神経幹細胞に対して行い、その時間アイデンティティの決定に対する影響を調べる。

また、我々はPtf1aやMath1が、それぞれ異なる時間アイデンティティを持つ神経幹細胞の中で、異なる分子と相互作用しながら、異なる下流の遺伝子の発現を調節しているのではないかと考えている。そこで、Ptf1aおよびMath1と相互作用する分子群を昨年度までに、アフィニティークロマトグラフィーによって多数同定して来た。今後は、それぞれの分子(遺伝子)の小脳原基での発現様式を調べて、さらに候補を絞り込んでいく。我々は、Ptf1aおよびMath1の下流で転写調節される遺伝子群もいくつか同定しているので、それらの転写調節エレメントの活性に対する、得られた候補分子を発現させた時の影響について調べる。また、子宮内エレクトロポレーション法を用いた強制発現、ノックダウン法を小脳原基の神経幹細胞に対して行い、その時間アイデンティティの決定に対する影響を調べる。

#### 5. 代表的な研究成果

(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 16 件)

1. Nishimura YV, Sekine K, Chihama K, Nakajima K, \*Hoshino M, Nabeshima Y, \*Kawauchi T: Dissecting the factors involved in the locomotion mode of neuronal migration in the developing cerebral cortex. **J. Biol. Chem.** 285, 5878-5887, 2010 (**\*Correspondence**)
2. Nishida K, Hoshino M, Kawaguchi Y, Murakami F: Ptf1a directly controls expression of immunoglobulin superfamily molecules Neph3 and Neph3 in the developing central nervous system. **J. Biol.**

**Chem.** 285, 373-380, 2010

3. Fujiyama T, Yamada M, Terao M, Terashima T, Hioki H, Inoue YU, Inoue T, Masuyama N, Obata K, Yanagawa Y, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, \*Hoshino M: Inhibitory and excitatory subtypes of cochlear nucleus neurons are defined by distinct bHLH transcription factors, Ptf1a and Atoh1. **Development** 136, 2049-2058, 2009
4. Yamada M, Terao M, Terashima T, Fujiyama T, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, \*Hoshino M: Origin of climbing fiber neurons and their developmental dependence on Ptf1a. **J. Neurosci.** 27, 10924-10934, 2007
5. Takemoto-Kimura S, Ishihara-Ageta N, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Mano T, Okamura M, Fujii H, Fuse T, Hoshino M, Suzuki S, Kojima M, Mishina M, Okuno H, Bito H: Regulation of dendritogenesis via a lipid raft-associated Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase CLICK-III/CaMKI $\gamma$ . **Neuron** 54, 755-770, 2007
6. Shima Y, Kawaguchi SY, Kosaka K, Nakayama M, Hoshino M, Nabeshima Y, Hirano T, Uemura T: Opposing roles in neurite growth control by two 7-pass transmembrane cadherins. **Nature Neuroscience** 10, 963-969, 2007

[学会発表] (計 24 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

ホームページ

[http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r\\_diag/index.html](http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_diag/index.html)