

平成23年05月18日現在

機関番号： 82401

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2009～2010

課題番号： 21770248

研究課題名（和文）

microRNAを介した遺伝子発生制御機構と大脳新皮質形成

研究課題名（英文） MicroRNA-9 Regulates Neurogenesis in Mouse Telencephalon

by Targeting Multiple Transcription Factors

研究代表者

柴田 幹士 (SHIBATA MIKIHITO)

独立行政法人理化学研究所・ボディプラン研究グループ・研究員

研究成果の概要（和文）：

本研究では、*microRNA-9-2*と*microRNA-9-3*の2重変異体マウスを作成し、これを用いて*microRNA-9* (*miR-9*)の端脳の神経発生における役割を解析した。その結果、端脳において*miR-9*は、様々な転写因子の発現を制御することによって神経前駆細胞の増殖と分化をコントロールしていることが明らかとなった。また、発生の進行とともに*miR-9*の活性は調節を受けるが、それはAU-rich RNA結合タンパク質によることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

microRNA-9-2 and *microRNA-9-3* double-mutant mice demonstrate that *microRNA-9* (*miR-9*) controls neural progenitor proliferation and differentiation in the developing telencephalon by regulating the expression of multiple transcription factors. Also we found that the activity of *miR-9* is finely modulated by AU-rich RNA-binding proteins and Msi1 during development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：マウス／発生／端脳／大脳新皮質／microRNA-9

1. 研究開始当初の背景

microRNA は、タンパク質をコードしない内在性の small non-coding RNA であり、多くは 19~23 ヌクレオチドの大きさである。現在までにマウスではおよそ 400 種類以上が単離され、その多くが組織特異的に発現していることが知られている (Lagos-Quantana et al., 2002; Kloosterman et al., 2006)。近年、発生や疾患における細胞増殖、分化、代謝等の様々な局面で、microRNA が遺伝子発現調節に重要な機能を果たしている事が明らかにされつつある (reviewed by Krutzfeldt et al., 2006; Slack et al., 2008)。一方研究代表者は、マウス端脳に特異的に発現する遺伝子の一つとして、*microRNA-9* (*miR-9*) を単離した。成熟型 *miR-9* の配列はショウジョウバエからヒトまで完全一致しており、進化的に高度に保存されていた。端脳における発現も、少なくとも硬骨魚類以降の脊椎動物に保存されていた。端脳から発生した大脳新皮質はほ乳類で顕著に発達し、外界からの情報処理の中心を担っているが、その形成過程における microRNA の機能と遺伝子発現制御のカスケードを解析することは、大脳新皮質の新たな形成メカニズムを明らかにするのみならず、進化の過程における大脳新皮質獲得メカニズムを明らかにするうえでも、大きな意義があるものと考えられる。これまでに、ほ乳類の発生における microRNA の *in vivo* の機能についてはいくつかの報告がなされている。例えば *Dicer* は RNaseIII タイプのエンドヌクレアーゼであり、microRNA の先駆体から成熟型を産生する過程で必須の因子の一つであるが、*Dicer-1* のノックアウトマウスでは、ES 細胞の増殖の減少が見られ、体軸形成期 (embryonic day 7.5) 以前に致死となっ

たことから microRNA が発生初期から重要な役割を果たしている事が示唆された (Kanellopoulou et al., 2005)。さらに *microRNA-1-2* のノックアウトマウスでは、心臓の形態形成、電気伝達、心筋細胞の増殖等に異常がみられ、心臓発生に必須の因子であることが示された (Zhao et al., 2007)。このような個々の microRNA の作用機序としては、標的となる遺伝子の mRNA の 3'非翻訳領域 (3'UTR) の特定配列に相補的に結合し、その mRNA の安定性や翻訳レベルを主に負に制御していることが知られている (reviewed by Cao et al., 2006)。このように発生における microRNA の重要な機能が示唆されつつありながら、ほ乳類の脳の発生における個々の microRNA の機能については未だに研究が進んでいない。この点を克服するため、研究代表者は *miR-9* のノックアウトマウスを作成した。*miR-9* の前駆体には 3 つのファミリーメンバーである *microRNA-9-1/2/3* があることが知られているが、現在までに発現量が多い *microRNA-9-2* と *microRNA-9-3* のノックアウトマウスを作成しその機能と標的遺伝子を解析した。

2. 研究の目的

本研究は、マウス胚発生において端脳および大脳新皮質に特異的に発現する *miR-9* の前駆体である *microRNA-9-2* と *microRNA-9-3* のノックアウトマウスの解析、およびそれら microRNA 標的遺伝子の包括的探索により、大脳新皮質形成の新たなメカニズムを解明することを目標とする。

3. 研究の方法

研究代表者のこれまでの研究において、*miR-9* がマウス胚の初期神経分化に必須であることが示唆されていた。そこで本研究では脳の発生の全ての段階における *miR-9* の役割を明らか

にするために *miR-9* の変異体マウスを作成した。*miR-9* にはそれぞれ異なる染色体上にコードされた 3 つのメンバーがあるが、成熟型は同一の配列を持つ。発生段階では *miR-9-2* と *miR-9-3* の発現が最も高かったため、この 2 つの前駆体を欠失した二重変異体マウスを作成した。このような二重変異マウスでは主に 1) Cajal-Retzius 細胞を含む初期の神経分化の減少。2) 外套部における神経前駆体細胞の分裂の一過的な亢進。3) SVZ における神経前駆体細胞の分裂の減少。4) 新皮質レイヤーII-V の欠失。5) 皮質腹側領域 (ventral pallium) の欠失とそれに伴う側方神経節隆起 (lateral ganglionic eminence) の背側へのシフト。6) 外套下部における神経前駆体細胞の分裂の亢進。といった表現型が見られたが、これらに関わる標的遺伝子の同定のため、マウスの転写物を載せた Affymetrix 社の Mouse Genome Array をもちいて各発生段階に皮質に発現する転写物の量を野生型と変異型で比較し、変異型で増加した転写物を同定する。3'UTR の配列からの予測と組み合わせて複数の候補遺伝子を同定し、それらのタンパク質が変異体で増加していることを確認した。それらには Gsh2, Islet1, Meis2, Foxg1 等の転写因子が含まれていた。

4. 研究成果

microRNA は、さまざまな生物の器官発生に関わる様々な遺伝子を標的とし、その転写後の発現量を主に負に調節していることが知られている。microRNA の標的遺伝子の同定は、microRNA それ自体の機能のみならず、器官発生そのもののメカニズムを知る上でも重要である。脊椎動物において *miR-9* は端脳に強く発現するが、*miR-9-2/3* の二重変異マウス端脳を解析した結果、*miR-9* は、神経前駆細胞の増殖を制御する転写因子である Foxg1, Nr2e1, Gsh2 等の発現を調節することがわかった。神経分化初期 (E12.5) の

miR-9-2/3 の二重変異マウス端脳皮質領域においては、Foxg1 タンパク質の発現が上昇しており、radial glia の増殖が亢進していた。一方で最も初期に分化する神経細胞である Cajal-Retzius 細胞と、他の early-born neuron が減少していた。しかしながら E15.5 といった後期においては、Foxg1 タンパク質の発現の上昇は認められなかった。これは Foxg1 mRNA の 3'UTR に対する *miR-9* の活性が何らかの調節を受けている事を示唆する結果であった。我々は RNA 結合タンパク質である Elav2 の発現が E15.5 から上昇し、さらに、Elav2 が Foxg1 mRNA の 3'UTR に結合することで、*miR-9* の活性を阻害することが分かった。しかしさらに発生が進むと、逆に神経前駆細胞の増殖は減少することが分かった。これは Nr2e1 タンパク質の発現の減少を伴っていたが、意外な事に *miR-9* は RNA 結合タンパク質である Elavl1 や Msi1 と協調的に Nr2e1 mRNA の 3'UTR に作用して翻訳を正に制御することが分かった。*miR-9-2/3* の二重変異マウス端脳の外套下部においては Foxg1 や Gsh2 といったタンパク質の発現が E15.5 においても増加しており、神経前駆細胞の増殖の亢進は維持されていた。これは Elavl2 が外套下部では発現していないためと考えられた。以上の結果から、大脳の発生において、*miR-9* は、RNA 結合タンパク質とともに神経前駆細胞の増殖を制御する遺伝子群の発現を微調整していることが明らかになった。

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)

MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription Factors

Mikihito Shibata, Hiromi Nakao, Hiroshi Kiyonari, Takaya Abe, and Shinichi Aizawa

The Journal of Neuroscience, March 2, 2011, 31(9):

3407-3422. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

1) *MicroRNA-9* regulates neural progenitor proliferation and differentiation in both pallium and subpallium by targeting *Foxg1*, *Nr2e1*, *Gsh2* and *Meis2*

Mikihito Shibata, Hiromi Nakao, Hiroshi Kiyonari, Takaya Abe, and Shinichi Aizawa

69th Annual Meeting of Society for Developmental Biology. 7 August. 2010 Albuquerque, New Mexico, USA

2) *microRNA-9* is regulates neural progenitor proliferation and differentiation in both pallium and subpallium by targeting *Foxg1*, *Nr2e1*, *Gsh2*, *Meis2*, and *Islet1*

Mikihito Shibata, Hiromi Nakao, Hiroshi Kiyonari, Takaya Abe, and Shinichi Aizawa

2nd Joint Meeting of the French and Japanese Society for Developmental Biology. 27 May, 2010. Institute Pasteur, Paris France

3) *microRNA-9* is required for neurogenesis and axon pathfinding in mouse telencephalon through the regulation of *Foxg1*, *Nr2e1*, *Gsh2*, *Meis2*, and *Islet1*

Mikihito Shibata, Hiromi Nakao, Hiroshi Kiyonari, Takaya Abe, and Shinichi Aizawa

19th CDB Meeting RNA Science in Cell and Developmental Biology. 11 May, 2010. Kobe, Japan.

4) *microRNA-9* is essential for the neurogenesis and morphogenesis in the mouse neocortex development

Mikihito Shibata, Hiromi Nakao, Hiroshi Kiyonari, Takaya Abe, and Shinichi Aizawa

Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. 15 Jan, 2010. Keystone, Colorado, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 幹士 (SHIBATA MIKIHITO)

独立行政法人理化学研究所・ボディプラン研究グループ・研究員

50391975

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者