

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790183

研究課題名(和文) 神経幹細胞から特異的ニューロン・グリア細胞を産み出す分子メカニズムの解析と応用

研究課題名(英文) Analysis on molecular mechanisms of cell differentiation from neural stem cells to specific neurons and glia

研究代表者

竹林 浩秀 (TAKEBAYASHI HIROHIDE)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：60353439

研究成果の概要(和文)：Olig2は、運動ニューロンおよびオリゴデンドロサイト発生に必須の basic helix-loop-helix (bHLH) 転写因子である。神経幹細胞から特異的ニューロン・グリア細胞を産み出す際の Olig 転写因子コンプレックスを同定するために、Olig2 転写因子に結合する因子をスクリーニングし、Olig Binding Protein1 (OBP1)、Olig Binding Protein2 (OBP2) と名前の付けた2つの因子を同定した。さらに Olig2 がリン酸化を受ける転写因子であること、リン酸化部位の同定を見いだした。Olig 転写因子の転写制御機構の一端が明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Olig2 is basic helix-loop-helix transcription factor essential for motoneuron and oligodendrocyte development. In order to investigate Olig transcription complex, which regulates differentiation from neural stem cell to specific subtype of neuron and glial cells, we screened Olig2-binding factors. We identified two factors, which are named Olig Binding Protein1 (OBP1), Olig Binding Protein2 (OBP2). Furthermore, we identified Olig2 as a phospho-protein and its phosphorylation sites. We revealed transcriptional regulation of Olig2 transcription factor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：細胞分化・組織形成

## 1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞は胎児期神経管の脳室近くの脳室帯で自己複製し、特定の場所から特定のニューロン、続いて、グリア細胞を産み出す。Olig2は、脊髄では腹側の限局した領域(pMNドメイン)に発現し、運動ニューロンとオリゴデンドロサイトの発生に関わる basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子である(図1)。神経幹細胞から運動ニューロン、オリゴデンドロサイトが産み出される際に、Olig2がどのような転写コンプレックスを形成して転写を調節するのかという点についてはほとんどわかっていない。

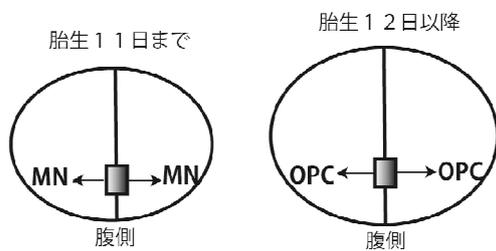


図1 胎児期腹側の Olig2 陽性 pMN ドメインより運動ニューロン(MN), 続いてオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)が産み出される。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず Olig2 に結合する因子を同定し、Olig2 転写因子の転写コンプレックスを明らかにする。そして、Olig 転写因子と Olig 結合因子の相互作用が、特定のニューロン、グリア細胞を産み出す際にどのような役割を担っているか明らかにする。また、本研究で得られた分子レベルの知見を運動ニューロン病、脱髄疾患などの神経難病の病態理解、治療法確立に応用することを目指す。

## 3. 研究の方法

まず Olig2 の結合因子を同定するために、酵母2ハイブリッドシステムによるスクリーニングを行った。さらにタンパクレベルでのスクリーニングとして、GST プルダウンアッセイとマスマスペクトロメトリーを組み合わせたプロテオミクス解析を行った。(プロテオミクス解析は名古屋大学 貝淵弘三教授のグループのご支援を受けた。)そして、多数の Olig 結合因子の候補を同定し、そのデ

ータベースの作成を行った。次に、タグ付きの Olig2 および結合因子を培養細胞に発現させ、免疫沈降法を用いた生化学的解析により Olig 転写因子との結合を実際に確かめた。

続いて、ニワトリ胚、マウス胚を用いたエレクトロポレーション法による遺伝子導入実験により、これらの Olig 結合因子の神経幹細胞からの分化制御における役割の解析を進めている。

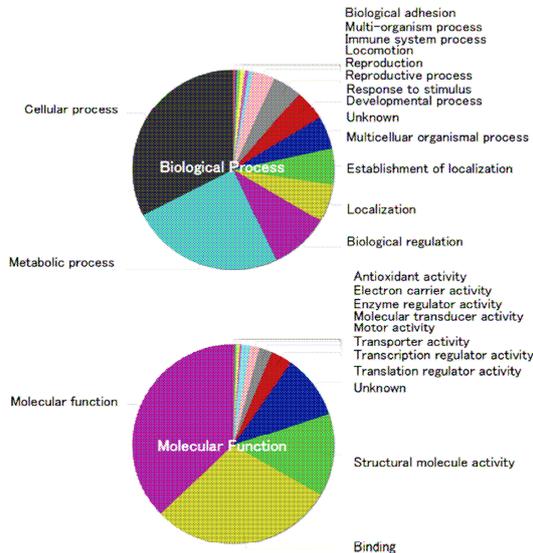
## 4. 研究成果

酵母2ハイブリッドスクリーニングにより、Olig Binding Protein 1 (OBP1) および、Olig Binding Protein 2 (OBP2) を同定した。免疫沈降法により、Olig2 との結合を確認した。OBP1, OBP2 の強制発現実験、および、Olig2 と OBP1 または、Olig2 と OBP2 の強制発現実験により、運動ニューロン分化、そして、オリゴデンドロサイト分化への影響を調べている。OBP2 に関しては、ノックアウトマウスを作製し、ヘテロマウスは正常であるが、ホモマウスで下肢の麻痺を含む神経症状がであることを確認した。現在これらの神経症状の原因となる病変についての組織学的な解析を進めている。

Olig2 がリン酸化タンパクであることを培養細胞における発現実験で明らかにし、リン酸化部位の変異体を作成する事により、リン酸化部位の同定を行った。さらに、プロテオミクス解析の結果(図2)から、Olig2 に結合するリン酸化酵素候補を同定し、Olig2 との結合を免疫沈降法にて確かめた。このリン酸化酵素による Olig2 のリン酸化が神経幹細胞から運動ニューロン・オリゴデンドロサイトの分化の過程にどのように関わっているのかについて調べるために、阻害剤を用いた実験を行っている。また、リン酸化部位に変異を導入して、リン酸化が起こらなくなった変異体、そして、リン酸化を模倣した変異体を作製し、これらをニワトリ胚で遺伝子導入することにより、運動ニューロン・オリゴデンドロサイトへの分化への影響を調べている。これまでにオリゴデンドロサイトへの分化が促進されるという現象を観察しており、さらに詳細に解析している。

将来的には、本研究により同定された Olig 結合因子、および、Olig2 をリン酸化する酵素

を人為的に操作することにより、神経幹細胞から特定のニューロン、グリア細胞の分化を誘導する道を拓く事、そして、運動ニューロン病や脱髄疾患などの神経難病の新たな治療法開発につなげることが期待される。



### Cyto Olig2 P2 Olig2

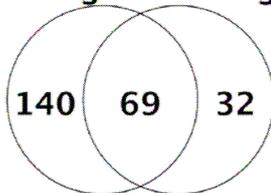


図2 プロテオミクス解析による Olig1、Olig2 結合因子の網羅的解析  
 プロテオミクス解析によって同定した、Olig1 結合候補因子(A)、Olig2 結合候補因子(B)を、分子の機能別に分類した。細胞質画分 (Cyto) と、粗精製膜画分 (P2画分) についてのデータを示した。

#### 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4件)

1. Kim WR, Chun SK, Kim TW, Kim H, Ono K, Takebayashi H, Ikenaka K, Oppenheim RW and Sun W. Evidence for the spontaneous production but massive programmed cell death of new neurons in the subcallosal

zone of the adult mouse brain. Eur J Neurosci 査読有 2011, 33: 599-611.

2. Goto H, Ono K, Takebayashi H, Harada H, Nakamura H and Ikenaka K.

Genetically-defined lineage tracing of Nkx2.2-expressing cells in chick spinal cord. Dev Biol 査読有 2011, 349: 504-511.

3. Barnabé-Heider F, Görnitz C, Sabelström H, Takebayashi H, Pfrieger FW, Meletis K and Frisén J. Origin of new glial cells in the intact and injured adult spinal cord. Cell Stem Cells 査読有 2010, 7: 470-482.

4. Ono K, Takebayashi H and Ikenaka K. Olig2 transcription factor in the developing and injured forebrain: cell lineage and glial development. Mol. Cells 査読無 2009 27: 397-401.

[学会発表] (計4件)

1. Takebayashi H, Usui N, Watanabe K, Ono K, Tamamaki N, Ikenaka K. Novel phenotype of Olig2 knockout mice: possible involvement of motoneuron-derived factor in sensory neuron development.

The 29th NAITO Conference on Glia World - Dynamic Function of Glial Cells in the Brain. Shonan Village, Hayama, Kanagawa 2010. 10. 5-8.

2. 竹林浩秀 感覚神経発生における運動ニューロン由来因子の役割 第115回 解剖学会 岩手県民会館 岩手 2010年3月28-30日

3. Takebayashi H, Bepari AK, Usui N, Ikenaka K, Tamamaki N. Analysis on brain left-right asymmetry.

Fourth Neural Development Seminar, Okazaki Conference Center, Okazaki, Aichi 2010. 03. 19-20.

4. Takebayashi H.

Roles of motoneuron-derived NT-3 on sensory neuron development. 9th Biennial Satellite Meeting of the ISN on Myelin Biology, TEMF Hotel, Gyeongju, South Korea 2009. 8. 19-23.

[その他] (計1件)

日本神経化学会 若手育成セミナー 講師  
神戸、兵庫 2010年8月31日～9月1日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹林 浩秀 (TAKEBAYASHI HIROHIDE)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号：60353439