

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 24日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500318

研究課題名（和文） 大脳皮質形成における興奮性ニューロンの分化および生存機構の解明

研究課題名（英文） Functional analysis for differentiation and survival mechanism of excitatory neurons during the formation of cerebral cortex.

研究代表者

岡戸 晴生（OKADO HARUO）

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・副参事研究員

研究者番号：60221842

研究成果の概要（和文）：RP58はId1-4の転写抑制を介して、神経前駆細胞からの細胞周期離脱を促進し、ニューロンの分化を促進していることを見いだした。さらにニューロン移動をNgn2の転写抑制を介して、細胞周期離脱とは独立して制御していることが明らかとなった。このことは、RP58はそれぞれ異なる下流遺伝子の転写を抑制することで、それまでの履歴には無関係に複数の機能を果たしていることを意味しており、発生期大脳皮質における多機能転写抑制因子といえる。

研究成果の概要（英文）：We found that RP58 enhanced the cell-cycle exit resulting in neurogenesis via transcriptional repression of Id1-4 genes. In addition, we found that RP58 controls neuronal migration via transcriptional repression of Ngn2 gene independent on the cell cycle exit. This shows that RP58 is multifunctional regulator that suppresses the different downstream genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,320,000	4,920,000

研究分野：神経解剖学・神経病理学

科研費の分科・細目：神経解剖学・神経病理学

キーワード：RP58、大脳皮質、転写抑制

1. 研究開始当初の背景

転写抑制因子 RP58 は胎生期大脳皮質にとくに強く発現し、KO マウスの解析から、新皮質、

海馬形成、視床-皮質経路形成に必須の因子であった。より詳細に解析したところ、興奮性グルタミン酸作動性ニューロンの前駆細胞

胞の成熟、分化、移動、生存に関与していた (Okado et al., 2009)。RP58 の制御する遺伝子群を含めた分子レベルの解析をおこない、とくに神経細胞の分化、生存に重要な分子メカニズムを明らかにすることが重要と考えられる。加齢脳前頭葉、アルツハイマーモデルマウスにおいて RP58 の著明に発現が減少しており、本研究は、医療分野での発展の可能性を秘めている。

RP58 は Zinc フィンガーモチーフと POZ ドメインを持つ転写抑制因子で、POK ファミリーに属する。POK ファミリーは、発生に重要な役割を示すものが多い。

2. 研究の目的

RP58 がニューロンの分化・生存にかかわる分子メカニズムを明らかにする。その過程で、とくに大脳皮質における興奮性ニューロンの分化・生存の基本的メカニズムに焦点をあてる。具体的には、RP58 が転写を抑制する下流の遺伝子を同定し、神経細胞分化、生存過程における新たな核内転写制御カスケードを明らかにする。

3. 研究の方法

RP58 の欠損マウスで異常をきたす、神経細胞分化、ニューロンの放射状移動に関して、RP58 の欠損マウスと野生型のマウスで遺伝子発現の違いを明らかにし、異常に転写産物の増加しているものを、RP58 の下流遺伝子の候補とする。その際子宮内エレクトロレーション法と RP58^{Fllox} マウスを組み合わせる。転写活性はルシフェラーゼをリポータとして、定量した。

4. 研究成果

(1) RP58 欠損マウスの大脳皮質では著明な神経前駆細胞の増加がある。RP58 が転写抑制

因子であることから、RP58 欠損皮質で増加するものをマイクロアレイ解析により網羅的に検索し、いくつかの候補遺伝子を同定し、ルシフェラーゼを用いたレポータアッセイ、chip アッセイから、RP58 は直接 Id1-4 (分化抑制因子) の転写を抑制することを明らかにした。さらに、Id を子宮内電気穿孔法により前駆細胞に導入すると、著明な前駆細胞の増加がみられた。さらに、RP58 欠損マウスに Id1-4 の shRNA を発現させると、前駆細胞の増加が抑制された。以上のことから、「神経分化促進因子 Ngn2 が RP58 の転写を促進し、それが Id1-4 の転写を抑制することにより、神経細胞分化抑制が解除され、神経細胞の分化が促進する」という新たな分子カスケードが明らかとなった。

(2) 神経細胞の分化以降では、RP58 欠損マウスにおいて放射状移動の障害が見出されている。子宮内電気穿孔法により RP58 を導入することにより放射状移動は回復する。同時に導入した GFP により、細胞の形態を詳細に観察したところ、RP58 欠損体では多極性細胞移動が著明に障害されているが、RP58 の導入により、多極性細胞移動が回復した。従って、RP58 は多極性細胞移動過程を介して、放射状移動を司っていることが示唆された。逆に、RP58^{Fllox} マウスを作製し、Cre 発現プラスミドを子宮内電気穿孔法により導入すると、皮質層への侵入が阻害されることを見出した。本研究により、RP58 が神経細胞の分化、その後の放射状移動を制御していることが明らかとなった。さらに、そのメカニズムの一つに、RP58 が Ngn2 の転写抑制が重要である事を明らかにした。

(3) RP58 の転写調節機能を明らかにするために、RP58 のゲノム領域を単離し、転写活性を解析した。その結果、上流 5.3kbp は、内在性の RP58 の発現をほぼ再現することが明

らかとなった。

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 5件)

① Ohtaka-Maruyama C, Hirai S, Miwa A, Heng J l, Shitara H, Ishii R, Taya C, Kawano H, Kasai M, Nakajima K, Okado H, RP58 Regulates the Multipolar-Bipolar Transition of Newborn Neurons in the Developing Cerebral Cortex. Cell Rep. 査読有 2013, 21, 458-71, doi: 10.1016/j.celrep.2013.01.012.

② Hirai S, Miwa A, Ohtaka-Maruyama C, Kasai M, Okabe S, Hata Y, Okado H. (2012) RP58 controls neuron and astrocyte differentiation by downregulating the expression of Id1-4 genes in the developing cortex. EMBO J査読有 2011, 31:1190-202. doi: 10.1038/emboj.2011.486.

③ Ohtaka-Maruyama C, Hirai S, Miwa A, Takahashi A, Okado H (2012) The 5'-flanking region of the RP58 coding sequence shows prominent promoter activity in multipolar cells in the subventricular zone during corticogenesis. Neuroscience 査読有2011, 67-84. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.006.

④ Mizutani R, Nakamura K, Yokoyama S, Sanbe A, Kusakawa S, Miyamoto Y, Torii T, Asahara H, Okado H, Yamauchi J, Tanoue A. Developmental expression of sorting nexin 3 in the mouse central nervous system. Gene Expr Patterns. 査読有 2011, 11, 33-40. doi: 10.1016/j.gep.2010.08.007.

⑤ Takahashi N, Hatakeyama H, Okado H, Noguchi J, Ohno M, Kasai H. SNARE conformational changes that prepare

vesicles for exocytosis. Cell Metab. 査読有 2010 12, 19-29. doi: 10.1016/j.cmet.2010.05.013.

[学会発表] (計 8件)

① Shinobu Hirai, Koji Hotta, Atsuo Nishino, Akiko Miwa, Hiroki Takahashi, Kotaro Oka, Shigeo Okabe, Yoshihiro Kubo, Yasushi Okamura, Haruo Okado,

“Exploring the new function of AMPAR in the developing stage using protochordate.” 第35回日本分子生物学会年会 福岡 (2012, 12, 13)

② 丸山千秋、三輪昭子、設楽浩志、石井里絵、多屋長治、葛西正孝、岡戸晴生 Zinc フィンガー転写抑制因子RP58は発生期大脳皮質において新生ニューロンの極性決定に必須の役割を果たす 第35回日本分子生物学会大会、福岡 (2012, 12, 12)

③ 丸山千秋、平井志伸、三輪昭子、設楽浩志、石井里絵、多屋長治、葛西正孝、岡戸晴生 RP58欠損による神経細胞移動障害のスライス培養を用いたライブセルイメージング、第35回日本神経科学学会大会、名古屋、(2012.9.21)

④ 丸山千秋、平井志伸、三輪昭子、設楽浩志、石井里絵、多屋長治、葛西正孝、岡戸晴生 転写抑制因子 RP58 欠損による神経細胞移動障害のスライス培養を用いたライブセルイメージング 第34回日本分子生物学会年会 横浜 (2011, 12, 13)

⑤ 平井志伸、三輪昭子、丸山千秋、葛西正孝、岡部繁男、畑裕、岡戸晴生 RP58 controls the ratio of neuron to astrocytes by down-regulating all Id-family genes expression in the developing cortex 第34回日本神経科学大会 横浜 (2011, 9, 15)

⑥丸山千秋、三輪昭子、平井志伸、高橋亜紀代、葛西正孝、岡戸晴生，転写抑制因子 RP58 の大脳皮質発生過程における神経細胞移動における機能解析，第 33 回日本分子生物学会、第 83 回日本生化学学会大会，神戸ポートアイランド（2010, 12, 7）

⑦丸山千秋、三輪昭子、平井志伸、高橋亜紀代、岡戸晴生，神経前駆細胞における RP58 遺伝子プロモータ活性の発光ライブイメージングを用いた視覚化，第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学学会大会、第 20 回日本神経回路学会大会，神戸ポートアイランド（2010, 9, 2）

⑧高橋亜紀代、平井志伸、丸山千秋、三輪昭子、岡戸晴生，小脳発生期における simiRP58 の発現は RP58 の発現に先行する，第 33 回日本神経科学大会、第 53 回日本神経化学学会大会、第 20 回日本神経回路学会大会，神戸コンベンションセンター，（2010, 9, 2）

〔図書〕（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡戸 晴生 (OKADO HARUO)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・副参事研究員

研究者番号：60221842

(2) 研究分担者

丸山 千秋 (MARUYAMA CHIAK)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・主席研究員

研究者番号：00281626

(3) 連携研究者

なし

