

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440112

研究課題名(和文) 神経幹細胞の増殖とニューロン分化を協調させる新規分子機構

研究課題名(英文) Novel molecular mechanism collaborating stem neural stem cell maintenance and differentiation

研究代表者

勝山 裕 (Katsuyama, Yu)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：10359862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Sbno1の機能を明らかにするために、本研究ではSbno1タンパク質の異なる部位を認識する抗体を作成した。これら抗体はウェスタンブロットで、それぞれ異なったバンドパターンを検出した。つまり、Sbno1はタンパク質が合成されたのちに、特異的な切断制御を受け、断片化していることを示唆している。Sbno1/Sbno1結合因子には、それぞれ細胞増殖(細胞周期制御因子)、アポトーシス(脱ユビキチン化酵素)、細胞分化(転写因子)に關与する複数の因子が同定された。これらの研究結果からSbno1は多様な分子機構に与することで、これら分子機構を統合する役割をもつのではないかと考えられた。

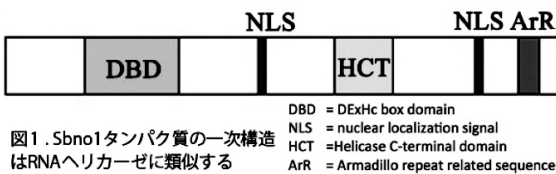
研究成果の概要(英文)：We prepared polyclonal antibodies against Sbno1 protein, Western blot analysis using these antibodies detected different band pattern, suggesting that Sbno1 protein is regulated by cleavage. Sbno1 knockout mice showed premature neuronal differentiation, extinction of the neural stem cells, and apoptosis. Yeast two hybrid screening identified several molecules interacting with Sbno1. Our analyses suggested that one of these is transcription factor regulating cell differentiation, some of these are involved in regulation of cell cycle, and rest of these is deubiquitination enzyme which downregulates apoptosis. These findings suggest that Sbno1 function is regulated after protein translation, probably by protein cleavage mechanisms. Sbno1 can bind to multiple factors of different function, such as regulation of cell differentiation, cell cycle, and apoptosis. Thus, Sbno1 is a molecule which integrates these cellular processes.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

我々がマウスから新規に同定した分子 *Sbno1* (Baba et al., 2006; 図1) のホモログ、パラログについての解析結果は一致しない。ショウジョウバエでは Notch シグナルの下流で働く分子と結論されているが (Coyle-Thompson & Banerjee, 1993)、変異体では Notch シグナルの典型的機能である側方抑制には影響がない (Majumdar et al., 1997)。線虫の *sbno* 相同遺伝子の変異では Notch シグナルに関連した表現系は見られない (Simms & Baillie, 2010)。我々は魚類胚で *sbno* 機能阻害を行い、顕著な中枢神経形態異常を得たが、Notch シグナル因子の欠損で典型的に報告されているニューロン分化亢進や筋節の形成異常は見られなかった (Takano et al., 2011)。ヒトのゲノム解析では統合失調症関連遺伝子や正常な脳の発達に関わる遺伝子のうちの1つと報告されている (Girard et al., 2011; Taal et al., 2012)。パラログである *Sbno2* ノックアウトマウスは骨粗鬆症に類似した表現型を示すが Notch との関連は報告されていない (Maruyama et al., 2013)。このように *Sbno* 遺伝子の機能は様々な実験系で、それぞれ異なる機能が報告されており、実際のところ、どのような分子的機能、細胞生物学的役割を持っているかは未だ不明である。



2. 研究の目的

これまでに我々は *Sbno1* ノックアウトマウスを作成し、その表現型について解析してきた。その結果、この分子が脳の発生過程で p53 発現を抑制していることを明らかにした。また、*Sbno1* タンパク質が細胞周期や分化状態によって、異なる分布をみせることを見出した。そこで、本研究では、*Sbno1* タンパク質の異なる領域を認識する抗体を作成し、免疫染色やウェスタンブロットによって、細胞が異なる状況にある時に、タンパク質のプロセッシングなどの制御を受ける可能性について調べ、また、そのような *Sbno1* 機能の制御が、ニューロン分化以外の過程で、幹細胞の機能としての、細胞増殖と細胞分化にどのように関わっているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Sbno1 タンパク質の N 末領域、中央領域、C 末領域をそれぞれ認識するポリクローナル

抗体を準備し、それぞれの抗体を用いて、各臓器での *Sbno1* タンパク質の発現をウェスタンブロット解析と組織免疫染色によって、調べた。

各臓器での *Sbno1* の機能については、コンディショナルノックアウトマウスを作成し、組織学的解析を行った。

最後に、*Sbno1* の機能をグローバルに調べる目的で、MEF 細胞において inducible な *Sbno1* ノックアウトを行い、コントロール MEF 細胞と、遺伝子発現の比較を行った。

4. 研究成果

我々は *Sbno1* の N 末側領域 (N2)、中央領域 (Hm2)、C 末側領域 (C15) を認識する抗体を作成し発生中の脳で免疫染色を行ったところ、N2 と Hm2 は異なった染色を見せた。

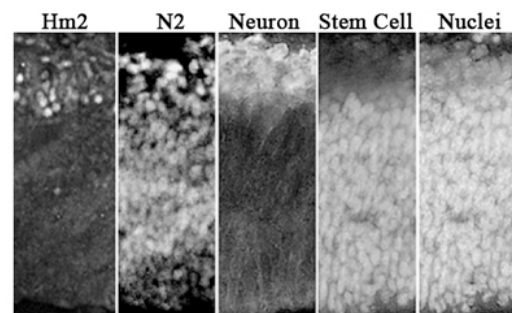


図2 : *Sbno1* タンパク質の中央領域認識抗体 Hm2 はもっぱら分化を始めたニューロンを染めるが、N 末領域認識抗体 N2 は神経幹細胞も染める。

またウェスタン解析では臓器ごとに異なったバンドパターンがみられた。

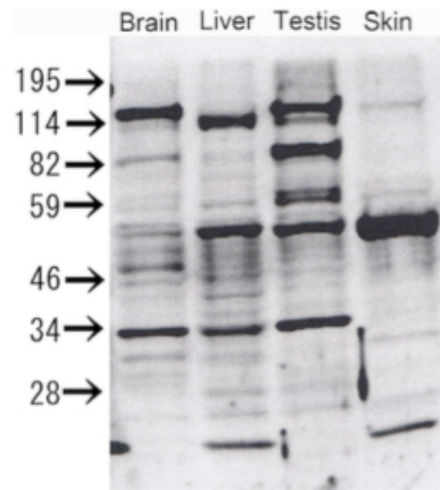


図3 N2 抗体を用いて、脳、肝臓、精巣、皮膚での *Sbno1* タンパク質の発現を調べたところ、それぞれの臓器で異なったバンドパターンが検出された。

我々が作成した *Sbno1* タンパク質を検出するポリクローナル抗体はウェスタンブロット解析を行うと、臓器ごとに異なったバンドパターンを見せる。*Sbno1* 強制発現プラスミド

を作成した。最初には Sbnol がゲノム上で元々もっている翻訳開始のメチオニンとその周辺の配列を cDNA からクローニングして、CMV プロモーターにつないだプラスミドを作成したが、このプラスミドでは Sbnol の発現を HEK293, COS2 といった培養細胞で誘導することはできなかった。そこで CAG プロモーター下に GFP を導入し、GFP が細胞で強く発現することがわかっているプラスミドに GFP の cDNA 配列に in frame で接続し、GFP との融合タンパク質として Sbnol の発現を試みた。その結果、このプラスミドでは弱いながらも GFP の蛍光を観察することができ、また N2 抗体を用いればウェスタンブロットでも、Sbnol タンパク質の過剰発現が検出できた。この時のバンドパターンには、各臓器でウェスタンを行った際にみられたと同様に多数のバンドが検出された。興味深いことに、Sbnol の N 末領域を認識する抗体と中央領域を認識する抗体では、異なるバンドパターンがみられた。これらの事実は、Sbnol タンパク質が全長として発現したのちに、断片化制御を受け、これが Sbnol タンパク質の機能に影響を与えている可能性がある。

N2 抗体と HM2 抗体がウェスタン解析でそれぞれ異なるバンドパターンを示すので、脳の発生過程での Sbnol の発現を免疫染色によってさらに解析した。HM2 抗体で免疫染色を行うと、濃淡はあるものの、発生過程の大脳皮質の全部の層で Sbnol の発現を検出した (not shown)。しかし、N2 抗体を用いると、発生過程でもっと特異性をもった発現が検出された。つまり、N2 で免疫組織学的に検出される Sbnol 陽性細胞は発生過程の大脳皮質で cortical plate でより多く観察され、この

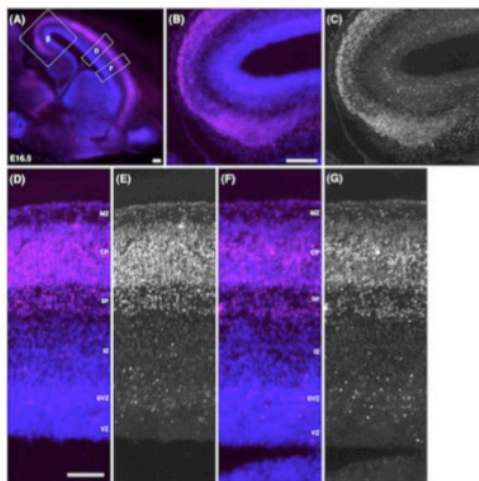


図4 N2 抗体で検出される Sbnol タンパク質の発現。この抗体では E16.5 で cortical plate でより多くの細胞が Sbnol を発現していることが示された (A)。しかし、Cortical plate 内での発現細胞の分布は、脳の後端 (B, C)、脳の中央領域 (D, E)、脳のより前の領域 (F, G) で異なる。

cortical plate 内での発現細胞の分布は前後軸に沿った各領域で異なっていた。

臓器ごとに Sbnol タンパク質の断片化パターンが異なったことから、各臓器で Sbnol の欠損を行った場合に、それぞれにどのような影響がみられるかをコンディショナルノックアウトマウスで調べた。すると表皮では上皮の角質化が起こらなくなり、消化管では、絨毛上皮の断片化がみられた。肝臓においては肝細胞索はみられず、中心静脈を見出すこともできなかった。

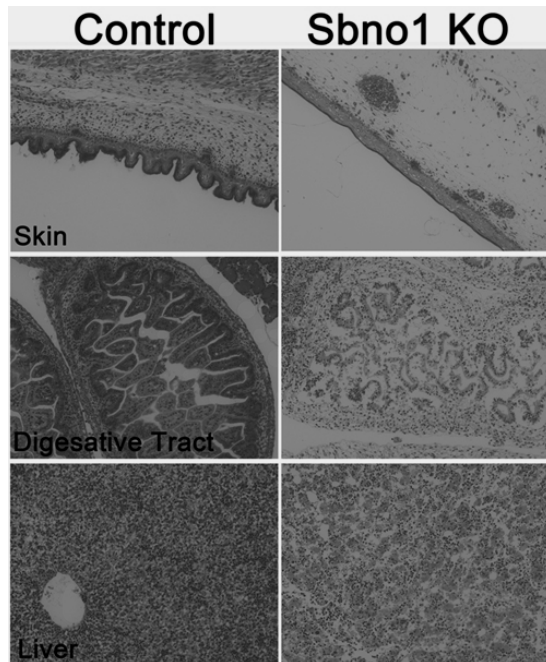


図5 : Sbnol ノックアウト (KO) では、皮膚、消化管、肝臓で組織・細胞の変性が起こる

これらの各臓器で Sbnol 欠損によってみられる異なる形態異常は、Sbnol の機能が各臓器で正常な形態を作るのに必須であるが、その働き方がことなる可能性を示唆している。

我々は MEF 細胞を用いて、タモキシフェン投与依存的な in vitro での Sbnol ノックアウトを試みた。Sbnol ノックアウトによって、MEF 細胞の増殖はほぼ抑えられた。さらに細胞を植え継ぐと、大量の細胞死が起こった。植え継がないで、培養し、免疫染色を行ったところ、p53 分子の発現がノックアウトによって経時的に増加することがわかった。現在は、Sbnol ノックアウトによる細胞死が p53 依存的であるかどうかを p53 ノックアウトマウスと掛け合わせることで確認しているところである。最後に Sbnol ノックアウト MEF とタモキシフェンを投与しない MEF でマイクロアレイによって遺伝子発現の変化を調べ

た。ノックアウト開始2日後にMEFを回収し調べたところ、数十の遺伝子で100倍以上の発現量の変化がみられた。ショウジョウバエではSbno1相同遺伝子はNotchシグナル関連分子とされているが、我々のマイクロアレイデータはSbno1がNotchシグナルと関連することを全く示していなかった。Sbno1ノックアウトで劇的な遺伝子発現増加がみられたことからSbno1は転写抑制因子である可能性が高い。

以上、本研究課題で得られた結果からSbno1は神経幹細胞のみならず、ほぼ全ての臓器の発生に関与しており、Sbno1はそれぞれの臓器で異なったプロセッシングを受けたタンパク質として発現していることが示された。Sbno1結合性分子には、それぞれ細胞分化、細胞増殖制御、細胞死に関わるような因子が含まれていることがわかった。現在それらの因子について解析中であり、まだ論文化していないので、ここではその詳細については述べることは控えるが、Sbno1は多様なプロセッシングを受け、多様な分子と相互作用することができることが本研究で示された。つまり、Sbno1はこのような多様な分子機構に関わることができる分子であることから、様々な分子機構を統合させる役割をもっているのではないかと考えられた。一方で、Sbno1ノックアウトを誘導した培養細胞での遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析で調べたところ、極めて多くの遺伝子が劇的に発現増加させたことから、Sbno1は転写抑制にはたらいっていると考えられる。

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 2件)

- (1) Imai, H., Shoji, H., Ogata, M., Kagawa, Y., Owada, Y., Miyakawa, T., Sakimura, K., Terashima, T., and Katsuyama, Y. Dorsal Forebrain-Specific Deficiency of Reelin-Dab1 Signal Causes Behavioral Abnormalities Related to Psychiatric Disorders (2016). *Cerebral Cortex* 1-17. doi: 10.1093/cercor/bhv334 (査読あり)
- (2) Sonoshita, M., Itatani, Y., Kakizaki, F., Sakimura, K., Terashima, T., Katsuyama, Y., Sakai, Y., & Taketo, M. M. Promotion of colorectal cancer

invasion and metastasis through activation of NOTCH-DAB1-ABL-RHOGEF protein TRIO. (2015). *Cancer Discovery* 5, 198-211. (査読あり)

[学会発表] (計 9件)

- (1) 2017年5月26日
第6回幹細胞若手の会(第15回幹細胞シンポジウム) (東京: 東京大学)
神経発生におけるSbno1の機能解析
寛直之、金田勇人、勝山裕
- (2) 2017年3月29日
第122回日本解剖学会 (長崎(長崎))
Dab1は海馬体各領域の形態形成に異なる関与をする
Marissa Blume、井之口文月、瀧公介、杉山拓、大和田祐二、相見良成、勝山裕
- (3) 2016年8月21日
幹細胞・細胞分化に関する合同リトリート (滋賀(同志社びわこリトリートセンター))
Strawberry notch関連遺伝子による神経幹細胞機能制御
勝山裕
- (4) 2016年3月29日
第121回日本解剖学会総会・全国学術集会 (福島(郡山))
大脳皮質特異的Dab1欠損マウスは精神疾患関連行動異常を示す
勝山裕、今井英明、昌子浩孝、尾形雅君、香川慶輝、崎村健司、宮川剛、大和田祐二、寺島俊雄
- (5) 2015年6月3-5日
第48回日本発生物学会(茨城(つくば))
Intermingled migration of the CA3 pyramidal and dentate granule progenitors in the developing hippocampal formation
Taku Sugiyama, Noriko Osumi, Yu Katsuyama
- (6) 2015年3月22日
第120回日本解剖学会 (兵庫(神戸))
Sbno1 is required for maintenance and differentiation of the neural stem cells
Ryuji Nakamura, Taku Sugiyama, Takaya Abe, Noriko Osumi, Shin-ichi Aizawa, Masahiko Hibi, Toshio Terashima, Yu Katsuyama
- (7) 2015年3月19,20日
ELyT Workshop 2015 (宮城(松島))
Morphological abnormalities in the hippocampus caused by Dab1 deficiency

Marissa Blume, Taku Sugiyama, Noriko Osumi, Yu Katsuyama

- (8) 2015年2月20日
第8回神経発生討論会 (福岡 (福岡))

Dab1 functions in the development of Hippocampal formation
Marissa Blume, Taku Sugiyama, Noriko Osumi, Yu Katsuyama

- (9) 2014年5月28、29日
第47回日本発生生物学会大会 (愛知 (名古屋))

Involvement of Sbnol in cell differentiation and stem cell maintenance
Yu Katsuyama, Ryuji Nakamura, Taku Sugiyama, Takaya Abe, Noriko Osumi, Masahiko Hibi, Shin-ichi Aizawa, Toshio Terashima

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://www.shiga-med.ac.jp/~hqanat2/sumsanatomy_researchcon.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝山 裕 (KATSUYAMA, Yu)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：10359862

(2) 研究分担者

寺島 俊雄 (TERASHIMA, Toshio)
神戸大学・医学研究科・教授
研究者番号：20101892

(3) 連携研究者

五十嵐 和彦 (IGARASHI, Kazuhiko)
東北大学・医学研究科・教授
研究者番号：00250738

大林 武 (OBAYASHI, Takeshi)
東北大学・情報科学研究科・准教授
研究者番号：50397048

(4) 研究協力者

()