

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440116

研究課題名(和文) 神経前駆細胞の活性化と栄養状態を結ぶシグナリングネットワークの解明

研究課題名(英文) Characterization of the signaling network that couples reactivation of neuronal progenitors to the nutritional state

研究代表者

福山 征光 (Fukuyama, Masamitsu)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・講師

研究者番号：20422389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：動物において、脳を含む神経系は、神経幹細胞や神経前駆細胞から産生される。神経幹細胞や神経前駆細胞は活発に分裂や分化をおこない新しい神経細胞を産生する活性化状態と、そのような活動をおこなわない静止期状態を行き来することが知られており、その制御機構を理解することは再生医療の実現化や老化の解明に重要だと考えられている。今回、線虫を用いてPTCHDという、ヒトでは知的障害や自閉症スペクトラムに関与すると考えられているタンパク質が、神経前駆細胞の活性化制御に重要である知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In animals, the nervous system is derived from neural stem and progenitor cells. These cells dynamically shuttle between the activated and quiescent states. During the former state, neural stem and progenitor cells actively divide and differentiate to produce neurons. On the other hand, these cells stay dormant during the latter. Better understanding the mechanism that regulates the balance between these two states is believed to contribute to development of regenerative medicine and elucidation of aging process. Using the nematode worm, *C. elegans* as an experiment system, this study found that PTCHD, which is proposed to be involved in intellectual disability and autism spectrum disorder, plays an important role in maintaining the quiescent state of neural progenitor cells.

研究分野：分子発生遺伝学

キーワード：線虫 栄養 神経前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

幹細胞や前駆細胞の中には、個体の栄養状態の変化に応答して対称分裂や非対称分裂の頻度を変化させたり、静止期への進入・離脱をおこなったりするものがある。このような幹・前駆細胞の栄養応答に、IIS 経路や TORC1 経路が細胞自律的あるいは非自律的に介在することがショウジョウバエやマウス、線虫などを用いて明らかにされつつある (Fukuyama et al., Curr. Biol. 2006; Ables & Drummond-Barbosa, Cell Stem Cell 2011; Yilmaz et al., Nature 2012 など)。しかしながら、幹・前駆細胞の追跡観察が技術的に容易でないこともあり、IIS 経路や TORC1 経路といったユビキタスな栄養応答機構と幹・前駆細胞特有の分裂や分化の制御機構との相互作用メカニズムに関しては不明な部分が多く残されている。申請者らは、線虫 *C. elegans* において、孵化直後の 1 齢幼虫における全ての幹・前駆細胞が静止期にあり、静止期からの活性化 (分裂や分化の開始) が餌の添加によって誘導できる点に着目し、幹・前駆細胞の栄養応答メカニズムを研究してきた (Fukuyama et al., Curr. Biol. 2006; Fukuyama et al., Biol. Open 2012; Kasuga et al., Nature 2013)。これまでに、1) 表皮において IIS 経路や Rag-TORC1 経路の活性化が神経前駆細胞の活性化を促進すること、2) IIS 経路の下流で miRNA である miR-235 が標的遺伝子 *nhr-91* (哺乳動物 GCNF のオルソログ) の発現を抑制し、飢餓条件下における神経前駆細胞の静止期を促進すること、3) *foxo* と Rag 遺伝子との遺伝学的相互作用から *foxo* の下流で IIS 経路と Rag-TORC1 経路が合流する可能性があることなどを見出している。しかしながら、*nhr-91* の欠失変異体で摂食時における神経前駆細胞の活性化に影響が見られないこと、飢餓条件下における *nhr-91* の強制発現は神経前駆細胞の活性化を誘導しないことから、*nhr-91* 以外にも神経前駆細胞の活性化に関与する miR-235 標的遺伝子が存在することが示唆されている。

2. 研究の目的

幹細胞や前駆細胞の中には、インスリン/IGF シグナリング (IIS) 経路や TORC1 経路を介して個体の栄養状態の変化に応答し、分裂や分化の頻度を調節するものが存在する。しかしながら、このようなユビキタスな栄養応答経路がどのような下流エフェクターを介して分裂や分化といった幹・前駆細胞特有の細胞挙動を調節しているか不明な点が多い。申請者らは、幹・前駆細胞の観察が容易な線虫を用いて、IIS 経路やマイクロ RNA (miRNA) miR-235 が表皮で機能し、神経前駆細胞の摂食に応答した静止期から活性化 (分裂や分化の開始) への移行を制御することを見いだしてきた。そこで本研究では IIS-miR-235 経路の下流遺伝子群を同定し、表皮を介した神経前駆細胞の活性化と個体の栄養状態の連動

メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

本研究では、IIS-miR-235 経路の新規下流遺伝子群を同定・解析することにより、表皮を介した神経前駆細胞の活性化と個体の栄養状態を連動させる分子機構の解明を目指す。マイクロアレイなどを用いて飢餓条件下の miR-235 変異体で発現亢進あるいは低下している遺伝子群を同定し、miR-235 の結合が 3' UTR 内に予測される遺伝子の中から表皮と神経前駆細胞間の細胞間シグナル伝達を仲介する因子群を同定し、餌の有無における発現パターンや、過剰発現や機能阻害への影響、先行研究より予測される相互作用因子が推測されるのであれば、それらの因子の神経前駆細胞静止期・活性化調節への関与を評価する。

4. 研究成果

(1) ヘッジホッグ関連因子をコードする *grl-7* は *mir-235* の標的遺伝子である

これまでの研究で、miR-235 は細胞非自律的に神経前駆細胞の静止期を制御することが認められている。そこで、miR-235 の標的遺伝子の中に分泌因子をコードするものが存在し、それが表皮から神経前駆細胞への組織間連係に介在すると考えた。そこでこのような下流遺伝子を同定するために、まず microRNA の標的遺伝子を予測するための複数のアルゴリズム (TargetScan, PicTar,

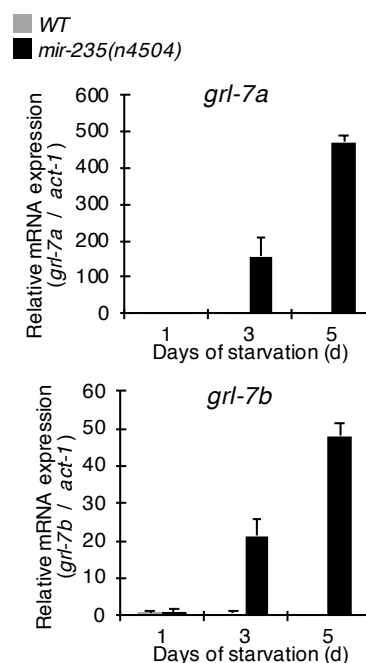


図1 飢餓条件下の *mir-235* 変異体では *grl-7* の発現が亢進する

飢餓条件下の幼虫における *grl-7a, b* mRNA の発現量を *act-1* を内部標準にした定量的 PCR 法 (比較定量法) によって定量し、飢餓 1 日目の野生型に対する相対値として示した。 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired two sided t-test compared with wild-type), $n=3$, bars: s. d.

miRanda, mirWIP) を用いて 3' UTR 内に miR-235 結合配列をもつことが予測される標的候補遺伝子を検索し、複数のアルゴリズムで重複して予測された遺伝子に注目した。この遺伝子群の中に、ヘッジホッグ関連因子をコードする *grl-7* が、飢餓条件下の *mir-235* 欠失変異体 *mir-235(n4504)* において野生型と比較して発現量が増加していることを見出した (図 1)。

grl-7 が miR-235 の直接の標的遺伝子として生体内で抑制されるかどうかを確認するため、*gfp-pest* cDNA の下流に *grl-7* 3' UTR を繋いだレポーター遺伝子を作製し、そのレポーター遺伝子の発現が miR-235 に抑制されるかどうか検討した。表皮と神経前駆細胞において恒常的な活性をもつ *dpy-7* プロモーター (*Pdpy-7*) の誘導下で *gfp-pest::grl-7* 3' UTR と miR-235 を共発現したところ、GFP-PEST の発現が顕著に抑制され、さらに *grl-7* 3' UTR 内の miR-235 結合配列に変異を施すと、GFP-PEST の抑制効果が解消された (図 2)。これらの結果は、*grl-7* が miR-235 の直接の標的遺伝子であることを示唆する。

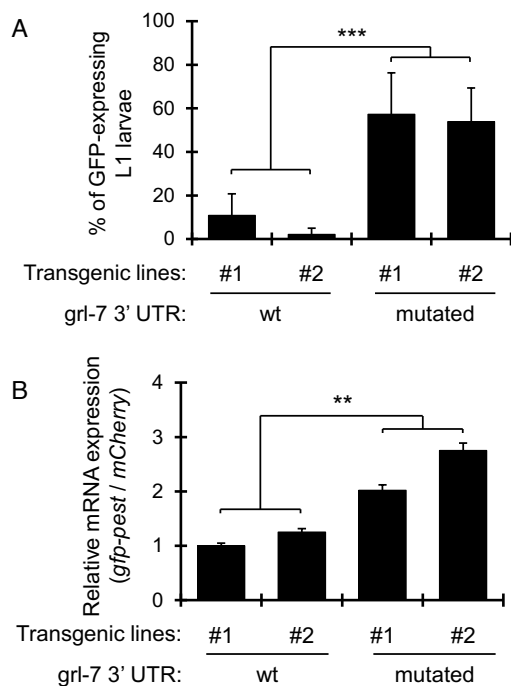


図 2. miR-235 は *grl-7* 3' UTR 内の miR-235 認識配列を介して *grl-7* 3' UTR の上流の遺伝子発現を抑制する

(A) 摂食 12 時間目において、*grl-7* 3' UTR 内の miR-235 認識配列を変異すると、GFP-PEST 発現個体数が増加した (4 回以上の試行で計 110 匹以上数えた)。*** $p < 0.0001$ (Scheffé's method, $n = 4$, bars: s. d.)

(B) S complete 培地で 24 時間飢餓させた一齢幼虫から total RNA を精製し、qRT-PCR により *mCherry* mRNA に対する *gfp-pest* mRNA の発現量を定量した。** $p < 0.001$ (Scheffé's method, $n = 3$, bars: s. d.)

次に、*mir-235* と *grl-7* の遺伝学的相互作用を検証した。*mir-235* 変異体で観察される神経前駆細胞の活性化は、*grl-7* の機能阻害により顕著に抑制された (図 3)。よって、*grl-7* の発現亢進が、*mir-235* 変異体における神経前駆細胞の活性化に寄与することが示された。

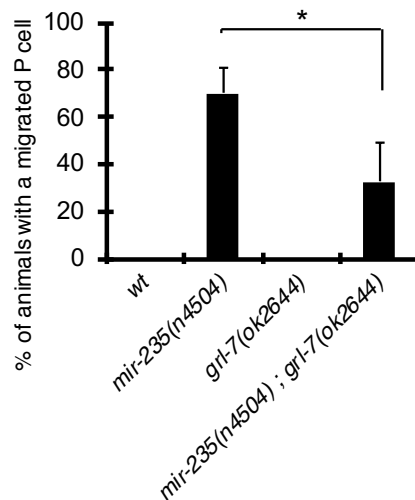


図 3 *grl-7(ok2644)* は飢餓条件下の *mir-235(n4504)* における神経前駆細胞の活性化を抑制する

飢餓 5 日目に神経前駆細胞が 1 個移動した個体数を定量した (3 回以上の試行で計 130 匹以上数えた)。*mir-235(n4504); grl-7(ok2644)* 二重変異体では *mir-235(n4504)* 変異体の表現型が抑制された。* $p < 0.05$ (unpaired two-sided t-test), $n \geq 3$, bars: s. d.

(2) PTCHD (patched domain containing) をコードする *ptr-18* は飢餓条件下における神経前駆細胞の静止期維持に必須である

grl-7 がどのような因子を介して神経前駆細胞の活性化を促進するのかが検討するため、まず線虫において保存されるヘッジホッグ受容体に着目した。ショウジョウバエや脊椎動物における典型的なヘッジホッグシグナル伝達経路において、ヘッジホッグは 12 回膜貫通型タンパク質である Patched (PTCH と呼ばれる) に結合し、Patched の機能を抑制する。これによって、一回型膜貫通タンパク質である Smoothed (Smo) が活性化し、下流のヘッジホッグシグナル経路を活性化する。線虫には、patched は存在するものの、Smo が存在しないため、上に述べた典型的なヘッジホッグシグナル経路は存在しないと考えられている。その一方、ヒトから線虫において、Patched 様の構造をもった Patched domain-containing protein (PTCHD, あるいは Patched related: ptr とよばれる) は、線虫にも存在する。線虫の *Patched (ptc)* や *PTCHD (ptr)* が神経前駆細胞の栄養応答に関わる可能性について検討することにした。まず、機能減弱型あるいは機能欠失

型の可能性がある入手可能な *Patched* 及び *PTCHD* の変異体を用いて、飢餓条件下における神経前駆細胞の静止期にこれらの遺伝子が必須であるかどうかを調べた。その結果、*PTCHD* をコードする *ptr-18(ok3532)* 変異体において、飢餓条件下にも拘らず、神経前駆細胞の移動が観察された(図 4A)。

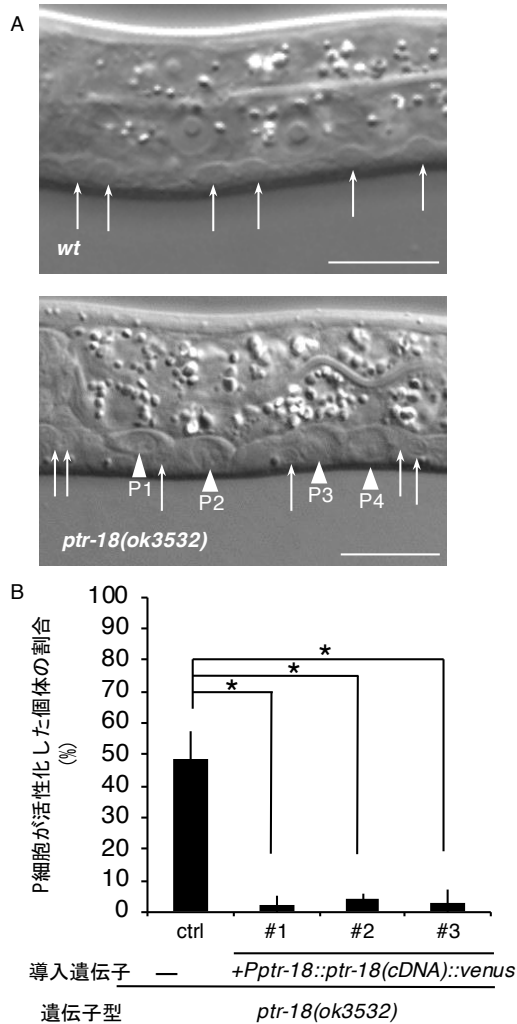


図4 *ptr-18* 変異体では飢餓条件下に神経前駆細胞が活性化する

(A) 飢餓 5 日目における正中面の微分干渉像。矢印: 腹側神経索細胞。矢頭: 神経前駆細胞。Bars: 10 μ m。
(B) *ptr-18* cDNA をもちいた救助実験。飢餓 5 日目に計測した。n=3, *P < 0.01 (Unpaired two-sided t-test)

ptr-18 遺伝子の第 2 イントロンには Y38F1A.4 遺伝子が存在する。そのため *ok3532* 変異体で観察される表現型が、*ptr-18* あるいは Y38F1A.4 の機能阻害に由来するか判然としない。そこで、*ptr-18* プロモーターに *ptr-18* cDNA、さらに *venus* を融合させたコンストラクトを *ok3532* 変異体に導入し、形質転換体を 3 系統確立した。これらの 3 系統では、飢餓条件下における神経前駆細胞の活性化がほとんどの個体で認められなかった(図 4)。よって、*ptr-18(ok3532)* 変異体における神経前駆細胞の活性化は、*ptr-18* の機能阻害に起因することが示された。

(3) *ptr-18* の発現パターン解析

ptr-18 がどのような時空間発現パターンを示すか明らかにするために、*ptr-18* 遺伝子座を含む約 40kb のゲノム断片をもつ fosmid をもちいて、*ptr-18* のストップコドンの手前に *gfp* 遺伝子を挿入したレポーター遺伝子を作成した。このレポーター遺伝子の発現パターンを解析したところ、胚発生中の三つ折れ (3-fold) 期に、表皮細胞や神経前駆細胞にて PTR-18::GFP の発現が認められた(図 5)。PTR-18::GFP の発現は、最初細胞の頂端側にて認められ、発生が進むにつれて、頂端側の発現が低下するとともに、細胞質内に粒状に認められ、最終的には検出されなくなった(図 5)。また、一齢幼虫期では、神経前駆細胞の一部で一過的に発現が認められた。

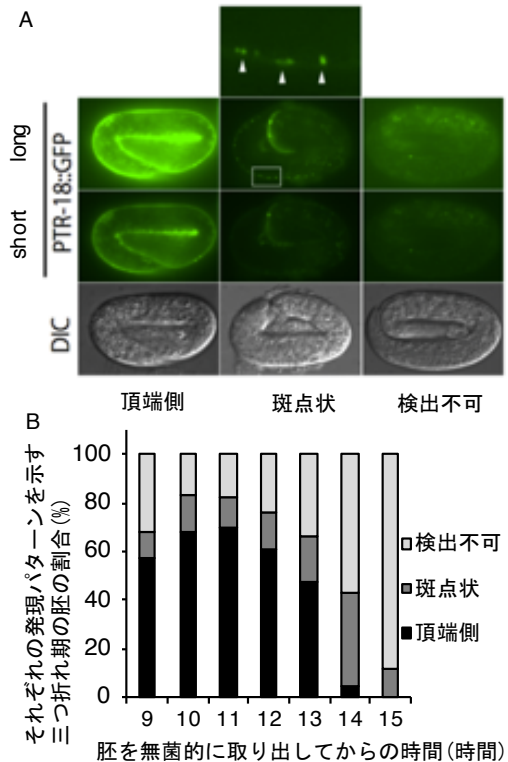


図5 *ptr-18* 変異体では飢餓条件下に神経前駆細胞が活性化する

(A) 三つ折れ期に認められる PTR-18::GFP の発現パターン
(B) 発生経過にともなう PTR-18::GFP の発現パターンの変化

(4) *ptr-18* は *grl-7* の局在変化を制御する

ptr-18 変異体で、*mir-235* 変異体と同様の表現型が観察されたことから、次に *ptr-18* と *grl-7* の遺伝学的相互作用を調べた。*ptr-18* 変異体では飢餓条件下では神経前駆細胞の活性化が見られるものの(図 4)、*grl-7* の機能阻害はその表現型を顕著に抑制することが認められた(図 6A)。*grl-7* プロモーターに *gfp* 遺伝子を融合したレポーター遺伝子の発現解析により、*grl-7* は *ptr-18* と同様に表皮や神経前駆細胞で発現することが示唆されていたが(Hao et al., BMC Genomics, 2006)、その局在分布は不明であった。そこ

で、*grl-7* 遺伝子座を含む約 40kb のゲノム断片を含む fosmid ベクターをもちいて、*grl-7* 遺伝子のストップコドンの手前に mCherry 遺伝子を挿入したレポーター遺伝子を作成した。GRL-7 はヘッジホッグ関連因子であることから、細胞外に分泌されると予測される。野生型に導入した GRL-7::mCherry も孵化前後に頂端側に分泌されていることが確認された (図 6B)。その後発生が経過するにつれ、頂端側の分布は減少し、細胞質内の斑点状の分布が増加するパターンを認めた (図 6B)。そこで、この発現パターン変化に *ptr-18* が関与するか検討するために、*ptr-18* 変異体で GRL-7::mCherry を導入したところ、頂点側から斑点状への発現パターン変化が遅延することが認められた (図 6C)。*ptr-18* 変異体と同様に、飢餓条件下で神経前駆細胞の活性化が認められる *daf-16* や *mir-235* の変異体では、GRL-7::mCherry の発現パターン変化に異常が見られなかった (図 6C)。よって *ptr-18*

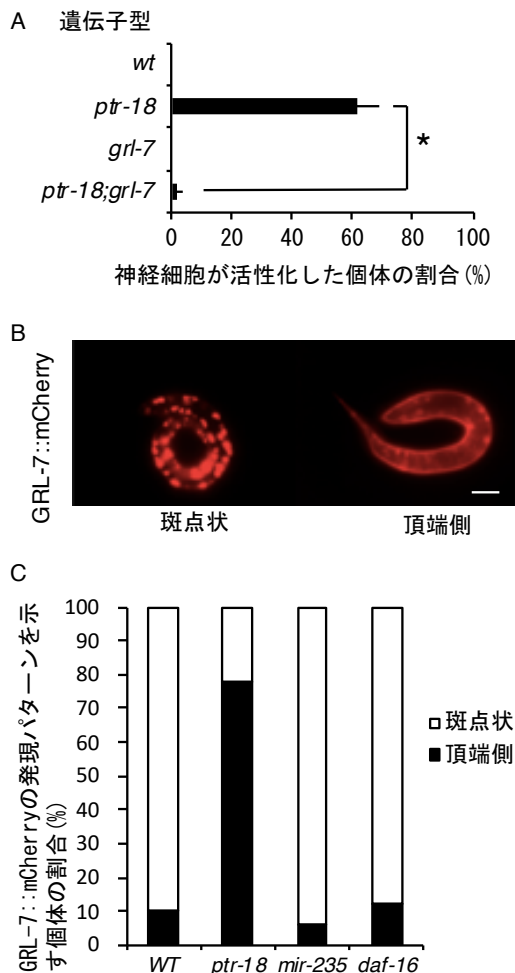


図6 *ptr-18*は*grl-7*の上流で機能する

- (A) 飢餓5日後における神経前駆細胞を活性化した個体の割合
 (B) 孵化後におけるGRL-7::mCherryの発現パターン
 (C) 孵化後1時間内の各変異体におけるGRL-7::mCherry発現パターンの解析

はGRL-7タンパク質の発現パターン制御を介して、神経前駆細胞の静止期維持を制御する可能性が示唆された。

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0件)

[学会発表] (計2件)

- ① 福山 征光、頭部神経系と栄養貯蔵組織における栄養応答システムの協調機構の解明、金沢大学新学術創成研究機構 革新的統合バイオ研究コア 栄養・代謝研究ワークショップ、2018年
- ② 福山 征光、*C. elegans* において静止期前駆細胞の活性化を制御する食餌中の栄養分子と遺伝子の解明、第50回日本発生生物学会、2018年

[図書] (計1件)

- ① Masamitsu Fukuyama、Reproductive and Developmental Strategies, Diversity and Commonality in Animals、Springer Japan、印刷中

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

東京大学大学院薬学系研究科・生理化学教室 ホームページ

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~seiri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福山 征光 (FUKUYAMA, Masamitsu)

東京大学・大学院薬学系研究科・講師

研究者番号：20422389