

平成 21年 5月29日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770164

研究課題名（和文） 大脳発生におけるニューロン分化期の長さを決定するメカニズム

研究課題名（英文） Regulation mechanism of the neurogenic phase in the developing neocortex

研究代表者

平林 祐介（HIRABAYASHI YUSUKE）

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：80447391

研究成果の概要：

大脳は高度な機能を持ち、進化に伴って高度に発達して来た。この脳を構成する主要な細胞種の一つがニューロンであり、脳が適切に機能するためには適切な数のニューロンが発生期間中に作り出されなければならない。ニューロンは発生中の一定期間しか作られず、このニューロン産生の期間の決定が最終的に作り出されるニューロンの数の決定に重要な要素となる。本研究では、ニューロン産生期が終了するメカニズムを明らかにし、ニューロンの数の決定機構の一端を明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

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：大脳、神経幹細胞、発生

1. 研究開始当初の背景

同じ種であればそれぞれの個体の脳はほぼ一定の数のニューロンやグリア細胞を持つと考えられる。複雑な機能を持つ神経系が正確に発生するためには、産生されるニューロンやグリア細胞の数が厳密に制御されなければならない。ニューロンとグリア細胞（アストロサイトやオリゴデンドロサイト）は、共通の前駆細胞である神経幹細胞から産み出されるが、このとき発生時期に依存して決まった種類の細胞を順々に産み出すこと

がわかっている。例えば大脳皮質であれば発生中期にはニューロンを主に産み出し、周産期以降には主にアストロサイトを産み出す。この時、正しい数のニューロンと正しい数のグリアが生み出されるためには、ニューロン分化期の長さ（神経幹細胞がニューロンを産み出す分裂を何回するか）が厳密に決まっていなくてはならない（図1）。例えば、ニューロン分化期が長過ぎればニューロンが多く産生され過ぎグリアは不足することになるであろうし、ニューロン分化期が短過ぎれば

逆にニューロンが不足することになるであろう。

しかしながら、ニューロン分化期の長さを決定するメカニズムについてはまだ多くが明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究ではニューロン分化期の長さがいかなる分子メカニズムで制御されているかを明らかにすることを目的とした。プロニューラル bHLH の幾つかの遺伝子破壊を行うとニューロン分化が阻害されるだけでなく、アストロサイト分化期が早く始まってしまふ。従って、ニューロン分化期からグリア分化期への転換にはプロニューラル bHLH 発現の抑制が必須であり、プロニューラル bHLH の発現が低下するタイミングこそが、ニューロン分化期からアストロサイト期への転換のタイミングを決める主要な要因のひとつであると考えられる。

我々は、Wnt シグナルの下流で β -catenin/TCF 転写複合体がプロニューラル bHLH の neurogenin 1 (Ngn1) と neurogenin 2 (Ngn2) の発現を誘導することを明らかにしていた。しかし、非常に興味深いことに、Wnt シグナルは発生段階の進んだ（周産期以降・アストロサイト分化期の）神経幹細胞に対しては Ngn1, Ngn2 の発現を誘導することはなく、ニューロン分化を誘導できなかった。この原因を調べたところ、発生が進むにつれて、Ngn1, Ngn2 のプロモーター領域のヒストンアセチル化量（開いたクロマチン状態に貢献）が低下し、逆にヒストン H3 Lys27 トリメチル化量（閉じたクロマチン状態に貢献）が増加することを見出していた。

そこで本研究では、Ngn1, Ngn2 プロモーターという特定の遺伝子座に起こるエピジェネティックな状態の変化が、いわば時間を測る「Clock」として働き、Ngn の発現をある時期に OFF にしているという仮説を検証し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

発生の後期になり、ニューロン分化期が終了する頃になると、ヒストン H3K27 のメチル化が上昇することを見いだした。そこで、メチル化されたヒストン H3K27 を認識して転写を抑制する複合体の主要な構成因子である

Ring1B 及び Ezh2 のノックアウトマウスを理化学研究所横浜研究所の古関明彦先生との共同研究により解析した。まず Ring1B あるいは Ezh2 をノックアウトした細胞を *in vitro* で培養し、この細胞のニューロン分化能及びこの細胞における Ngn の発現についてコントロールの細胞と比較した。さらに、Ring1B あるいは Ezh2 を時期特異的に神経幹細胞でのみノックアウトする事ができるマウスを作成し、このマウスにおいて、ニューロン分化期が延びるかを検討した。

またこのマウス由来の発生後期神経幹細胞を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、Ring1B をノックアウトすることによって脱抑制される遺伝子を同定した。

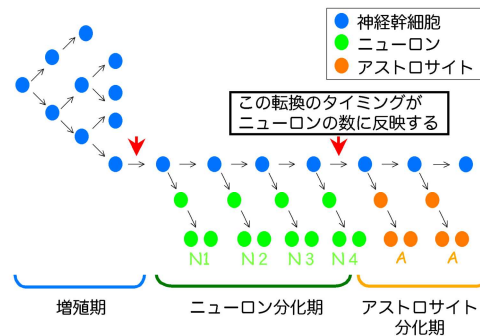


図1 ニューロン分化期の長さでニューロンの数

4. 研究の成果

発生が進むにつれて、Ngn1, Ngn2 プロモーター領域のヒストンアセチル化量（開いたクロマチン状態に貢献）が低下し、逆にヒストン H3 Lys27 トリメチル化量（閉じたクロマチン状態に貢献）が増加することを見出した（図1）。また、ヒストン H3 Lys27 トリメチル化を認識する Polycomb Repressor Complex

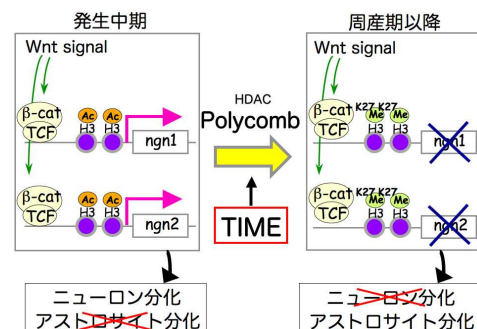


図2 Polycomb はニューロン分化期からアストロサイト分化期への転換を制御する

1 (PRC1)の必須構成因子 Ring1B やヒストン H3Lys27 トリメチル化酵素である Ezh2 のノックアウト (KO) マウスにおいては、アストロサイト分化期においても Ngn1 の発現が維持されていた。

さらに Ring1B KO マウスにおいてニューロン産生は発生後期間で持続しており、アストロサイト分化の開始が遅れていた。このことからこれらのノックアウトマウスにおいてはニューロン分化からアストロサイト分化への転換のタイミングが遅れていることが示唆された。すなわち、Polycomb が Ngn1 と Ngn2 のプロモーターのクロマチン状態を時間経過と共に閉じることで、ニューロン分化期が終了しアストロサイト分化期へと転換することが明らかになった (図2)。

Ring1B ノックアウトマウス由来の神経幹細胞を用いた遺伝子発現解析から、神経幹細胞において、Ring1B による抑制を受けている遺伝子を同定した。ES 細胞において Ring1B は非常に多くの遺伝子を抑制している事が報告されている。しかし、本研究の結果から ES 細胞と比べ神経幹細胞において Ring1B はニューロンの産生に関わる非常に限定された遺伝子のみを抑制している事が明らかになった。

これらの事から発生時期依存的に Ngn 遺伝子座におけるヒストン H3K27me3 の量が増加し、ある閾値を超える事によって、Ngn1 の発現が抑制され、ニューロン分化期からアストロサイト分化期へと運命が転換する事が示唆される (図3)。

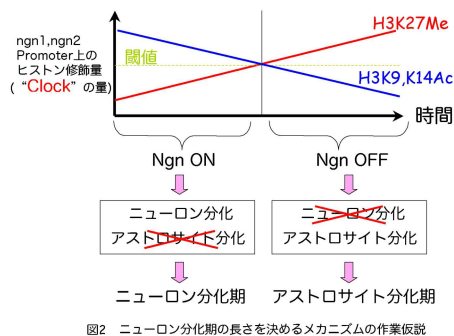


図3 ニューロン分化期の長さを決めるメカニズム

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)

平林祐介、後藤由季子

大脳皮質においてニューロンの数を決定するメカニズム

細胞工学 (査読無し) 2009, 1,

森靖典, 樋口麻衣子, 平林祐介, 福田光則, 後藤由季子

JNK phosphorylates synaptotagmin 4 and enhances Ca²⁺-evoked release.

EMBO J. (査読有り) 2008, 27, 76-87

[学会発表](計 5 件)

平林祐介, 鈴木菜央, 壺井将史、後藤由季子

Keystone Symposia Chromatin Dynamics and Higher Order Organization

2009年2月26日、Coeur d'Alene Resort, Coeur d'Alene, Idaho

平林祐介, 鈴木菜央, 壺井将史、後藤由季子

Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrocytic fate transition

日本分子生物学会年会

2008年12月9日、神戸

平林祐介, 鈴木菜央, 古関明彦、後藤由季子

大脳皮質発生における神経幹細胞の時期依存的な運命転換機構

日本組織工学会

2007年11月8日、東京

平林祐介、古関明彦、後藤由季子

Epigenetic modification regulates the termination of Wnt-dependent neurogenesis in the developing mouse neocortex

5th ISSCR Annual Meeting

2007年6月17日

オーストラリア、ケアンズ

平林祐介、古関明彦、後藤由季子
大脳皮質由来神経幹細胞の運命の発生依
存的変化、第5回幹細胞シンポジウム
2007年5月19日、淡路島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平林 祐介

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号 80447391

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

後藤 由季子

東京大学・分子細胞生物学研究所・教授

古関明彦

理化学研究所・横浜研究所・グループディレ
クター