

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570172

研究課題名（和文）転写抑制因子 RP58 の大脳皮質形成における機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of transcriptional repressor RP58 in corticogenesis

研究代表者 丸山 千秋 (MARUYAMA CHIAKI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・主席研究員

研究者番号：00281626

研究成果の概要（和文）：RP58 は発生期大脳皮質に強く発現し、大脳皮質形成に必須の機能を果たしている因子である。これまでにノックアウトマウスの表現型の解析から、本転写抑制因子は神経細胞の誕生とその生存、および細胞移動に重要な役割をしていることが示唆されていた。そこで本研究では、RP58 の機能解明を通して大脳皮質形成の分子メカニズムを明らかにする目的で、その下流標的遺伝子及び細胞移動障害の実態を解析した。その結果、神経分化誘導因子である Ngn2 は RP58 の転写を誘導するが、誘導された RP58 は Ngn2 遺伝子のプロモーター領域に結合してその転写を抑制していることが明らかになった。また、子宮内エレクトロポレーション法により E14 の胎児脳に GFP を導入し、E17 で解析すると、野生型に比べて RP58 ノックアウトでは移動が障害されており、特にサブプレート層を超えてロコモーションモードに入れなかったことがわかった。細胞の形態も、多極性細胞のまま変形した様な異常な形であった。しかし RP58 発現プラスミドを導入することで、その障害がレスキューされたことから RP58 が多極性細胞から双極性細胞へ変換してロコモーションに移る過程に必須であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：RP58, a transcriptional repressor, is expressed strongly in the developing neocortex and plays an essential role for corticogenesis. From the RP58-KO mice analysis, it is suggested that RP58 is important for neuronal differentiation, survival and migration. In the present study, in order to reveal the molecular mechanism for corticogenesis, RP58 downstream effector genes and detailed migration defects have been analyzed. As a result, proneural bHLH factor, Ngn2 has been identified as RP58 target gene. Ngn2 activates RP58 transcription first, then induced RP58 represses Ngn2 transcription. This negative feedback mechanism between Ngn2 and RP58 allows transient expression of Ngn2. Using in utero electroporation, it was revealed that RP58 deficient cells can not convert from multipolar to bipolar and enter to locomotion mode in the cortical plate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：大脳皮質、RP58、転写抑制因子、胚発生、神経細胞移動、Ngn2

1. 研究開始当初の背景

(1) 哺乳類大脳皮質の興奮性ニューロンは、脳胞の中でも、前脳領域の神経上皮細胞に局在する、神経前駆細胞からの細胞周期離脱、移動、成熟の過程を経る。特に遅生まれのニューロンに関しては、分化した後、多極性移動および皮質板でのロコモーションによる細胞移動を経たニューロンが整然とした6層構造を構築する。その分子メカニズムに関しては様々な因子の関与が解析されているが、転写制御からみた分子カスケードについては未解明な部分も多かった。

(2) RP58 は転写抑制因子で、発生期大脳皮質で強く発現し、ノックアウトマウスの解析から興奮性ニューロンの分化、移動過程に重要であることが示唆されていたが、その制御のエフェクター因子、および細胞移動における機能については不明であった。

2. 研究の目的

転写抑制因子 RP58 は胎生期大脳皮質とくに強く発現し、脳形成に必須の因子である(Ohtaka-Maruyama et al., 2007)。大脳皮質形成過程は、既知の転写因子の発現細胞や分化マーカーの発現が解析されているという点で、発生過程における転写因子制御ネットワークの役割が解明できる良いモデル系である。そこで RP58 の制御する遺伝子群を含めた分子レベルの解析を行い、とくに興奮性ニューロン産生とその移動過程に重要な転写制御ネットワークの分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) RP58 の下流標的遺伝子の検索

RP58 が実際に発生期の脳皮質においてどのような遺伝子の転写を抑制しているのかを調べるために WT と RP58 (-/-) の 16 日胚の大脳皮質組織を単離して RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。そこで得られた候補遺伝子に関して定量 PCR および in situ ハイブリダイゼーションにより KO マウスで実際に発現が上昇しているかどうか確認した。

(2) 発光ライブセルイメージングによる RP58 遺伝子プロモーター活性の視覚化

RP58 のプロモーターは Ngn2 によって活性化されることがわかっている。Ngn2 のプロモーターは神経前駆細胞中でオシレーションしている (Shimojo et al., 2008) ことから、神経前駆細胞中で RP58 プロモーターも Ngn2 に反応することでオシレーションしている可能性があるため、これを調べるためにルシフェラーゼ遺伝子をレポーターに用いた発光ライブセルイメージングを用いてプロモーター活性のリアルタイムの視覚化を試み

た。

(3) RP58 の細胞移動における機能解析

RP58 を欠損した細胞が神経細胞移動においてどのような挙動を示すのかを解析するために子宮内エレクトロポレーション法を用いて E14 の胎児脳に GFP 発現プラスミドを導入後 E17 で固定し、野生型細胞と比較しての移動度への影響や細胞形態の違いについて観察を行った。

4. 研究成果

(1) RP58 の下流標的遺伝子の同定

マイクロアレイ検索の結果、KO マウス脳で発現が上がっている様々な候補遺伝子があった。その中でも神経分化に関与するものとして知られている bHLH 因子、Ngn2 は定量 PCR、in situ ハイブリダイゼーションとともに RP58KO 脳での発現上昇が確認された。さらに RP58 抗体を用いた ChiP アッセイ、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイで Ngn2 の発現制御領域に RP58 が直接結合していることが明らかになった。すなわち RP58 は Ngn2 によって転写活性化されるが、誘導された RP58 は逆に Ngn2 の転写を抑制することで一過的な発現を可能にしていることが示唆される。

(2) RP58 プロモーター活性は Ngn2 に反応してオシレーションしている

RP58 プロモーターを Ub-Luc (ユビキチン付加により不安定化したルシフェラーゼ遺伝子) に結合し、発光ライブセルイメージングにより視覚化した。その結果 RP58 プロモーターも、Hes1 や Ngn2 と同様に 3-4 時間おきにオシレーションすることが観察できた (図 1、日本神経科学会、2009)。この結果を RP58KO

で前駆細胞の割合が増えていることと考え合わせると、RP58 が前駆細胞のオシレーションを終了して分化の方向に向かわせる機能を担っているという仮説が成り立つ。

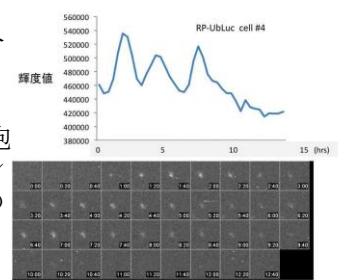


図 1 RP58 プロモーターは神経前駆細胞中でオシレーションしている

(3) RP58 は多極性細胞から双極性細胞への変換過程に必要である

子宮内エレクトロポレーション法により E14 胎児脳に導入した GFP 陽性細胞は 3 日後の E17 において野生型では脳表まで到達している細胞があるが、RP58KO では途中まで移動して止まっている像が観察された (図 2)。これを MAP2 の抗体染色により、神経細胞の形態を詳細に検討しながら観察すると、サブプレートニューロン層を超え

てロコモーションモードに入れないということがわかった。この時 RP58 発現プラスミドを同時に導入することでその移動障害がレスキューされることから、RP58 は新生ニューロンの移動過程、なかでもロコモーションモードに必須であることが明らかになった。さらに細胞形態についても詳しく観察すると、RP58 欠損細胞は多極性細胞から双極性細胞への変換に障害があった。すなわちサブプレート層を超えた後、一本の太い

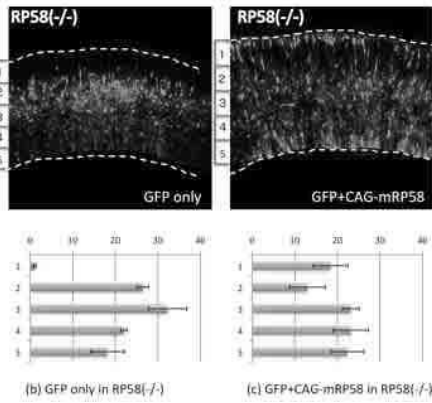


図2 RP58 により KO の移動障害がレスキューされる

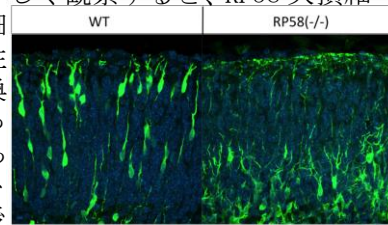


図3 RP58 欠損細胞は多極性から双極性細胞への変換が障害される

先導突起を持つ双極性細胞になって放射状グリアの繊維を上って行く野生型細胞に比べ、RP58 欠損細胞は多極性細胞の神経突起が細長く伸びたままサブプレート層付近で停滞している像が観察された(図 3)。以上の結果から RP58 は下流標的遺伝子を抑制することによって神経細胞が早生まれの細胞を追い越していくロコモーションを促し、整然とした6層構造の構築に寄与していることが明らかになった。その下流としては最近の共同研究から、Rho-シグナルに関与する低分子量G蛋白質である Rnd2 もその一つであることがわかってきた。Rnd2 も Ngn2 によってその発現が活性化されることから、Ngn2-RP58-Rnd2 のシグナルカスケードが脳皮質形成にとって重要かつ必須であることが示唆される(図 4)。今後はこの点について詳細に解析を進めて行く。

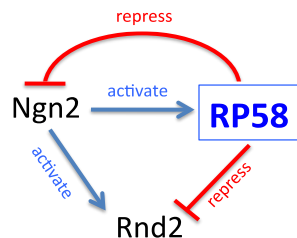


図4 Ngn2-RP58-Rnd2 シグナルカスケード

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

① Takahashi,A. , Hirai,S. , Ohtaka-Maruyama,C. , Miwa,A. , Hata,Y. , Okabe,S. , Okado,H. , Co-localization of a novel transcriptional repressor simiRP58 with RP58, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 査読有、368(0), 2008-, 637-642

② Okado,H. , Ohtaka-Maruyama,C. , Sugitani,Y. , Fukuda,Y. , Ishida,R. , Hirai,S. , Miwa,A. , Takahashi,A. , Aoki,K. , Mochida,K. , Suzuki,O. , Honda,T. , Nakajma,K. , Ogawa,M. , Terashima,T. , Matsuda,J.,Kawano,H. , Kasai,M. , The transcriptional repressor RP58

is crucial for cell-division patterning and neuronal survival in the developing cortex, *Dev Biol*, 査読有、331(2), 2009, 140-151

③ Yokoyama S, Ito Y, Ueno-Kudoh H, Shimizu H, Uchibe K, Albini S, Mitsuoka K, Miyaki S, Kiso M, Nagai A, Hikata T, Osada T, Fukuda N, Yamashita S, Harada D, Mezzano V, Kasai M, Puri PL, Hayashizaki Y, Okado H, Hashimoto M, Asahara H., A systems approach reveals that the myogenesis genome network is regulated by the transcriptional repressor RP58. *Dev Cell.* 査読有、6, 2009, 836-48

④ Hiraoka M, Inoue K, Ohtaka-Maruyama C, Ohsako S, Kojima N, Senoo H, Takada M., Intracapsular Organization of Ciliary Zonules in Monkey Eyes. *Anat Rec (Hoboken)*. 査読有、293, 2010, 1797-1804

⑤ Takahashi,N. , Hatakeyama,H. , Okado,H. , Noguchi,J. , Ohno,M. , Kasai,H. , SNARE conformational changes that prepare vesicles for excitosis., *Cell Metab*, 査読有、12(1), 2010, 19-29

[学会発表] (計 15 件)

① 平井志伸、三輪昭子、丸山千秋、岡戸晴生、新規転写抑制蛋白の組織分布と修飾の解析、第85回日本生理学会大会 (20080325)、東京・京王プラザホテル

② 平井志伸、岡戸晴生、翻訳修飾がZnf238の転写抑制活性に影響を及ぼす、第31回日本神経科学大会(20080711)、東京、東京国際フォーラム

③ 丸山千秋、平井志伸、三輪昭子、葛西正孝、岡戸晴生: “脳において転写抑制因子 RP58と Neurogenin 2間には転写制御での負のフィードバックが存在する” 第31回日本神

経科学大会. (20080710). 東京国際フォーラム

④ 岡戸晴生, 丸山千秋, 平井志伸, 三輪昭子, 高橋亜紀代: “転写抑制因子RP58は脳皮質形成に必須である” 首都大バイオコンファレンス. (20081023). 首都大学東京

⑤ 丸山千秋, 平井志伸, 三輪昭子, 葛西正孝, 岡戸晴生: “発生期脳皮質において転写抑制因子RP58と Neurogenin 2間には転写制御での負のフィードバックが存在する” 第31回日本分子生物学会年会. (20081209). 神戸・ポートアイランド

⑥ 高橋亜紀代, 平井志伸, 丸山千秋, 三輪昭子, 葛西正孝, 岡戸晴生: “新規転写抑制因子 simiRP58はステージ特異的に精母細胞に発現する” 第31回日本分子生物学会年会. (20081211). 神戸・ポートアイランド

⑦ 岡戸晴生, 丸山千秋, 杉谷善信, 福田裕石田礼子, 平井志伸, 三輪昭子, 高橋亜紀代, 青木克己, 持田慶司, 鈴木治, 本田岳夫, 中嶋一範, 小川正晴, 寺島俊雄, 松田潤一郎, 川野仁, 葛西正孝, 転写抑制因子RP58は脳皮質の細胞分裂パターンとニューロン生存に必須である, 第32回日本神経科学大会(20090916), 名古屋, 国際会議場

⑧ 丸山千秋, 平井志伸, 三輪昭子, 高橋亜紀代, 葛西正孝, 岡戸晴生, 発生期脳皮質で強く発現する転写抑制因子RP58は細胞自律的に神経細胞移動を制御する, 第32回日本新神経科学大会(20090916), 名古屋, 国際会議場

⑨ 平井志伸, 丸山千秋, 三輪昭子, 高橋亜紀代, 葛西正孝, 岡戸晴生, RP58はbHLH因子Id3のプロモーターの活性を抑制する, 第32回日本新神経科学大会(20090916), 名古屋, 国際会議場

⑩ 高橋亜紀代, 平井志伸, 丸山千秋, 三輪昭子, 岡戸晴生, RP58とsimiRP58は共に小脳外顆粒層に発現している, 第32回日本神経科学大会(20090916), 名古屋, 国際会議場

⑪ 丸山千秋, 平井志伸, 三輪昭子, 高橋亜紀代, 葛西正孝, 岡戸晴生, 転写抑制因子RP58は細胞自律的に脳皮質発生過程における神経細胞移動を制御する, 第32回日本分子生物学会 (20091209), 横浜, パシフィコ横浜

⑫ 平井志伸, 丸山千秋, 三輪昭子, 高橋亜紀代, 葛西正孝, 岡戸晴生, RP58は適切なタイミングで神経を分化させるのに必要な因子である, 第32回日本分子生物学会 (20091209), 横浜, パシフィコ横浜

⑬ 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(20100902), 神戸, ポートアイランド

⑭ 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(20100902), 神戸, ポートアイランド

⑮ 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年会(20101207) 神戸, ポートアイランド

[図書] (計0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 千秋 (MARUYAMA CHIAKI)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・主席研究員

研究者番号: 00281626

(2) 研究分担者

岡戸 晴生 (OKADO HARUO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都神経科学総合研究所・副参事研究員

研究者番号: 60221842

(3) 連携研究者

なし