

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2008～2009

課題番号：20870034

研究課題名（和文）神経前駆細胞の運命決定を担う因子の生体レベルでの探索と解析

研究課題名（英文）A genetic approach for the neuronal cell fate determination in Drosophila.

研究代表者

菅田 浩司 (KANDA HIROSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：60508597

研究成果の概要（和文）:

優れたモデル系であるショウジョウバエ外感覚細胞の発生系譜を用いて神経前駆細胞の運命決定に関連する因子を探索し、関連因子について解析を行っている。現在までの解析の結果、RNA 結合タンパク質である Musashi の機能を翻訳後調節する事で神経細胞の運命決定を制御している可能性の高い分子見いだした。

研究成果の概要（英文）:

We have elucidated the molecular basis of how neuronal cell fate is determined by an RNA-binding protein, Musashi, using powerful Drosophila genetics. In this project, we have aimed to identify and analyze up/downstream signal components of Musashi-related cell fate determination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：神経、スクリーニング、ショウジョウバエ、遺伝学、Musashi

## 1. 研究開始当初の背景

一個の前駆細胞から生じる娘細胞が互いに異なる機能・性質を獲得する非対称分裂は生物の発生過程において恒常的に認められる

現象であり、生物の多様性を担う重要な現象である。分裂期にある神経前駆細胞内においても、ショウジョウバエを用いた解析などから、運命決定因子 (cell fate determinants) が細胞の極性に従って局在し、二つの娘細胞

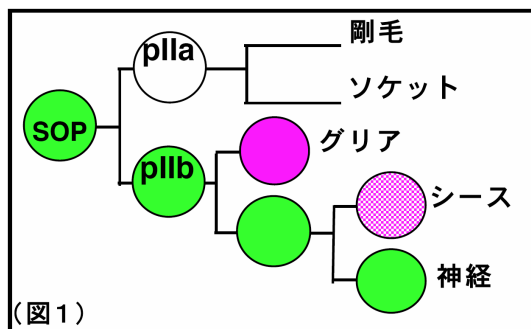
に不等に分配される事が次々に明らかとなった。さらに神経幹細胞の一つである neuroblast でこれらのメカニズムに異常をきたすと腫瘍様の増殖をする事が報告されている。発生過程におけるマウス脳においても同様に、細胞極性に支配される環境下で神経前駆細胞が非対称分裂を行う事が次第に明らかとなってきた。しかし、これらの事象の後に最終的に神経細胞の運命決定を行っている分子については全く明らかにされていない為、その解明は生物学的な意義のみならず、神経系の疾患メカニズムの解明や中枢神経の再生に関する研究を行う上でも急務である。ヒトを含めた高等生物では細胞の系譜そのものが明らかでない場合が多く、それゆえ非対称分裂の定義・解析は非常に困難であった。

## 2. 研究の目的

優れたモデル系であるショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の外感覚細胞の発生系譜を用いて神経前駆細胞の運命決定に関連する因子を探索し、生体レベルでその機能解析を行う事を目的とする。

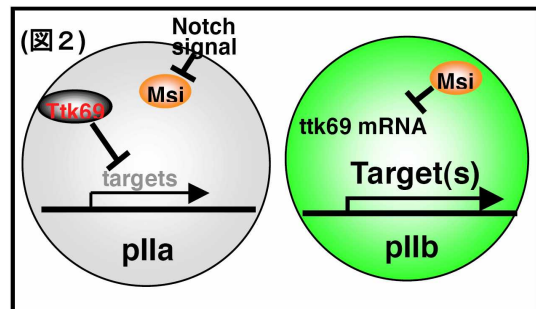
## 3. 研究の方法

ショウジョウバエ感覚剛毛 (体表の毛) の発生系譜は、進化的に保存された神経前駆細胞の非対称分裂を解析する上で優れた系である。その発生過程では、1個の感覚母細胞 (Sensory Organ Precursor ; SOP) が4度の非対称分裂を行い、神経、剛毛を含めた5個の細胞が生じる (図1)。SOP 内での運命決定因子の局在や娘細胞への不等な分配様式については比較的研究が進んでいるが、分裂直後の「未熟な」娘細胞が如何にして p11a 細胞及び p11b 細胞の運命を獲得・維持するかは明らかでない。



抑制性転写因子である Tramtrack69 (Ttk69)

はこの過程に必須の因子であり、その mRNA は p11a 細胞、p11b 細胞双方に発現する。p11b 細胞では RNA 結合タンパク質である Musashi (Msi) によってその翻訳が抑制されることから、Ttk69 タンパク質は p11a 細胞特異的に発現している。Ttk69 の p11a 細胞での発現が抑制される結果、細胞は p11b 細胞となる。そこで、本研究では Msi タンパク質の機能はその上流シグナル因子によって如何に制御されているか、in vivo RNAi を用いた modifier screening により Msi/Ttk69 シグナルの下流のターゲット因子の探索を行い、該当遺伝子の機能解析を行う の2点を目指して解析を行った。



## 4. 研究成果

【 Msi の機能を制御する上流シグナルの解析】

Msi のアミノ酸配列を解析した結果、ある翻訳後修飾酵素のターゲット配列が複数存在する事を見いだした。この配列は進化的に保存されていた。特にこの配列は分子内の2つの RNA 結合領域にもそれぞれ複数認められる事から、Msi の翻訳抑制機能の調節に深く関わっている可能性が推察される。in vivo RNAi によってこの修飾酵素の発現を抑制すると、成虫個体では剛毛が消失する表現型を示した。この個体内では p11a 細胞が消失している事が示唆される。この結果は、Msi の機能がこの翻訳後修飾によって抑制されている事を強く示唆するものである。現在はショウジョウバエの遺伝学を用いて Msi とこの分子双方の発現を同時にノックダウンするトランスジェニック動物を作成している。この個体を解析する事で両遺伝子間の遺伝学的相互作用の有無を確認すると共に、シグナル伝達経路における上下関係を解析する。同時に、この修飾酵素のターゲット配列のうち、RNA 結合配列内に存在する部分についてアミノ酸置換を行った Msi を発現するトランスジェニック動物を複数アレル作成した。

しかしながら、この変異では上流の修飾酵素の機能の顕著な抑制効果は認められなかった。従って、現在は Msi 分子内に存在する全てのターゲット配列に変異を導入した発現ベクター及びトランスジェニック動物の作成を行っている。この個体を解析する事で、Msi の機能を調節する分子メカニズムに迫る事が可能であると期待できる。

#### 【 Ttk69 の下流シグナル伝達機構の解析】

ttk69 の発現を抑制すると SOP から 2 個の p11b 細胞が生じる事が既に報告されている。この事は、抑制性転写因子である Ttk69 によるターゲットの発現抑制がキャンセルされると細胞は p11b の細胞系譜へと分化し得る事を示唆している。そこでこの Ttk69 のターゲット遺伝子の探索を立案した。SOP の系譜特異的に ttk69 の dsRNA を強制発現することで RNAi を行うと剛毛の消失が認められた。このとき SOP から 2 個の p11b 細胞が生じていると考えられる。この表現型は dsRNA のコピー数依存的であった。この系統と一連の染色体欠失系統を交配する事で、表現型に影響を与える遺伝子領域のスクリーニングを行う。2 次スクリーニングでは、得られた領域内にある遺伝子の dsRNA を過剰発現しうる系統との遺伝学的相互作用を解析する事で目的遺伝子の同定を試みる。ttk に対する RNAi 効果を向上させる目的で、現在さらに 二本鎖 RNA のプロセッシングに関わる Dicer2 を共発現し得るトランスジェニック動物を作成している。

#### 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 1 件)

Smith-Bolton R, Worley M, Kanda H, Hariharan IK.

“Regenerative Growth in Drosophila Imaginal Discs Is Regulated by Wingless and Myc” *Dev Cell*. 16 (6), 797-809 (2009)査読あり

#### 〔学会発表〕(計 4 件)

菅田浩司、島村理恵子、岡野栄之

‘in vivo large scale screen to identify molecules that regulate the integrity of

Blood-Brain Barrier in Drosophila.’ : 第 32 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜・横浜、2009 年 12 月 9 日)

菅田浩司、島村理恵子、岡野栄之

‘Genetic analysis of the organization and function of the blood-brain barrier in Drosophila.’ : 第 32 回日本神経科学大会 (名古屋国際会議場・名古屋、2009 年 9 月 17 日)

菅田浩司、島村理恵子、岡野栄之

‘A genetic approach for the organization and function of blood-brain barrier in Drosophila.’ 第 9 回日本ショウジョウバエ研究会 (ヤマハリゾートつま恋・三島、2009 年 7 月 6 日)

Kanda H, Alexander H. Nguyen, Leslie Chen, Iswar K. Hariharan.

“A genetic screen for regulators of cell growth and proliferation.” 50<sup>th</sup> Annual Drosophila Research Conference (Chicago, USA; March 5-7, 2009.)

〔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

慶應義塾大学医学部生理学教室  
<http://www.okano-lab.com/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菅田 浩司 (KANDA HIROSHI )  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：60508597

(2)研究分担者

該当者なし

(3)連携研究者

該当者なし