

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22500288

研究課題名(和文) Fgfr3 の神経幹細胞特異的な発現制御機構解析と大脳形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of neuronal stem cell-specific expression mechanism of Fgfr3 and its function on corticogenesis

研究代表者

武内 章英 (Takeuchi, Akihide)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90436618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：Fibroblast growth factor receptor 3 (Fgfr3) は脳の神経幹細胞の分化を制御し、哺乳類の大脳形成過程で中心的な役割を果たす分子であるが、Fgfr3 の神経幹細胞特異的な発現制御機構はこれまで謎であった。我々は、神経幹細胞に局限した Fgfr3 の発現制御が、プロモーターによる制御と Fgfr3 の相互排他的な exon 9 / exon 10 の選択的スプライシング調節を介した制御、により 2 重に調節されている事を明らかにし、さらにその制御に関わる因子の同定と解析から、大脳形成の分子メカニズムの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Fibroblast growth factor receptor 3 (Fgfr3) is one of the essential molecules during corticogenesis that regulates proliferation and differentiation of neuronal stem cells in mammalian brain. However, its regulatory mechanism is still largely unknown. Here we found that neuronal stem cell-specific expression of Fgfr3 is achieved by (1) Fgfr3 promoter activity, and (2) utilizing mutually exclusive alternative splicing regulation of exon 9 and 10. From these analyses in alternative splicing regulators of Fgfr3, we deciphered the mechanism of mammalian corticogenesis.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：神経科学 発生・分化 FGFR3 可視化

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳は、脳の中でも最も高度で複雑な、運動・知覚・認知・思考の機能を司っており、これらは特有の構造と機能を持つ運動野、感覚野、視覚野、聴覚野などの「機能領域」によりそれぞれ制御されている。脳の「機能領域」の形成機構の理解は、脳の機能や発生の理解、さらには疾患で失われた脳の機能を回復させる再生医療においてきわめて重要である。これまでの研究から、脳の「機能領域」の形成には、大脳皮質神経幹細胞の分化制御による運命決定と細胞増殖調節とが中心的な役割を果たしていることが分かっている(O'Leary et al., *Curr Opin Neurobiol*, 2008)。この分化制御と増殖調節は、シグナルセンターと呼ばれる脳の特定の部位から分泌される細胞増殖因子により制御されており(O'Leary et al., *Neuron*, 2007)、特に **Fibroblast growth factor 8(Fgf8)**とそのレセプターの **Fibroblast growth factor receptor 3(Fgfr3)**などが中心的な役割を担っていることが明らかとなっている(Thomas et al., *Neural Dev*, 2009)。

シグナルセンターから分泌される **Fgf8**、**Fgf2** は、大脳発生過程の神経幹細胞に特異的に発現する **Fgfr3** レセプターを介して、その分化や増殖を制御している。この **Fgfr3** の発現パターンは、神経幹細胞に限局し、かつその発現に脳内での部位特異性がある(吻側:低-尾側:高、内側:低-外側:高)。**Fgfr3** の神経幹細胞特異的かつ脳の部位特異的な発現レベルの制御が、脳の「機能領域」の形成(神経幹細胞の領域固有の性質の獲得とその後の細胞増殖制御による機能領域の形成制御)にきわめて重要なことが分かっているが、この神経幹細胞特異的かつ脳の部位特異的な発現制御メカニズムについてはまだほとんど明らかにされていない。この神経幹細胞での **Fgfr3** の発現制御メカニズムは、脳の形成過程で幹細胞が特有の性質を獲得しながら分化・増殖していく機構の理解にきわめて重要である。

2. 研究の目的

これまでの大脳形成の研究で、まだほとんど明らかとされていない **Fgfr3** の神経幹細胞特異的かつ脳の部位特異的な発現制御メカニズムを明らかにする。そして、神経幹細胞での **Fgfr3** の発現制御がどのように領域特異的な機構獲得に関与して脳の「機能領域」が形成されているのかという謎に挑む。

我々のこれまでの **Fgfr3** の神経幹細胞での発現制御に関する研究から、**Fgfr3** を神経幹細胞に限局して発現させているメカニズムは、転写調節による制御ではなく、むしろ選択的スプライシング制御によるものであることが明らかとなりつつある(武内ら未発表データ)。神経幹細胞から神経細胞への分化の過程で、**Fgfr3** のスプライシングパターンの変化がどのような制御メカニズムによ

るものなのかを解析する。具体的には、神経幹細胞および分化した神経細胞間で異なる **Fgfr3** のスプライシング・パターンを制御する制御配列と制御因子を同定する。またスプライシング制御因子は、機能に関連した複数の遺伝子のスプライシングを同時に制御して、神経機能を包括的に調節する例がこれまでにいくつか報告されていることから(Ule et al., *Nat Genet*, 2005, Calarco et al., *Cell*, 2009)、同定した **Fgfr3** のスプライシング制御因子が、大脳皮質の「機能領域」決定に関する遺伝子群を包括的に制御している可能性があり、神経幹細胞の分化・増殖を制御している遺伝子群とそれらの制御メカニズムが明らかにされる可能性を含んでいる。

3. 研究の方法

(1) 申請者が新規に開発したスプライシング・レポーターシステムを用いて、**Fgfr3** のスプライシング制御の実態を解析する。このレポーターを発生過程のマウス大脳皮質の神経幹細胞に、子宮内遺伝子導入法(in utero electroporation)にて遺伝子導入し、選択的スプライシング制御が神経幹細胞特異的な **Fgfr3** の発現を制御している可能性を詳細に検討する。

このスプライシング・レポーターへの変異の導入により、どの制御配列が神経幹細胞から分化した神経細胞への発現の切り替えに寄与しているのかを、神経系の細胞株にレポーターを導入し同定していく。in utero electroporationにて最終的な in vivo での確認を行い、神経幹細胞から分化した神経細胞への発現切り替えを制御しているシス・エレメントを決定する。

(2) **Fgfr3** の発現制御に関わるシスを同定した後に、そのシス・エレメントに結合して発現制御を行うトランス因子の同定を行う。具体的には、作成したスプライシング・レポーターシステムを用いて、cDNA library および siRNA library screening を行うことで、神経幹細胞および分化した神経細胞のそれぞれの発現パターンを形成するトランス因子を同定していく。レポーターと神経系の培養細胞に cDNA および siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングをかけることにより、**Fgfr3** のスプライシングおよび発現制御に関わる因子群が網羅的に同定できると考えている。in vitro の実験により、同定したトランス因子が、先に明らかにした制御配列を介して **Fgfr3** のスプライシングを制御しているのか確認を行い、その結果からさらに in vivo の実験を行う因子を絞る。

(3) ライブラリースクリーニングで抽出され、さらに in vitro の実験で **Fgfr3** のスプライシングを制御することが明らかになった因子に関して、in situ hybridization による発現解析を行い、神経発生時に大脳で発

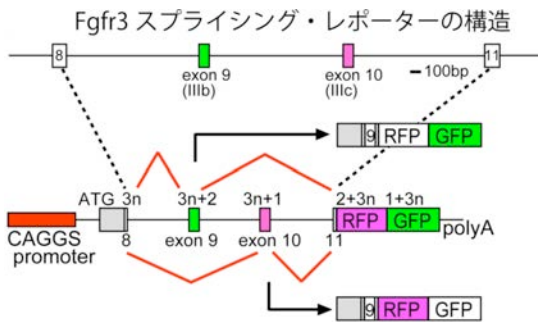
現しさらにそのパターンがスプライシングのパターンと合うかどうかを検証する。

発現が確認されたスプライシング制御因子につき、遺伝子改変マウス作成よりも迅速に実験およびアッセイのできる in utero electroporation によるノックダウンおよび発現増強実験により、Fgfr3 の発現変化と神経幹細胞の分化を指標にした機能解析を行う。in vivo でスプライシングを介した Fgfr3 の発現制御に必須と考えられる因子につき、さらに knock out mouse を作成することにより、大脳皮質形成におけるメカニズム解析を行う。

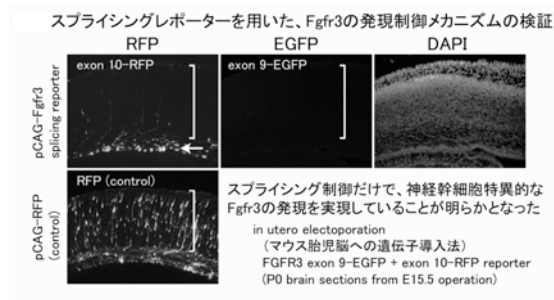
4. 研究成果

(1) スプライシング・レポーターの作成・改変による制御領域の同定

申請者が新規に樹立したスプライシング・レポーターシステムを用いて、Fgfr3 の相互排他的エクソンのスプライシング制御をモニターするレポーターを作成し、制御機構の解析を行った（下図）。

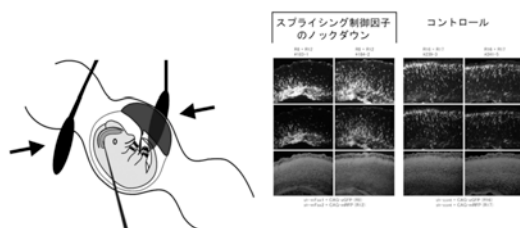


詳細な解析の結果、神経幹細胞ではエクソン 10のみを用い、分化神経細胞でどちらか一方を選択するアイソフォームは全く発現しないことが明らかとなった（下図）。



次に、分化神経でどのアイソフォームを取ることによってレポーターの発現がなくなるかを詳細に検討した（下図）。

In utero electroporationによる、スプライシング制御因子の、大脳形成における機能解析の例

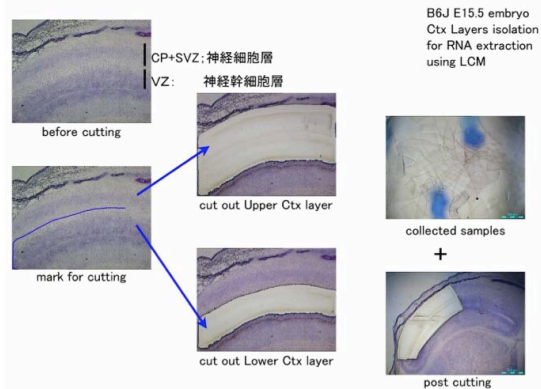


レポーターを in utero electroporation でマウス胎児脳に導入し、そこから total RNA を回収して RT-PCR によりアイソフォームの同定を試みることにした。このため、double-inclusion, double-skip のアイソフォームを生じても Nonsense Mediated Decay メカニズムによる RNA の分解を受けないような改良をレポーターに施した。

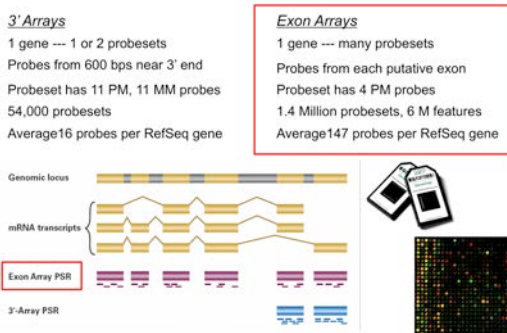
このレポーターを用いて in utero electroporation から RT-PCR まで行ったが、脳内でレポーターの発現自体が抑制されているのか、特定のアイソフォームが選択的に選ばれているという結論を得ることはできなかった。

そこで、pre-mRNA に直接結合してその代謝を制御する RNA 結合タンパク質に着目して、Fgfr3 の神経特異的な発現抑制に関わる因子を同定することにした。

(2) 胎生 15 日齢のマウス脳を用い、Laser Capture Microdissection 法を用いて大脳皮質を神経幹細胞領域と分化神経細胞領域に分けた（下図）。



Exon Array



それぞれの領域から total RNA を抽出し、MicroArray により分化神経細胞領域に特異的に発現している遺伝子を抽出した。翻訳後のタンパク質の構造、Gene Ontology Term 等から RNA 結合能を持つタンパクをコードする遺伝子を RNA 結合タンパク質として定義して、約 1000 遺伝子のリストを作製し、先の MicroArray のデータとの照合から、分化神経細胞特異的な発現が認められた RNA 結合タンパク質をセレクトした（次頁図）。

Muscle-specific splicing factors ASD-2 and SUP-12 cooperatively switch alternative pre-mRNA processing patterns of the ADF/cofilin gene in *C. elegans*.
PloS Genet 8(10) e1002991 doi: 10.1371/journal.pgen.1002991. (2012).

- ⑥ Kuroyanagi H, Watanabe Y, and Hagiwara M.
CELF family RNA-binding protein UNC-75 regulates two sets of mutually exclusive exons of the unc-32 gene in neuron-specific manners in *Caenorhabditis elegans*.
PLoS Genet. 9(2):e1003337 doi: 10.1371/journal.pgen.1003337. (2013).

- ⑦ 武内 章英、萩原 正敏
Special Review 可視化スプライシング・レポーターシステムで開く、哺乳類の mRNA 制御の世界
細胞工学 Vol.31 No.6 p698-P704
2012 年

[学会発表] (計 8 件)

- ① BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会) 神戸ポートアイランド (2010/12/7-10)
武内 章英、渡辺 要平、伊藤 美佳子、大野 欽司、萩原 正敏
哺乳類の脳の発生過程での mRNA 制御の網羅的解析
Whole-genomic mRNA regulation analysis of neuronal development in mouse brain
- ② 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 山梨大学甲府キャンパス (2012 年 3 月 26-28 日)
武内 章英、伊藤 美佳子、大野 欽司、萩原 正敏
哺乳類の脳の発生過程での mRNA 制御の網羅的解析
- ③ 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会
サンポートホール香川・かがわ国際会議場 (2013 年 3 月 28-30 日)
武内 章英、伊藤 美佳子、大野 欽司、萩原 正敏
RNA 結合タンパク質の機能解析から迫る、哺乳類中枢神経発生における RNA 制御の意義の解明
- ④ The 18th Annual Meeting of the RNA Society
Davos, Switzerland (2013/6/11-16)

Akihide Takeuchi, Kei Iida, Kensuke Ninomiya, Mikako Ito, Kinji Ohno, Masatoshi Hagiwara
RNA Binding Protein Sfpq is required for the expression of neuron-specific long pre-mRNAs essential for brain development.

- ⑤ Neuro2013
国立京都国際会館 (2013 年 6 月 20-23 日)
武内 章英、伊藤 美佳子、大野 欽司、萩原 正敏
RNA 結合タンパク質は、mRNA processing を介して脳形成過程で何を制御しているのか?
- ⑥ 第 15 回日本 RNA 学会年会
愛媛県 県民文化会館・ひめぎんホール (2013 年 7 月 24-26 日)
武内 章英、伊藤 美佳子、大野 欽司、萩原 正敏
RNA 結合タンパク質 Sfpq は、神経発生過程において長い pre-mRNA の発現を制御する
- ⑦ 2013 CSHL Meeting on Eukaryotic mRNA Processing Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA (2013/8/20-24)
Akihide Takeuchi, Kei Iida, Kensuke Ninomiya, Mikako Ito, Kinji Ohno, Masatoshi Hagiwara
RNA Binding Protein Sfpq is required for the expression of neuron-specific long pre-mRNAs essential for brain development.
- ⑧ Neuroscience 2013 San Diego, California, USA (2013/11/9-13)
Akihide Takeuchi, Kei Iida, Kensuke Ninomiya, Mikako Ito, Kinji Ohno, Masatoshi Hagiwara
RNA Binding Protein Sfpq is required for the expression of neuron-specific long pre-mRNAs essential for brain development.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 哺乳類生物における選択的スプライシングの発現プロファイルおよび制御機構を明らかにするトランスジェニックレポーターシステム

発明者: 萩原正敏、武内章英

権利者: 国立大学法人 京都大学

種類: 日本

番号: 特願 2012-554135

出願年月日: 11/30/2012

国内外の別： 国内

○取得状況 (計 2 件)

名称：Transgenic reporter system that reveals expression profiles and regulation mechanisms of alternative splicing in mammalian organisms

発明者：Masatoshi Hagiwara, Akihide Takeuchi

権利者：Kyoto university

種類：USA

番号：13700890

取得年月日：11/30/2012

国内外の別： 国外

名称：Transgenic reporter system that reveals expression profiles and regulation mechanisms of alternative splicing in mammalian organisms

発明者：Masatoshi Hagiwara, Akihide Takeuchi

権利者：Kyoto university

種類：EU

番号：11789456.8

取得年月日：01/11/2013

国内外の別： 国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.anat1dadb.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武内 章英 (TAKEUCHI, Akihide)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90436618

(2) 研究分担者

萩原 正敏 (HAGIWARA, Masatoshi)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし