

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 3 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650078

研究課題名（和文） 二分子蛍光補完による複数サイトカインシグナルの入力部位同時検出法の開発

研究課題名（英文） Development of method to detect multiple cytokine signal inputs using bi-molecular fluorescence complementation.

研究代表者

中島 欽一（NAKASHIMA KINICHI）

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：80302892

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、神経幹細胞のアストロサイト分化に必須である細胞外シグナル（IL6-FC：IL-6 ファミリーサイトカイン）のシグナル入力を観察する手法として、受容体膜タンパク質と転写因子が会合することを利用した二分子蛍光補完（BiFC）法の開発を行った。また、現在まで分かっていた生体内における IL6-FC 分泌細胞を探索し、脳を覆っている軟膜が LIF, CNTF, CLC といった複数の IL6-FC を高発現していることを発見した。

研究成果の概要（英文）：In this research, I have developed the method to detect the reception of cytokines (IL6-FCs, Interleukin-6 family of cytokines) signal by neural stem cells, which is essential for astrocyte differentiation of them using bi-molecular fluorescence complementation (BiFC). Furthermore, I identified that brain surface-covering meningeal cells express IL6-FC such as LIF, CNTF, CLC.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	420,000	3,320,000

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、神経薬理学

キーワード：神経幹細胞、二分子蛍光補完、分化、サイトカイン、アストロサイト

## 1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞は記憶、学習、情動などの実体を担うニューロンと、その機能を支持するグリア細胞への多分化能を持った細胞と定義されるが、胎生中期まではニューロンへの分化能しか持たず、胎生後期になって初めてグリア細胞への分化能を獲得する。本研究代表者らはグリア細胞のうちアストロサイトへの分化能獲得には、アストロサイト特異的遺

伝子の脱メチル化が必須であることを明らかにしている (*Dev Cell* 2001, 2009)。しかし神経幹細胞は脱メチル化によって分化能は獲得しても、アストロサイトへ実際に分化するためには細胞外シグナルを必要とする。代表者らはこれに関して、IL-6 や LIF に代表される IL-6 ファミリーサイトカイン (IL6-FC) が転写因子 STAT3 を介して重要な役割を果たすこと (*JNeurosci* 1999)、IL6-FC

が全く異なるサイトカインである骨形成因子群 (BMPs) と相乗的に作用して神経幹細胞のアストロサイト分化を誘導できる分子メカニズムを明らかにしている (*Science* 1999)。しかし生体内において、前述サイトカインの分泌細胞の同定とともに、神経幹細胞がこれらのシグナルを本当に受け取っているのか、また受け取っているとすれば細胞のどの部分で受け取っているのかという問題については残されたままであった。そこで代表者は、この理解なくしては、神経幹細胞がアストロサイトへの分可能を獲得し、アストロサイトへと分化するまでの全体像を解明したことにはなり得ないと考え、本研究課題を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

前述のように、代表者らは IL6-FC と BMPs が相乗的に作用して神経幹細胞のアストロサイト分化を誘導することを明らかにしているが、生体内において神経幹細胞が実際にこれらサイトカインシグナルを受け取っているかについては不明のままであった。そこで本研究では、これらサイトカインの分泌細胞を同定することに加え、サイトカインシグナル入力の際に、受容体膜タンパク質と転写因子が会合することを利用したこれまでにない二分子蛍光補間 (BiFC) 法により、異なるサイトカインシグナルの入力同時観察、及びその入力部位同定を行う技術を開発することを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) IL6-FC 分泌細胞の同定

BMPs の分泌細胞に関しては、胎仔期では脳室内に突出した脈絡叢であるという報告が多く成されていることから、本研究では特に IL6-FC 分泌細胞の同定に焦点を当てた。胎生期の神経幹細胞は細胞体を脳室帯に局在させているが、放射状突起を脳表面を覆う軟膜と接触あるいは非常に近接して存在している。これを考慮して代表者らは、この軟膜が IL6-FC 分泌細胞である可能性を検証する予備的実験として、軟膜細胞の培養上清存在下で神経幹細胞を培養したところ、アストロサイトへの劇的な分化が観察された。そのため、軟膜細胞が実際に IL6-FC を発現しているかを検証した。まず、IL6-FC に応答することが明らかなアストロサイト特異的 GFAP 遺伝子プロモーターを持つレポーターコンストラクトを神経幹細胞に導入し、軟膜細胞培養上清に対してレポーターアッセイを行った。この際、優性抑制型 STAT3 及び全ての IL6-FC のシグナル伝達を阻害できる gp130 阻害抗体を培地に添加し、軟膜培養上清中のアストロサイト誘導因子が IL6-FC であるかを確認した。

また、胎仔から軟膜を単離し、RT-PCR 法にて、どの IL6-FC が軟膜細胞で発現されているかを同定した。

### (2) BiFC 法に必要なコンストラクトの開発

IL6-FC は、膜タンパク質 gp130 を介して JAK チロシンキナーゼを活性化する。JAK は gp130 の細胞内領域をリン酸化し、STAT3 はその部分に会合することで JAK によってリン酸化を受け gp130 から解離する。一方 BMPs はセリン/スレオニンキナーゼを有する I 型 BMP 受容体 (BMPRI) と II 型 BMP 受容体 (BMPRII) のヘテロ 4 量体を活性化し、転写因子 Smad は BMPRI に直接リン酸化を受け受容体から解離する。本研究ではこの会合を利用して、二分子蛍光補間 (BiFC) 法によりシグナル受領の検出とその細胞部位の同定を試みた。まず、gp130 と緑色蛍光タンパク質 Venus の N 末側約半分の融合タンパク質 (gp130-VN) 及び STAT3 と Venus の C 末側約半分の融合タンパク質 (STAT3-VC) の発現コンストラクトを作成し、細胞にこれらを同時に発現させる。これは、細胞がシグナルを受け取り両者が結合した場合のみ Venus の立体構造が再生され蛍光が観察されるという

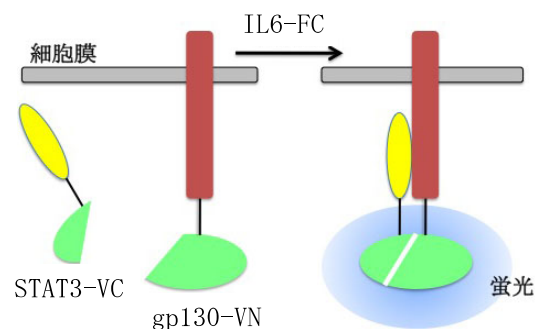


図 1. BiFC の原理。IL6-FC 刺激により、gp130-VN と STAT3-VC が会合したときのみ Venus タンパク質の立体構造が再生され、蛍光を発する。

原理に基づいたものである (図 1)。

作成したコンストラクトは細胞株に発現させ、その蛍光を観察することで最適なコンストラクトの組み合わせを選択しようと試みた。

## 4. 研究成果

### (1) IL6-FC 分泌細胞の同定

軟膜細胞より回収した培養上清にどのような因子が含まれているかを検討するため、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に GFAP 遺伝子プロモーターを組み込んだレポーターコンストラクトを用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果、軟膜培養上清の添加によりプロモーター活性の上昇が確認された。一方、優性抑制型 STAT3 (DN-STAT3) および IL-6 ファミリーサイトカインの共通信号伝達受容

体である gp130 の特異的阻害抗体 (RX435) によってその効果が抑えられた (図 2) ため、軟膜細胞が IL6-FC を発現している可能性が考えられた。そこで、どの IL6-FC を発現しているかを定量的 RT-PCR 法により解析した結果、LIF, CNTF, CLC という複数の IL6-FC が軟膜細胞において高発現していることを見いだした。

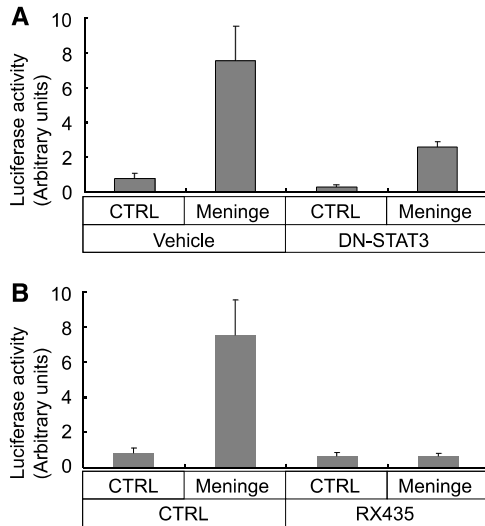


図 2. DN-STAT3 及び RX435 は、軟膜培養上清によるプロモーター活性を抑制する。DN-STAT3 を発現させた場合 (A)、及び、IL6-FC の共通伝達受容体である gp130 の特異的阻害抗体 (RX435) で処理することにより (B)、軟膜培養上清 (Meninge) によって観察された *Gfap* プロモーターのプロモーター活性が抑制された。

(2) BiFC 法に必要なコンストラクトの開発  
まず、gp130 と緑色蛍光タンパク質 Venus の N 末端側約半分 (VN) の融合タンパク質 (gp130-VN) の発現コンストラクト、及び STAT3 と Venus C 末端側約半分 (VC) の融合タンパク質 (STAT3-VC) の発現コンストラクトを作成した。また、組み合わせを換え、gp130-VC や、STAT3-VN も作成した。しかし、ただ単に野生型各タンパク質に Venus 部分タンパク質を融合させただけでは、Venus タンパク質の立体構造再編成がうまく行われな可能性が考えられた。立体構造の再編成は近接した時のみ起こるので、その距離を少しでも縮めるため、gp130 の細胞内領域を必要最低限まで削ったコンストラクトや、STAT3 の gp130 への結合に必要な SH2 ドメインのみのコンストラクトも作成した。また、STAT3 は gp130 に結合後、直ちに JAK によるリン酸化を受け gp130 から解離してしまうことを考慮し、STAT3 のリン酸化を受けるチロシンをフェニルアラニンに置換したコンストラクトも作成した。

作成したコンストラクトの有効性を検証するため、HEK293 細胞に各種組み合わせで融

合タンパク質をトランスフェクトし、それぞれの蛍光強度を観察した。その結果、gp130-VC と、SH2 ドメイン-VN の組み合わせにおいて蛍光を観察することができ、BiFC 法に必要なコンストラクトを作成することができた。

多くの増殖因子やサイトカインは本課題で取り扱ったサイトカインに類似したメカニズムによって信号を細胞内へと伝達するため、本方法は当該分野の枠を超えて他分野での研究へも広く応用できると期待される。

(3) 今後は、神経幹細胞が脱メチル化によりアストロサイトへの分化能を獲得する時期 (胎生 14 日)、及びアストロサイトへの分化が開始される時期 (胎生 17 日あるいは 18 日) に、作成したコンストラクトを電気穿孔法により導入する。その後、一定時間において、放射状突起を伸展させた神経幹細胞が IL6-FC のシグナルを実際にうけとっているかを蛍光顕微鏡下で観察する。

また、アストロサイト分化が胎仔脳で開始される時期の脳を摘出し、軟膜を付着させたまま、あるいは軟膜を除去した脳切片の培養を行い、アストロサイト分化細胞数の変化を観察する。

軟膜細胞が LIF, CNTF, CLC といった複数の IL6-FC を高発現していることを同定したため、BiFC 法を用いた上述の実験により、以下モデルのような神経幹細胞のアストロサイト分化の一連の過程を生体内で証明できると期待できる (図 3)。

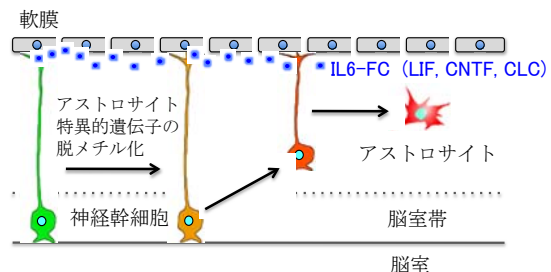


図 3. 神経幹細胞のアストロサイト分化。神経幹細胞は発生段階の進行に伴いアストロサイト特異的遺伝子の脱メチル化が生じ、多分化能を持った神経幹細胞として成熟する。この神経幹細胞に軟膜より分泌された IL6-FC のシグナルが入力されると、STAT3 の活性化に応じてアストロサイトへ分化する。

## 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)

- ① 武藤哲司, 佐野坂司, 伊藤慧, 中島欽一, Oxygen levels epigenetically regulate fate switching of neural precursor cells via hypoxia-inducible factor 1alpha-notch

signal interaction in the developing brain. Stem Cells 誌, 30 卷, 561-569, 2012, 査読有.

〔学会発表〕 (計 5 件)

① 佐野坂司, 波平昌一, 滝沢琢己, 中島欽一. Meningeal cells express astrocyte-inducing cytokines in the developing mouse brain. 40<sup>th</sup> Annual Meeting NEUROSCIENCE 2010. 2010 年 11 月 13 日. アメリカ・サンディエゴ.

② 佐野坂司, 波平昌一, 滝沢琢己, 中島欽一. Identification of cells expressing astrocyte-inducing cytokines in the developing mouse brain. Neuro2010. 2010 年 9 月 2 日. 兵庫県.

③ 中島欽一. 発生期脳における神経幹細胞のアストロサイトへの分化能獲得および分化誘導機構. 第 50 回日本先天異常学会学術集会. 2010 年 7 月 8 日. 兵庫県.

④ 中島欽一. Astrocyte Differentiation Mediated by Cytokines' Signaling. 第 29 回内藤カンファレンス. 2010 年 10 月 5 日. 神奈川県.

⑤ 佐野坂司, 波平昌一, 滝沢琢己, 中島欽一. Meningeal cells induce astrocyte differentiation of neural stem cells. 第 29 回内藤カンファレンス. 2010 年 10 月 5 日. 神奈川県.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 欽一 (NAKASHIMA KINICHI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号 : 80302892