

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 31日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23700372

研究課題名（和文） 大脳新皮質の機能領野の空間的割り当てにおけるポリコーム群タンパク質の役割

研究課題名（英文）

The role of Polycomb proteins in the spatial allocation of neocortical area

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（和文）：

本研究では Polycomb 複合体が大脳皮質の領野形成を制御する可能性を検討し、大脳皮質の領野形成メカニズムについて明らかにする事を目的とした。Polycomb 複合体の主要な機能を担う遺伝子である Ring1B を、NestinCreERT2 を用いて時間的空間的に条件的に遺伝子破壊し、Polycomb 複合体の機能を調べた。その結果 Polycomb 複合体は神経幹細胞の性質を変化させることで大脳皮質の領野形成を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we examined whether Polycomb repressor complex regulates the areal organization of a mammalian neocortex. To this end, we conditionally knocked out Ring1B gene, which is an essential component of Polycomb repressor complex, and examined the arealization of the neocortex. We found that Polycomb repressor complex changes the fate of neural stem cells and this fate changes results in the regulation of neocortical arealization.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：大脳皮質、神経幹細胞、ポリコーム

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の大脳皮質は情動や知覚などの高度な情報処理を担う組織である。大脳皮質の中のそれぞれの部位は異なる機能を担っていることが知られており、例えば大脳皮質の前方と内側には運動野、中央部には感覚野、後方には視覚野が存在することが知られている。これまでにそれぞれの領野の大きさや位置を決定するのに重要な分子がいくつか明らかにされてきたが、それらの分子の作用メカニズムはほとんど分かっていなかった。

大脳皮質は層構造を取っており、層状に配列されたニューロンから構成されている。それぞれの層を構成するニューロンは層特異

的な機能を担う。また、各領野間でニューロンの総数やそれぞれの層を構成するニューロンの数の比は大きく異なっている事が知られている（図1）。大脳皮質神経系は様々なニューロンの他にアストロサイト、オリゴデンドロサイトといったグリア細胞から構成されるが、これらの細胞は全て大脳皮質神経幹細胞（神経系前駆細胞）から産生される。神経幹細胞は多分化能を有するが、その分化方向は発生過程の時期によって大きく変化する。即ち、まずそれぞれの層のニューロンが順次（6層→5層→4層→2/3層）産生され、その後にグリア細胞が産生される、というように発生時期依存的に特定の機能を

持ったニューロンやグリア細胞が産生されている(図2)。従って、神経幹細胞が「どのタイミングで産生する細胞の種類を変化

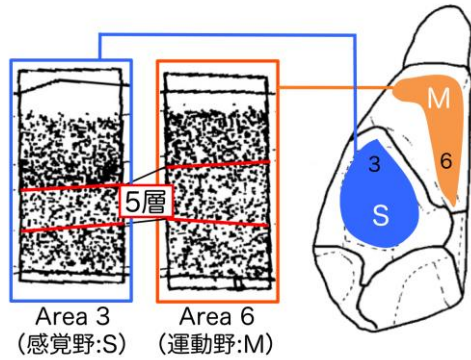


図1(右) マウス大脳模式図。(左) マウス大脳断面図。運動野においては感覚野よりも5層が厚いがニューロンの総数は少ない。

させるか」がそれぞれ細胞種の数の決定に重要であると考えられる。実際、5層ニューロンが多い運動野においては感覚野よりも5層ニューロンの産生期間が長い (Polleux et al. 1997)。

2. 研究の目的

我々は最近ヒストン H3K27 トリメチル化を介し転写抑制に働く複合体である Polycomb がこの神経幹細胞の運命変化のタイミングの決定に重要であることを見いだした (Hirabayashi et al, Neuron, 2009, 未発表, 図2)。即ち、Polycomb 複合体の構成

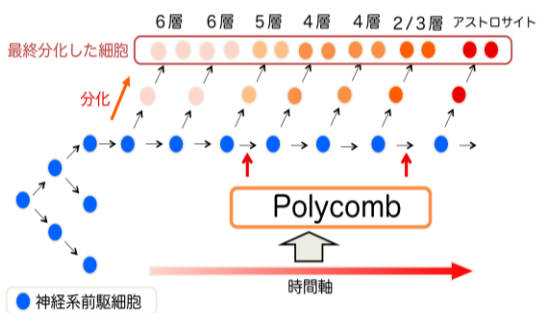


図2 大脳皮質神経幹細胞は発生時期依存的に産み出す細胞の種類を変える。5層ニューロン産生から4層ニューロン産生、ニューロン産生からアストロサイト産生の転換に Polycomb は必須の役割を果たす。

因子である Ring1B を大脳発生後期にノックアウトするとニューロンの産生期が伸びて

多くのニューロンが産生されるようになり、4層ニューロン産生期において Ring1B をノックアウトしておくともこの時期でもまだ5層運動ニューロンを作り続けた。この結果に基づき我々は、「Polycomb 複合体がニューロンの総数や構成比を制御するのであれば、それに対応して Polycomb 複合体は領野形成をも制御しているのではないか」という着想を得た。そこで本研究では Polycomb が大脳皮質の領野形成を制御する可能性を検討し、大脳皮質の領野形成メカニズムについて明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

非常に興味深い事に、Ring1B を4層ニューロン産生期にノックアウトし感覚野の5層運動ニューロンが増加した時、感覚野と視覚野のマーカで染色される領域が狭くなり、感覚野の特徴的な構造であるバレル構造が失われた。さらにより大脳皮質発生の遅い時期で Ring1B をノックアウトし、ニューロンの総数が増加した時には、逆に感覚野が広がっていることを示唆するデータを得た。つまり、Ring1B 欠損によるニューロン数やニューロンの組成の変化に、領野パターンの変化がちょうど対応していた。このことは、その部位のニューロンの数やそれぞれの層を構成するニューロン数の比によってその領野の特性が決定されるという大脳皮質領野形成の新しい仮説を支持するものである。本研究では神経幹細胞内での Polycomb による運命制御が大脳皮質の領野決定に関与するかを調べ、またそのメカニズムを検討した。

具体的には、Polycomb 複合体の主要な機能を担う遺伝子である Ring1B を NestinCreERT2, Nex-Cre を用いて時間の位置、大きさを調べた。また、感覚野に位置するニューロンの投射先が Ring1B 遺伝子の破壊によって変化するのか、を調べた。

4. 研究成果

まず Polycomb 複合体を形成する遺伝子のノックアウトマウスにおいて大脳皮質の領野形成が野生型と比べてどのように変化しているかを検討した。発生中の任意の時期に中枢神経系神経幹細胞特異的に Polycomb 複合体構成因子 Ring1B をノックアウトするため、中枢神経系神経幹細胞特異的に活性化する Nestin プロモーター下で Tamoxifen 応答性の Cre recombinase, CreERT2 を発現するマウス系統 (NestinCreERT2) を用いた。このマウスを用いて、大脳皮質発生早期に神経幹細胞内で tamoxifen 誘導的に Ring1B 遺伝子を破

壊 (Ring1B KO) したところ、感覚野のバレル構造の形成が不完全であった。詳細に調べた所、Ring1B KO においては視床から感覚野への投射は正常に起こっているものの、大脳皮質の4層ニューロンがバレル構造を形成出来ないことが分かった。

大脳皮質ニューロンへの投射及び大脳皮質ニューロンからの投射はいずれも領野特異的なパターンを示す。例えば運動野のニューロンは脊髄へと投射するが感覚野のニューロンは脊髄にはほとんど投射せず視床に投射する。このようなニューロンが投射を受ける先及び、ニューロンの投射先のパターンこそが領野の個性を与える大きな要因であると考えられている。そこで、Ring1B cKO における投射のパターンを検討し、野生型と比較した。色素を結合させたコレラ毒素bサブユニットの注入により脊髄や橋へ投射するニューロンをラベルし、大脳皮質ニューロンの投射先を検討したところ、野生型マウスにおいて感覚野に相当する部位において、Ring1B KO では脊髄に投射する運動ニューロンが増加していた。

領野形成が神経幹細胞の段階で行われているのか、それとも神経幹細胞からニューロンへと分化した後に起こるのかは大脳皮質発生において多くの論争が行われて来た。そこで我々は分化後のニューロンにCreを発現させるNex-Creトランスジェニックラインを用いてRing1Bのノックアウトを行った。非常に興味深いことに、NestinCreERT2を用いてRing1Bをノックアウトした時に見られた脊髄投射ニューロンの増加はNexCreを用いて、Ring1Bを分化後のニューロンにおいてノックアウトしても見られなかった。このことから、Ring1Bの神経幹細胞内での働きが、感覚野の形成に必須であることが示唆された。

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3件)

(1)Kishi, Y., Fujii, Y., Hirabayashi, Y. and Gotoh, Y.

HMGA regulates the global chromatin state and neurogenic potential in neocortical precursor cells. (査読有)

Nat Neurosci. 15, 1127-1133, 2012.

(2)Onoguchi, M., Hirabayashi, Y., Koseki, H. and Gotoh, Y.

A noncoding RNA regulates the neurogenin1 gene locus during mouse neocortical development. (査読有)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109, 16939-16944, 2012.

(3)Watatani, K., Hirabayashi, Y., Itoh, Y. and Gotoh, Y.

PDK1 regulates the generation of oligodendrocyte precursor cells at an early stage of mouse telencephalic development. (査読有)

Genes Cells 17, 326-335, 2012.

[学会発表] (計6件)

①Yusuke Hirabayashi, Nao Morimoto-Suzki, Masafumi Tsuboi, Haruhiko Koseki and Yukiko Gotoh: Gene Regulation by Polycomb Group Proteins in the Neocortical Neural Precursor Cells (poster), Keystone Symposia "Neurogenesis", Santa Fe, USA, February 3-8, 2013

②Yusuke Hirabayashi, Nao Morimoto-Suzki, Masafumi Tsuboi, Haruhiko Koseki, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano and Yukiko Gotoh: Gene Regulation by Polycomb Group Proteins in the Neocortical Neural Precursor Cells (poster), International Symposium on genetic and epigenetic control of cell fate, グランドプリンスホテル京都 平成24年11月6-7日

③平林祐介、小野口真広、桑原篤、徐源江、酒井寛、後藤由季子: Wntシグナルによる大脳皮質神経幹細胞の運命制御機構、特定領域研究「細胞増殖制御」終了シンポジウム、くらまホール(東京)、平成24年8月30-31日

④Yusuke Hirabayashi, Nao Morimoto-Suzki, Masafumi Tsuboi, Haruhiko Koseki and Yukiko Gotoh: Gene Regulation by Polycomb Group Proteins in the Neocortical Neural Precursor Cells (poster), ISSCR 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June 13-16, 2012

⑤Yusuke Hirabayashi, Nao Morimoto-Suzki, Masafumi Tsuboi, Haruhiko Koseki and Yukiko Gotoh Temporal changes of the Polycomb targets in the neocortical neural precursor cells (poster) The 59th NIBB Conference (1st International Symposium), Neocortical Organization, Okazaki, Japan, March 10-13, 2012

⑥Yusuke Hirabayashi, Nao Morimoto-Suzki, Masafumi Tsuboi, Haruhiko Koseki and Yukiko Gotoh Gene regulation by polycomb group proteins in the neocortical neural precursor cells (poster) "Joint CSH Asia/ISSCR Conference on Cellular

Programs & Reprogramming” Suzhou, China,
October 24 -28, 2011

[その他]
ホームページ等
<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/celltech/>

6. 研究組織

(1) 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