

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 13 日現在

機関番号：12501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770242
 研究課題名（和文） Notch 下流の新規因子 Nepro の機能と神経幹細胞の解析
 研究課題名（英文） Functional analysis of *Nepro*, a novel Notch downstream gene required for the maintenance of neocortex neural progenitor cells
 研究代表者
 室山 優子（MUROYAMA YUKO）
 千葉大学・大学院医学研究院・講師
 研究者番号：20422248

研究成果の概要（和文）：本研究では、研究代表者等が同定した大脳形成初期の神経幹細胞の維持に必須な Notch 下流の新規因子 *Nepro* の作用機作と発現制御の解析を行った。*Nepro* の機能ドメインを解析した結果、種間で保存された C 末端領域とその内部の核移行シグナルが *Nepro* の機能に重要であることが明らかとなった。さらに、*Nepro* の発現制御領域の解析により、*Nepro* 遺伝子上流に大脳神経幹細胞での発現を制御する領域が存在することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In a previous study, we identified *Nepro*, a gene expressed in the developing mouse neocortex at early stages and showed that *Nepro* is involved in the maintenance of NPCs downstream of Notch. In this study, we examined whether the conserved parts of *Nepro* are important for its activity by transfecting deletion mutants into NPCs. In contrast to full-length *Nepro*, the mutant lacking conserved C-terminal part of *Nepro* did not inhibit neuronal differentiation, suggesting that this region is required for *Nepro* function. Furthermore, *Nepro* mutant in which the NLS is disrupted by amino acid substitutions did not exhibit *Nepro* activity, suggesting that the NLS is important for *Nepro* function. To search for regulatory regions responsible for *Nepro* expression in early NPCs, we constructed reporter vectors carrying parts of the *Nepro* genome. We electroporated them into the embryonic mouse brain and identified a regulatory region located upstream of *Nepro*, which directs *Nepro* expression in the early NPCs.

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	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、発生生物学

キーワード：神経幹細胞、大脳皮質、Notch

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の高次脳機能を担う大脳皮質は入力と出力を分担する六つの神経細胞層から成る。大脳発生過程においてはこれらの神経細胞が正しく生み出されることが必須である。大脳皮質の神経細胞は脳室沿いに存在する神経幹細胞と呼ばれる多分化能と自己複製能を持つ

細胞から生み出される。神経幹細胞はくり返し分裂し、発生の早い時期に下層の神経細胞を生み出したのち、順に上層へ向かって‘inside-out’方式で異なる層の神経細胞を生み出す。細胞移植の実験から、神経幹細胞は時間経過に伴って性質が変化し、分化能力が減衰することにより、生み出す神経細胞の種類

が時系列で変化すると考えられる。すなわち、異なる種類の神経細胞が特定の時期に決まった数だけ生成するためには、適切な時期に至るまで神経幹細胞が正しく維持される必要がある。

Notchシグナルは種を超えて保存され、様々な発生現象を制御する細胞間シグナルである。ノックアウトマウス等の解析から Notch シグナルは神経幹細胞の維持に必須の役割を果たすことが示されている。Notch の細胞内ドメインは転写調節因子の Rbpjk や Maml と結合し、Hes や Hey などの bHLH 型転写調節因子の転写を活性化する。Hes1 及び Hes5 は神経幹細胞の維持における Notch シグナルの主要な下流因子であり、神経分化の正の制御因子であるプロニューラル遺伝子の発現を抑えることにより、神経分化を抑制し神経幹細胞を維持することが知られている。一方で、Hes1 と Hes5 のダブルノックアウトマウス的大脑において神経幹細胞が若干残存していることなどから、他に神経幹細胞の維持に働く因子が存在することが示唆されていた。しかし、他の種類の Notch 下流因子については不明であった。

研究代表者等は脳神経幹細胞の時系列における性質変化の分子機構を解明するため、脳形成の初期と後期以降で発現する遺伝子を網羅的に比較解析すると同時に、発現パターンを詳細に調べ、初期の神経幹細胞で特異的に発現する遺伝子を多数同定した。これらの遺伝子群の殆どは生体内機能が未知である。研究代表者等の解析により、その中の一つは初期の神経幹細胞の維持に必須であることが示され、Nepro と名付けた。さらに、Nepro が Notch の下流の新しい必須因子であることも初めて明らかにした(図1; Muroyama and Saito, *Development* 2009)。興味深いことに、Notch 阻害剤存在下で Hes1 や Nepro をそれぞれ神経幹細胞で発現させても維持には不十分であったが、

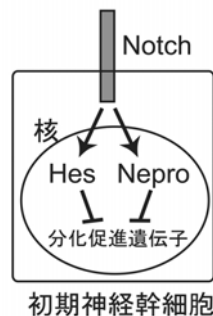


図1. 初期神経幹細胞を維持する機構 (Muroyama and Saito, *Development* 2009)。

両者を共に発現させると効果的に神経幹細胞が維持された。このことから初期の神経幹細胞の維持においては Notch の下流で Hes のみでは不十分であり、Nepro を必要とすることが明らかとなった。

一方、Nepro の分子機作や発現制御機構やさらには発現細胞の動態については全く不明である。Nepro は核移行シグナルを有し、HA タグと共に神経幹細胞で発現させると核に局在することから核タンパク質であると予測されるが、核移行の必要性や、Nepro がどのように Hes と関わり合い、神経幹細胞を維持するのかは全く分かっていない。また脳形成初期に特異的な Nepro の発現がどのように制御されおり、Nepro を発現する細胞が脳内でどのような動態を示すのかについても不明である。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者等が明らかにした脳形成初期の神経幹細胞の維持に必須な Notch 下流因子 Nepro の機能に基づき、以下の研究を行うことを目的とする。

- (1) Nepro の機能ドメインを明らかにし、分子機作を解析することにより、Notch の下流で Hes 及び Nepro を要する神経幹細胞維持の分子メカニズムを解明する。
- (2) 初期神経幹細胞に特異的な Nepro の発現の制御機構を明らかにするとともに、Nepro を発現する細胞の生体脳における動態を解析することにより、脳形成初期の神経幹細胞の性質の分子基盤を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は研究代表者等が新たに見出した Nepro を軸として、生化学的手法や独自の遺伝子導入法を用いた個体レベルでの解析により、Nepro の分子機作の解析と、発現制御機構の解析を行った。

(1) Nepro の分子機作の解析

Nepro は三つの種間で保存された領域と核移行シグナルを有する(図2)。Nepro の機能ドメインを明らかにするため、種間で保存された領域を欠損させたコンストラクトを作製した。欠損体の発現及び細胞内局在を確認するため、HA タグを C 末端側に付置した。それぞれの欠損体

は *EYFP* を発現させるダブルプロモーターベクターに組み込み、電気穿孔法により *Nepro* の発現が消失する時期のマウス大脳の神経幹細胞で発現させ、*Nepro* 全長で見られた神経分化抑制作用の有無を *EYFP* の蛍光を指標に確認した。*Nepro* 機能欠損体については、*Nepro* を強く発現する時期の神経幹細胞で発現させ、欠損体のドミナントネガティブ作用についても検証した。

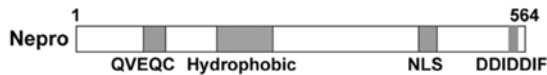


図2. *Nepro* の構造。*Nepro* タンパク質は三か所の保存されたモチーフと核移行シグナル (nuclear localization signal, NLS) を有する。

(2) *Nepro* ポリクローナル抗体の作製

Nepro の内在性の細胞内局在の解析や生化学的な解析に用いる特異的な抗体を得るため、GSTと*Nepro*の融合タンパク質を大腸菌で発現させて抗原として用い、ウサギに免疫した。得られた抗血清についてはアフィニティー精製を行った。

(3) *Nepro* 発現制御機構の解析

Nepro の発現を制御するDNA領域を同定するため、*Nepro* 遺伝子を含むBACクローンを用い、*Nepro* のゲノム領域に蛍光タンパク質をコードする *Venus* 遺伝子を連結したレポーターベクターを構築した。電気穿孔法を用いて、*Nepro* の発現が開始する胎生 10.5 日から消失する 13.5 日にかけてベクターを遺伝子導入し、1-3 日後に大脳を回収し、切片を作製し、*Venus* の蛍光を指標として、*Nepro* 発現細胞の分布を解析した。遺伝子導入された部位を示すため、*DsRed* を発現するベクターを共に導入した。

(4) *Nepro* 発現細胞の動態の解析

Nepro 発現細胞をマウス生体脳内で可視化するため、*Nepro* 遺伝子の発現制御下に *Venus* を発現するトランスジェニックマウスの作製を行った。今回同定した *Nepro* の発現制御領域を含むゲノムDNA断片の下流に *Venus* 遺伝子とSV40のイントロンとポリAをつないだコンストラクトを作製し、受精卵へのマイクロインジェクションを行った。

4. 研究成果

研究の主な成果

(1) *Nepro* の分子機作の解析

マウス胎児への電気穿孔法を用いて、*Nepro* を胎児の大脳で強制発現させると、脳室層の神経幹細胞は維持される。一方、*Nepro* の C 末端側の保存された領域を欠損させると神経幹細胞は維持できず、*Nepro* の siRNA を発現させた場合と同様に神経細胞への分化が促進された。このことから、C 末端側の保存された領域は *Nepro* の機能に必須であり、その欠損体はドミナントネガティブ作用を示すことが明らかとなった。

さらに、C 末端側領域内に存在する *Nepro* の核移行シグナルの必要性を明らかにするため、核移行シグナルの塩基性アミノ酸をアラニンに置換した変異体を発現させたところ、神経幹細胞を維持する活性が失われることが明らかになった。このことから核移行が *Nepro* の機能に重要であることが示唆された。

(2) *Nepro* ポリクローナル抗体の作製

抗原に用いる *Nepro* 蛋白は、*Nepro* と GST タグの融合タンパク質を大腸菌で発現させて、タンパクを可溶化し、グルタチオンセファロースカラムを用いて精製することにより調製した。また、変性タンパクについては SDS-PAGE により分離し、切り出したゲルを抗原として用いた。それらをウサギに 4 羽に免疫し、得られた抗血清についてはマウス組織切片を用いて免疫染色を行うことによりスクリーニングした。そのうち 1 羽のウサギの抗血清が神経幹細胞に特異的な染色を示したことから、アフィニティー精製を進め、免疫組織化学に使用できる抗体を得ることに成功した。その抗体を用いた組織化学的解析により、*Nepro* タンパク質はマウス大脳形成初期の神経幹細胞で発現することが明らかになった。

(3) *Nepro* 発現制御機構の解析

Nepro の発現制御機構を明らかにするため *Nepro* のゲノム領域を含むレポーターベクターを構築し、それらを電気穿孔法によりマウス脳組織で発現させたところ、*Nepro* 遺伝子の上流領域を含むコンストラクトにおいて *Nepro* の発現が高い胎生 11.5 日、12.5 日の大脳神経幹

細胞でVenusが強く発現した。このことから、*Nepro*遺伝子上流領域に*Nepro*の特異的発現を制御する領域が存在することが明らかになった。

データベース解析により*Nepro*遺伝子上流領域における転写制御に関わる因子の結合配列モチーフを検索したところ、Notchカスケード下流の転写制御因子の結合配列が複数存在することが明らかとなった。そこで、種間で保存された結合配列を含むDNA断片やその領域を欠損させたゲノムDNA断片に*Venus*遺伝子をつないだコンストラクトを作製し、電気穿孔法を用いてマウス脳組織で発現させて*Nepro*の特異的発現に必要な十分な領域の同定を行っている。

(4) *Nepro* 発現細胞の動態の解析

*Nepro*発現細胞をマウス生体脳内で可視化するため、明らかにした*Nepro*の発現制御領域を含むゲノムDNA断片の下流に*Venus*遺伝子とSV40のイントロンとポリAをつないだコンストラクトを作製し、受精卵へのマイクロインジェクションを行った。得られたマウスの組織片からDNAを抽出し、PCRによりtransgeneの有無を解析したところ、一系統のマウスにおいてtransgeneが確認された。得られた一系統については交配を進めており、今後発現細胞の解析を行う。さらにtransgeneを多コピー有する複数の系統を得ることを目指し、引き続きマイクロインジェクションを行っている。

得られた成果の位置づけと今後の展望

Nepro は既知の Notch シグナルの下流因子と多くの点で異なるユニークな遺伝子であり、その機能や制御を明確にすることは神経幹細胞の性質や制御機構を解明するうえで重要である。一つの大きな特色として、*Nepro* は既知の分化制御因子や Notch 関連因子の多くが持つ機能ドメインを持たないことから、既存の機構に拠らない新しい分子機能を持つと考えられる。本研究では、*Nepro* の C 末端側の機能ドメインを明らかにし、核移行シグナルの重要性を初めて示した。今後はこれらの機能ドメインと相互作用するタンパク質を同定することが急務の課題である。また、Hes や Hey などの Notch 下流

の転写制御因子との直接的相互作用の有無についても示す必要がある。

また、*Nepro* の発現は主に大脳形成初期の神経幹細胞に限られており、その分化抑制作用についても初期の神経幹細胞に特異的であることから、初期に特異的な性質を解明する鍵の因子である可能性が高い。本研究では今回、*Nepro* の特異的な発現を制御する領域の同定に成功した。これにより、初期特異的な性質をもたらす分子機構の解明が大きく進むと期待される。さらに、*Nepro* の発現制御領域を用い、*Nepro* の発現を mimic するトランスジェニックマウスの作製にも着手しており、得られたマウスを用いて、初期神経幹細胞の動態や他の遺伝子との関係についても明らかにすることができると考えられる。

謝辞：本研究を進めるにあたり、多大なご支援をいただきました千葉大学大学院医学研究院・斎藤哲一郎教授に深く感謝いたします。

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. Tatsuya Sato, Yuko Muroyama and Tetsuichiro Saito. 2013. Inducible gene expression in postmitotic neurons by an in vivo electroporation-based tetracycline system. J. Neurosci. Methods. 214:170-176. doi: 10.1016/j.jneumeth.2013.01.014. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. Yuko Muroyama, Tatsuya Sato and Tetsuichiro Saito. *Nepro* is required for the maintenance of neural progenitor cells in the early neocortex. 1st International Symposium "Neocortical Organization" 2012年3月、岡崎
2. Tatsuya Sato, Yuko Muroyama and Tetsuichiro Saito. Functional analysis of *Nepro*, a gene required for the maintenance of neocortex neural progenitor cells. 第34回日本神経科学学会大会、2011年9月、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室山 優子 (MUROYAMA YUKO)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：20422248

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：