

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700334

研究課題名(和文) 神経幹細胞において Musashi1 遺伝子を制御する転写因子の同定と機能の解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of transcription factors regulating Musashi1 in neural stem/progenitor cells

研究代表者

河瀬 聡 (Kawase, Satoshi)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：80468496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：Musashi1は神経幹細胞に特異的に発現し、その維持・増殖に関与するタンパク質である。脳腫瘍の増殖にも関与することから、Musashi1遺伝子の発現制御解析は重要であったが、明らかにされてはいなかった。本研究において、我々は神経幹細胞におけるMusashi1遺伝子の転写促進に、Rfx4が関与することを明らかにした。本研究成果は、神経幹細胞の維持に、繊毛形成を制御する転写因子、Rfx4が関与することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Musashi1 is specifically expressed in neural stem/progenitor cells and involved in their maintenance and proliferation. Because Musashi1 also plays a role in glioma cell growth, the analysis of transcriptional regulation of Musashi1 gene is important, however, the regulatory factor has been unclear. In this study, we showed that the transcription factor Rfx4 promote the transcription of Musashi1 gene. Our results suggest that the ciliogenic Rfx4 transcription factor regulates the maintenance of neural stem/progenitor cell.

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：神経発生 神経幹細胞 転写制御 エンハンサー Musashi1 Rfx

1. 研究開始当初の背景

(1) Musashi1(Msi1)は、無脊椎動物・脊椎動物において、種を超えて進化的に高度に保存された RNA 結合タンパク質である。胎生脳・成体脳において、神経系の細胞群を生み出す神経幹細胞・前駆細胞に発現が強く、神経幹細胞のマーカー遺伝子として用いられている (Sakakibara et al. *Journal of Neuroscience*, 1997)。人検体における脳腫瘍 (glioblastoma、astrocytoma、medulloblastoma)においても、Msi1 の発現細胞数と悪性度(Ki67 陽性細胞数)は正に一致することが報告されている (Toda et al. *Glia*, 2001)。

(2) Msi1 のノックアウトマウスは、水頭症を発症し、多くは 1~2 ヶ月で死亡する (Sakakibara et al. *PNAS*, 2002)。Msi タンパク質(Msi1、Msi2 両者)の発現抑制は、神経幹細胞の増殖を抑制する。Msi1 は下流標的配列[(G/A)UnAGU]を有する RNA に結合することが明らかにされ (Imai et al. *Mol. Cell. Biol.*, 2001)、その標的分子として、これまでに *m-Numb*、*p21* が同定された。これらの mRNA の翻訳を抑制することにより、神経幹細胞の維持や増殖を促進していると考えられている。Xenopus において、眼球の光刺激による神経伝達により Msi1 の発現量が減少し、視蓋における神経幹細胞の神経分化が起こる (Sharma et al. *Neuron*, 2010)。脳腫瘍においては、Msi1 を抑制した移植腫瘍細胞群は、有意に増殖が抑制され、移植個体の生存期間が顕著に延長することから、Msi1 の制御解析は、脳腫瘍の治療を目的とした研究としても重要であった (Muto et al. *PLoS one*, 2012)。

(3) Msi1 の発現機構を解析するために、我々は Msi1 制御領域の同定を行い、Msi1 遺伝子座の第 6 イントロン内に存在するエンハンサー領域(Msi1-6IE と命名、595 bp)の存在下において高い転写活性を持つことが明らかとなった (Kawase et al. *Molecular Brain*,

2011)。

2. 研究の目的

Msi1 が神経幹細胞マーカーであるだけでなく、機能的に神経幹細胞や脳腫瘍の維持・増殖に重要な遺伝子であることが明らかになる一方、Msi1 の発現がどのように制御されているかについては、これまでに報告が無かった。このため、Msi1 の発現がどのように制御されているのかについて、転写レベルで明らかにし、さらに同定した転写因子が神経幹細胞を維持するかについて、機能解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

Msi1-6IE を転写制御する転写因子を同定することにより、Msi1 の発現制御機構を明らかにし、さらにその転写因子の機能解析を行った。

(1) Msi1-6IE が内在性 Msi1 の発現制御を行うに十分な領域であるかについて検討するために、Msi1-6IE を発現制御領域として持つレポーター遺伝子(Msi1-6IE-ffLuc)を導入したトランスジェニックマウスを作製し、in vivo における発現解析を行った。

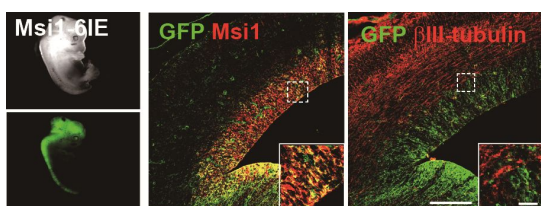
(2) Msi1-6IE の転写活性を担う転写因子結合配列を同定し、その転写因子による、レポーター遺伝子の転写活性化能とゲノム領域への結合について検討を行った。

(3) 転写因子の mRNA の発現解析を行い、神経幹細胞において Msi1 の発現と一致するものを候補として転写因子を同定した。さらに、この転写因子を検出する抗体を作製し、発生過程における発現解析を行った。

(4) この転写因子を in utero electroporation 法を用いて、発生過程の大脳皮質に発現させ、内在性 Msi1 の発現変化について解析し、さらに神経幹細胞の維持能力について機能的な解析を行った。

4. 研究成果

(1) **Msi1-6IE-ffLuc トランスジェニックマウスの解析**：胎生期において、6IE エンハンサー存在下で発現するレポーター遺伝子は、大脳から脊髄に至る中枢神経系で発現し、内在性の Msi1 を発現する神経幹細胞と共局在した（下図）。また、セルソーターにより分離した GFP 陽性細胞は、ニューロスフェアを形成し、神経細胞やグリア細胞への分化能を持つ神経幹細胞であることを確認した。



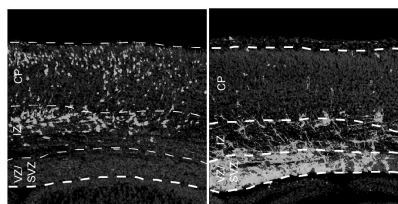
成体脳においては、神経幹細胞が存在する脳室下帯や海馬の顆粒細胞下帯において発現し、各々 Msi1 と局在が極めて一致したことから、この第 6 イントロンエンハンサーは、時空間的に Msi1 の発現を制御すると考えられる。

(2) **Msi1-6IE における転写制御解析**：595 bp の Msi1-6IE を分割して各領域のレポーター遺伝子を作製し、神経幹細胞においてレポーター活性を定量したところ、178 bp の転写責任領域が同定された。この領域の DNA 配列を、in silico 解析により転写因子結合配列の予測をすると、Sox と 2 カ所の並列する Rfx の転写因子結合サイトを含む、極めてコンセンサス配列に近い 7 サイトが同定された。全ての結合配列に各々変異を導入すると、2 カ所の Rfx、あるいは Sox 結合配列に変異を導入した際に、有意な転写活性の低下が見られた。両 Rfx 結合サイトが必須であるため、Rfx は 2 量体で転写制御すると思われる。2 量体を形成することが報告されている、Rfx1~Rfx4 の発現により、転写が有意に活性化することから、Msi1-6IE は Rfx による正の制御を受ける。

(3) **神経幹細胞における Rfx ファミリーの発**

現解析：Rfx は 7 つのサブタイプが存在し、繊毛形成に極めて重要な転写因子であるが、神経系における詳細な発現解析は行われていない。我々は、どの Rfx が神経幹細胞で発現しているのか、定量 PCR 法を用いて解析した。セルソーターにより分離した、胎生期の Msi-6IE レポーター陽性神経幹細胞において、Rfx1、Rfx3、Rfx4、Rfx7 が発現しており、Rfx4 は GFP 陽性細胞特異的に最も高発現していた。このため、Rfx4 抗体を作製し、局在を確認したところ、大脳から脊髄に至る中枢神経系において、神経幹細胞特異的に発現していることが明らかとなった。

(4) **Rfx4 の機能解析**：神経幹細胞において、Rfx4 がゲノムの Msi1-6IE 領域に結合することを、ChIP-PCR 法を用いて確認した。内在性の Msi1 は、脳室帯、脳室下帯に発現するが、Rfx4 を in utero electroporation 法を用いて、胎生 13 日の脳室下帯に発現させると、異所的な Msi1 の発現が中間体にも見られた。従って、Rfx4 は Msi1 第 6 イントロンエンハンサーを介して、Msi1 の転写制御を促進すると思われる。この時、Rfx4 を発現させた神経幹細胞は、極めて強く神経前駆細胞への分化を抑制することから、機能的に神経幹細胞を維持する（下図。GFP により標識される遺伝子導入細胞の、大脳皮質における挙動。胎生 13 日に in utero electroporation を行い、胎生 15 日観察した。左：コントロールベクター、右：Rfx4）。



Rfx は免疫細胞における、HLA-DRA 遺伝子の転写を制御する遺伝子として同定されたが、Rfx6 を除く Rfx ファミリーの発現は脳で最も高い。Rfx3 のノックアウトマウスは運動性繊

毛の形成が異常となり、Rfx4 のノックアウトマウスは 1 次繊毛形成異常により、水頭症や Shh シグナル不全による様々な異常が起こるが、Msi1 のノックアウトマウスも水頭症が起こることは興味深い。1 次繊毛形成の制御は、細胞周期と深い関連があることが知られており、Rfx による神経幹細胞の制御メカニズムについて、さらなる研究の進展が望まれる。最近、神経幹細胞を維持する Sox2、Brn2 が結合するゲノム領域に Rfx 結合サイトが多く含まれることが報告された (Lodato et al. *PLoS Genetics*, 2013)。Msi1-61E は、Rfx の他に、Sox2、Sox3 の結合が示されており、Rfx と Sox が協調的に神経幹細胞の維持に寄与するかについて、今後解析が期待される。ES 細胞では、Sox2、Oct4 を中心とした様々な転写因子を含むコアなネットワークが明らかとなりつつあり、iPS 細胞を含むその制御機構の解明に重要な知見となっているが、神経幹細胞については現在未知な点が多い。本研究成果より考察すると、Rfx が神経幹細胞においてコアな転写因子ネットワークの一端を担う可能性があるだろう。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

(1) Satoshi Kawase
Identification of a novel intronic enhancer responsible for the transcriptional regulation of *Musashi1* in neural stem/progenitor cells
Society for Neuroscience annual meeting 2012 (Sfn)
2012 年 10 月 15 日
ニューオーリンズ、アメリカ合衆国

(2) Satoshi Kawase
Identification of a novel intronic enhancer responsible for the transcriptional regulation of *Musashi1* in

neural stem/progenitor cells
International Society for Stem Cell
Research 10th annual meeting (ISSCR)
2012 年 6 月 13 日
横浜

[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 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]

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

河瀬 聡 (KAWASE SATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号 : 80468496