

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700354

研究課題名(和文) 神経発生における遺伝子発現モードによる神経分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Dynamic gene expression during mammalian neurogenesis.

研究代表者

下條 博美 (Hiromi, Shimojo)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定拠点助教

研究者番号：40512306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では神経分化に伴うプロニューラル遺伝子Ngn2とその下流遺伝子の発現動態を明らかにし、細胞運命の決定におけるその意義を明らかにすることを目的としている。単一細胞レベルでの遺伝子発現の可視化によってNgn2とその下流遺伝子の発現は様々な発現動態を示すことが明らかとなった。またNgn2の発現を人工的に操作し、Ngn2を持続発現させると振動発現している時と比べて、神経分化が早まることが明らかとなった。以上の結果よりプロニューラル遺伝子と下流遺伝子の様々な発現動態を組み合わせることで、細胞分化のタイミングを制御している可能性が示唆された。以上の成果は第36回日本分子生物学会等の学会で報告した。

研究成果の概要(英文)：Previously, we found that the expression of proneural gene Ngn2 showed various expression dynamics during neuronal differentiation, suggesting the possibility that different expression dynamics induce the different cell fates. To address this issue, we investigated the expression dynamics of Ngn2 and Ngn2 target genes during neuronal differentiation. Real-time imaging revealed that the expression of Ngn2 and Ngn2 target genes showed various expression dynamics during neuronal differentiation. Furthermore, opto-genetical manipulation of Ngn2 expression revealed that sustained expression of Ngn2 induced the expression of Ngn2 target gene Tbr2 rapidly and led to premature down-regulation of Tbr2. This result suggested that oscillatory expression of Ngn2 is important for proper Tbr2 expression during neuronal differentiation. From these results, we concluded that the combination of various gene expression dynamics control the proper timing of cell differentiation during neurogenesis.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経発生 遺伝子発現ダイナミクス プロニューラル遺伝子 神経幹細胞

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は多種多様なニューロンやグリア細胞から構成され、非常に複雑な構造を持つ。哺乳動物の終脳を構成する莫大な数のニューロンやグリア細胞のほとんどは、一部の領域を除き生後間も無く終了する。神経発生過程は厳密にコントロールされており、前駆細胞増殖期、ニューロン産生期、グリア細胞産生期の順に進行する。神経前駆細胞から分化したニューロンは増殖せず、その数を増やすことができないので、脳を構成する十分な数と種類のニューロンを産生するためには、神経発生後期まで未分化な前駆細胞を維持することが非常に重要である。こうした神経発生過程には、転写因子やシグナル伝達因子など様々な因子が関与していることが、これまでの **loss-of-function**、**gain-of-function** の解析により明らかにされてきた。**Mash1** や **Neurogenin (Ngn)** といったプロニューラル遺伝子は神経前駆細胞に発現し、神経分化を促進することが知られている転写因子である。

私たちは以前ライブイメージングにより単一細胞レベルで遺伝子発現を可視化することによって、未分化な神経前駆細胞ではプロニューラル遺伝子 **Neurogenin2 (Ngn2)** の発現が増減を繰り返し短時間周期の発現振動を示すことを明らかにした。さらに細胞が分化した後では **Ngn2** の発現は持続発現を示すことを明らかにした。この結果は同じ因子であっても異なる発現モードを示すことによって、異なる細胞運命をたどる可能性が示唆されたが、その詳細なメカニズムは不明な点が多い。

2. 研究の目的

以上のような背景をふまえて、本研究では遺伝子の発現モードという観点から神経分化過程を捉えることを目的とし、単一細胞レベルで遺伝子発現を可視化することで、神経分化に関わる様々な遺伝子の発現ダイナミクスを明らかにする。とくに神経分化を促進するプロニューラル遺伝子の発現とその下流遺伝子の発現に着目し、神経前駆細胞から神経分化が誘導された時のこれらの遺伝子の発現ダイナミクスがどのように変化するか明らかにする。また、上流遺伝子であるプロニューラル遺伝子の発現ダイナミクスと、下流遺伝子群の発現ダイナミクスとの相関や、プロニューラル遺伝子の発現ダイナミクスが下流遺伝子群の発現誘導にどのように関与するのか明らかにする。さらに、光刺激によって遺伝子発現を誘導する系を用いて、プロニューラル遺伝子の発現を人工的に操作し、下流遺伝子の発現動態や細胞の増殖、分化の変化をモニターすることによって、遺伝子発現動態の細胞増殖・細胞分化の制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、マウス終脳における神経発生過程において遺伝子発現を単一細胞レベルで可視化する系を用いて以下の実験を行った。

(1) プロニューラル遺伝子 **Ngn2** に対する下流因子群の反応性の違いの検討。

Ngn2 の発現とその下流遺伝子群の発現誘導との相関を明らかにするために、培養細胞を用いて **Ngn2** を発現誘導し、各下流遺伝子の発現がどのタイミングで誘導されてくるか明らかにする。

(2) 神経発生過程のマウス終脳における、プロニューラル遺伝子 **Ngn2** とその下流因子群の発現動態の同定。

神経前駆細胞およびマウス終脳のスライス培養等を用いて、神経前駆細胞から神経細胞へと分化する過程において、**Ngn2** とその下流遺伝子群の発現動態がどのように変化するか明らかにする。

(3) 同一細胞内における **Ngn2** とその下流因子群の発現の同時モニター。

マルチカラーのルシフェラーゼレポーターを用いることで、**Ngn2** とその下流遺伝子の発現を同一細胞でモニターする。**Ngn2** の発現動態の変化に伴って、下流遺伝子の発現がどのように変化するか明らかにする。

(4) **Ngn2** の人工的な遺伝子発現誘導による下流遺伝子群の発現動態の変化および細胞動態の変化の解析。

光刺激によって遺伝子発現を誘導する系を用いて、神経前駆細胞において **Ngn2** を様々な発現動態（振動パターンや持続発現モード）で誘導し、下流遺伝子の発現誘導ならびに前駆細胞の増殖や分化といった細胞動態にどのような影響があるか明らかにする。

以上の解析により、神経分化過程におけるプロニューラル遺伝子とその下流遺伝子群の発現動態の意義を明らかにすることを目的とする。

4. 研究成果

(1) **Ngn2** の下流遺伝子群は、様々なタンパク安定性を示し、さらに **Ngn2** に対して様々な反応性を示した。

①タンパク安定性：

培養細胞および、マウス胎子脳の神経前駆細胞における、**Ngn2** の下流因子群 (**D111**, **Tbr2**, **Neurod1**, **Neurod4**, **Neurod6**) のタンパク安定性を検討した。これらの下流遺伝子は全て **Ngn2** によって直接的に発現が制御されていることが示されている因子群である。しかしながら、神経発生過程のマウス終脳におけるその発現には多様性が認められる。マウス終脳においては、未分化な前駆細胞が大脳皮質の一番内側の層 (**VZ**) に存在し、細胞分化に伴って、より外側の層 (**SVZ**, **IZ**, **CP**) に移動することが知られている。つまり、発現領域

が異なるということは、それぞれの遺伝子の発現するタイミングが異なることが考えられる。D111はNgn2同様、VZに発現し未分化な神経前駆細胞に発現することが知られているが、そのタンパク安定性はNgn2同様不安定である。一方、より分化した細胞に発現するTbr2やNeurod1などのタンパクはより安定であることが明らかとなった。

②Ngn2に対する反応性：

培養細胞を用いてNgn2を発現誘導し、下流因子群の発現を経時的にモニターした。その結果、D111はNgn2の発現誘導とほぼ同じタイミングで発現が誘導されてくる(early-response)のに対して、Neurod1やNeurod6の発現はNgn2の発現誘導のち数時間たたないと誘導されない遅い反応(late-response)を示すことが明らかとなった。つまり、下流遺伝子のNgn2に対する反応性には多様性があることが明らかとなった。

(2) Ngn2 および Ngn2 の標的遺伝子群の発現は、神経前駆細胞において様々な発現モードを示した。

神経分化に伴うNgn2およびNgn2の下流遺伝子群の発現動態を明らかにするために、不安定化ルシフェラーゼを用いて作製した各遺伝子のレポーターをマウス終脳の神経前駆細胞に導入し、それぞれの発現を単一細胞レベルでライブイメージングを行った。その結果、より未分化な細胞に発現が認められるD111やTbr2はその発現が振動パターンや持続発現モードなど、様々な発現パターンを示し、Ngn2の発現モードと類似していた。一方、Neurod1やNeurod6といったより分化が進んだ細胞に発現が認められる因子の発現は、ほとんどの細胞で持続発現を示し、より安定的な発現モードを示すことが明らかになった(図1)。

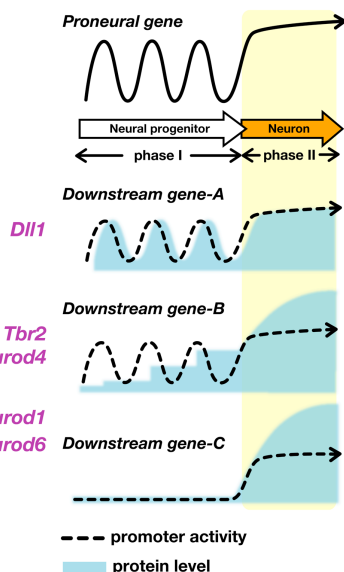


図1 Ngn2と下流遺伝子群の神経分化に伴う発現動態

(3) Tbr2タンパクはNgn2の発現に伴って、神経前駆細胞において徐々に蓄積する。

大脳皮質の発生過程においては、神経前駆細胞からニューロンが産生される際に、その中間段階の細胞であるintermediate progenitorの過程をたどることが報告されている。Intermediate progenitorは神経前駆細胞よりも分化が進んだ細胞ではあるが、数回ほどの分裂能を有し、大脳皮質において産生されるニューロンの数を増幅していることが知られている。Ngn2の下流因子の一つであるTbr2は、神経前駆細胞からintermediate progenitorへの分化誘導とその性質の維持に機能しており、Tbr2をノックアウトするとintermediate progenitorの産生が抑制され、最終的に生み出されるニューロンの数も大幅に減少することが報告されている。

これまでの可視化等の結果から、Tbr2の発現はNgn2同様、神経前駆細胞で振動パターンや持続発現モードなど様々な発現動態を示すこと、またそのタンパクは前駆細胞において安定なタンパクであることから、Ngn2が発現振動しTbr2の発現を誘導している間に、Tbr2タンパクが神経前駆細胞で蓄積していくことが考えられた(図1)。

そこで、Ngn2の転写活性レポーターとTbr2のタンパクレポーターを同一細胞に導入し、それぞれの発現をリアルタイムに追跡を行った。その結果、Ngn2が発現振動モードを示す間も持続発現を示す間も、Tbr2タンパクが神経前駆細胞で徐々に蓄積することが明らかとなった。

(4) 神経前駆細胞において Ngn2 を持続発現させると、下流遺伝子 Tbr2 の発現は早期に誘導されるとともに早期に消失した。つまり、intermediate progenitor の分化誘導が早期に起こり、早期にニューロンへと分化する。

①神経前駆細胞におけるNgn2の発現振動の意義を明らかにするために、光刺激によって遺伝子発現を操作し、神経前駆細胞でNgn2の発現を持続発現させた。同時にNgn2のターゲットでありintermediate progenitorのマーカであるTbr2のレポーターの発現をリアルタイムに可視化した。その結果、Ngn2が持続発現すると、Ngn2が発現振動している細胞と比べて、Tbr2の発現は早期に発現誘導され、さらに早期にその発現が消失した(図2)。

②さらに、in vivoでのNgn2の発現振動の意義を明らかにするために、Ngn2をマウス終脳の神経前駆細胞で持続発現させると、in vitroで得られた結果同様、Tbr2の発現が早期に誘導されたが、早期に消失した。このことは、Ngn2が持続的に発現していた細胞では、早期にintermediate progenitorからニュー

ロンへの分化が誘導されたことを意味する。
以上の結果より、神経発生過程において Ngn2 が発現振動することで徐々に Tbr2 タンパクを蓄積させ、未分化な神経前駆細胞および intermediate progenitor として維持される時間を稼いでいたことが考えられた (図 2)。

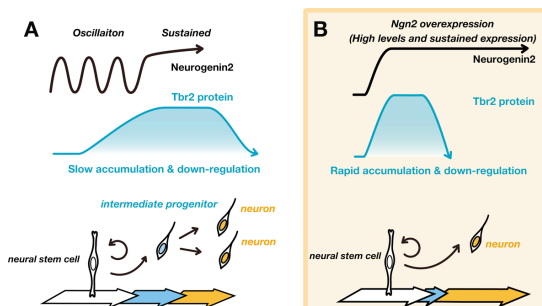


図2 Ngn2が持続発現するとTbr2の発現消失のタイミングが早まり、早期にニューロン分化が引き起こされる。(A) Ngn2が発現振動している場合。(B) Ngn2を持続発現させると、Tbr2 陽性の intermediate progenitor である時間が短くなり、前駆細胞は早期に神経細胞へと分化する。

これらの結果より、神経発生過程においてプロニューラル遺伝子やその下流遺伝子群の発現が様々な発現ダイナミクスを示すことによって、細胞分化のタイミングをコントロールしてい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 4 件)

- ① Imayoshi I, Shimojo H, Sakamoto M, Ohtsuka T and Kageyama R., Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis., *Cell Mol Life Sci.*, 70., 2013, 2045-57., DOI: 10.1007/s00018-012-1151-x, 査読有。
- ② Shimojo H, Harima Y, Kageyama R., Visualization of Notch signaling oscillation in cells and tissues., *Methods Mol Biol.*, 1187, 2014, 169-179., DOI: 10.1007/978-1-4939-1139-4_13, 査読有。
- ③ Harima Y, Imayoshi I, Shimojo H, Kobayashi T, Kageyama R., The roles and mechanism of ultradian oscillatory expression of the mouse Hes genes., *Semin Cell Dev Biol.*, 34, 2014, 85-90., DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.04.038, 査読有。
- ④ Kageyama R, Shimojo H, Imayoshi I., Dynamic expression and roles of Hes factors in neural development., *Cell Tissue Res.*, 359, 2015, 1250133, 査読有。

[学会発表] (計 8 件)

- ① 下條博美 Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during neural development. Swiss-Japanese Developmental Biology Meeting, 2012, 京都府京都市
- ② 下條博美 Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during neural development. 第7回 Notch シグナル研究会, 2013, 静岡県三島市
- ③ Hiromi Shimojo and Ryoichiro Kageyama, The significance of dynamic proneural gene expression in neural development. Neuro 2013 Satellite Symposium: Molecular and Cellular Mechanisms of brain development and evolution, 2013, 京都府京都市
- ④ Hiromi Shimojo and Ryoichiro Kageyama, Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during neural development, The 61st NIBB conference: Cellular Community in Mammalian Embryogenesis, 2013, 愛知県岡崎市
- ⑤ Hiromi Shimojo, Yukiko Harima, Yuki Maeda, Toshiyuki Ohtsuka, Hitoshi Miyachi and Ryoichiro Kageyama, Dynamic gene expression during neural development, 第36回日本分子生物学会年会, 2013, 兵庫県神戸市
- ⑥ Hiromi Shimojo, Akihiro Isomura, Toshiyuki Ohtsuka, Hitoshi Miyachi and Ryoichiro Kageyama, Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during development, 第37回日本分子生物学会年会, 2014, 神奈川県横浜市
- ⑦ Hiromi Shimojo, Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during development, 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会/第92回日本生理学会大会 合同大会, 2015, 兵庫県神戸市
- ⑧ Hiromi Shimojo, Akihiro Isomura, Toshiyuki Ohtsuka, Hitoshi Miyachi and Ryoichiro Kageyama, Dynamic expression of Notch ligand Dll1 during development, CDB Symposium 2015, 2015, 兵庫県神戸市

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下條 博美 (SHIMOJO, Hiromi)
京都大学・物質－細胞統合システム拠点・
特定拠点助教
研究者番号：40512306

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：