

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650077

研究課題名(和文) 生きた個体を用いて脳形成における神経細胞産生の時間的空間的制御機構を解明する

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms that regulate neural generation spatio-temporally in the brain using living embryos

研究代表者

瀬原 淳子 (Sehara-Fujisawa, Atsuko)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：60209038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュ中脳視覚統合領域である視蓋の形成をモデルとし、神経前駆細胞には、基底側・脳室側間でのエレベーター運動後に脳室側で分裂するタイプ、基底側の神経層の近傍sub-basal領域で移動を伴わずに分裂するタイプの2つの分裂様式があり、後者が神経細胞の産生につながることを示した。sub-basal領域における神経細胞の産生にはErbBシグナルが関与し、膜型増殖因子NRG1 TypeIIがそのリガンドであることを示した。一方NRG1は、プロテアーゼによる細胞外ドメイン切断により制御される。NRG1の切断評価プローブを開発し、細胞外ドメイン切断がNRG1の時間的空間的な制御を担うことを示した。

研究成果の概要(英文)：Post-mitotic neurons are generated from neural progenitor cells (NPCs) at the expense of their proliferation. Live imaging revealed how production of post-mitotic neurons from neural progenitor cells is regulated in the sub-ventricular zone (SVZ). This neurogenesis depends on Neuregulin 1 type II (NRG1-II)-ErbB signaling. Moreover, we developed a novel fluorescent probe, which enables us to monitor the activity of the NRG1 ectodomain shedding. Expression of the probe in zebrafish embryos revealed involvement of the NRG1 ectodomain shedding in the spatio-temporal regulations of its signaling, .

研究分野：発生生物学・細胞生物学

キーワード：発生・分化 組織・細胞 再生医学 生体分子

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物において神経上皮シートから3次元の脳組織が形成される際、神経幹細胞から神経前駆細胞が生じ、さらにそれらが分裂して神経細胞が生ずるが、分裂を終えた神経細胞が産生・蓄積する仕組みの研究は、脳発生研究の中で遅れている。脳の発達において、神経前駆細胞 (NPC) は増殖し神経を産み出す。NPC の増殖の程度や神経産生のタイミングの制御が、脳の大きさや形の重要な要因となるが、そこに細胞外シグナリングが関与するかどうか、それともどれだけ増殖して分化するかは、もっぱら神経細胞自律的に決まっているのか、という大きな疑問は、このプロセスに関与する細胞外シグナルが同定されておらず、不明であった。その理由には神経幹細胞から前駆細胞産生に多くの注目が集まっていることだけでなく、マウスやラットでは、脳形成初期を生きた状態で可視化するのが困難であることが挙げられる。

さらに、神経系で機能する ErbB リガンドであるニューレグリンはプロテアーゼ制御を受けることは知られていたが、それが細胞間シグナリングの時間的空間的な制御に関与することは、示唆あるいは仮定されているものの、これまで証明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、NPC の増殖の程度や神経産生のタイミングの制御に細胞間シグナリングが関与するかどうか、関与するとすればどのようなシグナル分子が関与するのかを解明することを目的とした。脊椎動物の脳形成機構として、ゼブラフィッシュ中脳視覚統合領域である視蓋の形成をモデルとして、この問題に取り組んだ。

また、神経系で機能する膜型増殖因子ニューレグリンのエクトドメインが、ニューレグリン-ErbB シグナリングの時間的空間的制御に関与することを証明すること、ニューレグリンの切断活性をもつ

ADAM プロテアーゼを始め、いくつかの ADAM ファミリープロテアーゼの役割と機能に関して調べ、プロテアーゼの側からの検討をおこなうことを、もうひとつの目的とした。

3. 研究の方法

神経細胞産生の時間的空間的制御に関与するプロセスと機構を明らかにすべく次のような研究を行った。

(1) NPC と神経細胞が異なる蛍光タンパク質でラベルされたトランスジェニックフィッシュ (Tg) を用いて、自己複製タイプ・神経細胞産生タイプの分裂を区別し、後者が時間的・空間的にどのように分布し、変化するかを調べる。

(2) 神経系で発現することが知られる ErbB リガンドであるニューレグリン (グリプ増殖因子) に着目し、いずれかのアイソフォームが、NPC から神経細胞の産生に関与するかどうかを検討した。

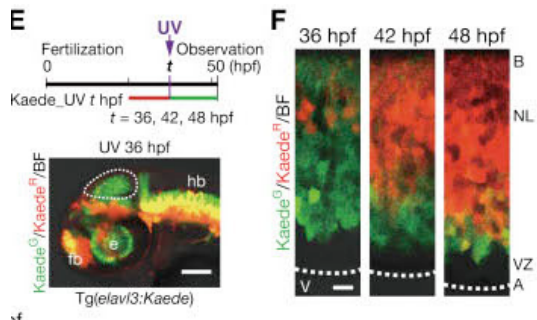
(3) 膜型ニューレグリンのエクトドメインシグナリング活性をモニターできるプローブを開発し、これを神経細胞で発現させることにより、その切断がニューレグリンシグナルの時間的空間的制御に寄与しているかどうかを検討した。

4. 研究成果

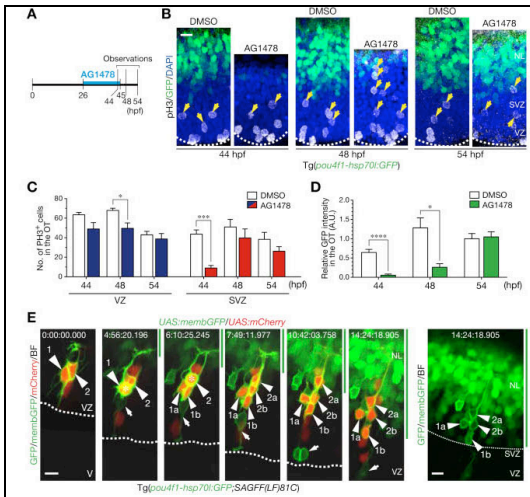
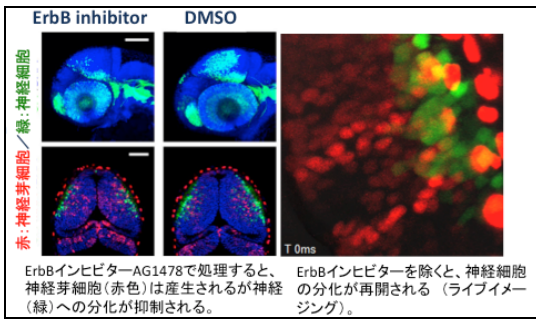
ニューレグリン-ErbB シグナリングは神経前駆細胞から神経細胞の産生に関与する

*neurogenin-RFP* で神経前駆細胞が、*neurod-GFP* で神経細胞がラベルされるトランスジェニックフィッシュ *TgBAC (ngn1:nRFP;neurod:EGFP)* (それぞれ生理研東島眞一先生・名古屋大日比正彦先生より供与)、および視蓋の幹細胞・前駆細胞・神経細胞系譜で特異的に Gal4 が活性化されるエンハンサートラップライン (遺伝研川上先生より供与) などを用いて、これらの細胞を可視化し、自己複製を行う分裂と神経細胞を産生する分裂とがそれぞれいつどこ (基底側-脳室側の極性から見た位置) で行われるかを検討した。

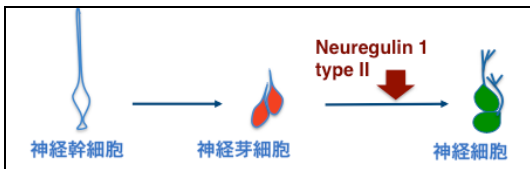
その結果、生きた脳では、受精後ほぼ決まった時間に脳の基底側 (外側) から細胞分裂を終えた神経細胞の産生が始まり、そこから脳室側 (内側) に向けて産生された脳細胞が蓄積していくことを見いだした (下図)。



さらに、NPC から神経細胞ができる過程で ErbB インヒビター AG1478 の一過的な効果の検討、いくつかのニューレグリンアイソフォームおよびレセプターである ErbB4 に対するアンチセンスモルフォリーノの効果の検討を行い、このような秩序ある神経細胞の産生がニューレグリン type II-ErbB シグナルに依存することを示した。



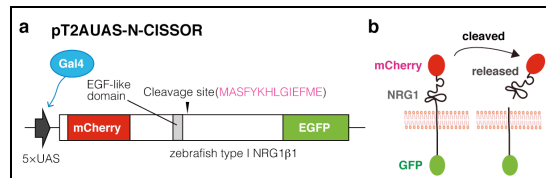
ニューレグリンの膜貫通領域に対するアンチセンスモルフォリンを用いることにより、神経細胞への分化には、膜型ニューレグリンが関与することも明らかとなった (T. Sato *et al.*, PLOS ONE, 2015)。



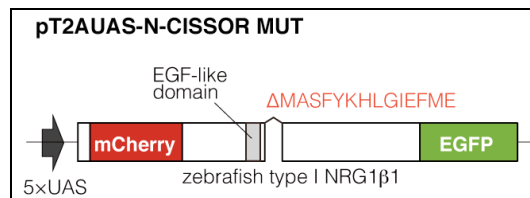
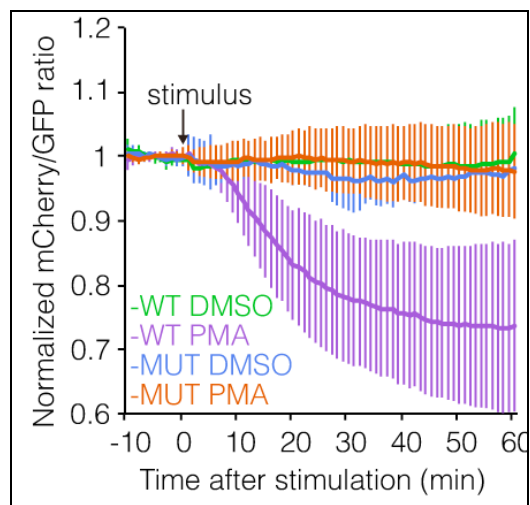
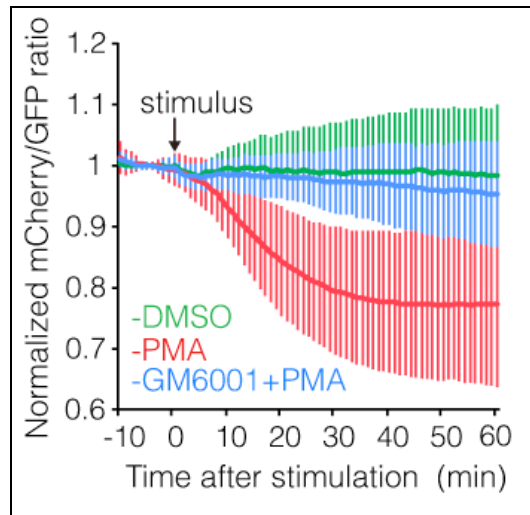
(2) 膜型ニューレグリンのエクトドメインシエディングは、ニューレグリンシグナルの時空間的制御に寄与することを可視化プローブを作成して証明

一方、膜型ニューレグリンは、ADAM19やBACE1などの種々のプロテアーゼによって切断され、その細胞外ドメインが可溶性リガンドとして働くことにより、切断のタイミング制御による時期特異的な活性化、および切断場所の制御による空間的な制御という二つのポテンシャルを持ち得る。

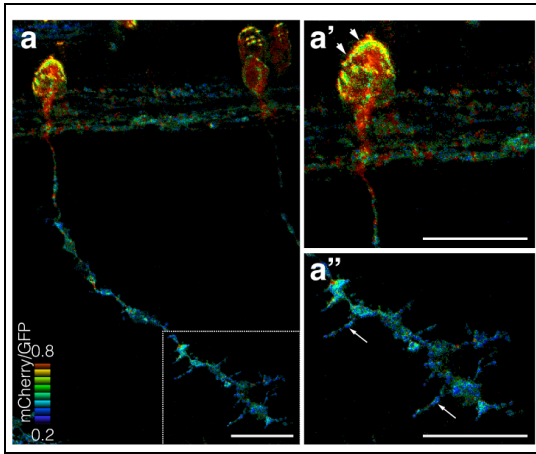
このようなプロテアーゼ制御の意義を検証するため、膜型ニューレグリンを蛍光蛋白質で標識したプローブを作成し、それを培養細胞やゼブラフィッシュ個体で発現させた。



そして、蛍光強度を計測することにより、ニューレグリンがいつどこで切断されるかを調べることができた。さらに、その切断がプロテアーゼインヒビター感受性であるのかも検討した。



その結果、ゼブラフィッシュ胚の運動ニューロンでこのプローブを発現させることにより、切断活性が、軸索特異的に見られることを見出した。



この結果は、ニューレグリンのエクトドメインシェディングが、そのシグナル産生を時間的・空間的に制御していることを証明するとともに、作成したニューレグリンエクトドメインシェディング活性プローブの有効性を示したものである(Kamesaki A., *et al.*, 投稿中)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Xiao Y, Faucher A, Pola-Morell L, Heddleston J, Liu T, Chew T, Sato F, Sehara-Fujisawa A, Kawakami K, \*Lopez-Schier H.: High-resolution live imaging reveals axon-glia interactions during peripheral nerve injury and repair in zebrafish. *Disease Models & Mechanisms*, 8(6):553-564 2015 (DOI: 10.1242/dmm.018184.)
2. Sato T, Sato F, Kamezaki A, Sakaguchi K, Tanigome R, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A: Neuregulin 1 type II-ErbB signaling promotes cell divisions generating neurons from neural progenitor cells in the developing zebrafish brain. *PLoS ONE*, 10(5):e0127360 2015 (DOI:10.1371/journal.pone.0127360)

[学会発表] (計 6 件)

1. Kamezaki A, Sato F, Aoki K, Asakawa K, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A: Development of a probe to monitor ectodomain shedding of Neureglin 1 in vitro and in vivo. International FishMed Conference on Zebrafish Research 2016, Warsaw, Poland 2016.3.18
2. 佐藤智美、佐藤文規、亀崎青沙、坂口和弥、谷米竜馬、梶原健、永島雅文、川上浩一、瀬原淳子: ニューレグリン-ErbB シ

グナルは脳室下帯において基底前駆細胞から神経細胞を生み出す分裂を促進する. BMB2015, 神戸市 2015.12.4

3. Sato T, Sato F, Kamezaki A, Sakaguchi K, Tanigome R, Kawakami K, Sehara A: NRG1-ErbB4 signaling promotes generation of neurons from neural progenitor cells in the developing brain. 第 58 回日本神経化学会大会, さいたま市 2015.9.13
4. Sato F, Nishimura D, Hori S, Arai H, Hiramuki Y, Sogabe M, Kuriki M, Choi M, Wang Z, Kawahara A, Kawakami K, Sehara-Fujisawa A: What can we learn by exploring the interstitial space of skeletal muscle during development and regeneration? 48<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, つくば市 2015.6.5
5. Tomomi Sato, Fuminori Sato, Aosa Kamezaki, Koichi Kawakami, Atsuko Sehara-Fujisawa: Exploring Mechanisms of Neurogenesis in the Developing Brain with Live Zebrafish Embryos. 第 66 回日本細胞生物学会大会, 奈良市 2014.6.12
6. 瀬原淳子: 神経細胞分化を制御する脳内細胞外環境. 第14回日本抗加齢医学会総会, 大阪市 2014.6.8

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: NRG1の切断検出用プローブ、NRG1の切断検出用プローブをコードするポリヌクレオチド、NRG1の切断検出用プローブの発現ベクター、NRG1の切断検出用形質転換体、NRG1の切断検出方法、およびNRG1切断酵素の阻害剤のスクリーニング方法

発明者: 瀬原淳子、亀崎青沙、佐藤文規、青木一洋、川上浩一(学外)

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: 特願2016-053156

出願年月日: 2016年(平成28年)3月16日

国内外の別: 日本国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/rc03/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀬原 淳子 (SEHARA-FUJISAWA, Atusko)  
京都大学・再生医科学研究所・教授  
研究者番号: 60209038

### (2) 研究分担者

佐藤 文規 (SATO, Fuminori)  
京都大学・健康長寿社会の総合医療開発  
ユニット・特定助教  
研究者番号: 10588263