

先端科学技術研究科 博士論文要旨

所属研究室 (主指導教員)	発生医科学研究室 (笹井 紀明 准教授)		
学籍番号	1821011	提出	令和2年4月20日
氏名	角谷 美典		
題目	Sonic Hedgehog と mTOR シグナルの協調による、 神経管底板領域における細胞分裂の制御		
<p>動物個体が正常に発生し、各器官が正常な機能を発揮するためには、器官を構成する様々な細胞が最適な量比を持たなければならない。脊椎動物の発生初期に形成される神経管は、将来、脳や脊髄を構成する中枢神経系の原基となる器官である。形成直後の神経管はほぼ均一な性質を持つ前駆細胞から構成されているが、発生に伴って性質の異なる多様な細胞が出現し、それらが神経管内に規則的に配置される。神経管は神経前駆細胞が豊富に存在する脳室帯と分化した神経細胞から構成される外套層、背側に位置する蓋板そして腹側に位置する底板などの領域から構成される。</p> <p>これらの各領域の細胞数は厳密に調節されており、この調節は「各前駆細胞の分化方向の決定」と「増殖・分化のプログラム」の共役によって果たされる。細胞の運命決定は、蓋板から分泌される Wnt や BMP、底板から分泌されるソニック・ヘッジホッグ (Sonic Hedgehog; Shh) が形成する濃度勾配に依存する。前駆細胞はこの濃度勾配を検知することにより自身の遺伝子発現を変化させ、その結果それぞれの細胞の運命が決定されていく。一方、運命が決定したそれぞれの前駆細胞は独自の増殖プログラムを持っており、特定の細胞数に到達するまで増殖し、その後分化していく。このようにして、器官内の各領域の相対的位置や細胞数が決定されていくのである。</p> <p>さて、Shh を分泌する底板領域はシグナリングセンターとして重要な働きを担い、神経管内の層構造の形成を司るだけでなく、分化した神経細胞の軸索ガイダンスや神経管全体の形態形成などにも関与するなど、多様な働きを持っている。興味深いことに、神経管底板領域は他の領域の細胞の分化、増殖を制御するが、底板領域自体の細胞はほとんど細胞増殖を行わず、その細胞数は発生に伴い大きく変化することはない。底板領域のサイズが一定に保持される生理的意義についてはこれまで報告がないが、シグナリングセンターである底板領域が量的な一定性を持つことが分泌されるシグナル量の定量性の維持に必要で、最終的には神経管全体の各領域が適切な量的バランスを持つために必要であると考えられる。底板領域は非神経性のグリア性細胞から構成されており、細胞周期はほぼ停止状態にあるとされている。実際に、細胞周期の M 期マーカーであるリン酸化ヒストン 3 (phospho-Histone3; pHH3) の局在を、神経管の背腹軸断面で解析すると、神経管の成長に伴う各発生段階で、底板領域でその局在が観察できなかった。このように底板領域における細胞増殖が抑制されていることは確認できたが、その分子機構は未だ明らかではない。そこで本研究では、神経管底板領域の機能のうち、細胞分裂を抑制する分子機構に解析の焦点を絞り研究を進めた。</p>			

先行研究において、ニワトリ胚から作成した未分化神経組織片 (neural explants) を Shh で処理して底板に分化させた細胞における発現遺伝子が解析された。そこで本研究では、このデータを用いて底板特異的に発現する遺伝子を探索し、その結果ユビキチンリガーゼ RNF152 (Ring finger protein 152) を単離した。RNF152 は低分子 GTP アーゼである RagA のユビキチン化することにより mTOR (mechanistic target of rapamycin) シグナルを負に制御することが知られている。一方、mTOR は細胞増殖に必須の役割を果たすと考えられており、実際に構成的活性化型の mTOR を神経管内に強制発現すると、神経前駆細胞の増殖が亢進することが明らかになった。そこで、RNF152 が RagA のユビキチン化を介して mTOR シグナルを阻害し、結果として細胞増殖を抑制しているという仮説を立て、RNF152 の底板領域における役割、さらに mTOR シグナルや細胞増殖の関係を明らかにすることを試みた。

まず RNF152 の機能を知るため、ニワトリ胚神経管にエレクトロポレーション法を用いて RNF152 遺伝子を強制的に発現してその影響を解析したところ、たしかに神経前駆細胞の増殖が著しく抑制された。また、mTOR のシグナル活性の指標であるリン酸化 p70S6K (phospho-p70S6K; p-p70S6K) とその下流因子であるリン酸化 S6 リボソームタンパク質 (phospho-S6; pS6) を抗体染色により解析したところ、たしかに底板領域で両者が特異的に抑制されたことから、mTOR シグナルが底板領域特異的に抑制されることが示唆された。

ところで、底板領域には Shh シグナルのターゲット遺伝子であるフォークヘッド型転写因子 FoxA2 が発現しており、FoxA2 を神経管に強制発現すると、神経管の細胞増殖がほぼ完全に停止し、しかも p-p70S6K や pS6 の発現が抑制されることが明らかになった。したがって FoxA2 は mTOR シグナルを抑制することが明らかになった。さらに、この増殖停止と mTOR シグナルの抑制は、構成的活性化型の mTOR を共導入することにより救済された。したがって、底板領域において、mTOR シグナルは Shh シグナルの下流で、FoxA2 を介して抑制されることが示された。

次に、RNF152 と FoxA2 の関連を明らかにするため、FoxA2 を強制発現した神経前駆細胞において mTOR シグナルに関連する遺伝子の発現を解析したところ、発現解析を行った 15 種類の遺伝子のうち RNF152 の発現のみが FoxA2 によって誘導されることが明らかになった。このことから、RNF152 が FoxA2 の下流遺伝子であることが示唆された。

また、RNF152 が底板の細胞分裂抑制に必須であるかを検証するため、RNF152 をターゲットとする siRNA を合成し、底板に導入することによって機能喪失実験を行った。その結果、RNF152 の発現抑制によって p-p70S6K や pS6 の発現が底板で異所的に観察されたばかりでなく、底板細胞で異所的な細胞分裂が観察される結果となった。このことから、RNF152 が mTOR シグナルを抑制するための責任遺伝子であり、mTOR シグナルを介した底板特異的な細胞増殖を抑制するために必須の役割を果たすことが明らかになった。

底板領域は Shh を分泌して神経管全体の成長を促すだけでなく、自身も自己分泌 (autocrine) の様式により Shh のシグナルを受け取る。一方、Shh シグナルによって遺伝子発現が惹起される FoxA2、さらにその下流で発現する RNF152 が RagA のタンパク質をユビキチン化することにより mTOR シグナル伝達を抑制する。本研究により、底板領域では Shh シグナル経路の下流で発現した RNF152 が mTOR シグナル経路をブロックするという、Shh と mTOR の両経路のバランスを制御する機構により細胞数が一定になる仕組みの一端が明らかとなった。

以上の解析を通して、本論文では、脊椎動物の中樞神経系における領域特異的な細胞増殖の制御機構について、Shh シグナルと mTOR シグナル両者の共役関係に焦点を当てて議論を行う。

Sonic Hedgehog と mTOR シグナルの協調による、
神経管底板領域における細胞分裂の制御

角谷 美典

奈良先端科学技術大学院大学

先端科学技術研究科 バイオサイエンス領域

発生医科学研究室

(笹井 紀明 准教授)

令和2年5月15日提出

目次

略語	4
序論	5
(1) 神経管における細胞増殖・分化とパターン形成	
(2) 神経管の発生におけるソニック・ヘッジホッグの機能	
(3) 底板領域の独特の性質	
(4) mTOR シグナルと神経発生	
(5) mTOR シグナルと Shh シグナルのクロストーク	
材料と方法	9
(1) 実験動物および倫理的配慮	
(2) プラスミド作製	
(3) 遺伝子導入と siRNA による発現抑制	
(4) ニワトリ胚の固定および凍結切片の作製	
(5) <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション法	
(6) 神経組織片(explant)の作製と培養	
(7) 免疫組織化学 (凍結切片の蛍光抗体染色)	
(8) 定量的 RT-PCR(RT-qPCR)による遺伝子発現の定量	
(9) TUNEL 法	
(10) mES 細胞 (マウス胚性幹細胞) の神経分化法	
(11) ES 細胞への si-RNA の導入による遺伝子の発現阻害	
(12) 画像処理	
(13) 有意差検定	
結果	15
(1) 底板領域の細胞増殖は他の領域に比べて抑制されている	
(2) 底板領域においては mTOR シグナルが不活性化されている	
(3) FoxA2 は mTOR シグナルを負に調節することにより細胞増殖をブロックする	
(4) RNF152 は FoxA2 の標的遺伝子であり、底板で発現している	
(5) RNF152 は mTOR シグナル伝達経路を介して細胞増殖を負に制御する	
(6) RNF152 の発現を喪失すると、底板で異常な細胞分裂が起こる	
考察	23
(1) RNF152 は、神経管の発生において mTOR シグナル伝達経路を負に制御する	
(2) Shh と mTOR の 2 つのシグナル伝達経路が RNF152 によって関連づけられる	
(3) Shh と mTOR のシグナル伝達経路の協調またはバランス	
(4) マウス ES 細胞を用いた <i>in vitro</i> の神経分化システムの利用	

謝辭 ····· 29

参考文献 ····· 30

略語

Shh : Sonic Hedgehog

BMP : Bone Morphogenetic Protein

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

RNF : RING finger protein

TSC : tuberous sclerosis complex

H.H. stage : Hamburger and Hamilton's stage

(ハンバーガーとハミルトンによるニワトリ胚発生段階の評価基準)

Pur : Purmorphamine

Smo : Smoothed

Ptch : Patched

GPCR : G-protein coupled receptor

序論

神経管における細胞増殖・分化とパターン形成

中枢神経系は、体外からの刺激を中枢に伝達し、それに適応・反応する働きを持つ器官である。その発生は胚発生期の初期に始まり、胚の背側に頭尾軸に沿って細長い管状の構造「神経管」が形成されることにより始まる。神経管は中枢神経系の原基であり、多様な神経前駆細胞と神経細胞が特定の順序で配置されることにより構成されている (Le Dreau and Marti, 2012; Ribes and Briscoe, 2009)。さらにこれらの細胞は適切な数と量比を保ち、空間的な位置関係と協調することにより、全体として統合された機能を発揮する (図 1)。

神経管の成長は、前駆細胞の増殖と神経細胞への分化が協調することにより進行する (Kicheva et al., 2014)。現在までに、この根底にある分子メカニズムの一端が明らかになっている。例えば、Notch シグナル伝達は、前駆細胞がその状態を維持し、自己複製するために重要である (Molina and Pituello, 2017; Shimojo et al., 2011)。また、Tead / Yap 転写因子によって仲介される Hippo シグナル伝達は、細胞周期の進行に関わる因子 CyclinD1 発現を誘導することにより前駆細胞の増殖に関与する (Cao et al., 2008; Molina and Pituello, 2017)。一方、Neurogenin や Achaete-scute homolog (ASH) などのベーシック・ヘリックスループヘリックス (basic Helix-Loop-Helix; bHLH) 型転写因子はプロニューラル遺伝子として知られ、神経分化を促進する (Baker and Brown, 2018; Molina and Pituello, 2017; Shimojo et al., 2011)。

また、これらの増殖と分化の制御系と並行して、各神経前駆細胞はそれぞれ個性を持っている。体幹部の神経管においては、前駆細胞は 10 以上の領域に分けられる。前駆領域には、蓋板 (Roof Plate; RP)、pD1-pD6、p0-p2、pMN、p3、底板 (Floor Plate; FP) があり (図 2A) (Alaynick et al., 2011; Ribes et al., 2010)、ほとんどの領域において、各前駆細胞はさらに各々の領域に対応したニューロンへと分化する。これらの細胞はどの個体においても同じ順序で配置されており、このことを「パターン形成」と呼ぶ。

さて、神経管が機能するためには、これらの各領域が空間的に正しく配置されてだけでなく、それぞれが特定の細胞数、またその量比を持つことが重要である。たとえば、運動神経領域は多数の細胞が存在して大きな領域を構成する一方で、介在ニューロン領域の一部には少数の細胞しか存在しない (Kicheva et al., 2014)。この各領域の細胞数の決定には、モルフォゲンによる細胞の運命決定に加え、各細胞に特異的な増殖プログラム、そして分化のタイミングが複合的にか

つ協調的に相互作用することにより調節される (図 1)。

(図 2B) は、ニワトリ胚の 2 日胚から 4 日胚の前肢レベルの神経管の断面を作成し、背側領域、運動神経前駆領域ならびに底板領域を抗体染色法によって解析したものである。背側領域 (ホメオボックス型転写因子 Pax7 陽性細胞) は胚発生の進行とともに単調に細胞数が増加し、運動神経前駆領域 (bHTH 型転写因子 Olig2 陽性細胞) は細胞数が増加した後、大多数の細胞が神経分化するため細胞数は減少する。これらの前駆領域が経時的に細胞数を変化させる一方、底板領域 (FoxA2 陽性細胞) の細胞数はほとんど変化しない。このことは、各領域の細胞が異なる増殖効率を持つこと、そして底板細胞がほとんど増殖しないことを示している。

神経管の発生におけるソニック・ヘッジホッグの機能

前駆細胞の配置、つまり神経管のパターン形成につながる細胞の運命決定はモルフォゲンと呼ばれる分泌因子によって調節される (Dessaud et al., 2008; Kicheva et al., 2014; Perrimon et al., 2012)。モルフォゲンには、最も背側 (蓋板領域) に発現する Wnt、BMP および最も腹側 (底板領域) に発現する Sonic Hedgehog (Shh) が知られており、これらの因子が濃度勾配を形成することにより、濃度依存的に各領域を形成する (Jacob and Briscoe, 2003; Le Dreau and Marti, 2012)。

このうち、Shh は底板領域およびその下部に存在する脊索 (notochord; 中胚葉性の組織) に発現し、底板領域で最も高濃度となりながら腹側から背側にかけて濃度勾配を形成する (Ribes and Briscoe, 2009)。Shh は、特に腹側神経管の細胞運命決定に必須の役割を果たす (Dessaud et al., 2008; Jacob and Briscoe, 2003)。

これまでの研究から、Shh が細胞の運命決定と並行して細胞増殖を調節することが知られてきた (Komada, 2012)。Shh 遺伝子を欠損した胚では、パターン形成の欠陥だけでなく、神経管のサイズも縮小することから、Shh が細胞運命の決定と細胞増殖の両方に不可欠な役割を果たすことが示唆された (Bulgakov et al., 2004; Chiang et al., 1996)。反対に、過剰な Shh シグナルが細胞に導入されると、腫瘍が形成されてしまう (Dahmane et al., 2001; Rowitch et al., 1999)。このことから、Shh シグナルはモルフォゲンとして細胞の運命を決定するだけでなく、細胞増殖も制御することが示唆されている。したがって、神経管全体の細胞数や器官サイズが適切に決定されるためには、Shh の強度は、空間的にも時間的にも厳密に制御されなければならない。

底板領域の独特の性質

底板領域は神経管の最腹部に位置し、Shh のほか神経管の背腹軸に沿ったパターン形成のオーガナイザーとして機能する (Dessaud et al., 2010; Yu et al.,

2013)。さらに、底板は他の神経領域と比較して多くのユニークな特徴を持っている (Placzek and Briscoe., 2005)。たとえば、体幹部では底板領域は非神経のグリア性細胞からなり (Ono et al., 2007)、神経細胞を産出することはない。この点で、前駆細胞として神経細胞に分化するポテンシャルを持つ他の前駆領域と性質が異なる (Dessaud et al., 2008; Ribes and Briscoe, 2009)。また、底板領域の細胞は交連軸索の誘導に不可欠な Netrin や Slit などのガイダンス因子も発現する (de la Torre et al., 1997; Kennedy et al., 1994; Ming et al., 1997; Sloan et al., 2015)。さらに、底板細胞は Shroom3 などのアクチン関連因子も発現し、神経管の形状、とりわけ管状構造の形成に重要である (Nishimura et al., 2012; Nishimura and Takeichi, 2008)。したがって底板は、神経管全体のパターン形成、形態、および機能制御に不可欠だといえる。

また、増殖に関しても底板細胞は他の神経前駆領域細胞に比べて性質が異なる。ほとんどの神経前駆領域の細胞数は活発に増殖して経時的に増加するが、最も高濃度の Shh にさらされているはずの底板領域の細胞はほとんど増殖しない (Kicheva et al., 2014)。このメカニズムとして、底板領域にのみ発現する因子が Shh の増殖促進効果に拮抗し、細胞増殖を負に制御するためだと考えることができる。

mTOR シグナルと神経発生

mammalian Target of Rapamycin 経路 (mTOR) 経路は、初期胚から生後にいたるまで、細胞の増殖、生存、代謝を含め多くの生物学的現象に関与する (Gangloff et al., 2004; Laplante and Sabatini, 2009; Murakami et al., 2004)。mTOR 複合体 (mTOR complex; mTORC) は mTOR シグナル伝達経路の中心的な因子であり (Laplante and Sabatini, 2012)、セリン/スレオニンキナーゼとして機能する。mTOR シグナルは中枢神経系の発達にも不可欠であり (LiCausi and Hartman., 2018; Ryskalin et al., 2017; Tee et al., 2016)、mTOR シグナル伝達に異常を生じると、発生段階において発達障害を引き起こす。例えばホスホイノシチド 3-キナーゼ (PI3K) や mTORC1 をターゲットとする阻害剤 (LY294002 やラパマイシン) で mTOR シグナルをブロックすると、前駆細胞の増殖が抑制される (Fishwick et al., 2010)。また、mTOR 遺伝子を神経系特異的に破壊すると、前駆細胞の自己複製が阻害され、脳のサイズが減少する (Ka et al., 2014)。一方、結節性硬化症の原因遺伝子である Tsc1 (Tuberous Sclerosis Complex) は mTOR シグナル伝達の負の調節因子であり (Dalle Pezze et al., 2012)、Tsc1 遺伝子ノックアウトマウスでは脳や腎臓に腫瘍が形成され、神経管が閉鎖せず、胚性致死となる (Kobayashi et al., 2001; Rennebeck et al., 1998)。したがって、mTOR シグナルは前駆細胞の増殖をはじめとして、神経発生の様々な段階に必須の役割を果たす。

mTOR シグナルと Shh シグナルのクロストーク

以前の研究から、神経管内の mTOR と Shh シグナル伝達経路との関連が示唆されている。まず mTOR 経路は、腹側領域と神経堤細胞で活性化している (Nie et al., 2018)。Shh は神経管腹側領域の形成 (Ribes and Briscoe, 2009) や神経堤の移動 (Kahane et al., 2013) に重要であることから、Shh と mTOR シグナル伝達経路が協調して作用することが示唆される。

また、mTOR 経路は細胞内 Shh シグナル伝達の仲介因子である転写因子 Gli1 をリン酸化して活性化し、細胞増殖に関連するターゲット遺伝子の発現を促進することが示されている (Wang et al., 2012)。mTOR による Gli1 の活性化は、既知の Gli の活性化メカニズム (ヘッジホッグシグナルが Ptch/Smo 2 つの細胞膜タンパク質によって仲介される経路) に依存していないため、非標準的 (non-canonical) 経路と言われている (Dessaud et al., 2008)。このシグナル伝達経路の存在は細胞レベルでは証明されている (Deng et al., 2015) が、生体内での関与、とりわけ発生段階での役割についてほとんど明らかになっておらず、実際にどの部分またはステージで働くのかについては知見が存在しない。

最近の研究では、放射状グリアの細胞膜上における繊毛 (cilium) の形成が Kif3a の脳特異的なノックアウトによって阻害されることにより、脳室帯の細胞で mTOR シグナルが異常に活性化され、脳構造に形成異常が起きることが示されている (Foerster et al., 2017)。Shh シグナル伝達には繊毛が必要であるため (Sasai and Briscoe, 2012)、この報告は Shh シグナル伝達と mTOR 活性化が何らかの形で互いに関連していることを示唆している。しかし、詳細なメカニズムはまだ解明されていない (Foerster et al., 2017)。

先行研究から、mTORC1 のターゲットの 1 つである p70S6K のリン酸化が底板領域において特異的に抑制されていることが観察された (Fishwick et al., 2010)。この事実を元に、本研究では底板細胞の特異的な増殖効率に着目し、mTOR シグナルに関連する因子の解析を行うことにより、Shh と mTOR の 2 つのシグナルが関与するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

1. 実験動物および倫理的配慮

城山鶏園（神奈川県）からオランダ原産鶏ヒペコ種の有精卵である奉寿蘭を、またヤマギシ鶏園（和歌山県）から有精卵を購入した。また、妊娠マウスは、日本 SLC（静岡県）から購入した。ニワトリおよびマウス胚を用いる実験は、すべて奈良先端科学技術大学院大学の動物倫理委員会によって承認されたプロトコール（承認番号 1636 および 1810）にしたがって倫理的に行った。

2. プラスミド作製

RNF152 コーディング領域は RT-PCR によって単離した。ニワトリ胚 (H.H. stage 9-12) (Hamburger and Hamilton, 1992) を RLT (QIAGEN ; Cat. no. 79216) / 1% 2-mercaptoethanol にピペティングで溶解し、RNasy Mini Kit (QIAGEN ; Cat. no. 74104) により RNA を回収し、PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara Bio Inc. ; Cat. no. 2680A) を用いて cDNA を合成した。これをテンプレートとして、RNF152 コーディング領域を PCR により増幅した。増幅した DNA フラグメントを pBluescript-SK(+/-) に XhoI/EcoRI サイトにてサブクローニングした。さらに RNF152 を遺伝子発現がニワトリ β -Actin プロモーターによって誘導される発現ベクター pCIG (pCAGGS-IRES2-nucEGFP) に組み込んだ。pCIG-constitutive active-mTOR (pCIG-CA-mTOR : 恒常的活性化型 mTOR) は、まず Addgene (#69013) から pcDNA3-FLAG-mTOR-S2215Y (David Sabatini 博士 (Grabiner et al., 2014) によって寄託されたもの) を購入し、それを鋳型として PCR し、pCIG ベクターにサブクローニングして作製した。

3. 遺伝子導入と siRNA による発現抑制

まず、DNA 導入のためのガラス管 (G-1.2, Glass Capillaries 1.2x90mm (NARISHIGE)) を、PC-10 プーラー (NARISHIGE) により作成した。ニワトリ卵は 38°C のインキュベーターで 30 時間 (H.H. stage 9) または 40 時間 (H.H. stage 12) インキュベートし、発生したニワトリ胚の神経管にプラスミド DNA 溶液または RNAi 溶液と FastGreen (DNA 注入を視認するための色素; Wako 2353-45-9) の混合液をガラス管から胚に注入した。そして、エレクトロポレーター (EBM830, BTX HARVARD APPARATUS) を用いて 25~30V の電気パルスを与え、遺伝子を細胞に導入した。その後、インキュベーター (38°C) で胚を 24 時間または 48 時間発生させた。底板領域に対するエレクトロポレーション (図 15、16) では、開いた状態の神経管を挟むように、胚の上と下に電極を配置し、10~

15V 電気パルスを与え、遺伝子を導入した。エレクトロポレーションに用いたプラスミドベクターは、pCIG-FoxA2、pCIG-constitutive active-mTOR (pCIG-CA-mTOR)、pCIG-dominant negative-FoxA2 (pCIG-dnFoxA2)、pCIG-dominant negative-RagA (pCIG-dnRagA)、pCIG-constitutive active-RagA (pCIG-CARagA)、pCIG-RNF152 である。si-RNF152 はセンス鎖が、5'-CCAGAUUUGUUUCAACUACUACA(dG)(dC)-3' でアンチセンス鎖が 5'-GCUGUAGUAGUUGAAACAAAUCUGGCA-3' であり、また、si-control はセンス鎖が 5'-AUGCUUCUCCGAACGUGUCACGU(dT)(dT)-3' で、アンチセンス鎖が 5'-UUUCGUGACACGUUCGGAGAAGCAUCA-3' である。siRNA はユーロフィンジェノミクス社より購入した。

4. ニワトリ胚の固定および凍結切片の作製

電気穿孔法により遺伝子を導入した胚または、野生型 (WT) の胚を PBS (8.1mM Na₂HPO₄ · 12H₂O(Wako; 196-02835), 1.39mM NaCl(Wako; 191-01665), 2.9mM KCl(Wako; 166-17945), 1.47mM KH₂PO₄(Wako; 166-04255(pH7.4)) 溶液の中で回収し、4% paraformaldehyde (Wako; 163-20145) / PBS または 4% formaldehyde (Wako; 163-20145) / PBS で 4°C、2 時間固定した後に 15% sucrose (Wako; 193-00025) / 1M PBS に 1 晩浸漬した。7.5% gelatin (SIGMA; G1890-100G) / 15% sucrose / 1M PBS に置換し、42°C で 20 分間バイオシェイカー (タイテック) で浸漬した後に、鋳型に 7.5% gelatin / 15% sucrose / 1M PBS を入れその中で胚を垂直に立てた。氷上で 7.5% gelatin / 15% sucrose / 1M PBS を固めて、ドライアイス上で -40°C に冷やした isopentane (Wako) の中にモールドから胚を取り出し入れ、凍結ブロックにした。凍結ブロックを -20°C クライオスタット (Sakura Finetek) にて厚さ 12 μm の切片を作成した。

5. in situ ハイブリダイゼーション法

5-1. RNA-DIG プローブの作成

pBluescript SK(+/-) にサブクローンされた RNF152, F-spondin プラスミドを、DIG RNA Mix (Roche ; Cat. No.11175025910) を用いて T7 RNA ポリメラーゼによって逆転写を行い、アンチセンス RNA プローブを作成した。

5-2. ガラススライド上における in situ ハイブリダイゼーション法

凍結切片を 37°C の PBS で洗浄して、gelatin を取り除いた。次に室温で 10 分間 4% paraformaldehyde によって再固定した後に、PBS で 5 分間 3 回洗浄した。Acetylation buffer (distilled water, 10% triethanolamine(Wako; 142-05615)、18 HCl (Wako; 080-01066)、Acetic anhydride (Wako; 011-00276)) で室温 7 分間処理し、PBS で 3 分間 5 回洗浄した。その後ハイブリダイゼーション buffer (20×SSC

(3M NaCl, 0.3M C₆H₅Na₃O₇ · 2H₂O) (pH5.0)、50x Denhardt's Salmon Sperm DNA (10 mg/ml) , Torula RNA (10 mg/ml)、0.5M EDTA, 10%(v/v) CHAPS) で室温 5 時間 prehybridization を行い、DIG プローブを切片に乗せ、70°Cで一晩処理をした。翌日、2×SSC で 70°C 30 分間 2 回の洗浄後、0.2×SSC で 70°C 30 分間 2 回洗浄した後に、TBST(100mM Tris(Wako ; 013-16385)(pH 7.5)、150mM NaCl, 0.1% Tween 20 (Wako ; 166-2115))で室温にて 5 分間 3 回洗浄した。Blocking Solution(TBST/4%Blocking reagent/10% Sheep serum)で 2 時間 Blocking を行い、DIG 抗体(Roche ; 13680323) / Blocking Solution を乗せて一晩 4°Cで処理した。3 日目は TBST で室温 30 分間 4 回洗浄した後、AP1 buffer (200mM Tris-Cl(pH 9.5)、50mM MgCl₂, 100mM NaCl) に置換して、5 分間経過した後にもう一度 AP1 buffer を入れ替え 5 分間待ち、AP1 buffer を BCIP/NBT solution (SIGMA ; B6404-100ML) に入れ替え、発色するまで遮光して室温で放置した。発色後の切片は TBST で一度洗浄した後に、50% TBST/50% methanol に 5 分間置換して、100%メタノールで脱色した後に包埋した。その後、光学顕微鏡 (Axiovision2, Carl Zeiss) で撮影した。

6. 神経組織片 (explant) の作製と培養

神経組織片は、均一な神経前駆細胞からなり、細胞外因子に反応してその性質を再現することができるため、生体内の神経発生を細胞レベルで再現する有用な実験系である (Dessaud et al., 2010; Sasai et al., 2014)。

ニワトリ胚 (H.H. stage 9) を卵から取り出し、氷上で冷やした L-15medium(SIGMA; L5520) に移動した。次に、実体顕微鏡 (Stemi 2000c, CarlZeiss) 下で、胚の神経板 (神経管を形成する前の領域) の部分を周りの組織とともに切り出した。必要に応じ、胚を取り出す前にあらかじめ発現プラスミドを胚内に過剰発現させた (図 11)。それを Dispase II (SIGMA ; D4693) /L-15 medium で処理をして、組織同士が剥離しやすい状態にした。そして、実体顕微鏡下で内胚葉と中胚葉を剥がし、外胚葉から神経前駆細胞のみを単離した。Explant は 4-well plate (Thermo; Cat. no. 176740) の well の中央に、collagen (SIGMA; C-4941) / 1×DMEM (Wako; 044-29765) を滴下した中に埋没させて、37°C 45 分間静置した後に、explant medium (F-12 medium (SIGMA)/1×PSG/Mito serum (SIGMA)) を加え培養した。ShhH は、explant が 24 時間で 20%程度の Olig2 陽性細胞と 80%程度の Nkx2.2 陽性細胞が出現する濃度と定義した。ShhL は、ShhH の濃度の 1/4 であり、70%を超える Olig2 陽性細胞と、30%以下の Nkx2.2 陽性細胞を産生する濃度である (Dessaud et al., 2010; Dessaud et al., 2007)。48 時間後の時点で、ShhH 外植片は底板領域の細胞に分化したが、ShhL は Islet1 陽性の運動ニューロンの分化を誘導した (Ribes et al., 2010; Yatsuzuka et al., 2019)。

7. 免疫組織化学（凍結切片の蛍光抗体染色）

まず、切片を貼付したスライドガラスを PBS にて 37°C で 3 回（各 5 分）洗浄し、切片からゼラチンを除去した。次に PBS/0.1% Triton-X/1% BSA (SIGMA) を用いて、4°C、1 時間ブロッキングを行った。一次抗体を加えた PBS/0.1% Triton-X/1% BSA (SIGMA) に置換して 4°C で一晩静置した。一次抗体液を除去後、PBS/0.1% Triton-X でシェイカー（NA-101N (NISSIN)）上で室温にて 5 分間 3 回洗浄を行った。次に、二次抗体/PBS/0.1% Triton-X/1% BSA に置換し、遮光を行い、室温で 2 時間静置した。二次抗体液を除去後、遮光したまま PBS/0.1% Triton-X を用いてシェイカー上で室温 5 分間 3 回洗浄した後に、PBS で室温にて 5 分間の洗浄を行い、DAPI 包埋液（nacalai tesque ; 12745-74）で包埋した。最後に共焦点レーザー顕微鏡（LSM710, ZWISS）で撮影した。

用いた 1 次、2 次抗体を以下に記す。FoxA2（Santa Cruz, sc-6554X, goat, x1000）、Nkx2.2（DSHB, 74.5A5, mouse, x100）、pHH3（Millipore, 06-570, rabbit, x1000; MAB Institute, 309-35191, mouse, x1000）、Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235,236)（Cell Signaling Technology, 2211, rabbit, x500）、phospho-p70S6K（Thermo Fisher Scientific, 701064, rabbit, x1000）、GFP（AbD Serotec, 4745-1051, sheep, x1000; abcam, ab6556, rabbit, x1000; millipore, MAB3580, mouse, x1000）。2 次抗体は、以下の蛍光コンジュゲート抗体をそれぞれ 500 倍で用いた。Fluorescein (FITC) AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Sheep IgG (H+L)（Jackson; 713-096-147）、CyTM3 AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)（Jackson; 711-166-152）、CyTM3 AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)（Jackson; 711-166-151）、Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)（Jackson; 715-606-150）、Alexa Fluor 647-AffiniPure F(ab')₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)（Jackson; 715-606-152）。

8. 定量的 RT-PCR（RT-qPCR）による遺伝子発現の定量

explant 培養の際の培地を除去した後に、PBS で 3 回洗浄後、PicoPure RNA extraction kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて、RNA を抽出・精製した。5µg 相当の RNA を PrimeScript RT Master Mix（Takara Bio）を用いて逆転写を行い、cDNA ライブラリーを作製した。この cDNA を鋳型として、KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix(2x)(KAPA BIOSYSTEMS)と各プライマーを用いて、LightCycler 96（Roche）を用いて PCR 反応によって増幅し、測定・定量した。内部コントロールとして GAPDH を用い、定量分析は comparative Ct 法によって実施した。RT-qPCR に用いたプライマーは（別表 1）に示す。

9. TUNEL 法

凍結切片の蛍光抗体染色と同様にサンプルを処理し、TdT transferase (Roche) と DIG-labelled dUTP (Merck Millipore) を DNA 断片の末端に細胞を取り込ませ、抗 Digoxigenin-Rhodamine 抗体 (Sigma) により検出した。

10. mES 細胞 (マウス胚性幹細胞) の神経分化方法

ケンブリッジ大学の Austin Smith 教授から分与された Sox1-GFP ES 細胞 (mESC) を継代し、神経分化させた (Kamiya et al., 2011; Ying et al., 2003)。はじめに、 1.5×10^4 個の ES 細胞をフィブロネクチンとコラーゲンでコーティングされたガラスボトムディッシュ (Gibco; 33016-015) に継代し、単層分化培地 (DMEM/F12 Glutamax (Thermo;10565018) 25ml、Neurobasal medium (Invitrogen; 21103-049) 25ml、B27 (Invitrogen;17504-044) 500 μ l、N2 supplement ($\times 100$) (Invitrogen;17502-048) 250 μ l、Purified BSA(20%) 200 μ l、100 \times Penicillin-Streptomycin-L-Glutamine (Wako;161-23201)、0.1M 2-ME (Wako; 137-06862) 2 μ l) で3日間培養した後に、分化培地にレチノイン酸 (retinoic acid; RA) または Shh のアゴニストである SAG (SIGMA SML1314) を加え、pMN 領域、p3 領域、FP 領域に分化誘導させた (図 19A)。pMN 領域への分化 (図 19A の(i)) では、分化開始3日目から 300 nM RA (high RA) を含む分化培地に換えて12時間培養し、その後、300 nM RA と 50 nM SAG (high RA + low SAG) を加えた分化培地に入れ換え36時間培養した。また、p3 領域への分化 (図 19A の(ii)) では、分化開始3日目から 30 nM RA (low RA) を含む分化培地に換えて12時間培養し、その後、30 nM RA と 500nM SAG (low RA + high SAG) を加えた分化培地に入れ換え36時間培養した。FP 領域に分化させるには、分化開始3日目から 500 nM SAG (high SAG) を加えた分化培地に入れ換え48時間培養した。

11. ES 細胞への si-RNA の導入による遺伝子の発現阻害

本研究では、腹側神経前駆領域に発現する G タンパク質共役受容体 GPR17 をコードする遺伝子の発現を抑制するため、si-RNA を用いた。本実験では、マウス *GPR17* (*mGPR17*) をターゲットにする Stealth RNAi (*si-GPR17-1*; UCGCCUGCUUCUACCUUCUGGACUU)、*si-GPR17-2*; ACCGUUCAGUCUAUGUGCUUCACUA) ならびにネガティブコントロール RNAi をそれぞれ Invitrogen より購入した。ES 細胞への導入は、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) 5 μ l と、200 nmol の si-RNA をそれぞれ 100 μ l の Opti-MEM (Invitrogen) に加えて混和し15分間静置した後、ES 細胞 (2 ml の維持メディア) に導入した。導入は、ES 細胞を維持している間に24時間間隔で2回行い、2回目のトランスフェクションの24時間後から分化をスタートした。これらの RNAi が分化

5日目でも GPR17 の発現を抑制していることを RT-qPCR によって確認した (図 20A)。

12. 画像処理

In situ ハイブリダイゼーション法による写真は AxioVision2 (Carl Zeiss) で、蛍光免疫抗体染色の写真は共焦点顕微鏡 LSM710 (Carl Zeiss) で撮影した。また写真の画像処理は、Photoshop CC (Adobe) を用いて行い、図は Illustrator CC (Adobe) を用いて作成した。

13. 有意差検定

統計解析は、Prism (GraphPad) を使用して行った。統計データは平均値 \pm s.e.m. として表示し、有意性は、*、 $p < 0.05$ 。**、 $p < 0.01$ ；***、 $p < 0.001$ ；****、 $p < 0.0001$ ；または n.s.；有意差なし、と表示した。単一比較(図 3D、5D、9、10A、14H、15G) は両側 t 検定を用い、多重比較 (図 6M、10B、12C、13E) は分散分析(ANOVA) を用いた。

結果

底板領域の細胞増殖は他の領域に比べて抑制されている

神経管の細胞増殖および器官発達を調節するメカニズムを明らかにするため、有糸分裂細胞の分布を、M期マーカーであるリン酸化ヒストン3 (phospho-Ser 10) (phosphorylated-Histone3; pHH3) 陽性細胞の蛍光免疫染色法によって調べた。胚は、神経管閉鎖直後のハンバーガー・ハミルトン (Hamburger and Hamilton; HH) ステージ 11、神経分化の開始時である HH ステージ 16、および神経管が成熟した HH ステージ 22 のものを使用した。解析する部位は前胸部レベルで統一した。

その結果、pHH3 陽性細胞は、HH ステージ 11 では神経管深部でも一部観察されたものの、特に HH ステージ 16 や HH ステージ 22 では神経管の頂端面で検出された (図 3A、B、C)。また、pHH3 陽性細胞は背腹軸全体でほぼ均一に検出され、この結果は以前の報告であったものと一致していた。一方、底板には陽性細胞がほとんど検出されなかった (Kicheva et al., 2014)。

そこで、底板領域を正確に特定し、底板における pHH3 陽性細胞を定量することにした。底板領域にはフォークヘッド型転写因子 FoxA2 が高レベルで発現するため (図 3A'、B'、C') (Sasai et al., 2014) (Sasaki and Hogan, 1994)、FoxA2 によって底板領域を特定し、FoxA2 陽性の頂端面細胞に対する pHH3 陽性細胞の比率を測定した。さらに、FoxA2 陰性の領域における頂端面の細胞数を DAPI を指標にしてカウントし、そのうち pHH3 陽性である細胞の割合を計算した (図 3A'、B'、C')。

その結果、神経管のほとんどの領域における頂端面の細胞では、pHH3 陽性の細胞がステージによって 15-35%程度出現し (図 3D: 青のバー)、その分布はほぼ一様であった (図 3A'、B'、C')。一方、FoxA2 陽性の底板領域では、pHH3 陽性細胞数が、FoxA2 陽性の頂端面の細胞の 5%以下程度しか存在せず (図 3D: 緑のバー)、どのステージでも神経管の他の領域よりも有意に少ないことが示された。

底板領域においては mTOR シグナルが不活性化されている

前項の結果から、神経管における細胞増殖は領域によって異なり、特に底板領域では他の領域に比べて低いことが明らかになった。そこで、神経管における細胞増殖の調節のメカニズムを解析することにした。

mTOR シグナル伝達経路は一般に細胞増殖に重要であり (Saxton and Sabatini, 2017)、以前の報告から、底板領域で不活性化されていることが示唆さ

れている示されている (Fishwick et al., 2010)。そこで、底板領域の発生における mTOR シグナルの重要性や関与に着目した。

まず、神経管の背腹軸断面において、mTOR シグナルが活性化した細胞の分布を解析した。この目的で、mTOR の 2 つの主要な基質である p70S6K (p-p70S6K) と S6 リボソームタンパク質のリン酸化の組織内分布を解析することにし、リン酸化 p70S6K とリン酸化 S6 (Ser 235 / 236) (以降 pS6 と示す) 抗体を用いた抗体染色を行った。また解析サンプルとして、ニワトリ神経管の各発生段階 (HH ステージ 11, 16, 22) (図 4A-C、E-G、I-K、図 5A-C、E-G、I-K、M-O) および、ニワトリの HH ステージ 22 に対応するマウス 11.5 日胚 (図 4D、H、L、図 5D、H、L、) の体幹部を用いた (Biever et al., 2015)。

p-p70S6K 陽性細胞は、ニワトリ (図 4A-C) およびマウス (図 4D) の神経管のどのステージでも神経管の頂端面に分布していた。さらに、p-p70S6K 陽性細胞は pHH3 も陽性であるため (図 4E-H)、mTOR シグナルが細胞増殖に関与していることを示唆された。

pS6 は、HH stage 11 の神経管の頂端面で検出された (図 5 A) (Fishwick et al., 2010)。HH stage 16 では、pS6 が神経管のほぼ全体に見られ、背腹軸に沿ってシグナル強度にばらつきがあった (図 5 B)。HH stage 22 では、前駆細胞と神経領域の遷移領域で pS6 が検出された (図 5 C)。一方、11.5 日胚マウス神経管では、前駆細胞領域で強い pS6 シグナルが検出された (図 5 D)。このことから、pS6 の分布には種特異性があることが示唆された。

S6 は p70S6K の基質であるが、p-p70S6K および pS6 陽性領域は完全には一致しなかった (図 4、5)。これは、2 つのタンパク質の細胞内局在が異なるためだと考えられる。つまり、p-p70S6K は核に局在し、pS6 は細胞質に局在している。さらに、pS6 は p70S6K 以外のキナーゼによってもリン酸化される (Biever et al., 2015)。

p-p70S6K および pS6 の局在によって検出される mTOR シグナル伝達の活性化領域は発生段階によって徐々に変化するが、いずれの発生段階においても、またニワトリ胚においてもマウス胚においても、底板領域では検出されなかった (図 4I-L、図 5M-P)。

次に、神経管の背腹軸における pS6 陽性細胞の領域をより正確に識別するため、pS6 陽性細胞を FoxA2 および Nkx2.2 発現細胞との共染色により比較した (Ribes et al., 2010; Sasai et al., 2014)。FoxA2 は底板領域で強く発現しているほか、p3 領域 (Nkx2.2 陽性領域) でも弱く発現している (図 5E-H)。したがって厳密には、底板領域は FoxA2 陽性でかつ Nkx2.2 陰性となる (Ribes et al., 2010; Sasai et al., 2014)。この事実を考慮し、pS6、Nkx2.2、FoxA2 の三重染色を行った結果、pS6 と Nkx2.2 陽性細胞の腹側の末端は一致しており (図 5I-L)、pS6、p-

p70S6K とともに FoxA2 の発現量が高い領域では検出されなかった (図 4I-L、図 5M-P)。

これらの結果から、mTOR シグナル伝達は領域特異的に活性化され、特に底板領域の細胞では活性化されていないことが示唆された。

FoxA2 は mTOR シグナルを負に調節することにより細胞増殖をブロックする

FoxA2 は神経管の形成直後から底板特異的に発現する転写因子であり (Ang et al., 1993; Sasaki and Hogan, 1994)、Shh の一次的応答遺伝子の 1 つであるほか (Kutejova et al., 2016; Vokes et al., 2007)、底板細胞への分化に不可欠である (Placzek and Briscoe, 2005; Sasaki and Hogan, 1994)。前項の実験から、mTOR シグナルが底板特異的に抑制されることが示唆されたため、FoxA2 が mTOR シグナルを調節していると仮定し、mTOR シグナルに対する FoxA2 の機能を解析することにした。FoxA2 発現領域には pHH3 陽性細胞がほとんど存在しないため (図 3A'、B'、C'、D)、底板の増殖は FoxA2 によって制御されると予想した。この仮説を検証するため、FoxA2 を HH ステージ 11 で神経管の片側に過剰発現し、48 時間後に回収して表現型を解析した。また同時に control (GFP のみを発現するベクター) をエレクトロポレーションして対照とした。

その結果、FoxA2 過剰発現胚において、神経管のサイズが対照側よりも有意に小さい ($n=8/8$) ことが明らかになった (図 6A-B')。また、pHH3 陽性細胞数は、FoxA2 過剰発現細胞 ($n=8$; 図 6B) において、コントロール GFP を発現する細胞 ($n=6$; 図 6A) に比べて有意に少なく、FoxA2 が細胞周期の進行をブロックしていることが示唆された。

さらに、FoxA2 過剰発現細胞において、p-p70S6K ($n=8/8$; 図 6D-E') および pS6 ($n=8/8$; 図 6G-H') 陽性細胞率は、コントロール GFP 発現細胞における陽性率に比べて有意に低下しており、mTOR シグナルが抑制されたと示唆された。

次に、FoxA2 によって抑制された mTOR シグナルが、構成的活性化型 mTOR (CA-mTOR) によって回復するかを検証した。この目的で、FoxA2 と CA-mTOR を神経管内で共発現したところ、pHH3 陽性細胞の比率が、FoxA2 のみを発現する細胞の pHH3 発現と比較して増加しており、細胞増殖が回復したことが示唆された ($n=7$; 図 6B-C'、M)。さらに、FoxA2 と CA-mTOR の両コンストラクトが共導入された神経管では、導入された細胞で p-p70S6K、pS6 がともに活性化されていた。 ($n=6/7$; 図 6F、F'、I、I')。これらの結果から、mTOR シグナルは FoxA2 の下流で負に制御されることが示唆された。

実際、CA-mTOR の単独のエレクトロポレーションにより pS6 が活性化され、p-p70S6K および pHH3 の陽性細胞数が増加した (図 7)。

次に、FoxA2による細胞数の減少がアポトーシスによって引き起こされるかを解析するため、今回のエレクトロポレーションで用いたサンプルに対してTUNELアッセイを行った。しかし、FoxA2単独、FoxA2とCA-mTORを共導入したいずれのサンプルにおいてもTUNEL陽性シグナルの増加・減少は検出されなかった（GFPはn=0/6、FoxA2ではn=0/8、FoxA2+CA-mTORではn=0/7、図8A-C'）。しかし、エレクトロポレーション48時間後ではアポトーシスを起こした細胞がすでに胚から排除されてしまった可能性がある。そこで、エレクトロポレーション24時間後の胚においてもTUNELアッセイを行った。しかし、この場合にもTUNEL陽性細胞は検出されなかった（すべてのエレクトロポレーションでn=6;図8D-F'）。一方、TUNEL実験システムが機能していることを確認するため、ポジティブコントロールとして恒常活性型のPtch (Ptch Δ)をエレクトロポレーションで導入し、24時間後に回収した胚において同様に実験を行ったところ、実際に陽性シグナルが検出された (Briscoe et al., 2001; Cayuso et al., 2006) (図8G, G')。このことから、FoxA2やCA-mTORのエレクトロポレーションによって細胞死は誘導されないと結論され、細胞数の変化の主な原因はアポトーシスではなく、細胞増殖効率の低下であることが示唆された。

さて、CA-mTORが細胞増殖を活性化させた原因として、FoxA2単独の導入によって誘導された底板細胞への運命決定がCA-mTORによって変更したからだという可能性が考えられる。この可能性を検証するため、FoxA2とCA-mTORの共導入によってFoxA2とNkx2.2の発現を調べた。その結果、GFP陽性細胞（エレクトロポレーションされた細胞）は、FoxA2とCA-mTORの導入によってもFoxA2陽性であり、なおかつNkx2.2陰性であった（図9F）。したがって、CA-mTORによって細胞運命は変更されていないことが示唆された。さらにこの結果から、過剰発現したFoxA2はShhの発現を誘導し、それが周囲に影響を及ぼして細胞非自律的に周囲の領域に腹側神経前駆細胞であるNkx2.2の発現を誘導したことが明らかになった (Cho et al., 2014) (図9B-C')。

最後に、FoxA2単独、またはFoxA2+CA-mTORを導入した領域が底板に分化したことを確認する目的で、底板特異的に発現する遺伝子F-Spondin (Burstyn-Cohen et al., 1999; Klar et al., 1992)プローブを用いてin situハイブリダイゼーションを行った。その結果、FoxA2単独 (FoxA2ではn=8/8;図6K)、またはFoxA2+CA-mTOR (n=6/7;図6L)がエレクトロポレーションされた神経管で、異所的なF-Spondinの発現が観察された。このような異所的なF-spondinの発現は、コントロールの神経管では検出されなかった (n=0/6;図6J)ため、FoxA2やCA-mTORとの共導入によって誘導された細胞はいずれも底板領域の細胞として分化していくことが明らかとなった。

以上の実験の結果から、FoxA2がmTORの上流でmTORシグナルを抑制

することにより、細胞増殖が負に制御されていると結論された。

RNF152 は FoxA2 の標的遺伝子であり、底板で発現している

FoxA2 は転写因子であるから、他の遺伝子の発現を制御することによって mTOR シグナルを負に抑制すると考えられる。そこで、mTOR シグナルの負の制御因子の発現が FoxA2 によって誘導(または抑制)され、その結果として mTOR シグナルが負に調節されるものと予想した。そこで、FoxA2 によって発現調節され、底板領域に特異的に発現する mTOR シグナル伝達の負の調節因子を特定するために、ニワトリ神経組織片で RT-qPCR を用いたスクリーニングを行った。

高濃度の Shh (以下、ShhH と表記、「高濃度」の定義については「材料と方法」を参照) で処理した神経組織片は底板に分化するが、低濃度の Shh (ShhL) で刺激した組織片では、(20%程度の細胞は底板に分化するものの) 細胞の多くは運動神経神経および V3 介在神経に分化する (Dessaud et al., 2010; Ribes et al., 2010; Sasai et al., 2014)。そこで、ShhL または ShhH で 48 時間刺激した組織片から RNA を抽出し、mTORC1 の構成因子に焦点を当てた qPCR により、遺伝子発現レベルを Shh 未処理の組織片のレベルと比較した (Laplante and Sabatini, 2009; 2012; 2013) (プライマー配列は補足表 1 を参照)。なお、この条件では ShhH によって FoxA2 の発現上昇が、また ShhL により Nkx2.2 の発現上昇が、それぞれ認められ、実際に組織片の細胞が底板領域または V3 や運動神経に分化したことが確認された (Dessaud et al., 2010; Sasai et al., 2014)。

今回は、mTOR 関連の遺伝子として、mTORC1/2 の構成因子や、その上流、下流因子に着目し、14 種類の遺伝子を解析した (図 10)。その結果、mTOR 関連因子のほとんどの遺伝子の発現が Shh の有無や濃度に影響されなかった (4 回の試行; 図 10)。その一方、E3 ユビキチンリガーゼをコードする RNF152 (Deng et al., 2019; Deng et al., 2015) は、ShhH を処理した組織片で強く誘導され、ShhL 組織片ではより弱く誘導された観察されたため、底板に高発現することが示唆された。

以前の研究では、RNF152 遺伝子の発現調節領域に FoxA2 結合領域が存在することが示されている (Metzakopian et al., 2012)。そこで、FoxA2 と RNF152 の発現との関係を解析した。この目的のために、FoxA2 のエレクトロポレーションにより強制発現した組織片を作成し、24 および 48 時間後に回収して RNF152 の発現量を解析した (3 回の試行; 図 11A)。その結果、RNF152 の転写レベルは、コントロール GFP をエレクトロポレーションした組織片よりも FoxA2 過剰発現によって有意に高く、RNF152 が FoxA2 の下流遺伝子であることを示唆している。

さらに、RNF152 の発現が FoxA2 に依存するかどうかを調べるため、ドミ

ナントネガティブ FoxA2 (DN-FoxA2) のエレクトロポレーションを行い、Shh で上昇した RNF152 の発現が抑制されるかを解析した (Jacob et al., 2007)。その結果、コントロール GFP をエレクトロポレーションして ShhH で処理した組織片では、48 時間後に RNF152 発現が上昇した (図 11B、レーン 1、2)。一方、DN-FoxA2 をエレクトロポレーションした組織片では RNF152 の発現が有意に減少しており (図 11B、レーン 3)、RNF152 の発現には FoxA2 が必要であることが示唆された。

次に、神経管における RNF152 の *in vivo* における発現を特定するために、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。RNF152 の発現は HH ステージ 11 (図 12A) では検出されなかったが、HH ステージ 16 および 22 の底板で検出され、その他の領域では発現が低かった (図 12B、C)。

以上の結果から、RNF152 は FoxA2 の下流遺伝子であり、mTOR シグナルの底板特異的な制御因子であることが示唆された。

RNF152 は mTOR シグナル伝達経路を介して細胞増殖を負に制御する

次に、RNF152 の神経管の細胞増殖に対する機能の解明を試みた。RNF152 遺伝子は、低分子 GTP アーゼ (small GTPase) RagA を標的とする E3 ユビキチンリガーゼをコードし (Deng et al., 2019; Deng et al., 2015; Kim et al., 2008)、一方で RagA は GTP 結合型 (活性型) となって mTOR シグナルを活性化することが知られている (Efeyan et al., 2014; Shaw, 2008)。そこで、RagA の活性化型または不活性化型をエレクトロポレーションすることにより、その細胞増殖に対する影響を解析した。

まず、ドミナントネガティブ RagA (DN-RagA) をエレクトロポレーションによって導入して pHH3 の発現を解析したところ、エレクトロポレーションされた細胞の増殖が抑制され (図 13A、A'、C)、逆に恒常活性型 RagA (CA-RagA) によって細胞増殖が活性化された (図 13B、B'、C)。一方、底板領域のサイズには変化がなかった (図 13C) (図 13D-E'; DN-RagA は n = 6、CA-RagA は n = 7)。

このことから、RNF152 は RagA の活性を抑制することにより、mTOR シグナル伝達経路の負の調節因子として作用することが期待された。この仮説を証明するために、RNF152 を過剰発現する細胞における p70S6K の活性化を解析した。その結果、70S6K が活性化した細胞数は RNF152 の過剰発現によって減少し (n = 5/6; 図 6D、D'; 図 14A、A'のコントロール GFP をエレクトロポレーションした胚とそれぞれ比較)、RNF152 が mTOR シグナルの負の調節因子であることが示唆された。

次に、神経管の細胞増殖に対する RNF152 の影響を調べるために、pHH3 の発現を解析した。その結果、pHH3 陽性細胞の数は、コントロール GFP でエレクト

トロポレーションされた細胞よりも RNF152 過剰発現細胞の方が有意に低いことが示された (n=6/6; 図 14C, C'; 図 6A, A' と比較; 定量データは図 14E)。したがって、RNF152 は mTOR シグナル伝達経路をブロックすることにより、細胞増殖を負に制御することが示された。

次に、RagA の活性化によって RNF152 の効果が回復できるかを調べた。この目的のために、RNF152 (n = 7) とともに CA-RagA をエレクトロポレーションし、p70S6K (図 14B, B') の活性化および pHH3 (図 14D, D') の発現を調べた。その結果、p-p70S6K および pHH3 陽性細胞の数が、RNF152 のみを過剰発現している細胞よりも CA-RagA と RNF152 を共導入した細胞で有意に高いことが示された。また、FoxA2 の発現領域は RNF152 のエレクトロポレーションによっても変化しなかったため、RNF152 自体は底板細胞の運命決定に関与していないことが示された (図 14F, F', G, G')。

次に、S6 の活性化が RNF152 の強制発現の影響を受けるかどうかを解析した。しかし、RNF152 単独の強制発現では、S6 の活性化が有意に変化しなかった。このことから、RNF152 による mTOR シグナルへの負の影響は、神経管に存在する他のキナーゼによって補償されたことが示唆された (図 14H, H')。しかし、RNF152 と CA-RagA の共導入によると、S6 の発現が上昇したため、CA-RagA が RNF152 の影響を受けずに S6 を活性化 (リン酸化) できることが示唆された (図 14I, I')。

以上より、RNF152 は RagA の上流で mTOR シグナル伝達 (つまり p-p70S6K) をブロックすることにより、細胞増殖 (つまり pHH3) を負に調節することが明らかになった。

RNF152 の発現を喪失すると、底板で異常な細胞分裂が起こる

mTOR シグナル伝達と底板の細胞増殖における RNF152 の必要性を解明するために、si-RNA を用いて RNF152 発現を阻害する機能喪失実験を行った。HH ステージ 10 で GFP 発現プラスミドとともに神経管の底板領域 (を含む腹側神経領域) に si-control または si-RNF152 をエレクトロポレーションし、胚を 48 時間培養して HH ステージ 18 に達したものを解析した。

si-control では S6 の活性化に変化は見られなかったが、(n = 0/8; 図 15A, A'), si-RNF152 は底板における異常な S6 の活性化を誘導した (n = 6/7; 図 15B, B')。このことから、RNF152 の抑制により、mTOR シグナルが回復したことが示唆された。さらに、si-control をエレクトロポレーションした神経管では pHH3 は発現しなかったが (n = 0/8; 図 15F, F', H)、si-RNF152 のエレクトロポレーションにより、底板領域で異所的な pHH3 陽性細胞が検出された (n = 6/7; 図 15G, G', H)。この pHH3 陽性細胞は FoxA2 を発現しており (n = 6/6; 図 15G"; 図 15F"

の si-control エレクトロポレーション胚と比較)、底板における異所的な細胞分裂が RNF152 発現の機能喪失によって誘導されたことが示唆された。

また、底板における mTOR シグナルの活性化が、底板領域で異所的な pHH3 発現を誘導することを確認する目的で、コントロール GFP、CA-mTOR、または CA-RagA 発現プラスミドを腹側神経管にエレクトロポレーションによって強制発現し、S6 の活性化および pHH3 の発現を評価した。その結果、CA-mTOR (n = 6/6) および CA-RagA (n = 6/6) の強制発現によって底板領域に異所的な S6 の活性化シグナルが検出されたが、コントロール GFP のエレクトロポレーション (n = 0/8) ではこのようなシグナルは観察されなかった (図 16A-C)。さらに、コントロール GFP のエレクトロポレーションでは検出されなかった pHH3 発現細胞が、底板領域で検出された (図 16D、E、F、G)。さらに、この時異所的に発現した pHH3 陽性細胞は FoxA2 を発現していたため (CA-mTOR では n = 6/6、CA-RagA では n = 6/6; 図 16E'、F')、異所的に発現した pHH3 発現は細胞運命が変化した結果出現したものではないことを示唆している (コントロール GFP は n = 0/8、CA-mTOR および CA-RagA ではそれぞれ n = 0/6; 図 16D'、E'、F')。最後に、FoxA2 発現領域は、CA-mTOR または CA-RagA のエレクトロポレーションによって有意に変化しなかった (コントロール GFP、CA-mTOR、および CA-RagA はそれぞれ n = 8、6、6; 図 16D'、E'、F'、G)。このことは mTOR シグナルが底板細胞の運命を変更することなく細胞増殖が亢進されたことを示唆している。

以上の結果から、RNF152 は細胞増殖を抑制すること、また si-RNA による RNF152 の機能喪失により、底板領域において mTOR シグナルが異所的に活性化され、細胞増殖を誘導することが明らかになった。したがって、底板領域では FoxA2→mTOR シグナルが細胞増殖の抑制に必須であることが示された。

考察

RNF152 は、神経管の発生において mTOR シグナル伝達経路を負に制御する

本研究では、mTOR シグナル伝達経路が神経管の底板領域で不活性化され、この不活性化によって底板細胞の増殖効率が抑制されていることを実証した。まず、底板特異的に発現する転写因子 FoxA2 が mTOR シグナルの活性と細胞増殖を抑制することを示した (図 17)。次に、FoxA2 によって mTOR シグナルの抑制因子である RNF152 が発現誘導され (図 17)、これが mTOR 経路の別の構成因子 RagA を不活性化 (分解) することにより細胞増殖を抑制することを明らかにした。

Shh は神経管内で濃度勾配を形成し、神経管のパターン形成を制御するだけでなく、細胞増殖や組織の成長も調節する (Dessaud et al., 2008; Kicheva et al., 2014; Sasai et al., 2019)。その一方で、最も高濃度の Shh に暴露されるはずの底板細胞では増殖効率が抑制されている (Kicheva et al., 2014)。このことから、Shh の濃度勾配と細胞の増殖効率は必ずしも一致しないことが示唆され、細胞の増殖効率には領域特異的なメカニズムが存在すると考えられた。本研究は、このメカニズムの一端を明らかにしたものである。

本研究で同定した RNF152 は、RING フィンガーおよび膜貫通ドメインを持ち、リソソームに局在する E3 ユビキチンリガーゼである (Deng et al., 2019; Zhang et al., 2010)。この遺伝子が単離された当初、RNF152 は細胞においてアポトーシスを誘導すると考えられていた (Zhang et al., 2010)。一方、その後の研究により、RNF152 は低分子 GTP アーゼの 1 つである RagA をユビキチン化して分解し、それによって mTOR シグナル伝達を負に調節することが明らかとなった (Deng et al., 2015)。実際に、RNF152 ノックアウト細胞は mTOR シグナルの過剰な活性化を示す (Deng et al., 2015)。さらに最近、ゼブラフィッシュを用いた研究から、RNF152 が神経分化を促進する NeuroD の発現に必須であり、視神経系、中脳、後脳の神経分化に不可欠な機能を持っていることが示唆された (Kumar et al., 2017)。これらの知見は、RNF152 が胚発生を含む全ライフコースを通して mTOR シグナルの調節に重要な役割を果たすことを示唆するが、一方で RNF152 遺伝子ノックアウトマウスは生存可能であり、明らかな表現型が見つかっておらず (Deng et al., 2015)、RNF152 の機能は別の遺伝子によって代償されうると考えられている。本研究においても、RNF152 の発現阻害により底板細胞の異所的な細胞分裂の出現は認められたものの (図 15)、その程度は高くなく、RNF152 の機能を補完するメカニズムの存在が示唆される。

マウスにおいて、RNF152 の機能を相補する遺伝子の候補として、たとえ

ば Tsc1 / 2 が考えられる (Rennebeck et al., 1998; Kobayashi et al., 2001)。Tsc1 / 2 はいずれも mTOR の負の調節因子で、RNF152 と同様にマウス胎児では神経系や腎臓に発現している。Tsc1 / 2 の遺伝子変異マウスは、いずれもヘテロの遺伝型ですでに腎臓がんを生じる (Kobayashi et al., 2001)。また、Tsc1 ノックアウトマウスは胎生 11 日前後に神経管が閉鎖せず、胚性致死となる (Rennebeck et al., 1998)。したがって、同じ mTOR シグナルの抑制因子であっても遺伝子産物の活性や抑制様式に違いがあり、それが表現型に反映されていると考えられる。

また、mTOR の活性化因子である RagA については、遺伝子ノックアウトマウスは胚発生期に形態異常や成長不全を引き起こし、胎生 10.5 日で胚性致死となる (Efeyan et al., 2014)。このことから、RagA の不活性化には RNF152 以外に他の因子も関与していることを示唆している。さらに、本研究において、RNF152 の過剰発現によって p-p70S6K 陽性細胞 (図 14A、A') が明らかに減少したが、pS6 (図 14H、H') は抑制されなかった。このことから、p-p70S6K や pS6 といった mTOR シグナルの下流因子 (Biever et al., 2015; Fishwick et al., 2010) の制御機構が完全に一致していないことが示唆される。

また、p-p70S6K と pS6 の細胞内局在は完全には一致しなかった。p-p70S6K は主に神経管の背腹軸に沿って頂端面で検出されたが (図 4A-D)、pS6 は前駆細胞とニューロン領域の間の遷移領域で発現する (図 5A-D)。また、mTOR シグナルの上流制御因子としてリン酸化 AKT (phospho-AKT; pAKT) が知られているが、その局在は神経管の背腹軸に沿って頂端面に局在するほか (図 18A-C)、交連軸索でも観察された (図 18C)。これらの結果から、mTOR シグナルが神経管の発生において複数の機能を持っていることが示唆される。つまり mTOR シグナルは、細胞増殖 (図 6、13、14)、分化 (Fishwick et al., 2010)、神経管の形態形成 (Kobayashi et al., 2001; Torroba et al., 2018) および軸索ガイダンス (図 18) などの現象に関与しており、それぞれの機能において、異なる mTOR シグナルの構成因子が関与すると示唆される。今後、それぞれの現象に応じた mTOR シグナルの働きを個別に分析することが重要である。そのためにはたとえば、コンディショナルノックアウトマウスを用いて時期特異的または領域特異的に mTOR シグナルを不活化し、その影響を解析することが必要である。

Shh と mTOR のシグナル伝達経路の協調またはバランス

図 17 は、底板における細胞増殖の調節の概略図である。まず、Shh の標的である FoxA2 は、RNF152 を含む下流の標的遺伝子の発現を誘導する。次に、RNF152 の発現により、mTOR シグナル伝達経路が不活性化され (図 13、14)、それにより細胞増殖が負に制御される。このことから、Shh と mTOR が関与する 2 つのシグナル伝達経路を結び付ける機構が存在することが示唆された。底

板は Shh シグナルを分泌して神経管のパターンや増殖を制御する、いわゆる「オーガナイザー領域」であるほか、神経管の形状や神経細胞のガイダンスにも関与する領域であるため、細胞数が厳密に制御されている必要があり、RNF152 の発現を介して Shh シグナルと mTOR が互いにバランスを保ちながら細胞数の制御を行っていると考えられる。

一方、mTOR 経路の上流因子はまだ明らかではない (図 17)。これまでの研究から、mTOR の上流活性化因子としてインスリン様成長因子 (IGF; IGF1/2) が知られている (Laplante and Sabatini., 2012)。実際に、IGF2 および IGF1 受容体 (IGF1R) は体節および神経管の背側で発現している (Fishwick et al., 2010)。一方、pS6 は初期神経管の背側の体節 (図 5A) で発現し、発生が進むにつれて皮筋節での発現が見られる (図 5B)。この体節および皮筋節の pS6 陽性領域は、活性化 mTOR の領域分布と一致している (Nie et al., 2018)。さらに、IGF1R ノックアウトマウスでは、脳の発達中に細胞増殖が抑制される (Hu et al., 2012)。したがって mTOR の上流制御系は、適切なタイミングと場所に局在している。今後の解析により、IGF と mTOR シグナル伝達経路の相関関係が明らかになると期待される。

底板領域以外の神経管における mTOR シグナルの役割

本研究では底板領域の mTOR シグナルに着目したが、底板領域以外の神経管の前駆領域において、mTOR シグナルや細胞増殖は実際にどのような因子によって直接制御されるのだろうか。Shh の下流では CyclinD1 や Nmyc (Oliver et al., 2003; Kenney et al., 2003) の発現が誘導され、これが細胞周期を進行させることにより細胞増殖が亢進することが、小脳の神経前駆細胞を用いた研究から明らかになっている。一方、CyclinD1 の発現 (Averous et al., 2008) や Nmyc の安定化 (Vaughan et al., 2016) に mTOR シグナルを必要とする報告が存在する。したがって、底板領域以外の神経前駆領域では、これら細胞周期を制御する因子が Shh と mTOR によって調節され、働くと考えられる。

神経管の背腹軸に沿った mTOR 陽性領域の分布は、pS6 の局在化 (図 5A-D) で示されるように完全に均一ではなく、mTOR シグナルが背腹軸に沿ったパターン形成因子によって何らかの形で調節されていることが示唆される。Wnt、BMP、および Shh は背腹軸に沿ったパターン形成に不可欠であるため、これらの因子のいずれかと mTOR シグナルとの相互依存性の存在が予想される。例えば、前述の IGF1R については、IGFR1 ノックアウトマウスで Wnt シグナル伝達経路が不活性化されている (Hu et al., 2012)。また、神経前駆細胞において、mTOR シグナルがブロックされると Shh のターゲット遺伝子である Ptch や Gli1 の発現が抑制されるため、Shh シグナル伝達は mTOR を必要としている例も報告され

ている (Riobo et al., 2006)。さらに、Shh と IGF シグナルは互いに協調して脳内の細胞増殖 (Rao et al., 2004) および骨芽細胞分化 (Shi et al., 2015) を促進する。したがって、神経管のパターン形成と mTOR シグナルの関係、さらに各ニューロン領域の細胞数の決定のメカニズムを解明するには、神経管特異的に mTOR をノックアウトマウスしたマウスを使うなど、さらに詳細な解析が必要である。

(ここにあった「非対称分裂」の項目は削除：したがって図 19 以降は図番号を変更してあります)

マウス ES 細胞を用いた *in vitro* の神経分化システムの確立と利用

前述したように、mTOR シグナルに関連する因子は多数存在し、それらが互いに異なる機能を発揮することにより、細胞増殖や分化が進行するものと思われる。各遺伝子の機能を解析する上において、コンディショナルを含めたノックアウトマウスはその解析の手段としては有効であるが、すべての mTOR 関連遺伝子について遺伝子変異マウスを作製して解析することは現実的ではない。一方、ES 細胞から特定の神経細胞を作製する分化システムを利用し、関連遺伝子の発現や機能を解析・評価できれば、各遺伝子の発現・機能解析を細胞レベルで比較的容易に行うことができる

私はここまでに議論した RNF152 の機能解析と並行して、マウス ES 細胞の特定の神経細胞への分化システムの確立と、パターン形成に関与することが示唆されている GPR17 遺伝子の機能解析を行った (Yatsuzuka et al., 2019)。

まず、ES 細胞株の 1 つである Sox1-GFP 細胞 (Sox1 遺伝子の発現が GFP 遺伝子の発現によりリアルタイムに観察できる細胞) を用いて、レチノイン酸 (RA) と SAG (Shh シグナルのアゴニスト) の濃度を最適化して、腹側神経前駆細胞である運動神経前駆細胞 (pMN)、p3 介在神経前駆細胞 (p3) および底板領域 (FP) に分化させた (図 19A)。先行研究 (Kutejova et al., 2016) では、主に ES 細胞の株は、フィーダー細胞を要するタイプが使用され、分化には Shh のリコンビナントタンパク質が使用されていたが、本研究では、Sox1-GFP (フィーダーフリー細胞：細胞の維持にフィーダー細胞を必要としない細胞) を用い、なおかつ安定的な化学物質である SAG で Shh の活性が代用できるかを併せて試行した。

その結果実際に、(i) のプロトコールにより Olig2 陽性細胞が 60% 以上出現し、Nkx2.2 陽性細胞が 10% 程度であった (図 20B、E、H、K) 一方、(ii) のプロトコールでは Nkx2.2 陽性細胞が 80% 以上出現して Olig2 陽性細胞が 15% 程度となり (図 19B、C)、pMN または p3 の各前駆細胞を高効率に産出する最適なプロトコールが確立できた。

次に、このようにして分化した細胞を利用して、神経のパターン形成に関

与することが示唆された GPR17 遺伝子 (Yatsuzuka et al., 2019) の発現を、各神経サブタイプで RT-qPCR により評価した。その結果、分化開始後 5 日目 (胚性で 9-10 日に相当) において、GPR17 の発現量は pMN および p3 細胞で高く、底板細胞で低いことが明らかになった (図 19E)。この発現パターンは、*in vivo* における GPR17 の発現パターン (pMN ならびに p3 領域で発現量が高く、底板領域で低い : Yatsuzuka et al., 2019) と一致していた (図 19F)。

さて、GPR17 は Shh シグナルの下流で発現が誘導されるが、GPR17 自体は Shh シグナルの負の調節因子で、Shh シグナルを抑制する役割を持つことが、ニワトリ胚を用いた研究から示唆されている (Yatsuzuka et al., 2019)。そこで、この役割がマウスの神経前駆細胞でも保存されているかを調べるために、GPR17 をターゲットとする *si-RNA* を用いた発現阻害実験を行った。

本実験では、2 つの異なる *si-RNA* (*si-GPR17-1* および *si-GPR17-2*) をそれぞれ ES 細胞に導入し、(i) のプロトコールによって pMN 細胞に分化させ、分化開始 5 日後に GPR17 発現のノックダウン効率を RT-qPCR によって検証した (3 回の実験; 図 20A)。次に、本来 pMN に分化する条件 ((i) のプロトコール) で ES 細胞を分化させ、抗体染色により Olig2 (pMN)、Nkx2.2 の発現を解析した。その結果、*si-GPR17-1*、*si-GPR17-2* を導入したそれぞれの細胞で、Nkx2.2 陽性細胞の比率がコントロールに比べて上昇し、Olig2 陽性細胞数が低下することが明らかになった (図 20B、C、D、K)。したがって、*si-GPR17* を導入した細胞は、Shh シグナルに対して高い感受性を持ち、より高レベルの Shh シグナルが必要な p3 (図 20C、D、F、G、I、J、K) 細胞へと分化する傾向があることが示唆された (Kutejova et al., 2016)。

さらに、分化した細胞を回収し、RT-qPCR でも同様のことが見られるか検証した。その結果、*si-GPR17* を処理した細胞では、Nkx2.2 の発現が *si-control* を導入した細胞よりも高く、抗体染色で得られた結果と一致していた (図 20L)。さらに、Shh シグナルの標的遺伝子である *Ptch1* の発現は、コントロールよりも *si-GPR17* 導入細胞で高かった (図 21L)。したがって、ヘッジホッグシグナルが *si-GPR17* の導入により増強されている (つまり GPR17 自体はヘッジホッグシグナルの負の調節因子である) ことを示唆された。

これらの結果は、ニワトリ胚で行われた GPR17 の機能解析の結果とおおむね一致しており、GPR17 の機能が種間で保存されていることを示しているほか、神経分化に関与する遺伝子解析や、細胞生物学的解析に ES 細胞が有効な手段として用いることができることを示している。

以上のように、マウス ES 細胞の神経分化のシステムを用いることにより、分化が進行する過程に発現する遺伝子の機能解析が効率的に行えることが明らか

かになった。さらに現在、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子欠損 ES 細胞の作製が可能になったため、この方法を用いて効率的に遺伝子を破壊し、機能喪失実験を行うことが可能である。したがって今後、ES 細胞の神経分化とマウス個体を並行して用いた解析を行うことにより、細胞レベル、個体レベルでの遺伝子の機能解析が可能になり、神経発生における細胞レベルでの増殖・分化の解析、遺伝子の徹底した解析ができると考えている。

謝辞

本研究を行うにあたり、恵まれた研究環境を与えてくださるとともに、多くのご指導・ご助言を受け賜りました、奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス領域・発生医科学研究室の笹井紀明准教授に厚く御礼申し上げます。また、アドバイザー教員である神経システム生物学的研究室・稲垣直之教授ならびに遺伝子発現制御研究室・別所康全教授のご助言により、本研究を進展することができました。

発生医科学研究室の西晶子博士には、研究の基本から丁寧に教えていただきました。また、研究室のメンバーには、この研究生活を日々支えて頂きました。深く感謝申し上げます。

最後になりますが、支えてくれた家族や友人たちに心より感謝申し上げます。

参考文献

- Alaynick, W.A., Jessell, T.M., Pfaff, S.L., 2011. SnapShot: spinal cord development. *Cell* 146, 178-178 e171.
- Ang, S.L., Wierda, A., Wong, D., Stevens, K.A., Cascio, S., Rossant, J., Zaret, K.S., 1993. The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins. *Development* 119, 1301-1315.
- Averous, J., Fonseca, B.D., Proud, C.G., 2008. Regulation of cyclin D1 expression by mTORC1 signaling requires eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1. *Oncogene* 27, 1106-1113.
- Baker, N.E., Brown, N.L., 2018. All in the family: proneural bHLH genes and neuronal diversity. *Development* 145, dev.159426.
- Biever, A., Valjent, E., Puighermanal, E., 2015. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in the Nervous System: From Regulation to Function. *Frontiers in molecular neuroscience* 8, 75.
- Briscoe, J., Chen, Y., Jessell, T.M., Struhl, G., 2001. A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Molecular Cell* 7, 1279-1291.
- Bulgakov, O.V., Eggenschwiler, J.T., Hong, D.H., Anderson, K.V., Li, T., 2004. FKBP8 is a negative regulator of mouse sonic hedgehog signaling in neural tissues. *Development* 131, 2149-2159.
- Burstyn-Cohen, T., Tzarfaty, V., Frumkin, A., Feinstein, Y., Stoeckli, E., Klar, A., 1999. F-Spondin is required for accurate pathfinding of commissural axons at the floor plate. *Neuron* 23, 233-246.
- Cao, X., Pfaff, S.L., Gage, F.H., 2008. YAP regulates neural progenitor cell number via the TEA domain transcription factor. *Genes & development* 22, 3320-3334.
- Cayuso, J., Ulloa, F., Cox, B., Briscoe, J., Marti, E., 2006. The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development* 133, 517-528.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., Beachy, P.A., 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-413.
- Cho, G., Lim, Y., Cho, I.T., Simonet, J.C., Golden, J.A., 2014. Arx together with FoxA2, regulates Shh floor plate expression. *Developmental biology* 393, 137-148.

- Dahmane, N., Sanchez, P., Gitton, Y., Palma, V., Sun, T., Beyna, M., Weiner, H., Ruiz i Altaba, A., 2001. The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development* 128, 5201-5212.
- Dalle Pezze, P., Sonntag, A.G., Thien, A., Prentzell, M.T., Godel, M., Fischer, S., Neumann-Haefelin, E., Huber, T.B., Baumeister, R., Shanley, D.P., Thedieck, K., 2012. A dynamic network model of mTOR signaling reveals TSC-independent mTORC2 regulation. *Science signaling* 5, ra25.
- de la Torre, J.R., Hopker, V.H., Ming, G.L., Poo, M.M., Tessier-Lavigne, M., Hemmati-Brivanlou, A., Holt, C.E., 1997. Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron* 19, 1211-1224.
- Delfino-Machin, M., Lunn, J.S., Breitkreuz, D.N., Akai, J., Storey, K.G., 2005. Specification and maintenance of the spinal cord stem zone. *Development* 132, 4273-4283.
- Deng, L., Chen, L., Zhao, L., Xu, Y., Peng, X., Wang, X., Ding, L., Jin, J., Teng, H., Wang, Y., Pan, W., Yu, F., Liao, L., Li, L., Ge, X., Wang, P., 2019. Ubiquitination of Rheb governs growth factor-induced mTORC1 activation. *Cell Research* 29, 136-150.
- Deng, L., Jiang, C., Chen, L., Jin, J., Wei, J., Zhao, L., Chen, M., Pan, W., Xu, Y., Chu, H., Wang, X., Ge, X., Li, D., Liao, L., Liu, M., Li, L., Wang, P., 2015. The ubiquitination of rag A GTPase by RNF152 negatively regulates mTORC1 activation. *Molecular Cell* 58, 804-818.
- Dessaud, E., McMahon, A.P., Briscoe, J., 2008. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* 135, 2489-2503.
- Dessaud, E., Ribes, V., Balaskas, N., Yang, L.L., Pierani, A., Kicheva, A., Novitch, B.G., Briscoe, J., Sasai, N., 2010. Dynamic assignment and maintenance of positional identity in the ventral neural tube by the morphogen sonic hedgehog. *PLoS Biology* 8, e1000382.
- Dessaud, E., Yang, L.L., Hill, K., Cox, B., Ulloa, F., Ribeiro, A., Mynett, A., Novitch, B.G., Briscoe, J., 2007. Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* 450, 717-720.
- Efeyan, A., Schweitzer, L.D., Bilate, A.M., Chang, S., Kirak, O., Lamming, D.W., Sabatini, D.M., 2014. RagA, but not RagB, is essential for embryonic development and adult mice. *Developmental Cell* 29, 321-329.
- Fishwick, K.J., Li, R.A., Halley, P., Deng, P., Storey, K.G., 2010. Initiation of neuronal differentiation requires PI3-kinase/TOR signalling in the vertebrate neural tube. *Developmental Biology* 338, 215-225.

- Foerster, P., Daclin, M., Asm, S., Faucourt, M., Boletta, A., Genovesio, A., Spassky, N., 2017. mTORC1 signaling and primary cilia are required for brain ventricle morphogenesis. *Development* 144, 201-210.
- Gangloff, Y.G., Mueller, M., Dann, S.G., Svoboda, P., Sticker, M., Spetz, J.F., Um, S.H., Brown, E.J., Cereghini, S., Thomas, G., Kozma, S.C., 2004. Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Molecular and Cellular Biology* 24, 9508-9516.
- Grabiner, B.C., Nardi, V., Birsoy, K., Possemato, R., Shen, K., Sinha, S., Jordan, A., Beck, A.H., Sabatini, D.M., 2014. A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer Discovery* 4, 554-563.
- Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Developmental Dynamics* 195, 231-272.
- Hu, Q., Lee, S.Y., O'Kusky, J.R., Ye, P., 2012. Signalling through the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) interacts with canonical Wnt signalling to promote neural proliferation in developing brain. *ASN Neuro* 4, e00092.
- Jacob, J., Briscoe, J., 2003. Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Reports* 4, 761-765.
- Jacob, J., Ferri, A.L., Milton, C., Prin, F., Pla, P., Lin, W., Gavalas, A., Ang, S.L., Briscoe, J., 2007. Transcriptional repression coordinates the temporal switch from motor to serotonergic neurogenesis. *Nature Neuroscience* 10, 1433-1439.
- Ka, M., Condorelli, G., Woodgett, J.R., Kim, W.Y., 2014. mTOR regulates brain morphogenesis by mediating GSK3 signaling. *Development* 141, 4076-4086.
- Kadoya, M., Sasai, N., 2019. Negative regulation of mTOR signaling restricts cell proliferation in the Floor Plate. *Frontiers in Neuroscience* 13, 1022.
- Kahane, N., Ribes, V., Kicheva, A., Briscoe, J., Kalcheim, C., 2013. The transition from differentiation to growth during dermomyotome-derived myogenesis depends on temporally restricted hedgehog signaling. *Development* 140, 1740-1750.
- Kennedy, T.E., Serafini, T., de la Torre, J.R., Tessier-Lavigne, M., 1994. Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78, 425-435.
- Kenney, A.M., Cole, M.D., Rowitch, D.H., 2003. Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development* 2003 130, 15-28.
- Kicheva, A., Bollenbach, T., Ribeiro, A., Valle, H.P., Lovell-Badge, R., Episkopou, V.,

- Briscoe, J., 2014. Coordination of progenitor specification and growth in mouse and chick spinal cord. *Science* 345, 1254927.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., Guan, K.L., 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature Cell Biology* 10, 935-945.
- Klar, A., Baldassare, M., Jessell, T.M., 1992. F-spondin: a gene expressed at high levels in the floor plate encodes a secreted protein that promotes neural cell adhesion and neurite extension. *Cell* 69, 95-110.
- Kobayashi, T., Minowa, O., Sugitani, Y., Takai, S., Mitani, H., Kobayashi, E., Noda, T., Hino, O., 2001. A germ-line Tsc1 mutation causes tumor development and embryonic lethality that are similar, but not identical to, those caused by Tsc2 mutation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 8762-8767.
- Komada, M., 2012. Sonic hedgehog signaling coordinates the proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells by regulating cell cycle kinetics during development of the neocortex. *Congenital Anomalies* 52, 72-77.
- Kumar, A., Huh, T.L., Choe, J., Rhee, M., 2017. Rnf152 Is Essential for NeuroD Expression and Delta-Notch Signaling in the Zebrafish Embryos. *Molecules and Cells* 40, 945-953.
- Kutejova, E., Sasai, N., Shah, A., Gouti, M., Briscoe, J., 2016. Neural Progenitors Adopt Specific Identities by Directly Repressing All Alternative Progenitor Transcriptional Programs. *Developmental Cell* 36, 639-653.
- Laplante, M., Sabatini, D.M., 2009. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* 122, 3589-3594.
- Laplante, M., Sabatini, D.M., 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293.
- Laplante, M., Sabatini, D.M., 2013. Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance. *Journal of Cell Science* 126, 1713-1719.
- Le Dreau, G., Marti, E., 2012. Dorsal-ventral patterning of the neural tube: a tale of three signals. *Developmental Neurobiology* 72, 1471-1481.
- Li, Y., Inoki, K., Guan, K.L., 2004. Biochemical and functional characterizations of small GTPase Rheb and TSC2 GAP activity. *Molecular and Cellular Biology* 24, 7965-7975.
- LiCausi, F., Hartman, N.W., 2018. Role of mTOR Complexes in Neurogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* 19, E1544.
- Megason, S.G., McMahon, A.P., 2002. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts

- organizes growth in the CNS. *Development* 129, 2087-2098.
- Metzakopian, E., Lin, W., Salmon-Divon, M., Dvinge, H., Andersson, E., Ericson, J., Perlmann, T., Whitsett, J.A., Bertone, P., Ang, S.L., 2012. Genome-wide characterization of *Foxa2* targets reveals upregulation of floor plate genes and repression of ventrolateral genes in midbrain dopaminergic progenitors. *Development* 139, 2625-2634.
- Ming, G.L., Song, H.J., Berninger, B., Holt, C.E., Tessier-Lavigne, M., Poo, M.M., 1997. cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1. *Neuron* 19, 1225-1235.
- Molina, A., Pituello, F., 2017. Playing with the cell cycle to build the spinal cord. *Developmental Biology* 432, 14-23.
- Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K., Yamanaka, S., 2004. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology* 24, 6710-6718.
- Nie, X., Zheng, J., Ricupero, C.L., He, L., Jiao, K., Mao, J.J., 2018. mTOR acts as a pivotal signaling hub for neural crest cells during craniofacial development. *PLoS Genetics* 14, e1007491.
- Nishimura, T., Honda, H., Takeichi, M., 2012. Planar cell polarity links axes of spatial dynamics in neural-tube closure. *Cell* 149, 1084-1097.
- Nishimura, T., Takeichi, M., 2008. Shroom3-mediated recruitment of Rho kinases to the apical cell junctions regulates epithelial and neuroepithelial planar remodeling. *Development* 135, 1493-1502.
- Oliver, T.G., Grasdeder, L.L., Carroll, A.L., Kaiser, C., Gillingham, C.L., Lin, S.M., Wickramasinghe, R., Scott, M.P., Wechsler-Reya, R.J., 2003. Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: A critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7331-7336.
- Ono, Y., Nakatani, T., Sakamoto, Y., Mizuhara, E., Minaki, Y., Kumai, M., Hamaguchi, A., Nishimura, M., Inoue, Y., Hayashi, H., Takahashi, J., Imai, T., 2007. Differences in neurogenic potential in floor plate cells along an anteroposterior location: midbrain dopaminergic neurons originate from mesencephalic floor plate cells. *Development* 134, 3213-3225.
- Perrimon, N., Pitsouli, C., Shilo, B.Z., 2012. Signaling mechanisms controlling cell fate and embryonic patterning. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, a005975.
- Placzek, M., Briscoe, J., 2005. The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nature reviews. Neuroscience* 6, 230-240.

- Rao, G., Pedone, C.A., Del Valle, L., Reiss, K., Holland, E.C., Fults, D.W., 2004. Sonic hedgehog and insulin-like growth factor signaling synergize to induce medulloblastoma formation from nestin-expressing neural progenitors in mice. *Oncogene* 23, 6156-6162.
- Rennebeck, G., Kleymenova, E.V., Anderson, R., Yeung, R.S., Artzt, K., Walker, C.L., 1998. Loss of function of the tuberous sclerosis 2 tumor suppressor gene results in embryonic lethality characterized by disrupted neuroepithelial growth and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15629-15634.
- Ribes, V., Balaskas, N., Sasai, N., Cruz, C., Dessaud, E., Cayuso, J., Tozer, S., Yang, L.L., Novitch, B., Marti, E., Briscoe, J., 2010. Distinct Sonic Hedgehog signaling dynamics specify floor plate and ventral neuronal progenitors in the vertebrate neural tube. *Genes & development* 24, 1186-1200.
- Ribes, V., Briscoe, J., 2009. Establishing and interpreting graded Sonic Hedgehog signaling during vertebrate neural tube patterning: the role of negative feedback. *Cold Spring Harbor perspectives in Biology* 1, a002014.
- Riobo, N.A., Lu, K., Ai, X., Haines, G.M., Emerson, C.P., Jr., 2006. Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4505-4510.
- Rowitch, D.H., B, S.J., Lee, S.M., Flax, J.D., Snyder, E.Y., McMahon, A.P., 1999. Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *The Journal of Neuroscience* 19, 8954-8965.
- Ryskalin, L., Lazzeri, G., Flaibani, M., Biagioni, F., Gambardella, S., Frati, A., Fornai, F., 2017. mTOR-Dependent Cell Proliferation in the Brain. *BioMed Research International* 2017, 7082696.
- Sasai, N., Briscoe, J., 2012. Primary cilia and graded Sonic Hedgehog signaling. *Wires Dev. Biol.* 1, 753-772.
- Sasai, N., Kutejova, E., Briscoe, J., 2014. Integration of signals along orthogonal axes of the vertebrate neural tube controls progenitor competence and increases cell diversity. *PLoS Biology* 12, e1001907.
- Sasai, N., Toriyama, M., Kondo, T. 2019. Hedgehog signal and genetic disorders. *Frontiers in Genetics* 10, 1103.
- Sasaki, H., Hogan, B.L., 1994. HNF-3 beta as a regulator of floor plate development. *Cell* 76, 103-115.
- Sato, T., Umetsu, A., Tamanoi, F., 2008. Characterization of the Rheb-mTOR signaling

- pathway in mammalian cells: constitutive active mutants of Rheb and mTOR. *Methods in Enzymology* 438, 307-320.
- Saxton, R.A., Sabatini, D.M., 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168, 960-976.
- Shaw, R.J., 2008. mTOR signaling: RAG GTPases transmit the amino acid signal. *Trends in Biochemical Sciences* 33, 565-568.
- Shi, Y., Chen, J., Karner, C.M., Long, F., 2015. Hedgehog signaling activates a positive feedback mechanism involving insulin-like growth factors to induce osteoblast differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 4678-4683.
- Shimojo, H., Ohtsuka, T., Kageyama, R., 2011. Dynamic expression of notch signaling genes in neural stem/progenitor cells. *Frontiers in Neuroscience* 5, 78.
- Sloan, T.F., Qasaimeh, M.A., Juncker, D., Yam, P.T., Charron, F., 2015. Integration of shallow gradients of Shh and Netrin-1 guides commissural axons. *PLoS Biology* 13, e1002119.
- Tabancay, A.P., Jr., Gau, C.L., Machado, I.M., Uhlmann, E.J., Gutmann, D.H., Guo, L., Tamanoi, F., 2003. Identification of dominant negative mutants of Rheb GTPase and their use to implicate the involvement of human Rheb in the activation of p70S6K. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 39921-39930.
- Tee, A.R., Sampson, J.R., Pal, D.K., Bateman, J.M., 2016. The role of mTOR signalling in neurogenesis, insights from tuberous sclerosis complex. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 52, 12-20.
- Torroba, B., Herrera, A., Menendez, A., Pons, S., 2018. PI3K regulates intraepithelial cell positioning through Rho GTP-ases in the developing neural tube. *Developmental Biology* 436, 42-54.
- Vaughan, L., Clarke, P.A., Barker, K., Chantry, Y., Gustafson, C.W., Tucker, E., Renshaw, J., Raynaud, F., Li, X., Burke, R., Jamin, Y., Robinson, S.P., Pearson, A., Maira, M., Weiss, W.A., Workman, P., Chesler, L., 2016. Inhibition of mTOR-kinase destabilizes MYCN and is a potential therapy for MYCN-dependent tumors. *Oncotarget* 7, 57525-57544.
- Vokes, S.A., Ji, H., McCuine, S., Tenzen, T., Giles, S., Zhong, S., Longabaugh, W.J., Davidson, E.H., Wong, W.H., McMahon, A.P., 2007. Genomic characterization of Gli-activator targets in sonic hedgehog-mediated neural patterning. *Development* 134, 1977-1989.
- Wang, Y., Ding, Q., Yen, C.J., Xia, W., Izzo, J.G., Lang, J.Y., Li, C.W., Hsu, J.L., Miller, S.A., Wang, X., Lee, D.F., Hsu, J.M., Huo, L., Labaff, A.M., Liu, D., Huang, T.H., Lai,

- C.C., Tsai, F.J., Chang, W.C., Chen, C.H., Wu, T.T., Buttar, N.S., Wang, K.K., Wu, Y., Wang, H., Ajani, J., Hung, M.C., 2012. The crosstalk of mTOR/S6K1 and Hedgehog pathways. *Cancer Cell* 21, 374-387.
- Yatsuzuka, A., Hori, A; Kadoya, M.; Matsuo-Takasaki, M.; Kondo, T.; Sasai, N., 2019. GPR17 is an essential component of the negative feedback loop of the Sonic Hedgehog signalling pathway in neural tube development. *Development* 146, dev176784.
- Yu, K., McGlynn, S., Matisse, M.P., 2013. Floor plate-derived sonic hedgehog regulates glial and ependymal cell fates in the developing spinal cord. *Development* 140, 1594-1604.
- Zhang, S., Wu, W., Wu, Y., Zheng, J., Suo, T., Tang, H., Tang, J., 2010. RNF152, a novel lysosome localized E3 ligase with pro-apoptotic activities. *Protein & Cell* 1, 656-663.

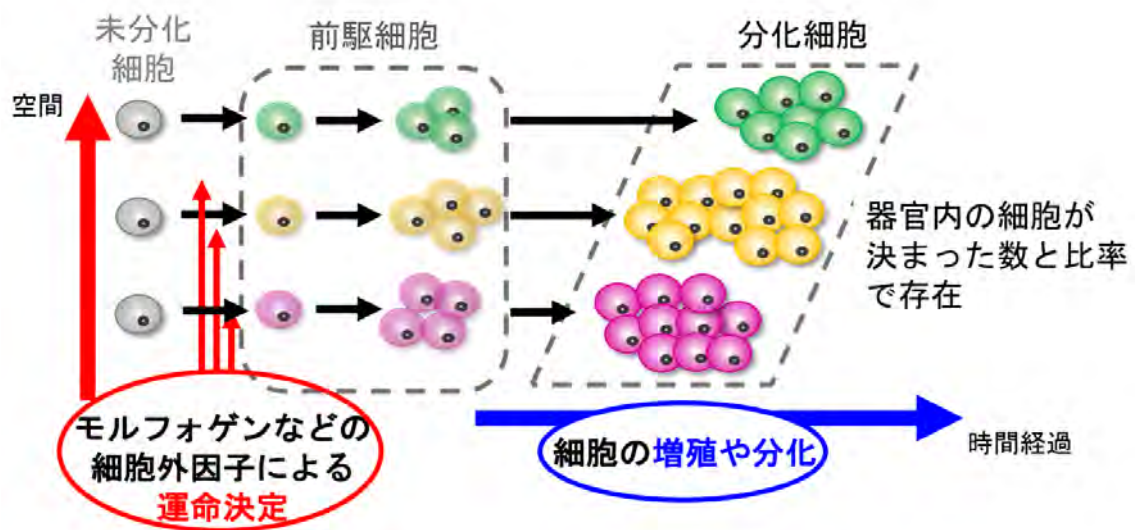
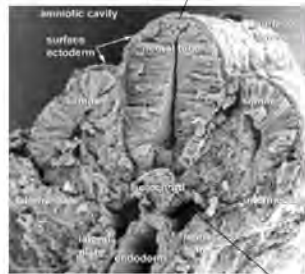
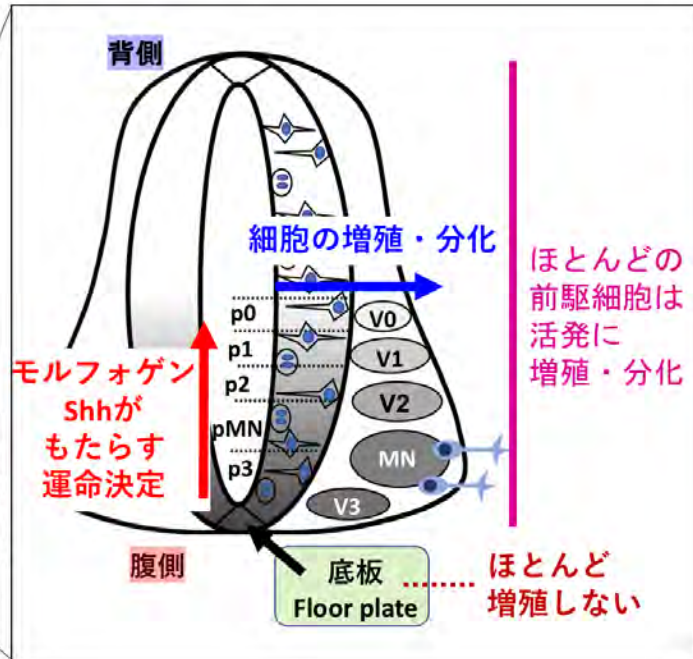


図1. モルフォゲンなどの細胞外因子による運命決定と細胞の増殖や分化の共役により、器官内の様々な細胞が一定の量比を持って存在する。

A 発生4日目のニワトリ胚

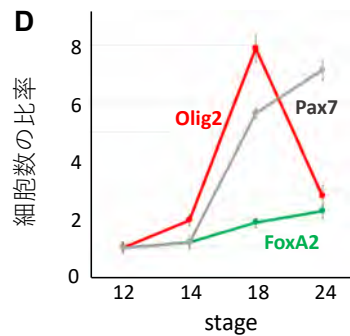
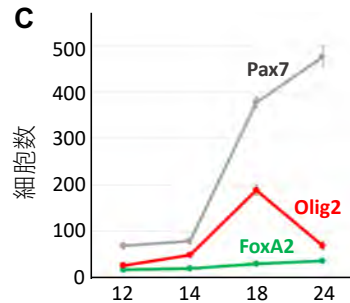
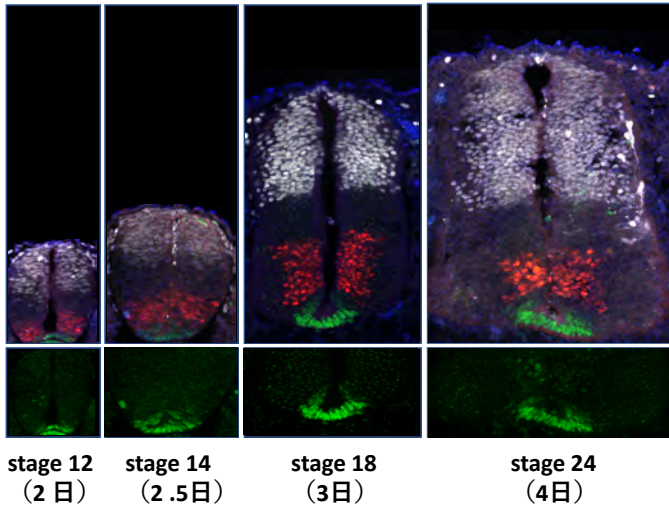


神経管の断面図
(embryology.med より引用)



4

B Pax7 (pdI) Olig2 (pMN) FoxA2 (FP) DAPI



(図2)の説明は次ページに記した。

図 2. 神経管の背腹軸における、パターン形成と増殖・分化の関係。各領域の前駆細胞は異なる増殖効率を持ち、底板領域細胞はほとんど増殖しない。

(A) 神経管の背腹軸には、神経管の内側（頂端面（アピカル側に近い方））に前駆領域（p0、p1、p2、p3 の介在神経前駆領域と、pMN とラベルした運動神経前駆領域）が存在し、これらの細胞運命はモルフォゲンである Shh の濃度勾配に依存して決定される。また、これらの前駆細胞は活発に増殖しながら分化（神経化）して神経管の外側領域へと移動していく。一方、最腹部には底板領域が存在し、この細胞増殖は極めて低い。

(B) 前駆細胞ごとに増殖効率が異なることの実験的な証明。ニワトリの 2 日胚から 4 日胚まで、異なる発生ステージ（HH stage 12、14、18、24）の前肢部の神経管断面を作成し、背側（ホメオボックス型転写因子 Pax7）、運動神経前駆領域（pMN; mHLH 型転写因子 Olig2）、底板領域（フォークヘッド型転写因子 FoxA2）の各抗体で傾向抗体染色を行った。

(C) (B) の写真について、各ステージにおける陽性細胞数をカウントし、その細胞数の変化を表に示した。

(D) (C) のグラフについて、ステージ 12 を 1 とした時の細胞数の比率を算出し、グラフに示した。

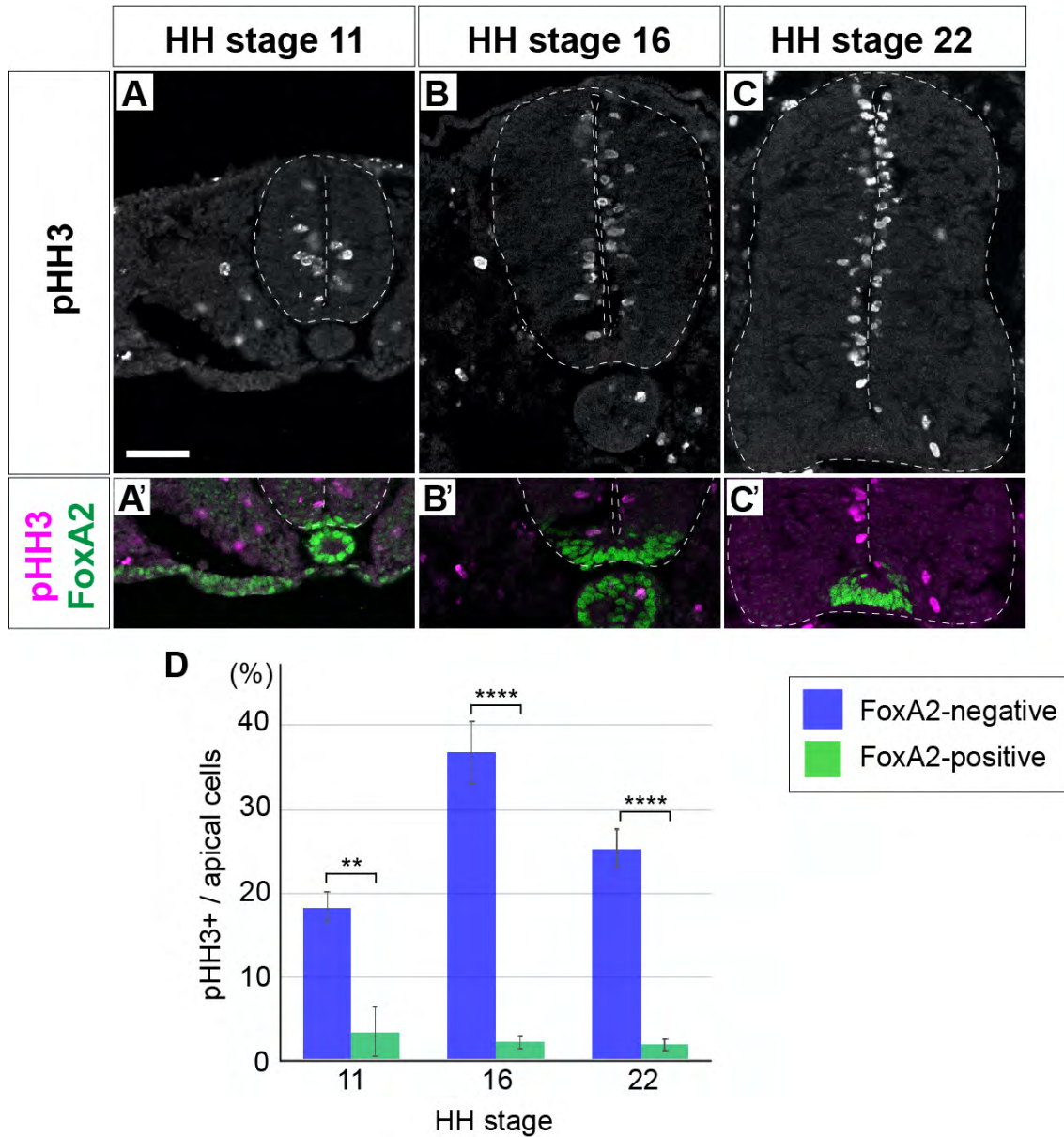


図 3. 底板領域の細胞は、他の領域の神経前駆細胞とは異なり増殖しない。(A-C') HH stage 11(A、A')、16(B、B')および22(C、C')の神経管切片における pHH3 および FoxA2 の発現。増殖細胞である pHH3 陽性細胞は、FoxA2 が発現している底板 (A'、B'、C') では検出されなかった。スケールバー = 50 μ m。(D) 底板 および神経管の他の領域の頂端面の細胞数に対する pHH3 陽性細胞数の比率の定量データ。

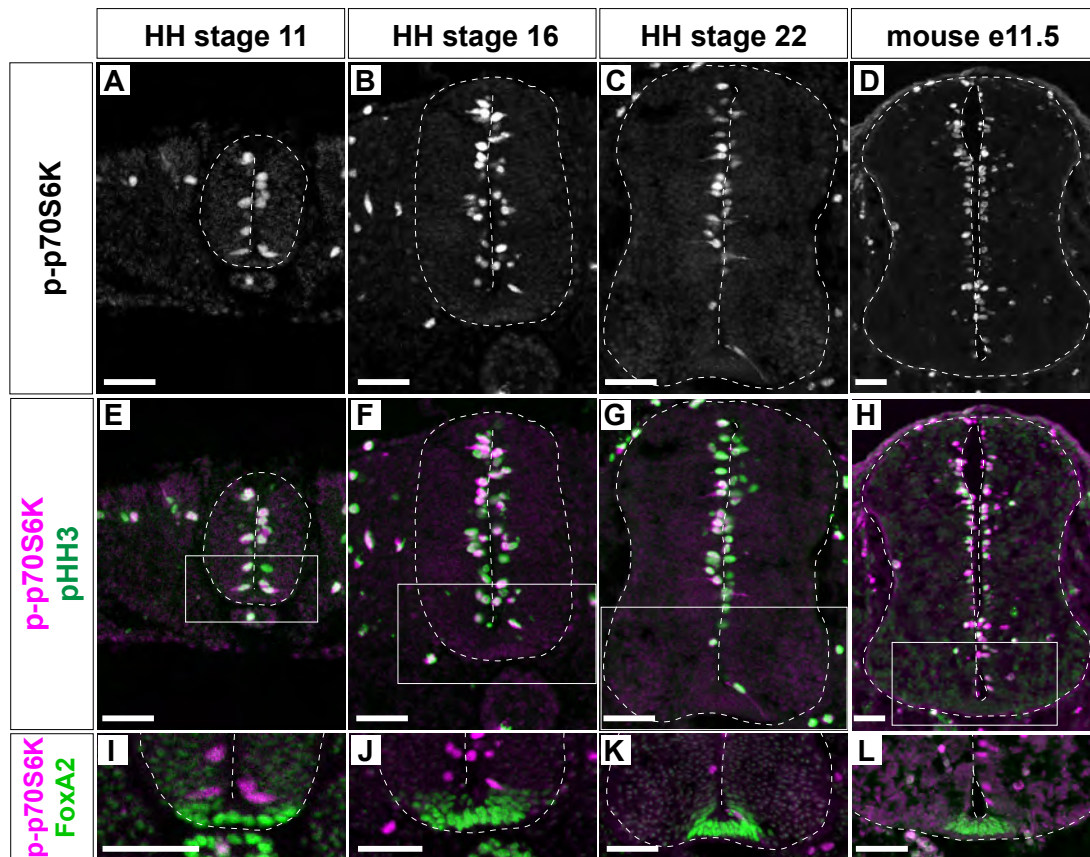


図 4. mTOR シグナル経路の下流因子である p-p70S6K は底板では活性化しない。
 (A-L) p-p70S6K(A-L)、pHH3(E-H)および FoxA2(I-L)の活性化を、HH ステージ 11 (A, E, I)、16 (B, F, J) および 22 (C, G, K) のニワトリおよび e11.5 (D, H, L) マウス神経管切片をそれぞれ用いて観察した。(I)、(J)、(K)、および (L) は、それぞれ (E)、(F)、(G)、および (H) の長方形で囲まれた領域に対応している。スケールバー = 50 μ m。

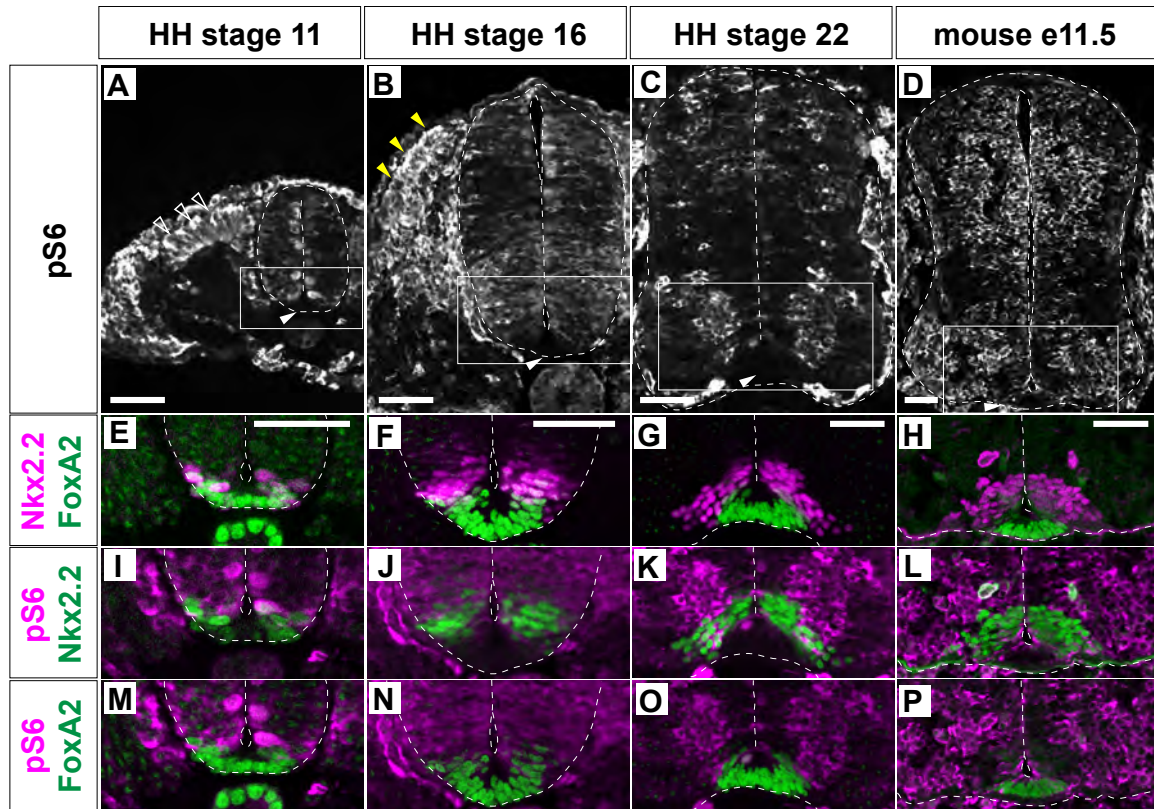
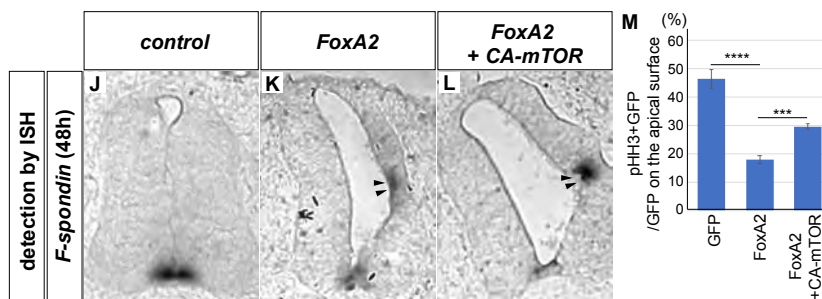
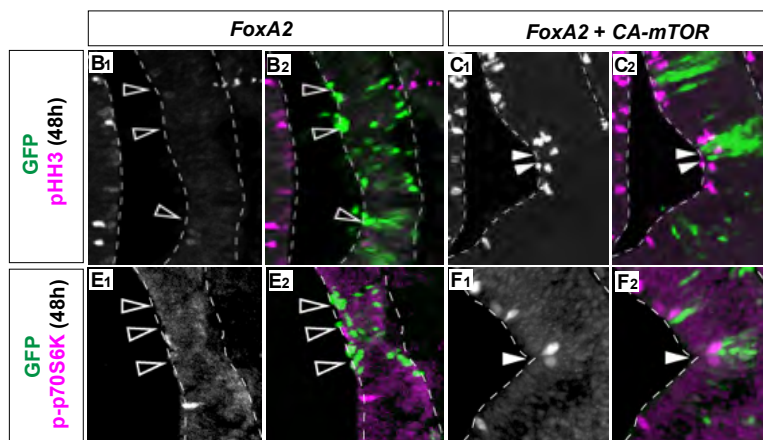
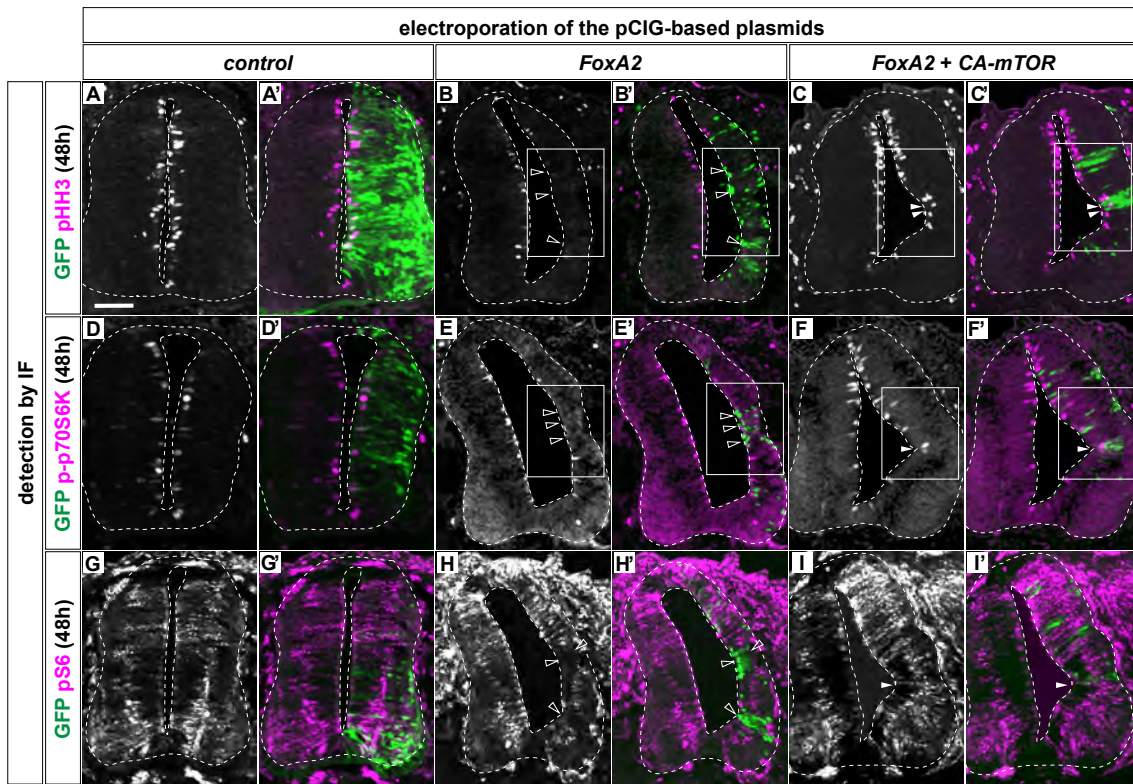


図 5. mTOR シグナル経路の下流因子である pS6 は底板では活性化しない。(A-P) pS6 陽性細胞 (白; A-D およびマゼンタ ; I-P) を Nkx2.2 (マゼンタ ; E-H、緑 ; I-L) および FoxA2 (緑 ; E-H、M-P) の細胞で解析した。(E、I、M)、(F、J、N)、(G、K、O) および (H、L、P) は、(A)、(B)、(C) および (P) の長方形で囲まれた領域にそれぞれ対応する。(A-D)の白い矢印; 底板領域、(A)の輪郭の矢印; 背側体節、(B)の黄色の矢印; デルモミオトーム。スケールバー = 50 μ m。



(図 6) の説明は次ページに記した。

図 6. FoxA2 は mTOR シグナルをブロックすることにより、細胞増殖を負に制御する。コントロール GFP (A、A'、D、D'、G、G'、J)、FoxA2 (B、B'、E、E'、H、H'、K) または FoxA2 と CA-mTOR (C、C'、F、F'、I、I'、L) を HH stage 12 胚の神経管の片側にエレクトロポレーションし、48 時間にて、表現型を pHH3 (A-C') を用いた免疫蛍光法により解析した。p-p70S6K (D-F')、pS6 (G-I') および GFP (A'、B'、C'、D'、E'、F'、G'、H'、I'、J'、K'、L') 抗体をそれぞれ使用した。GFP 発現を伴う pHH3 (C、C')、p-70S6K (F、F') または pS6 (I、I') の二重染色細胞は白矢印で、また GFP 陽性細胞のうち pHH3- (B、B')、p-p70S6K- (E、E') および pS6- (H、H') 陰性は、白抜き矢印で示した。(B₁-C₂、E₁-F₂) (B-C'、E-F') の矢印の部分拡大した写真を示した。(J-L) FoxA2 による底板の細胞運命決定は、CA-mTOR によって変更されない。F-spondin の発現領域は、in situ ハイブリダイゼーションにより解析した。FoxA2 によって異所的に誘導された F-spondin の発現は、黒矢印 (K、L) で示した。(J)、(K)、(L) の解析は、それぞれ (G)、(H)、(I) の隣接する切片で行った。スケールバー = 50 μm。(M) (A-C') の定量データ。

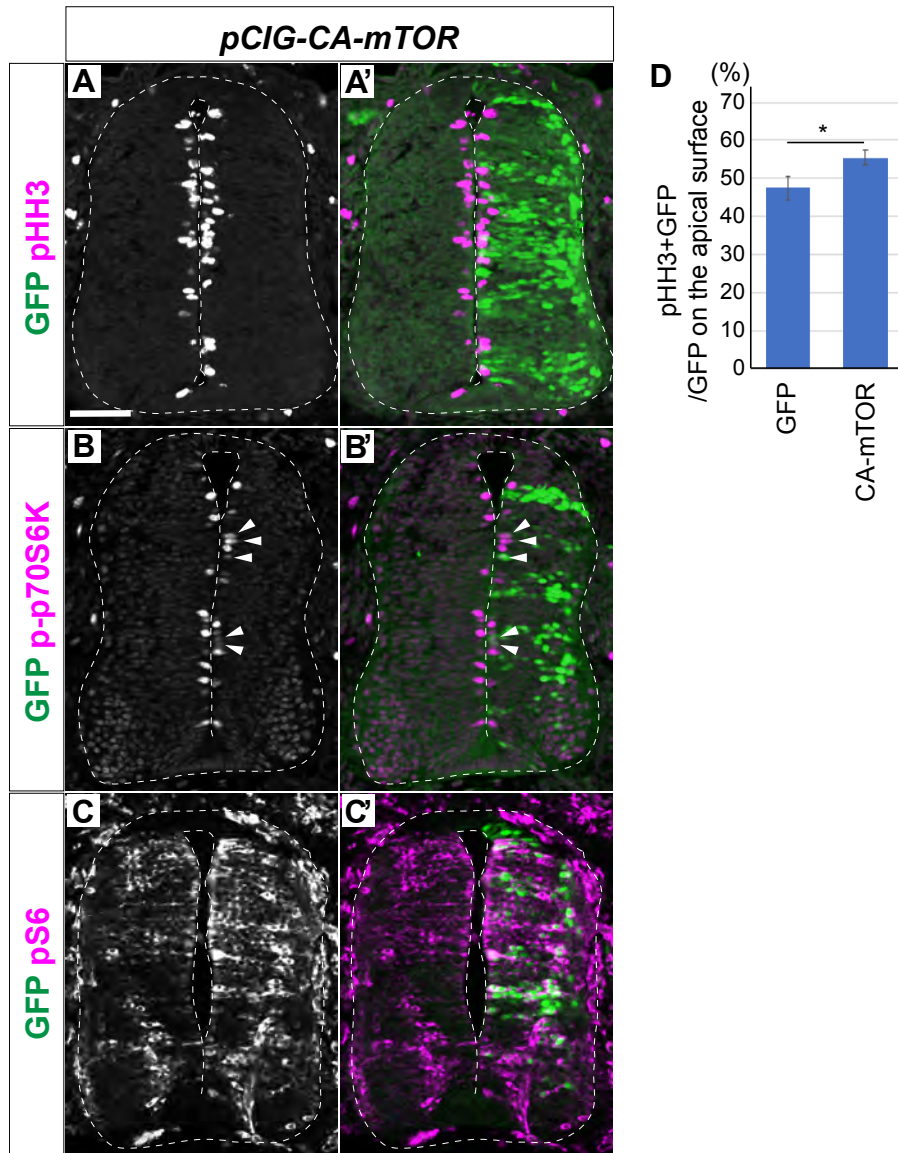


図 7. CA-mTOR の過剰発現により、pS6、p-p70S6K および pHH3 の陽性細胞数が増加する。(A-C') pCIG-CA-mTOR を HH stage 12 胚の神経管の片側にエレクトロポレーションし、48 時間で表現型を pHH3 (A、A') を用いた免疫蛍光法により分析した。p-p70S6K (B、B')、pS6 (C、C') および GFP (A'、B'、C') 抗体。各マーカーと GFP の二重陽性細胞は、白い矢印で示されている。スケールバー = 50 μ m。(D) (A、A') の定量データ。

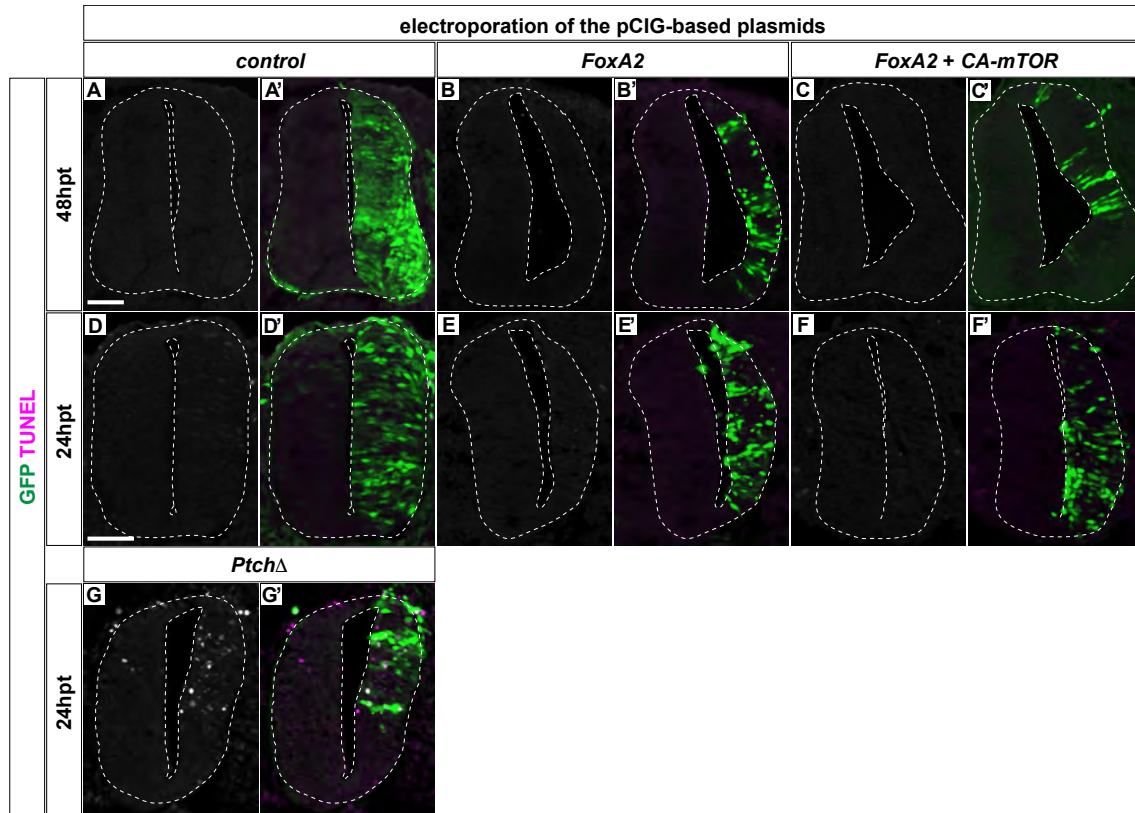


図 8. FoxA2 陽性細胞数の決定にはプログラム細胞死は関与しない。コントロール GFP (A、A'、D、D')、FoxA2 (B、B'、E、E')、FoxA2 と CA-mTOR(C、C'、F、F')または *Ptch* Δ (G、G') を HH stage 12 の神経管の片側に強制発現し、48 時間後 (A-C') または 24 時間後 (D-G') に解析した。TUNEL 陽性細胞は、白 (A、B、C、D、E、F、G) またはマゼンタ(A'、B'、C'、D'、E'、F'、G')で表した。強制発現した細胞を緑色 (GFP : A'、B'、C'、D'、E'、F'、G')で示してある。(A-C') の (A) と (D-G') の (D) のスケールバー = 50 μ m。

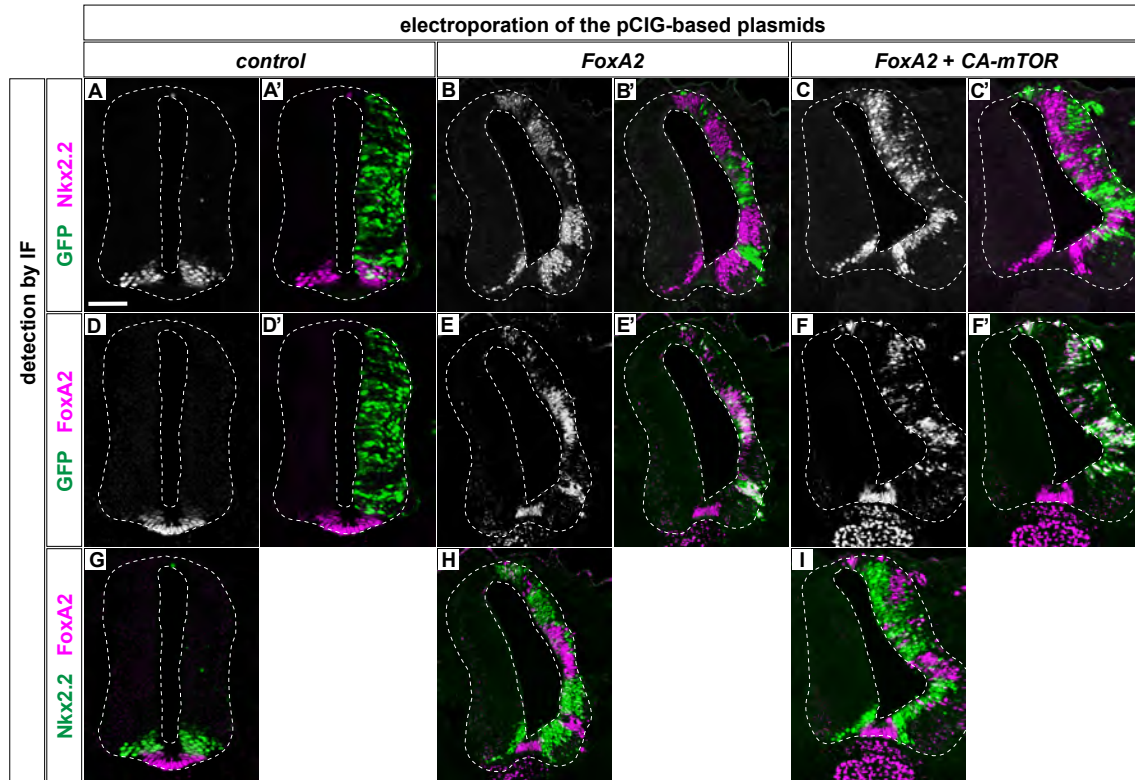


図 9. FoxA2 および CA-mTOR を強制発現した神経管において、FoxA2 が発現する細胞 (GFP 陽性) は底板領域になり、それ以外の大部分は p3 領域 (Nkx2.2 陽性) となる。図 6 と同様の方法によりエレクトロポレーションされた神経管において、Nkx2.2 (A、A'、B、B'、C、C'、G、H、I)、FoxA2 (D、D'、E、E'、F、F'、G、H、I) および GFP (A'、B'、C'、D'、E'、F') 抗体を用いて抗体染色を行った。スケールバー = 50 μm 。

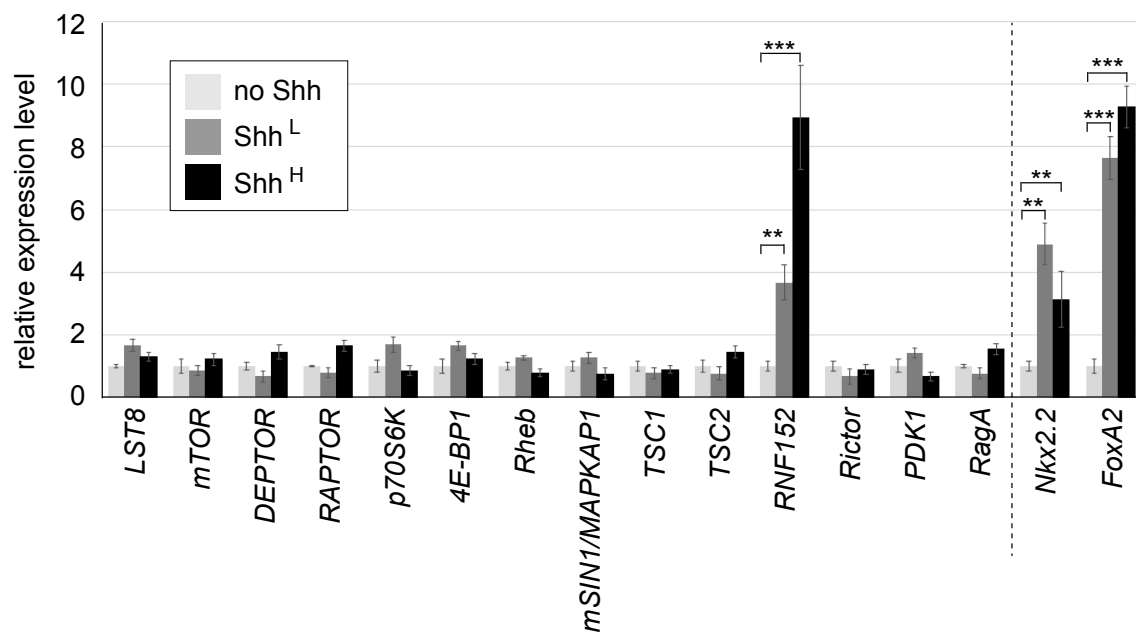


図 10. RNF152 は高濃度の Shh によって発現誘導される。mTOR シグナルに関連する遺伝子を RT-qPCR により発現解析した。ニワトリ神経組織片をコントロールの培地、または Shh-L または Shh-H の存在下で 48 時間処理し、各遺伝子の発現量を解析した。

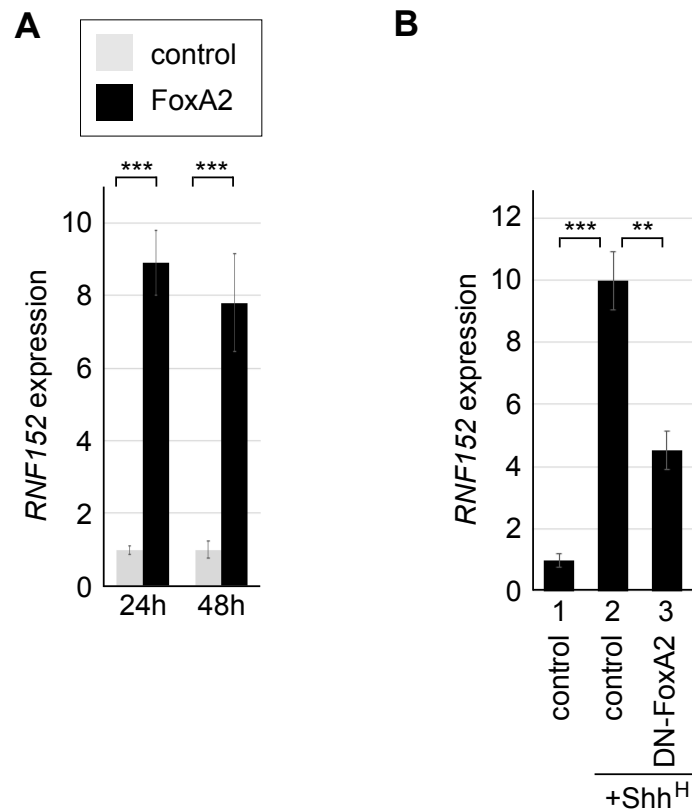


図 11. RNF152 は FoxA2 の標的遺伝子であり、発現には FoxA2 を必要とする。
 (A) pCIG (コントロール ; 灰色) または pCIG-FoxA2 (黒色) をエレクトロポレーションした組織片を 24 時間または 48 時間培養し、RNF152 の発現を RT-qPCR を用いて解析した。(B) pCIG (コントロール ; レーン 1,2) または pCIG-DN-FoxA2 (レーン 3) をエレクトロポレーションした神経組織片をコントロール培地 (レーン 1) または Shh-H 含有培地 (レーン 2,3) で 48 時間処理し、RNF152 の発現を RT-qPCR により解析した。

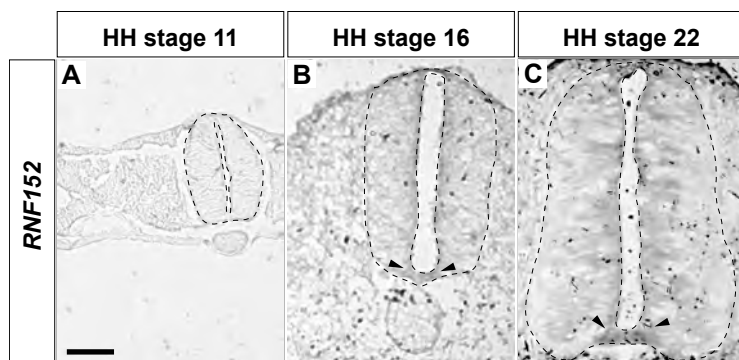


図 12. RNF152 は底板で発現する。(A-C) HH stage 11 (A)、16 (B) および 22 (C) の神経管において RNF152 の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションにより解析した。底板領域における発現を矢印 (B、C) で示した。スケールバー = 50 μm 。

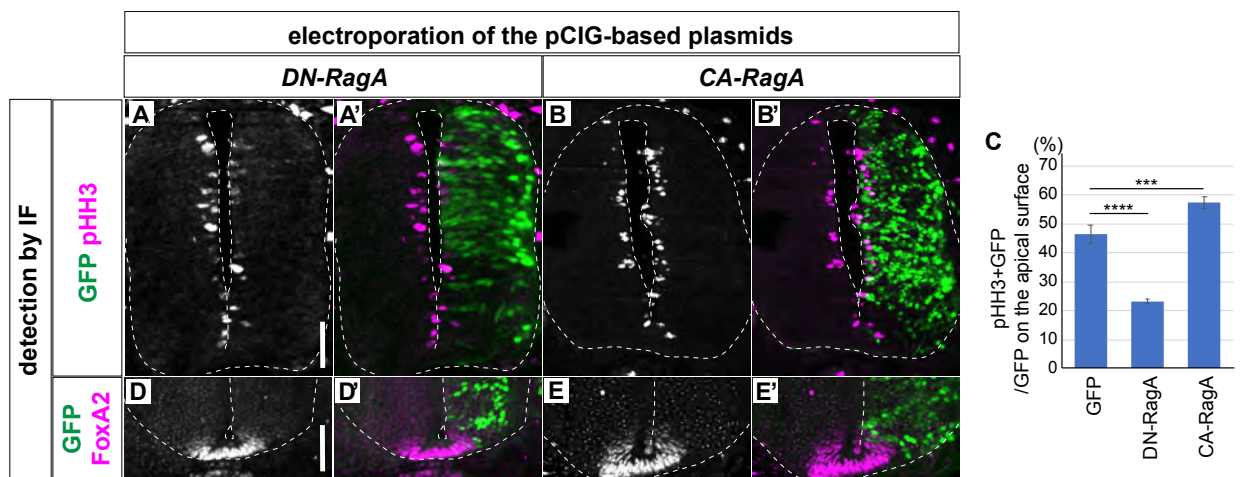


図 13. RNF152 は、mTOR シグナル伝達経路をブロックすることにより細胞増殖を負に制御する。(A-E') 細胞増殖は RagA の活性により制御されている。pCIG-DN-RagA (A, A', D, D') または pCIG-CA-RagA (B, B', E, E') を HH stage 12 でエレクトロポレーションし、48 時間で pHH3 (A-B'), FoxA2 (D-E') および GFP (A', B', D', E') 抗体で解析した。(C) (A-B') の定量データ。頂端面の GFP 陽性細胞に対する pHH3/GFP 二重陽性細胞の割合を示した。コントロール GFP エレクトロポレーションの定量データは、図 6A のデータを用いた。(A-B') の (A) および (D-E') の (D) のスケールバー = 50 μ m

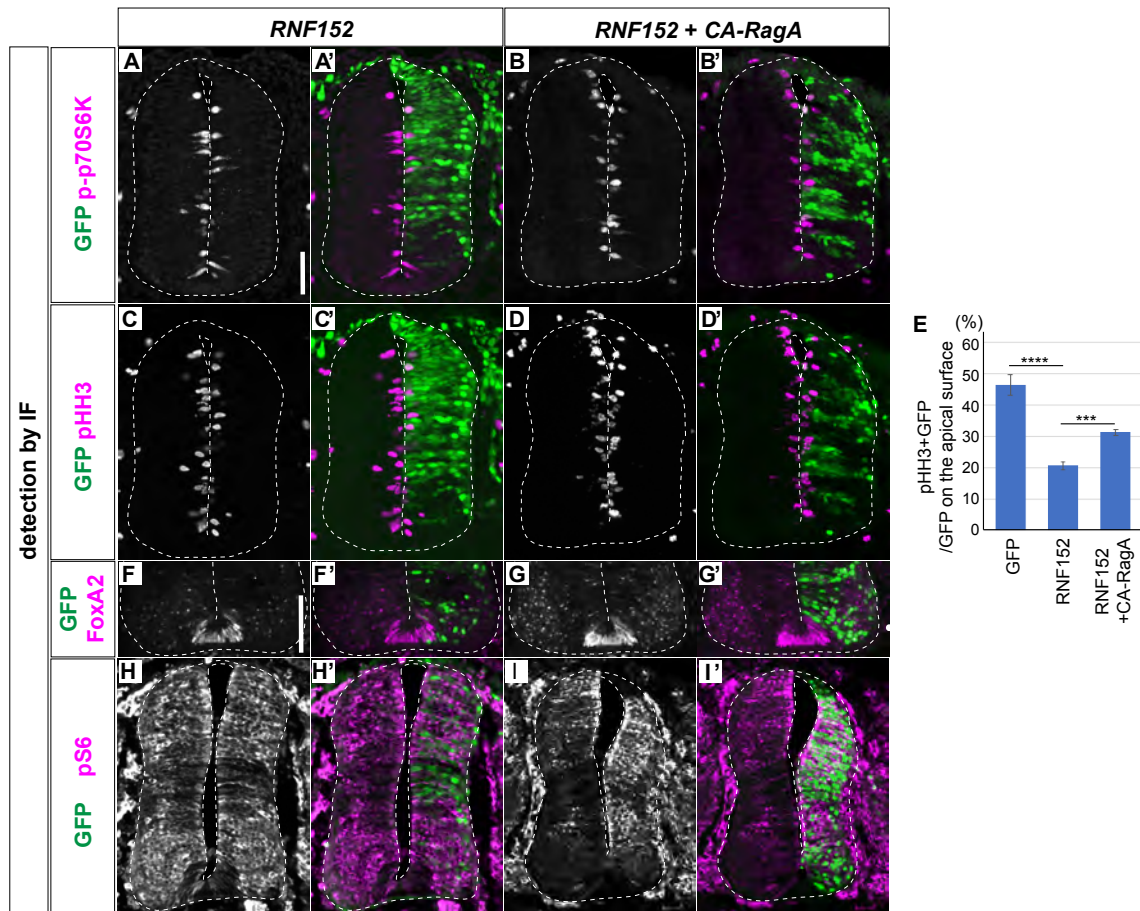
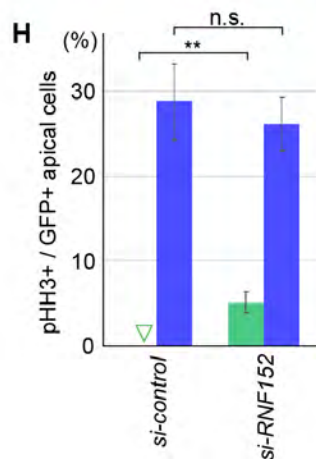
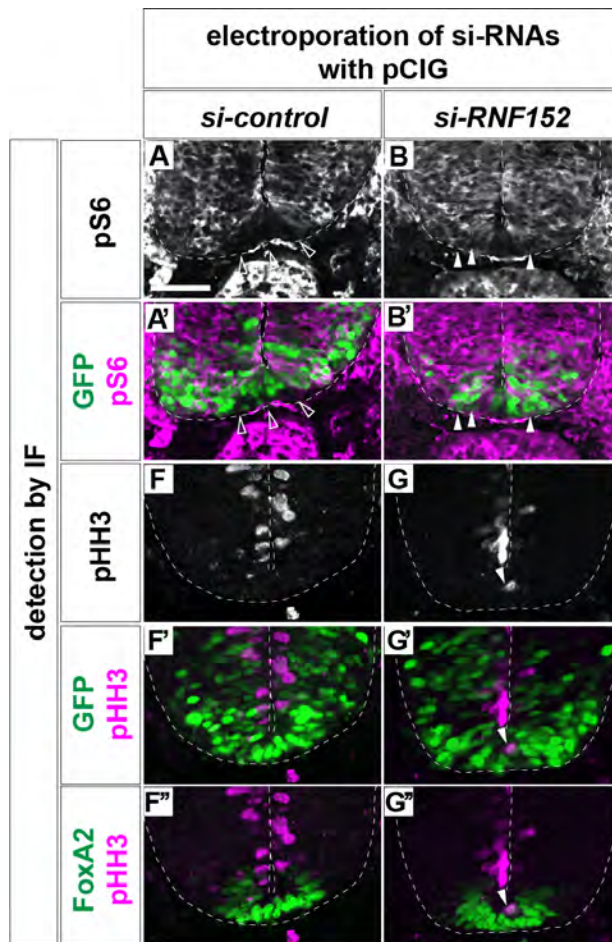


図 14. RNF152 は底板領域の細胞の細胞運命を変えることなく、mTOR シグナル伝達および細胞増殖を負に調節する。pCIG-RNF152 を単独 (A、A'、C、C'、F、F'、H、H') または RNF152 と CA-Rag (B、B'、D、D'、G、G'、I、I') を、HH stage 12 でエレクトロポレーションし、48 時間で p-p70S6K (A-B')、pHH3 (C-D')、FoxA2 (K-G')、pS6 (H-I') および GFP (F'、G'、H'、I'、K'、L'、M'、N') の発現を解析した。(E) の (C-D') の定量データ。コントロール GFP エレクトロポレーションの定量データは、図 6A のデータを用いた。(A-D'、H-I') の (A) と (F-G') の (F) のスケールバー = 50 μ m



(図 15) の説明は次ページに記した。

図 15. RNF152 の発現を機能喪失すると、底板領域における異常な pS6 の発現誘導と細胞分裂が起こる。(A-D'') si-RNA による RNF152 のノックダウンは、異所的な mTOR 活性化と pHH3 の発現を引き起こした。si-control (A、A'、C、C'、C'') または si-RNF152 (B、B'、D、D'、D'') を HH stage 10 で底板領域に対するエレクトロポレーションを行い、48 時間で pS6 (A-B')、pHH3 (C-D'')、FoxA2 (C''、D'') および GFP (A'、B'、C'、D') 抗体を用いて解析した。影響を受けた領域を矢印で示した。スケールバー = 50 μ m。(E) (C、C'、D、D') の定量データ。FoxA2/GFP 二重陽性細胞 (FoxA2+) および FoxA2 陰性 (FoxA2-) の頂端面における GFP 陽性細胞の中の pHH3 陽性細胞を測定した。白抜きの三角形はゼロ(0)を示す。

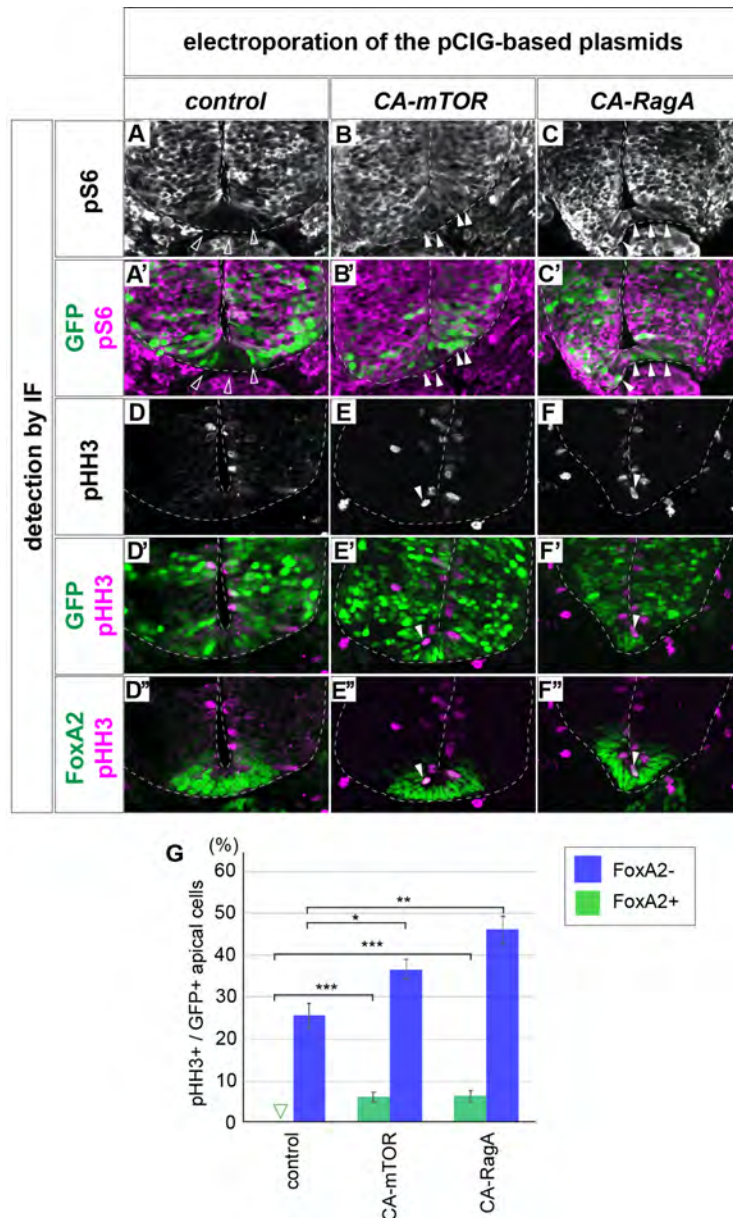


図 16. 底板領域における mTOR シグナルの活性化は異常な細胞分裂を引き起こす。コントロールのプラスミド (pCIG ; A、A'、D、D'、D'')、CA-mTOR (B、B'、E、E'、E'')、または CA-RagA (C、C'、F、F'、F'') を HH stage 10 で底板領域に対してエレクトロポレーションを行い、48 時間で pS6(A-C')、pHH3(D-F'')、FoxA2(D''、E''、F'') および GFP (A'、B'、C'、D'、E'、F') 抗体を用いて解析した。影響を受けた領域を矢印で示した。スケールバー = 50 μ m。(G) (D、D'、E、E'、F、F') の定量データ。FoxA2/GFP 二重陽性細胞 (FoxA2+) および FoxA2 陰性 (FoxA2-) /頂端面における GFP 陽性細胞の中の pHH3 陽性細胞を測定した。白抜き三角形はゼロ(0)を示す。

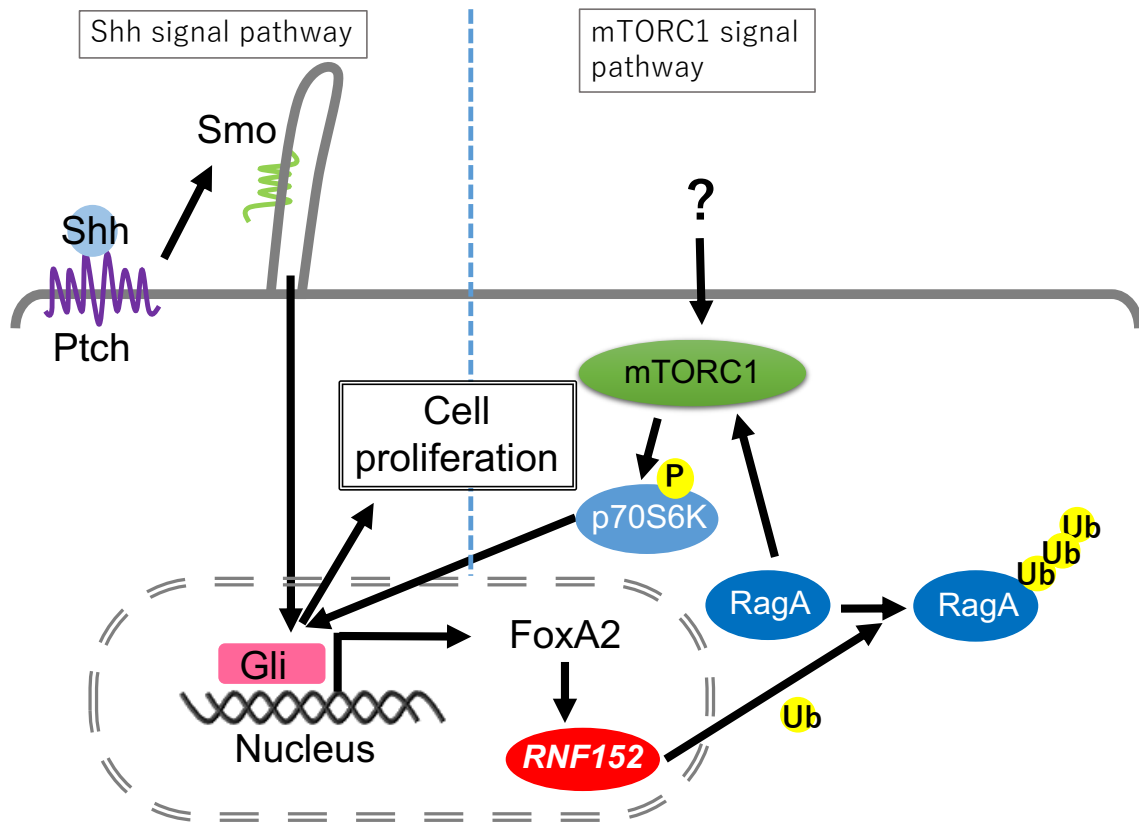


図 17. 本研究で明らかにしたシグナル経路図。Shh、FoxA2 および RNF152 で構成される調節ループは、底板細胞の増殖を制御する。底板マーカー転写因子 FoxA2 の発現は Shh によって誘導されるが、さらに RNF152 は FoxA2 の標的遺伝子である。RNF152 は mTOR シグナル伝達を負に制御することにより、細胞増殖をブロックする。

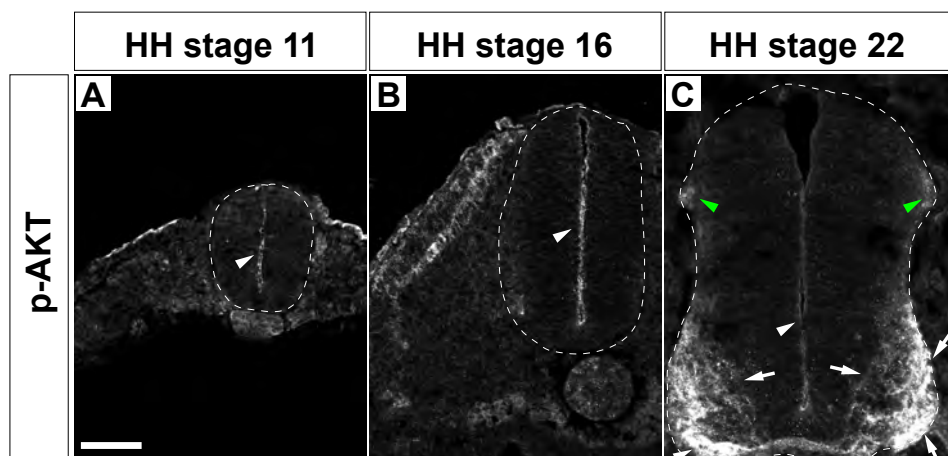


図 18. pAKT は、ニワトリ胚神経管の HH ステージ 11(A)、16(B)および 22(C)の頂端面および交連ニューロンの軸索に局在している。頂端面、交連軸索および背側の介在神経における発現はそれぞれ白い矢印、白い矢印、および緑色の矢印で示されている。スケールバー = 50 μm 。

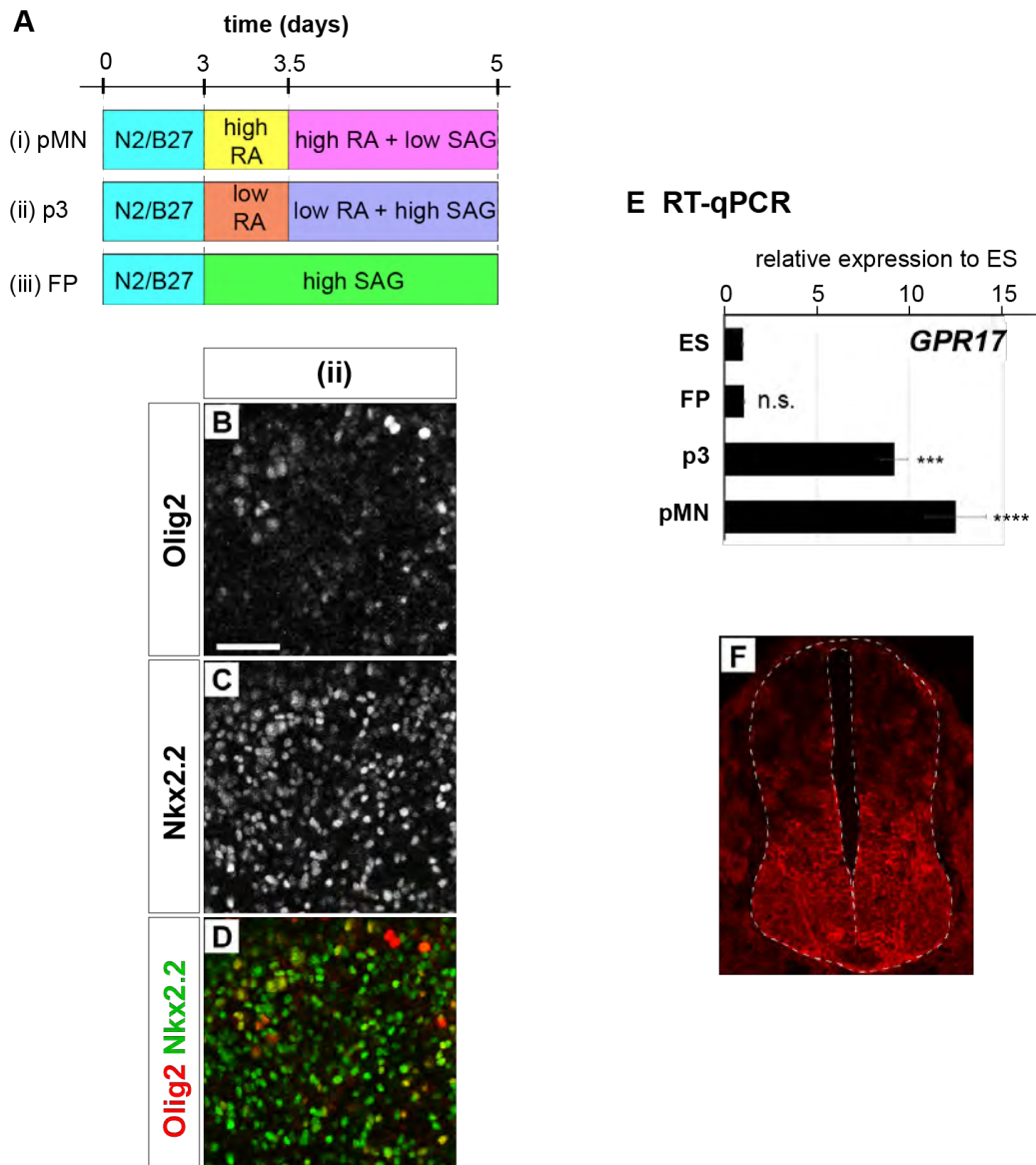


図 19. マウス ES 細胞から特定の神経細胞への分化条件の確立。(A) pMN、p3、FP に分化させるプロトコール。(B-D) (ii) の条件で p3 領域 (Nkx2.2 陽性領域) が分化したことを確認した。(i) の条件では、pMN 領域 (Olig2 陽性領域) が分化する (次の図 20B、E、H) ため、(i) と (ii) の条件で陽性細胞がよく分離できていることを示している。(E) GPR17 の発現領域を RT-qPCR によって確認した。GPR17 は腹側神経領域 (ただし底板領域を除く) ことが示唆されている (Yatsuzuka et al., 2019) ため、そのことが本実験によって確認できた。(F) 抗体染色により、マウス 10.5 日胚において実際に GPR17 が腹側前駆領域に発現することを確認した。

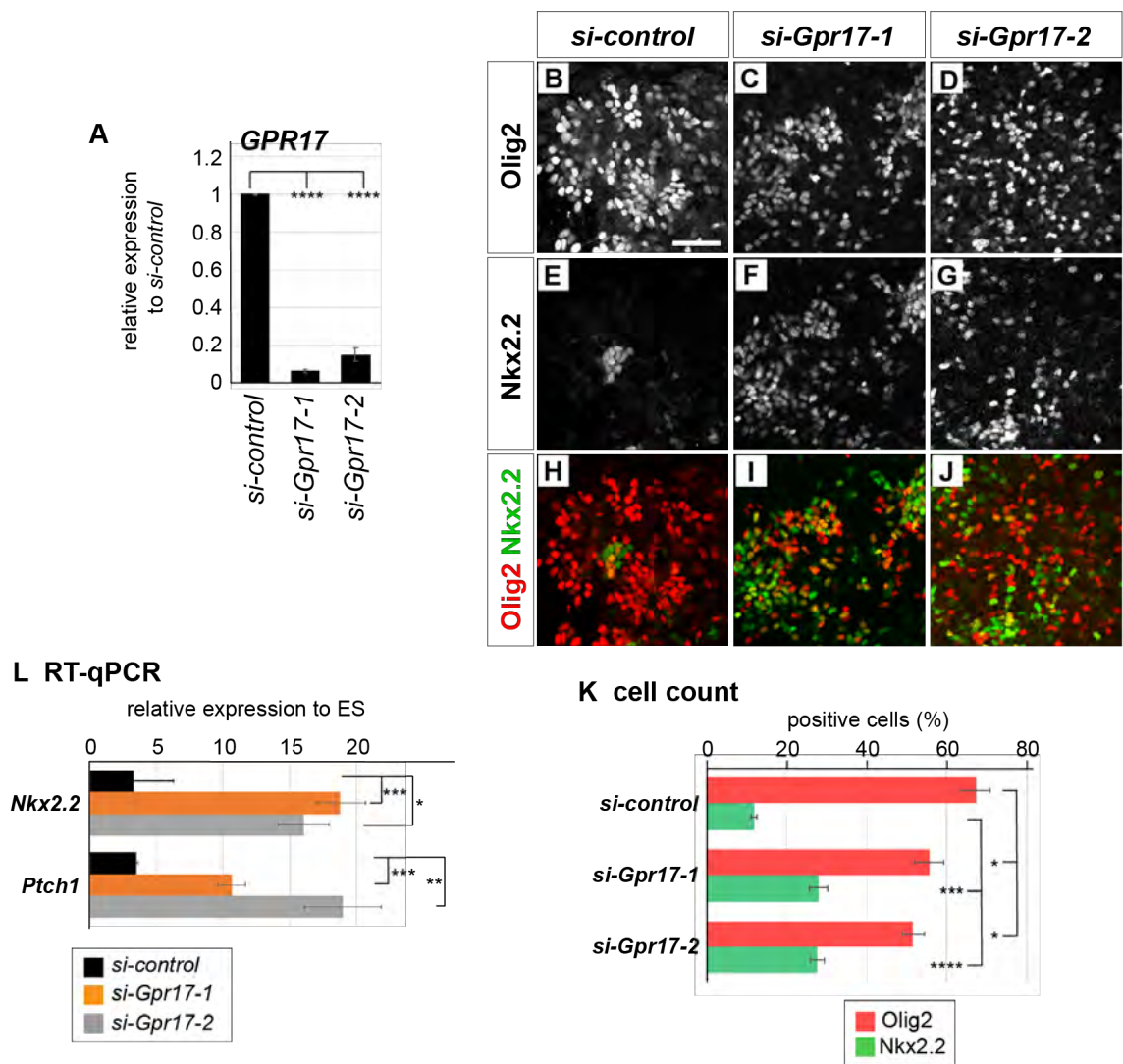


図 20. GPR17 はマウス ES 細胞からの神経分化方向の決定に必要である。(A) 2 種類の si-Gpr17 が Gpr17 の発現を抑制することを RT-qPCR によって確認した。いずれの siRNA も (i) の条件で運動神経前駆細胞に分化させた時に、分化 5 日目で発現量を 20%以下まで抑制することができる。(B-J) Gpr17 を標的とする si-RNA の効果。si-control (B、E、H)、si-Gpr17-1 (C、F、I) または si-Gpr17-2 (D、G、J) をトランスフェクションし、Olig2 (B-D) および Nkx2.2 (E-G) に対する抗体で解析した(H-J は Merge)。(K) DAPI 陽性細胞に対する Olig2 および Nkx2.2 発現細胞の定量。(L) Nkx2.2 および Ptch1 の発現レベルを RT-qPCR で解析した。スケールバー = 50 μ m。

gene	forward	reverse
chicken		
4E-BP1	GGCGGAACCAGGATTATTTA	GGAAGGTCAGAAGGTGGTGT
DEPTOR	CTGGTTGATTGACCACAAGG	CTGAGTGCTCGTCACAGACA
LST8	AGCGGATCTTCCAAGTGAAT	GCTGCTCATTGTGGTCTGTT
mSIN1_MAPKAP1	AATGCAAAAATGTGCAGTGG	GTCGCACAGACAGAATCGAC
mTOR	TGATGCAAATGAAAGGAAGG	TGGAAGCCATTTCCATTACA
p70S6K	CGTGATCTGAAGCCAGAAAA	ACGTGTGTGTGACTGTTCCA
PDK1	CAGTTCAGCTGGTGCAGAGT	GTGAATAGCCCCCGAATCT
RagA	GATCAGCGGGACTTGATTTT	GTAAGCGTTTCATCCCAGA
Rheb	TCCATGGCAAGTTATTGGAT	CGTTCCATATGCAGGCTTTTT
Rictor	CCAAATTACAAGGCGTTTCA	TTTCTTCAGCATGGCCAGTA
RNF152	GAGTGCCAGATTTGCTTCAA	CTTCTGGCTGGTCCTCATCT
RPTOR	TTGTGCCTAAATGTCGGTGT	TTTCTGAGGACCCATTGACA
TSC1	TTGTCTCTGCCAAGCAAATC	AGCGTTCATACAGCAACTGG
TSC2	CGTCAGAGAACCTGCCAGTA	AAATTGCACTGTGTCCCAA
mouse		
GPR17	GGCTTTTACCTTCCCATTCA	ATCAGGAAGATGGCCAGAAC
Nkx2.2	CCCAGGTGAAGATCTGGTTC	GGAGGGGAGAGGATTCACTT
Ptch1	TCTAGTGTGCGCAGTCTTCC	AGATGCAATCAGGATGACCA

(補足表 1) 定量 PCR に用いたプライマー配列