

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14603

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06411

研究課題名(和文) 神経管のパターン形成における遺伝子発現制御のダイナミクス

研究課題名(英文) Dynamic regulation of the genes involved in the neural tube pattern formation

研究代表者

笹井 紀明(Sasai, Noriaki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：80391960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系の、複雑で精緻なパターン形成の分子メカニズムを理解することは、神経発生学における重要な目標の一つである。我々は神経発生に重要な役割を果たしていると考えられている細胞外シグナル因子、ソニック・ヘッジホッグ(Sonic Hedgehog; Shh)の機能に着目し、その受け手となる神経前駆細胞の性質の変化に必要な細胞内因子をスクリーニングによって同定し、その機能を解析した。その結果、正確なパターン形成には、Shhの負のフィードバックが必要であり、そのフィードバックが新規のGタンパク質共役受容体によって制御されていることを明らかにした。

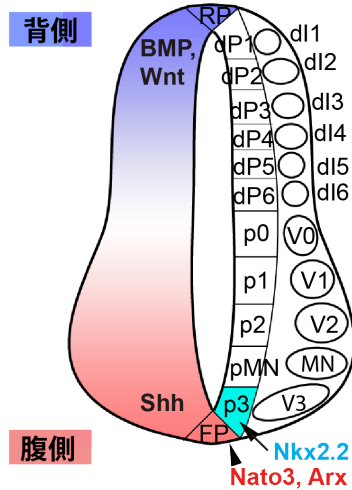
研究成果の概要(英文)：One of the central questions in the development of the central nervous system is to understand the molecular mechanisms leading to the complex and precise pattern formation of the neural tube. We have been focusing on one of the extracellular signal molecules Sonic Hedgehog (shh), and have attempted to isolate the intracellular factors that regulate the dynamic signal activity in the neural progenitor cells. Consequently we revealed that the negative feedback of the Shh signal activity is essential for the precise pattern formation, and this negative feedback is regulated by a novel G-protein coupled receptor.

研究分野：発生生物学

キーワード：神経管 パターン形成 ソニック・ヘッジホッグ 細胞外シグナル因子

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系にはきわめて多様な神経または神経関連細胞が存在し、それらが整然と配列されている。脊椎動物の発生過程において、この複雑なパターン形成に至る発生過程の分子メカニズムを理解することが神経発生学における大きな目標の1つである。



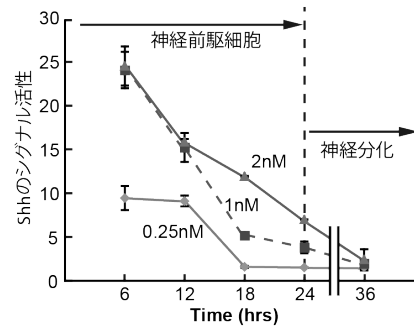
(図1) 神経管の断面図

性質の異なる多様な神経前駆細胞の産生は、比較的少数の分泌因子によって制御されている。特に体幹部の神経前駆組織である神経管においては、背腹軸に沿って、背側からBMPやWnt、腹側からソニック・ヘッジホッグ (Sonic Hedgehog; Shh) が分泌され、これらが背腹軸に沿った神経細胞の領域化に必須の役割を果たしている (図1)。これらの細胞外因子は「モルフォゲン」と総称され、濃度依存的に細胞の分化方向を決定して組織や期間の形態形成やパターン形成に重要な働きをしていることが知られている。

これまでの研究から、正確なパターン形成のためには、シグナル因子の濃度だけでなく、前駆細胞に作用する期間が重要であることが明らかになっている (Ribes*, Balaskas*, Sasai* et al., (2010), Dessaud*, Sasai* et al., (2010), Sasai et al., (2014))。Shh シグナルは細胞内では Gli (Gli1-3) と呼ばれる転写因子によって仲介される。Gli は Shh の非存在下では転写抑制型として存在するが、Shh シグナルの細胞内への導入とともに活性型に変換され、Olig2 (運動神経前駆細胞)、Nkx2.2 (p3 介在神経前駆細胞)、FoxA2、Arx、Nato3 (floor plate) を含め、広く腹側神経管を形成する遺伝子の発現を誘導する (図1)。Gli の活性は Shh から受け始めて数時間以内にピークに達し、その後徐々に減弱する。シグナル因子の濃度は「ピークの高さ」に、シグナルに暴露される期間は「シグナルの減衰にかかる時間」にそれぞれ変換される。しかし、何がシグナルの減衰を制御するのか、その減衰がパターン形成にどう影響するのかの分子メカニズムの詳細は完全には理解されていない。

2. 研究の目的

研究代表者らは、神経管のパターン形成に関与するシグナル因子のうち、特に Shh のシグナル活性の経時的な変化と前駆細胞の分化方向の関係について調べるため、中枢神経系の中でも特に体幹部 (脊髄) 領域の神経管に着目し、シグナル分子に暴露される時間とパターン形成の関係を調べることにした。



(図2) シグナルのnegative feedback.

実験は、ニワトリ胚の神経組織片に異なる濃度のShhを作用させて培養したもの (Dessaud, Sasai et al., 2010の一部)。

研究代表者らによる以前の研究から、神経前駆細胞におけるシグナルの減衰がパターン形成に影響を及ぼすことが知られている (Dessaud*, Sasai* et al., 2010; Sasai et al., 2014; 図2)。そこで、このシグナルの減衰を制御する因子を同定し、それが神経管のパターン形成に及ぼす影響を調べることにした。さらに、そのフィードバックの神経分化における生理学的意義を明らかにすることにした。

3. 研究の方法

本研究では、主にニワトリ胚を使用し、エレクトロポレーション法による遺伝子の強制発現ならびに siRNA の導入のほか、培養細胞を用いて分子の機能解析を行うこととした。さらに、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) の神経分化系 (Sasai et al., 2014; Kutejova et al., 2016) を用いて、異なる種においても同様のメカニズムが存在してそれが神経分化やパターン形成に機能することを確認することとした。

まず、以前の研究 (Sasai et al., 2014) で得られている、Shh に反応する遺伝子の網羅的解析のデータから、Shh に反応して発現が開始し、かつ Shh シグナルに対して負の効果をもたらす可能性のある遺伝子を同定することにした。網羅的解析だけでは本当に発現が上昇かが確実ではないため、定量 PCR 法を組み合わせることで、着目した候補因子の発現が実際に Shh によって制御されることを確認することにした。さらに、研究代表者らの以前の研究 (Kutejova et al., 2016) で示されている ChIP (クロマチン免疫沈降) のデータを用いてその遺伝子発現の制御が Shh シグナルの直接制御かまたは間接に制御されているかを確認することとした。

次に、それらを RT-PCR 法によりクローニングした上でニワトリ胚に強制発現し、(図 1) に示した *Nkx2.2*, *Arx*, *FoxA2* などの因子のほか、背側領域のマーカーである *Px6*, *Pax7*、神経マーカーである *TuJ*、増殖関連マーカーである *p27* やリン酸化ヒストンなどの発現パターンを抗体染色法によって染色することによって影響を調べることにした。

また、*siRNA* または *shRNA* を導入することにより、各因子が適切な分化パターンに必要とされるかを調べることにした。

さらに、培養細胞を用いて各因子が *Shh* シグナルにどのような影響を及ぼすかを明らかにすることとした。それぞれの因子を *NIH3T3* 細胞など *Shh* シグナルに反応する細胞にトランスフェクションにより強制発現し、*Shh* シグナルが抑制されるかを明らかにすることとした。

最後に、マウス ES 細胞に各因子の *siRNA* を導入した上で細胞を神経分化させることにより、各因子が神経発生に及ぼす影響を観察するほか、ニワトリ胚との共通点または相違点を明らかにすることとした。

4. 研究成果

(1) スクリーニングの結果、興味深い発現を示す遺伝子が複数個同定された。

まず、*Shh* に反応して発現が誘導される遺伝子を 50 個程度単離し、さらにそのうち *Shh* の細胞内シグナルに影響を及ぼすと考えられる細胞内因子 20 個程度に焦点を当て、その発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法によって明らかにした。

その結果、興味深い発現を示す遺伝子を多数同定することができた。多くの遺伝子は *Shh* が発現する基板を含む腹側神経管に発現していた。また、胚全体の *in situ* ハイブリダイゼーション法により、これらの因子が脊髄神経だけでなく、脳領域、さらには腎領域など、ヘッジホッグシグナルが重要とされる別の臓器または組織でも発現していることがわかり、別の組織の発生においても共通の因子が関与していることが示唆された。

(2) 強制発現並びに機能阻害実験により、*Shh* シグナルの負の制御因子として *GPRv* が単離された。

本研究の目的は、*Shh* の負のフィードバックを担う因子を単離してその機能を解析するものであるから、胚や細胞に強制発現したときに *Shh* シグナルを阻害するものに注目することとした。

そこで、前項で明確な発現が確認できた遺伝子を順に RT-PCR 法により単離し、発現ベクターにサブクローンしてニワトリの神経管に強制発現した。

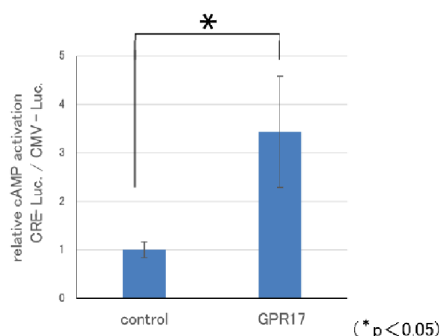
その結果、大半の遺伝子は *Shh* シグナルを正に制御 (つまり腹側領域が拡大し、細胞の増殖が亢進) する結果となった。この結果は、本解析によって *Shh* シグナルを仲介する新規

因子が多数単離されていることを意味し、興味深い結果となっている。これらの因子は別の機会に改めて解析を進めることとした。

その一方、*Shh* シグナルに応答し、そのシグナル経路を負に制御する因子が少数ではあるが単離された。

現在はそのうちの 1 つ、新規の G タンパク質共役受容体 (GPCR) を中心に解析を進めている。この因子は *Shh* に応答して発現が上昇して腹側 (ventral) に発現するので、*GPRv* と命名した。神経管における強制発現により *Shh* シグナルが阻害され、逆に機能喪失実験から、*GPRv* が *Shh* シグナルが亢進して腹側領域が拡大したことから、本来の *GPRv* の機能は *Shh* に対して負の影響を与えていることが明らかとなった。結果的に、*GPRv* が *Shh* シグナルのフィードバック調節因子であることが示唆された。

詳細なシグナル経路の解析から、*GPRv* は細胞内で cAMP の濃度を上昇させることがレポーターアッセイから明らかとなった (図 3)。*Shh* シグナルの仲介因子である *Gli2/3* は cAMP またはプロテインキナーゼ A (PKA) によってその修飾が負に調整されること、また cAMP/PKA の濃度上昇は *Shh* を阻害する方向で働いていることが示唆されている。したがって (図 3) の結果から、*GPRv* が細胞内で cAMP の濃度を上昇させ、*Gli* タンパク質の修飾を負に制御することによって *Gli* の活性を抑制し、細胞内で *Shh* シグナルをブロックする方向に働くことが明らかとなった。この事実は、マウス ES 細胞の神経分化のシステムでも明らかとなった。



(図 3) *GPRv* は細胞内で cAMP レベルを上昇させる。実験は、培養細胞に *GPRv* を強制発現し、cAMP の活性をレポーターアッセイにより検出した。

細胞外シグナル因子 (*Shh*, *BMP*, *Wnt* など) が濃度依存的に前駆細胞の分化方向を制御することは以前からよく知られた事実であり、これまでの多くの研究からもその分子メカニズムが明らかになっている。一方で、本研究はシグナル活性の経時的な変化による分化制御に焦点を当てたものであり、シグナル因子から細胞分化に至る分子メカニズムに新しい知見を与えるものである。

現在、神経前駆細胞の分化以外の状況下 (たとえばがん細胞の増殖) で *GPRv* が機能する

可能性を考えて解析を進めており、これらの解析が終了次第論文報告とする予定である。

(参考文献) Ribes*, Balaskas*, Sasai* et al., *Genes and Dev.* (2010) 24, 1186; Dessaud*, Sasai* et al. *PLoS Biol.* (2010) 8, e1000382; Sasai et al., *PLoS Biol.* (2014) 12, e1001907 (*は first authors) ; Kutejova et al., (2016) *Dev. Cell* 36, 639.

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 4 件)

(1) 笹井紀明「神経管のパターン形成における多次元制御メカニズム」第6回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting 東京慈恵会医科大学(東京都港区) 2016年8月6日

(2) Atsuki Yatsuzuka, Noriaki Sasai. “An analysis of the molecular network in the ventral neural tube.” The Tri-lateral NAIST-TLL-CU Joint Symposium 2016 奈良先端科学技術大学院大学(奈良県生駒市) 2016年3月28日

(3) Noriaki Sasai. “Spatial and Temporal Regulation of the Neural Tube Pattern Formation.” 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2015年12月2日

(4) 八塚敦輝、市川朋、安国勇貴、笹井紀明 「腹側中枢神経発生の遺伝子ネットワークの解析」第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 神戸国際会議場(兵庫県神戸市) 2015年12月3日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://bsw3.naist.jp/sasai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹井 紀明 (SASAI, Noriaki)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：80391960