

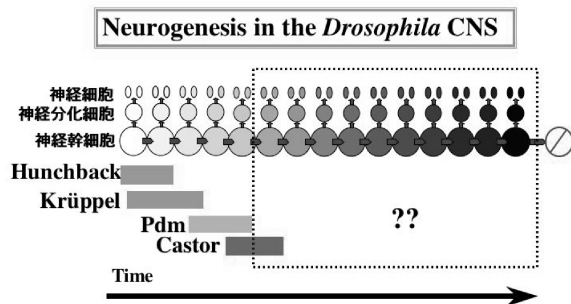
神経幹細胞に内在する時間的な発生プログラムの解明

●一色 孝子 ◆草野 亜弓

国立遺伝学研究所 系統生物研究センター

＜研究の目的と進め方＞

発生過程において神経幹細胞の個性は常に一定ではなく時間とともに変化していく。このため、一つの幹細胞は非対称的分裂を繰り返しながら多様な子孫神経細胞を特定の順番で作りに出していくことができる。我々は、幹細胞系譜の再現的な観察が比較的容易に行えるショウジョウバエ中枢神経系をモデル系として、この神経幹細胞の時間変化と細胞系譜形成を司る基本分子メカニズムが明らかにすることを目指している。



ほぼ全てのショウジョウバエ神経幹細胞は、胚発生期前半においてHunchback、Krüppel、Pdm、Castorという4種の転写因子を順次発現し、これらの転写因子の発現を自律的に切り替える。一方で、神経分化細胞では生まれたときの発現パターンが維持される。このメカニズムによって、姉妹神経分化細胞はそれぞれ異なる個性を獲得し、神経細胞の多様性が創出される。しかしながら、この転写制御を介した細胞多様性創出のメカニズムがゲノム上にどのようにコードされているかについては、いまだほとんど不明である。また、神経幹細胞はCastor発現開始以降も胚発生期だけでも10回程分裂するにもかかわらず、Castor発現開始以降の神経幹細胞の時間変化についても謎であった。以上の問題に取り組むために、データベースに基づく情報検索等を行って、幹細胞系譜の逐次的形成に関わる遺伝子を網羅的に同定することを最初の目標とした。

＜研究開始時の研究計画＞

1) 神経幹細胞系譜形成に関わる新規遺伝子の同定を目的として、中枢神経系で発現され、その発現が時間的に変化する遺伝子を公開データベースにもとづいてゲノムワイドに探索する。ショウジョウバエには約13,600の遺伝子があると予測されている。公開非重複cDNAセットに含まれる約10,000遺伝子について、転写産物の胚発生期におけるおおまかな時空間的発現パターンのデータベース化がBDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) グループによって平成15年半ばには完了する予定であった。このデータベースにもとづいて、神経系で広範囲に時期特異的に発現されている遺伝子を探索する。in situ hybridizationと4つの転写因子や細胞種マーカーの抗体染色を組み合わせることで、各遺伝子が発現されている神経系細胞の種類や時期の詳細な特定を行う。

類似の発現パターンを示す遺伝子群に分類し、各遺伝子の発現調節に共通な法則があるかを探る。

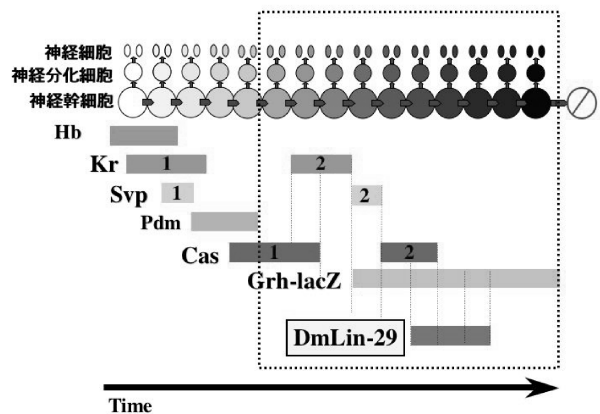
2) 神経幹細胞系譜形成に関わる遺伝子の同定を機能的側面から行うことを目的として、神経幹細胞系譜に異常をきたす突然変異の網羅的スクリーニングを行う。

3) 神経幹細胞で一過的に発現し、神経系細胞に時間に応じた特性を与えることが示されているHunchback、Krüppelの発現調節機構を、主に転写調節に注目して解析する。

＜研究期間の成果＞

1) 公開転写産物発現情報データベースに基づいて、全遺伝子の約20%について、肺中枢神経系で広範囲に時期特異的に発現される遺伝子を探索した。その結果、複数の線虫heterochronic遺伝子ショウジョウバエホモログをそのような遺伝子として見いだした。heterochronic遺伝子は線虫幼虫発生において系譜形成の各過程が正しいタイムスケジュールで進むように働く遺伝子である。これらのショウジョウバエホモログについて、抗体を作製し、タンパク発現パターンの観察とその発現制御の解析を行った。このほかにも、哺乳類の脳皮質で層特異的に発現される転写因子の一つのショウジョウバエホモログが、やはり時期特異的に発現されていることを見いだした。

これらの遺伝子や他の既知の遺伝子の発現を詳細に調べた結果、以下のように、神経幹細胞系譜をほぼ通して転写因子の発現パターンの変化というかたちでとらえることができた（一部の転写因子のみ表示）。



時期特異的な発現を示すことを新規に見いだした遺伝子のなかで、heterochronic遺伝子の一つであるlin-29のショウジョウバエホモログ (DmLin-29) に特に注目して解析を進めた。DmLin-29はKrüppelに非常に類似したC2H2Zincフィンガーモチーフを持つ転写因子をコードしている。しかし、DmLin-29は、Krüppelとは違って、最も後期に生成される細胞群で特異的に発現されており、それらの細胞に時期特異的な個性を与えていると考えられる。そこで、どのようにして、類似の転写因子KrüppelとDmLin-29が、それぞれに固有の時間特異性を付与するのかという問題に取り組んだ。

KrüppelとDmLin-29は、タンパク中央部にそれぞれ5

個および6個のC2H2Znフィンガーが存在する構造を持つ。KrüppelとDmLin-29は、このDNAとの直接結合に関与すると推定されるZnフィンガー部分において一次構造上非常に類似している。しかしながら、C末端側、N末端側は全く異なる構造を持っている。そこで、Krüppel/DmLin-29のどの部分にそれぞれに特異的な機能を担う部位が存在しているのかを検討する目的で、様々な形のKrüppel/DmLin-29キメラタンパクを発現するトランスジェニック系統を作製し、各キメラタンパクの機能を分子遺伝学的に解析した。その結果、中央のZnフィンガーを含む部分は交換可能であること、すなわちKrüppel/DmLin-29の直接的なDNAへの結合配列特異性は一致していることが判明した。一方で、N末端側、C末端側の一部の部位に、時間特異性の付与に必須な部位が存在することを強く示唆するデータが得られた。以上のことから、時期特異性決定において2つのタンパクの機能の差が生じているのは、直接的な結合塩基配列特異性が異なるからではなく、これらのタンパクの相互作用する分子やクロマチン構造への作用が異なるからであることが強く示唆された。実際、KrüppelのC末端側にはCtBPが結合することが知られているが、DmLin-29にはCtBP結合コンセンサス配列がないことがわかっており、CtBPのような分子との相互作用が、機能差を生み出すのに重要である可能性がある。以上の結果は、同一のDNA塩基配列情報が発生プログラムの進行に従って異なる読み出し方をされる一例を表しており、効率的なゲノム情報コードシステムの理解につながるものである。

2) 第一染色体上の変異のパイロットスクリーニングから、GMCの分化異常を示す変異が一つ同定され、変異の染色体上の位置を同定した。また、系譜形成後期において神経幹細胞あるいは分化細胞が繰り返し分裂するが、転写因子の発現推移が起こらなくなっている可能性のある変異を第二染色体上に発見した。

3) 細胞周期遺伝子の変異体など、様々な変異体における*hunchback*のエンハンサーをレポーター遺伝子につないだtransgeneの発現を観察し、*hunchback*の発現調節が、転写レベルで強く制御されていることを確認した。Krupelが多くの幹細胞において後期に再び発現されることを見だし、その後期発現を司るらしき転写因子候補を同定した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ショウジョウバエの神経幹細胞研究に携わっている国内外の同業者からは、今後の研究の土台となる記載的仕事を着実に進めている点を評価されている。実際、神経幹細胞系譜についてここまで細かな記載を行える研究グループは非常に少数である。

本研究を遂行している間に、*hunchback*の線虫ホモログ*hbl-1*がやはり*heterochronic*遺伝子に属して、時間的発生制御の要となる分子であることが報告された。これまで見つけられていた*heterochronic*遺伝子のなかには、*hbl-1*の発現量の調節分子として働くもの、*hbl-1*によって制御を受けるものが多く含まれていた。本研究では、逆に、線虫*heterochronic*遺伝子のショウジョウバエホモログが神経幹細胞系譜の時間的発生に関わることを見いだした。以上のように、線虫とショウジョウバエで共通因子が見つかったことから、本研究が対象としている細胞系譜の時間的形成の分子メカニズムが、種を超えて存在する基本的な時間的発生メカニズムから派生したものであることが明らかになった。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

1) 公開転写産物発現情報データベースの整備が予定より大幅に遅れ、当初予定に比べて少ない遺伝子しか検索できなかった。

2) 神経幹細胞系譜に異常をきたす突然変異のスクリーニングを、規模を大きくして行わなかった。既存の遺伝子や変異の解析を優先させたかったこと、第一染色体上の変異のパイロットスクリーニングの結果をふまえ、手間に比べて成果がかんばしくない恐れがあったことが理由である。

〈今後の課題〉

1. 公募研究終了後、Castorについて解析を行った。その結果、Castorが全ての後期特異的な遺伝子群の発現に必須であること、さらに、“第2のHunchback”のようにふるまうことがわかった。Krüppel/DmLin-29同様、Hunchback/Castorも酷似ないし共通のDNA塩基配列結合特異性を持つことが示唆されているが、付与する時間特異性が全く異なる。今後、Krüppel/DmLin-29とHunchback/Castorの両方について、同一のDNA塩基配列情報が異なる読み出し方をされるためのメカニズムを追究していく予定である。

2. 本研究等から、ショウジョウバエと線虫で類似した遺伝子が時間特異性を制御していることがわかった。しかしながら、ショウジョウバエの神経幹細胞系譜形成と線虫の幼虫発生では、遺伝子発現推移のタイムコースは非常に異なる。ショウジョウバエでは1分裂1〜2時間程度で次々と発現が移り変わっていく。対して、線虫の幼虫発生では、1幼虫ステージ6時間、4ステージで完了し、その間をかけてHbl-1からLin-29（線虫ではKrüppelに相当?）へと発現が移り変わるのみである。より複雑な神経系を作り出すには、長い系譜を持つ必要があったと推察される。しかし、ショウジョウバエではどうやって“第2のHunchback”のようなCastorが生まれ、Castor発現が最初のKrüppelの制御下に入るかたちで系譜が延びたのか、なぜ発現推移のスピードが生物ごとに大きく異なることができたのか、全く不明である。こういったことが、ゲノム情報がどのように変化することで生じてきたのかを探究してみたい。

3. 時期特異的転写因子の発現は、神経幹細胞では切り替わっていくのに対して、神経分化細胞では生まれた時の発現を維持するか減衰していくかであり、切り替わることは一切ない。系譜形成上の重要な問題であるにもかかわらず、この発現の非対称性がゲノム上にどのようにコードされているか、全ての転写因子について同じようなコードシステムが働いているのかといったことは、全くといっていいほど不明である。Krüppelについては非常に短い中枢神経系特異的な転写調節領域が同定されている。この領域について、ショウジョウバエ近縁種の配列情報などを参考に、現在解析を進めている。今後、Krüppelの転写調節領域の解析を足がかりとして、以上のような発現の非対称性の制御機構の解明を目指す。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

4) その他

1. Isshiki, T. and Doe, C.Q. Maintaining Youth in Drosophila Neural Progenitors. Cell Cycle 3(3): 296-299 (2004).
2. 一色 孝子「神経幹細胞システムによる神経細胞特異化の分子機構」蛋白質・核酸・酵素 49(3): 228-233 (2004).