

平成 29 年 4 月 10 日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
平成 28 年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）
所属：国立遺伝学研究所
職名：教授
氏名：川上 浩一

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題： 遺伝子トラップ・エンハンサートラップ法を用いた神経細胞-支持細胞相互作用の解明
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者： 瀬原 淳子
3. 研究期間：平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

4. 研究経過及び研究成果：

中枢・末梢神経系の神経細胞は、オリゴデンドロサイトやアストロサイト・シュワン細胞などの支持細胞集団とともに脳を構築・維持する。我々は、世界に先駆けて遺伝子トラップ法・エンハンサートラップ法による神経回路網の可視化、及びその形成に関与する遺伝子の大規模スクリーニングと解析を行い、神経回路構築に重要なはたらきをする分子を同定しつつあるが、それと同時に、脳回路形成におけるこれら支持細胞の役割や機能にも着目している。

そこで、神経系周辺の多様な細胞集団を可視化し、新規の神経系支持細胞の同定・支持機構の解明によって脳構築・維持の新たな機構を明らかにしたいと考え、支持細胞をマークできる遺伝子トラップフィッシュをスクリーニングしてきた。それらの遺伝子トラップフィッシュを利用して、また、増殖因子とそのプロテアーゼによる制御の観点から発生・再生における細胞間相互作用を研究している瀬原グループと共同研究をすることによって、グリアその他の支持細胞と神経細胞の相互作用のタンパク質レベルでの解明を試みてきた。このような試みの中で、これまでに、視覚情報の中枢である視蓋の神経幹細胞を可視化できるエンハンサートラップを用いた神経分化の研究 (Sato, T., *et al. PLoS One* 10, e0127360. (2015))、グリア細胞が可視化されるエンハンサートラッ

プを用いた側線神経系構築に関する研究 (Xiao, Y., *et al. Disease Models & Mechanisms* dmm.018184 (2015)) について共同研究を行い、これらに関してはすでに2015年に2つの論文を発表した実績がある。

本研究ではあらたに、主にふたつの観点から研究に取り組んだ。ひとつは、グリア細胞の増殖因子制御、ひとつはエンハンサートラップラインの挿入部位遺伝子として同定された転写因子の役割に焦点を絞った研究である。

グリア細胞の増殖因子制御

まず、運動神経で発現し支持細胞であるシュワン細胞の増殖・分化を制御する増殖因子を可視化し、支持細胞と神経細胞の相互作用の観点から脳構築機構の解明を目指した。この増殖因子は、グリア増殖因子とも呼ばれる ErbB リガンドで、中枢・末梢神経系においては主に神経細胞で産生され、その支持細胞として神経の軸索をミエリン化するグリア細胞に作用し、それらの移動、生存や分化の促進に関わる。しかし、この増殖因子の活性が、ミエリン形成やシナプス形成を時間的空間的に制御できるのは、どのような仕組みによるのかは不明である。そこで、そのような時空間的制御が、①グリア増殖因子の転写の時間的空間的特性に基づく制御によるのか、それとも②神経細胞内でグリアを軸索上で効率よくミエリン化すべく、グリア増殖因子の局在化が制御を担うのか、それとも、③この増殖因子は、細胞外ドメインが切断される、いわゆるエクストドメインシェディングを受けることから、そのような翻訳後制御が支持細胞の移動や分化を時間的空間的に制御しているのか、これらの疑問を解決すべく、瀬原グループと共同して、グリア増殖因子の可視化プローブを作成した。

このプローブは、グリア増殖因子の細胞外領域を mCherry、細胞内領域を GFP で標識したもので、N-CISSOR と命名された。まず、培養細胞 HEK293T 細胞を用いて、N-CISSOR の細胞表面上での分布、Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) 刺激により誘導される切断動態、および受容体である ErbB3 をリン酸化させる生理活性などを調べ、N-CISSOR がグリア増殖因子の細胞表面への分布や切断を正しく再現することを確認した。次に、個体中での NRG1 の切断を評価するため、N-CISSOR をゼブラフィッシュ胚で神経細胞特異的に発現させた。エンハンサートラップラインとして、CaP 運動神経特異的に Gal4 が発現するトランスジェニックライン Tg (SAIGFF213A) を確立し、それを、その Gal4 に依存して NCISSOR を発現するライン Tg (5×UAS:N-CISSOR) とかけ合わせることで、単一神経細胞内での NCISSOR の分子動態の観察を実現し、その切断を可視化・計測することに成功した。その結果、グリア増殖因子は、運動神経細胞において細胞体よりも軸索で優先的に切断されること、そしてその切断はメタロプロテアーゼあるいはセリンプロテアーゼのひとつ BACE により制御されていることがわかった。この結果は、グリア増殖因子によるグリア細胞の活性化制御機構のひとつとして、増殖因子のエクストドメインシェディングの時間的空間的制御が関与していることを示したものである (Kamezaki A *et al.*, *Sci. Rep.*, 2016)。

神経系・血管系組織構築に関わる新たな分子機構の解明

一方、側線神経のターゲットである有毛細胞をもつ感覚受容器 (側線) で発現する2系統に関してトランスポゾン挿入部位の遺伝子を同定したところ、転写因子をコードすることがわかった。この遺伝子に関して解析したところ、神経組織の形成のみならず血管系形成にも必須の役割を果

たすことがわかってきた。photoconversion 型蛍光タンパク質で細胞集団をラベルするなどの方法で、その細胞系譜を検討するとともに、CRISPR-Cas9 システムを用いてこの転写因子のノックアウトゼブラフィッシュを作成し、神経分化や血管形成・維持に関与する分子機構・細胞間相互作用を解析中である。また、コンディショナルノックアウトマウスの作成にも取り組み、その役割がマウスで保存されているかどうかを現在瀬原グループで検討中である。今後この遺伝子の役割と、神経系・血管系組織構築に関する新たな知見が得られることが期待される（未発表）。

5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表、特許取得等

(発表論文)

Visualization of Neuregulin 1 ectodomain shedding reveals its local processing in vitro and in vivo. Kamezaki A, Sato F, Aoki K, Asakawa K, Kawakami K, Matsuzaki F, Sehara-Fujisawa A. *Scientific Rep.* June ; 6:28873. DOI:10/1035/srep28873 (2016)

(学会発表)

(口頭)

Kamezaki, A., Sato, F., Aoki, K., Aoki, K., Asakawa K., Kawakami, K. and Sehara-Fujisawa A. Live cell imaging and proteomic approaches shed light on novel aspects of ectodomain shedding in developing neurons. Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists, Kiel, Germany, 15-18 March 2017, 2017.

Kamezaki, A. Development of a fluorescent probe to monitor NRG1 ectodomain shedding in vitro and in vivo. JSDB Special Symposium. Tokyo, June 2, 2016.

特許

発明者 : 瀬原淳子、亀崎青沙、佐藤文規、青木一洋、川上浩一

権利者 : 京都大学 (京大番号 : 5 3 1 5)

発明名称 : 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

出願番号 : 特願 2016-053156

出願日 : 2016年(平成28年)3月16日