

2020年 5月 19日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点
2019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： 京都大学大学院生命科学研究科

職名： 特定助教

氏名： 山田 真弓

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：光作動性転写因子を用いた、神経幹細胞の増殖・分化メカニズムの解明
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者： 大串 雅俊
3. 研究期間：2019年4月1日～2020年3月31日

4. 研究経過及び研究成果：

神経幹細胞は自己複製能を持ち、さらに中枢神経系の主要な細胞であるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを生み出す多分化能を持っている。神経幹細胞の増殖や細胞分化の過程で、bHLH型転写因子がダイナミックな遺伝子発現パターンを示すことが明らかになりつつあるが、その機能的意義については未だ不明な点が多い。本研究課題では、光遺伝学ツールを用いて、神経幹細胞におけるbHLH型転写因子のダイナミックな遺伝子発現パターンを人工的に操作し、その機能的意義の解明を目的とした。

マウス胎児の脳や脊髄では、オリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の産生やオリゴデンドロサイト分化過程において、転写因子 Olig1/2 が決定的な役割を担っていることが報告されている。本研究では、これらの転写因子に着目し、まずは内在性の発現動態をタイムラプス顕微鏡を用いて詳細に観察した。

次に、Olig1/2の発現動態を光操作するために、光作動性転写因子を安定的に発現する細胞株を樹立した。培養神経幹細胞は脆弱性が高いため、細胞へのダメージが少ない方法を検討する必要があった。そのため、共同研究者がES細胞で使用しているトランスポゾン法を導入することで、安定細胞株の作製を容易にすることができた。青色光により遺伝子発現を効率よく制御できる、Gal4/UAS システム(GAVPO など)や、テトラサイクリン誘導系システム(PA-Tet システム)を神経幹細胞に導入し、光照射により Olig1/2の遺伝子発現制御を実施した。光照射条件を変更することにより、様々な Olig1/2の発

現動態を人工的に操作し、神経幹細胞の増殖や分化に与える影響を観察中である。さらに、共同研究者からオルガノイド培養方法を教授頂き、培養方法の検討を進めることができた。今後は、*in vivo* に近い条件での機能解析が可能になると期待している。

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 >

Kobayashi T, Piao W, Takamura T, Kori H, Miyachi H, Kitano S, Iwamoto Y, **Yamada M**, Imayoshi I, Shioda S, Ballabio A, Kageyama R. (2019) Enhanced lysosomal degradation maintains the quiescent state of neural stem cells., *Nature communications*. Nov29; 10(1):5446.

Yamada M, Nagasaki C. S, Suzuki Y, Hirano Y, and *Imayoshi I., Optimization of light-inducible Gal4/UAS gene expression system in mammalian cells., *in revision*.

< 総説 >

Yamada M, Nagasaki C. S, Ozawa T, *Imayoshi I. (2020) Light-mediated Control of Gene Expression in Mammalian Cells. *Neuroscience Research*. Mar; 152:66-77.

< 学会発表 >

山田真弓、長崎真治*、今吉格：神経幹細胞における bHLH 型転写因子のダイナミックな発現制御機構. 2019 年度日本神経科学学会、新潟、2019 年 7 月 25 日-28 日