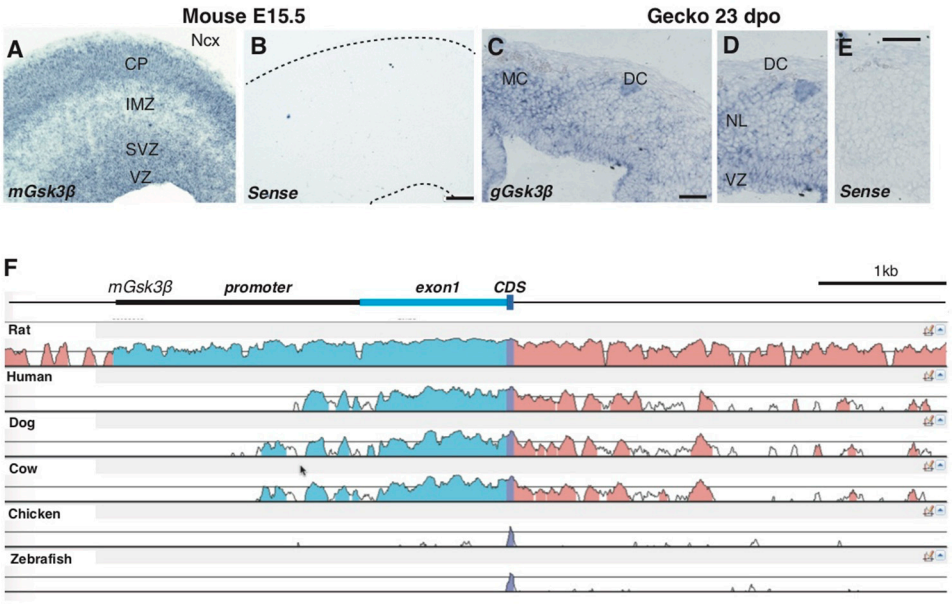
46　Wntシグナルの時間的制御による神経細胞の形態変化	野村　真

【目的】大脳皮質の発生過程において、神経前駆細胞から分化した興奮性の神経細胞は脳の内側から表層（軟膜側）へと放射状に移動し、大脳皮質に特徴的な 6 層構造を構築する。発生の時期に依存した神経細胞の分化と移動の精緻な制御は大脳皮質の局所神経回路網の構築に不可欠であり、大脳皮質発生プログラムの破綻は長期ライフステージにおける高次脳機能の発達に深刻な影響を及ぼす。Wnt シグナルはこうした大脳皮質の発生過程における神経細胞分化、移動に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。そこで本研究では、Wnt シグナルの活性を細胞内で制御するタンパク質の 1 つである Gsk3β に着目し、大脳皮質の発生過程における Gsk3β の転写制御に関わるシス・トランス制御因子を明らかにすることで、神経細胞の分化・移動における Wnt シグナル活性の細胞自律的な制御メカニズムを解明することを目的とした。

【方法】まず、ENCODE（Encyclopedia of DNA Elements）のエピジェネティックデータを参照することにより胎児期マウス大脳皮質におけるオープンクロマチン状態を検討し、シス制御領域の候補となるゲノム領域を同定・単離した。この配列が Gsk3β の時間的発現制御モジュールとしての活性を持つかどうか、神経前駆細胞あるいは HEK 細胞を用いたリポーターアッセイにより検討した。さらに、単離した発現モジュールの活性を変化させるトランス因子を同定するため、神経前駆細胞あるいは神経細胞で発現する様々な転写因子をリポータープラスミドと共に培養細胞に導入し、ルシフェラーゼの発現変化を測定した。また、Gsk3β のゲノム配列の種間比較を行い、シス制御領域の保存性と実際の遺伝子発現との対応について *in situ* hybridization 法によって検討した。

【結果】マウス E14.5 の前脳クロマチン免疫沈降法に基づく ENCODE データより、Gsk3β の 5'側 2 kb 領域が神経前駆細胞あるいは神経細胞におけるシス制御領域として機能することを見出した。さらに、このシス制御領域（2 kb プロモーター領域）は神経前駆細胞で発現する Sox ファミリー転写因子によって活性化されること、また神経分化を促進する Neurogenin2 によって抑制されることを見出した。さらに、2 kb プロモーター領域の配列の種間比較を行ったところ、この領域の配列は哺乳類間で高度に保存されていること、また羊膜類の各系統においては配列の多様性が見られることが明らかとなった。Gsk3β の発現が哺乳類と爬虫類で高度に保存されている知見と合わせると、Gsk3β を介した Wnt シグナルの時間的制御には種特異的なゲノム配列の進化が基盤となっている可能性が示唆された。

哺乳類および爬虫類大脳皮質における Gsk3β の発現とシス制御領域の多様性



46. Wnt シグナルの時間的制御による神経細胞の形態変化

野村　真

京都府立医科大学 大学院医学研究科 神経発生生物学

Key words：大脳皮質，Wnt シグナル，Gsk3β，転写制御，進化

緒　言

我々ヒトを含む哺乳類の大脳皮質は感覚情報、随意運動の統合、さらに記憶、学習、認知機能などの高次脳機能を司る最上位中枢である。大脳皮質を構成する様々な神経細胞はすべて胎児期の未分化な神経前駆細胞に由来する。大脳皮質の発生過程において、神経前駆細胞から分化した興奮性の神経細胞は脳の内側から表層（軟膜側）へと放射状に移動し、大脳皮質に特徴的な 6 層構造を構築する。移動を終えた神経細胞は 1 本の太い神経突起（尖端樹状突起）を軟膜側へと伸長させることにより錐体細胞としての形態を完成させる。発生の時期依存的な神経細胞の分化と移動の精密な制御は大脳皮質の局所神経回路網の構築に不可欠であり、大脳皮質発生プログラムの破綻は長期ライフステージにおける高次脳機能の発達に深刻な影響を及ぼす。

近年の高解像度イメージングや標的遺伝子操作技術の進歩によって、胎児期の大脳皮質における興奮性神経細胞の分化と移動様式を制御する分子メカニズムの研究が進展している。神経前駆細胞から神経細胞が分化する際には様々な細胞内タンパク質や細胞分裂制御因子が前駆細胞の運命決定に重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。さらに、こうした細胞自律的な運命決定を制御する上位シグナルとして、隣接する周囲の細胞に由来する細胞外分泌分子が関与していることも示唆されている。しかしながら、こうした様々な細胞内外のシグナルが移動中の神経細胞でどのようにして調節・統合され、ダイナミックな細胞運命変化や移動形態として表出されるのか、その分子機構の実体は未だ明らかとなっていない。

研究代表者はこれまで大脳皮質の発生過程における神経細胞の分化と移動メカニズムを解明するため、哺乳類以外の生物種が持つ始原的な皮質構築プログラムに着目し、その比較発生学的解析を行ってきた。細胞外分泌タンパク質である Wnt ファミリー分子は、胎児期の神経前駆細胞の増殖・分化・移動に重要な役割を果たすことが報告されている。Wnt リガンドが神経前駆細胞で受容されると、転写因子であるβカテニンの機能を介して神経前駆細胞の未分化性が促進・維持される。一方、移動中の神経細胞においても、多極性→双極性への神経細胞の形態変化と尖端樹状突起の進展には神経細胞内の Wnt シグナル活性の抑制が不可欠である。研究代表者のこれまでの研究によって、大脳皮質における Wnt シグナルの活性調節を担う分子の 1 つとして、βカテニンの分解を促進するキナーゼである Gsk3β が同定されている［1］。胎児期の大脳皮質において Gsk3β の発現は、神経前駆細胞から神経細胞が分化し、さらに神経細胞が多極性→双極性へと変化するタイミングでダイナミックに変化する。さらに、Wnt 分子の存在下でも Gsk3β の強制発現によって多極性の細胞形態が抑制される。すなわち、大脳皮質の発生時期、細胞種特異的な Gsk3β の発現制御機構が、Wnt シグナルに依存した細胞分化や形態を調節する「細胞内チューナー」として機能している可能性が示唆される。そこで本研究では、哺乳類大脳皮質発生過程における Gsk3β のダイナミックな発現変化に着目し、Gsk3β の転写制御に関わるシス・トランス制御因子を明らかにすることで、移動中の神経細胞における Wnt シグナル活性の細胞自律的な制御メカニズムを解明することを目標とした。まず、発生時期特異的な前脳細胞のオープンクロマチン状態について公共データベースを用いて解析した結果、Gsk3β の 5’側 2 kb 領域が神経前駆細胞あるいは神経細胞におけるシス制御領域として機能することを見出した。さらに、このシス制御領域（2 kb プロモーター領域）は神経前駆細胞で発現する Sox ファミリー転写因子によって活性化されること、また神経分化を促進する Neurogenin2 によって抑制されることを明らかにした。さらに、2 kb プロモーター領域の配列の種間比較を行ったところ、この領域の配列は哺乳類間で

高度に保存されていること、また羊膜類の各系統においては配列の多様性が見られることが明らかとなった。Gsk3βの発現が哺乳類と爬虫類で高度に保存されている知見と合わせると、Gsk3βを介したWntシグナルの時間的制御には種特異的なゲノム配列の進化が基盤となっている可能性が示唆された［2］。

方法および結果

1. 胎児期のマウス大脳皮質におけるGsk3βの発現に関わるシス制御領域の同定

胎児期のマウス大脳皮質では、Gsk3βの発現は神経前駆細胞で高く、神経細胞の分化段階に従って徐々に低下する。発生期の大脳皮質におけるGsk3βの時間的発現変化の基盤となる制御機構を調べるため、ENCODEデータベースを用いてGsk3β発現に関わるシス制御領域の検索を行った。E14.5マウス前脳のGsk3βゲノム領域に着目したヒストンChIP-seq解析では、マウスGsk3βのプロモーター領域周辺にオープンクロマチン状態を示すH3K4me3およびH3K27acのピークが確認された（図1A）。これらのピークは5′ UTRとエクソン1の中心に対応していた（図1B）。これらのゲノム領域がGsk3βの発現を制御するシス制御モジュール（CRM）として機能するかどうかを検証するため、2つのピークに対応するゲノム断片（Gsk3βプロモーターおよびエクソン1）を単離し、ルシフェラーゼアッセイによって転写活性を測定した（図1C）。コントロールベクター（pGL3）と比較して、pGL3-Gsk3βプロモーターはHEK293T細胞においてルシフェラーゼ活性を有意に増加させた（図1D）。またpGL3-Gsk3βプロモーターによるルシフェラーゼ活性の上昇は培養胚性マウス脳でも確認されたことから、（図1E）、このゲノム領域が胎児期のマウス大脳皮質でCRMとして機能していることが示唆された。次にどのような転写因子がGsk3βの発現制御に関与しているのかについて検討した。神経前駆細胞の自己複製や分化に重要な役割を果たすいくつかの転写因子に着目し、これらの転写因子の発現ベクターをGsk3βプロモーターやエクソン1を含むレポーターベクターとともにHEK293T細胞に導入した。その結果、Soxファミリータンパク質の1つであるSox9がレポーター活性を有意に上昇させること、Neurogenin2（Ngn2）がレポーターの転写活性を減少させることが明らかとなった（図2A、B）。一方、Gsk3βエクソン1を含むレポーターベクターでは、これらの転写因子に対する応答は検出されなかった。またNeuroD1はGsk3βプロモーター依存的な転写活性を変化させなかったが、Sox2はプロモーター依存的なレポーター活性を有意に上昇させた（図2C）。マウスGsk3βの2 kbプロモーター配列にSox2、Sox9、Ngn2の結合部位が複数存在することが確認された（図2D）。

2. Gsk3βのシス制御領域は羊膜類進化の過程で多様化した

以前の研究で、研究代表者は哺乳類と爬虫類の大脳皮質形成の種差の背景にWnt活性の時間的変化があることを報告している［1］。Gsk3βは、胎児期のマウス大脳皮質において、特に脳室帯、脳室下帯、および皮質板で顕著に発現している。また、発生中のヤモリ背側皮質においてもGsk3βの発現が観察され、神経細胞層と比較して脳室帯で比較的高い発現が確認される。そこで、本研究で同定したCRMが種間で保存されたGsk3βの発現に関連しているかどうかを調べるために、様々な哺乳類および非哺乳類のGsk3βの5′ UTRに相当するゲノム配列をNCBI genome browserおよびVISTAによる比較解析を行った。その結果、2 kbプロモーターのゲノム配列は哺乳類種間で高度に保存されているが、対応するゲノム領域の保存性は非哺乳類脊椎動物では低いことが確認された。特に、哺乳類以外の無脊椎動物（アノールトカゲ、ミシシッピアカミミガメ、ニワトリ）のゲノム配列を相互に比較すると、Gsk3βの5′ UTR領域はこれらの種で著しく多様化していることが明らかになった。すなわち、今回同定したCRM哺乳類に特異的な配列であり、非哺乳類種の脳におけるGsk3βの発現制御には関連しないことが示唆された。

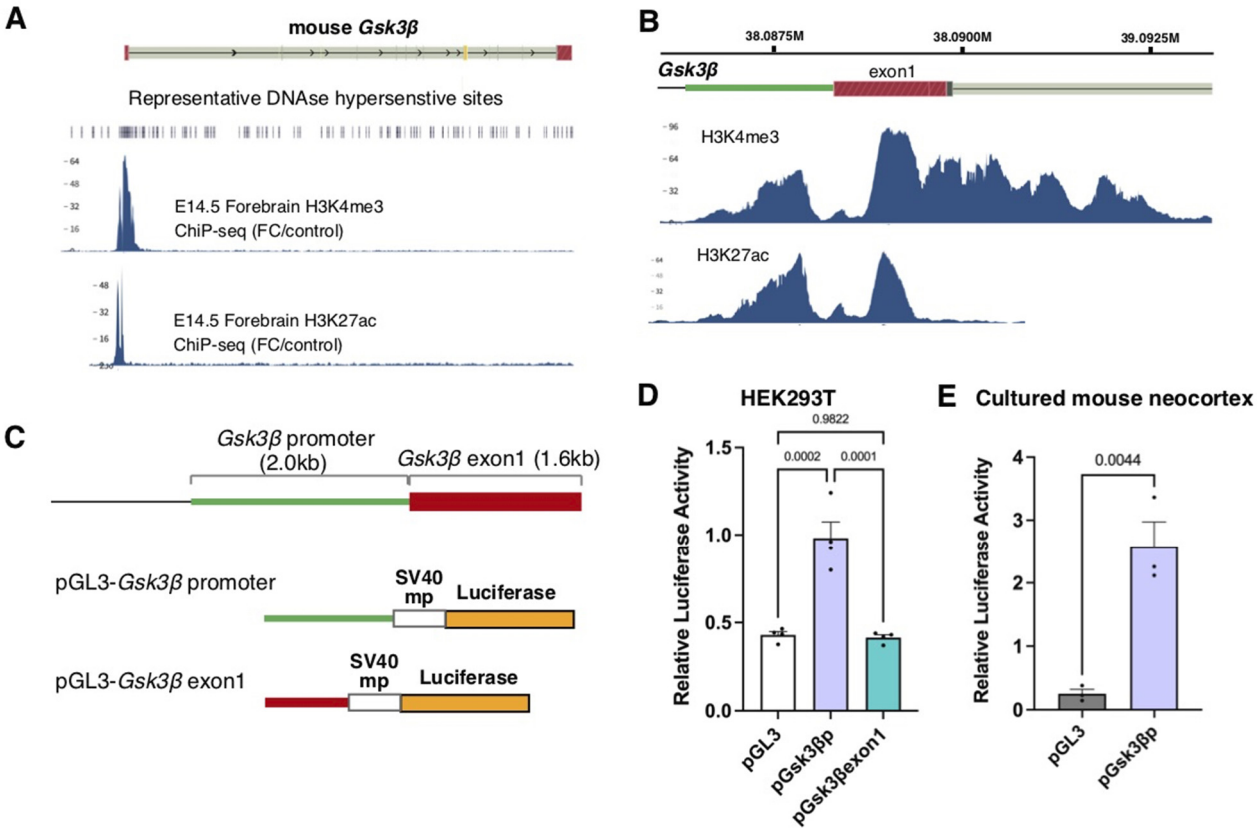


図 1. マウス Gsk3β のシス制御領域の同定と機能解析

A、B) ENCODE データベースによるマウス Gsk3β 遺伝子座における ChiP-seq 解析の結果。Exon1 および 2kb プロモーター領域にオープンクロマチン状態を示すピークが存在する。

C) ルシフェラーゼアッセイ用ベクターの構造。Gsk3β プロモーターおよび Exon1 を pGL3 ベクターに挿入した。

D、E) HEK293T 細胞およびマウス脳細胞におけるルシフェラーゼアッセイの結果。プロモーター領域のゲノム断片を含むベクターはどちらの細胞種でも対照群と比較して高い転写活性を示した 。One-way ANOVA（D）および unpaired t-test（E）を用いて統計検定を行った。p 値はグラフ中に記載。図は［2］を一部改変。

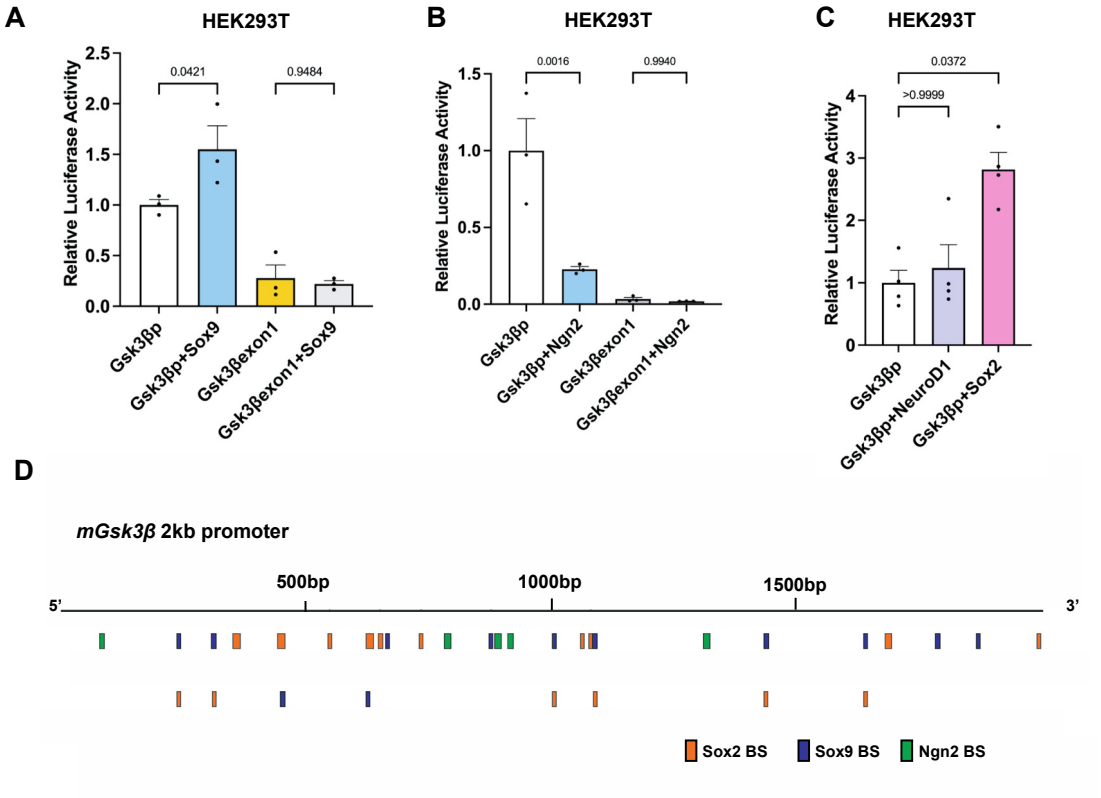


図 2. 細胞種特異的な転写因子によるマウス Gsk3β プロモーター領域の転写制御

A～C) 神経前駆細胞および神経細胞で発現する転写因子の導入による Gsk3β プロモーターおよび exon1 の転写活性の変化。プロモーター領域は Sox ファミリータンパク質により転写活性が促進される。一方、神経分化に関与する Ngn2 によって転写が抑制される。One-way ANOVA（A、B）および Kruskal-Wallis test（C）を用いて統計検定を行った。p 値はグラフ中に記載。

D) JASPAR データベースによるプロモーター領域における Sox2、Sox9 および Ngn2 の予測結合配列。図は［2］を一部改変。

考　察

発生時期の大脳皮質において Wnt シグナルは、神経前駆細胞の自己複製から神経分化への細胞運命の転換を制御している。Gsk3β は Wnt シグナル伝達の負の制御に重要な役割を担っていることが知られており、Gsk3β の時間的な発現制御は Wnt シグナル活性の細胞自律的な制御に重要であると考えられる。今回、我々は Gsk3β の 2 kb プロモーター領域が、Sox ファミリータンパク質や Ngn2 などの細胞種特異的な転写因子に応答して Gsk3β の発現を制御することを見出した。すなわち、このゲノム領域が CRM として神経前駆細胞の細胞運命の進行に応じた Gsk3β の時間制御に寄与していることが考えられる。Gsk3β は細胞内シグナル伝達成分の調節を通じて複数のシグナル伝達経路と相互作用する。したがって、Sox タンパク質依存的な Gsk3β の発現活性化は神経前駆細胞の過剰な産生を阻止するために重要であると考えられる。また以前の研究では、Gsk3β が転写後修飾によって Ngn2 の活性を抑制し、それによって大脳皮質発生の初期段階における Ngn2 の神経発生能が制限されることが示されている［3］。さらに最近、Wnt シグナルの発生時期依存的な活性減少が、大脳皮質層特異的ニューロンの連続的な生成に重要な役割を果たすことが示されている［4］。こうした知見と合わせると、Gsk3β と Ngn2 との間の負のフィードバックが発生期の大脳皮質における Wnt シグナルの段階依存的な調整にも重要であることが示唆される。

本研究では、Gsk3βのプロモーター配列が哺乳類間で高度に保存されていることを見出した。一方、このプロモーター領域に対応するゲノム領域は非哺乳類の各系統で多様化していることを明らかにした。我々は以前、発達中の爬虫類 DC において高い Wnt シグナル活性が、爬虫類特有の神経細胞移動のパターンを支えていることを報告している。Gsk3αおよびβの欠失は、哺乳類の新皮質発生における放射状神経細胞移動の失敗と神経細胞の形態異常をもたらすことが報告されている。 特に、いくつかの鳥類ではGsk3α遺伝子が欠損していることから、Gsk3 遺伝子群の役割は有羊膜類で大きく多様化したことが推測される。さらに哺乳類系統の進化の過程で、Gsk3 依存性のシグナルが発生期の大脳皮質におけるニューロン移動に必須の役割を担うようになったことが示唆された。また、Odom ら（2007）の報告では、相同遺伝子の保存された発現パターンは、ゲノム上の非アライメント領域に存在する転写因子の結合に依存することが多いことが示されている［5］。本研究においても、哺乳類特異的 CRM は非哺乳類の Gsk3βの細胞タイプ特異的な発現とは関連しないことが明らかとなった。また今回、胎児期の興奮性神経細胞における細胞内シグナル伝達系の依存度が種間で異なるという結果も得ている［6］。今回の研究では、神経前駆細胞から神経細胞へと分化する過程における Gsk3βの発現制御に関わる CRM を同定することができた。この CRM が移動中の神経細胞の形態変化にも関与しているかどうかについては、今後さらなる検討が必要である。大脳皮質形成の進行に伴う Gsk3βの時間的な発現制御を解明することで、Wnt 依存性の神経形成の微調整や、発達中の大脳皮質における哺乳類特有の神経形成パターンの進化に関する分子基盤に関する洞察を得ることができると考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都府立医科大学大学院医学研究科神経発生生物学の小野勝彦教授、後藤仁志博士、理化学研究所 BDR 生体モデル開発チームの清成寛博士である。

文　献

1) Nomura T, Ohtaka-Maruyama C, Kiyonari H, Gotoh H, Ono K. Changes in Wnt-dependent neuronal morphology underlie the anatomical diversification of neocortical homologs in amniotes. Cell Rep 2020 May 5; 31(5):107592.doi: 10.1016/j.celrep.2020.107592.
2) Nomura T, Gotoh H, Kiyonari H, Ono K. Cell type-specific transcriptional control of Gsk3β in the developing mammalian neocortex. Front Neuroci. 2022 Mar 23;16: 811689. Doi: 10.3389/fnins.2022.811689.
3) Li, S. Mattar, P. Zinyk, D. Singh, K. Chaturvedi, CP. Kovach, C. Dixit, R. Kurrasch, DM. Ma, YC. Chan, JA. Wallace, V. Dilworth, FJ. Brand, M. Schuurmans, C. GSK3 temporally regulates neurogenin 2 proneural activity in the neocortex. J Neurosci. 2012 Jun 6;32(23):7791-805. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.1309-12.2012.
4) Vitali, I. Fievre, S. Telley, L. Oberst, P. Bariselli, S. Frangeul, L. Baumann, N. McMahon, JJ. Klingler, E. Bocchi, R. Kiss, JZ. Bellone, C. Silver, DL. Jabaudon, D. Progenitor Hyperpolarization Regulates the Sequential Generation of Neuronal Subtypes in the Developing Neocortex. Cell. 2018 Aug 23;174(5):1264-1276.e15. doi: 10.1016/j.cell.2018.06.036.
5) Odom T, Dowell RD, Jacobson ES, Gordon W, Danford TW, Maclsaac KD, Rolfe A, Conboy CM, Gifford DK, Fraenkel E. Tissue-specific transcriptional regulation has diverged significantly between human and mouse. Nat Genet 2007 Jun; 39(6):730-2. Doi: 10.1038/ng2047.
6) Nomura T, Nagao K, Shirai R, Gotoh H, Umeda M, Ono K. Temperature sensitivity of Notch signaling underlies species-specific developmental plasticity and robustness in amniote brains. Nat Commun, 2022 Jan 10;13(1): 96. Doi.1038/s41467-021-27707-5.