

主論文の要旨

***Neurogenin2-d4Venus* and *Gadd45g-d4Venus* transgenic mice: Visualizing mitotic and migratory behaviors of cells committed to the neuronal lineage in the developing mammalian brain**

Neurogenin2-d4Venus および *Gadd45g-d4Venus* トランスジェニックマウス：
発生過程の（哺乳類）脳における神経細胞系譜に入ることが決定した細胞の
細胞分裂と細胞挙動の可視化

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻

機能形態学講座 細胞生物学分野

（指導：宮田 卓樹 教授）

川上 巧

[目的]

発生中の脳原基の脳室側には「脳室帯」と呼ばれる構造がある。脳室帯は細胞が生産される場であり、同時に細胞運命選択が行われる場でもある。誕生したばかりの細胞は、やがて、自身を産生した母細胞と同様の「未分化」状態、あるいは、ニューロンとなる手前の「分化途上」状態のどちらかへと進む。ゆえに脳室帯では未分化細胞と分化途上細胞 (=神経細胞系譜に入ることが決定した細胞) が混在する。生まれたての細胞がその運命を「未分化」へと傾けるには、周囲の「微小環境」から「Notchリガンド (デルタ)」が提示され、それを受容することが重要であると以前から知られてきた。最近の研究で、「分化途上細胞」が主要なデルタ提示主であろうと示唆されてきたので、「微小環境」という抽象に満足せず、生まれたて細胞が運命を決めるまでに「いつ、どんな相手 (分化途上細胞か否か) と接触するのか」を具体的に把握することが求められる。しかし、時々刻々と形態変化する分化途上細胞を直接的かつ網羅的にライブ観察する術はこれまで無かった。これを打開すべく、本研究では、三次元組織中での生きた分化途上細胞の網羅的可視化をめざした。

[方法]

分化途上細胞の形態と動態を鋭敏かつ網羅的に観察するために、分化途上細胞に一過性発現することが知られている *Neurog2* および *Gadd45g* のプロモーター活性依存的に分解促進的蛍光蛋白 *d4Venus* を発現させるトランスジェニックマウス (*Neurog2-d4Venus* および *Gadd45g-d4Venus*) を作成した。免疫組織学的解析により蛍光発現の特異性 (*d4Venus* 発現細胞が確かに分化途上であること) を、またライブ観察により、「分化途上」状態検出の鋭敏度ならびに細胞挙動を調べた。

[結果・考察]

作成した両マウスの大脳原基において、*d4Venus* 発現細胞が確かに分化途上であるのかを検証するために、間接蛍光抗体法を用いてその発現パターンを調べた (Fig. 1, 2)。*d4Venus* のシグナルは脳室帯およびその近傍域において検出され (Fig. 1A, G, 2A)、分化途上細胞マーカーの発現と一致した (Fig. 1B, C, F, 2B)。一方で、分化しきったニューロンでは *d4Venus* のシグナルが検出されず (Fig. 1A, 2C)、また、単層培養のライブ観察において、*d4Venus* 陽性細胞がニューロンへ移行した際に陰性になる様子が捉えられた (Fig. 2D)。これらのことから、両マウスともに *d4Venus* のシグナルが網羅性を持って分化途上 (細胞・時期) 特異的に検出されることが証明された。

d4Venus の発現開始時期を調べるために、三次元組織培養法 (スライス培養法) を用いて *Neurog2-d4Venus* マウス大脳原基の連続ライブ観察を行った (Fig. 1D)。その結果、*d4Venus* 陰性で誕生した細胞が陽性へと変化する瞬間 (運命選択により分化途上細胞へと移行する様子) が捉えられ、細胞誕生から陽性になるまでに約4時間かかることが分かった (Fig. 1E)。*d4Venus* 蛍光シグナルの検出は間接蛍光抗体法による *Neurog2* タンパク検出と比較して1時間以内の遅れはあるものの、その鋭敏性は示

された。また、誕生から4時間経過した細胞の d4Venus シグナルの有無を観察することで、運命選択の結果（「未分化（陰性）」もしくは「分化途上（陽性）」）をライブで判別することが可能となった。

連続ライブ観察により、分化途上細胞の詳細な形態・動態観察にも成功した（Fig. 3, 4）。運命選択後の分化途上細胞の多くは、はじめ細長い突起構造を脳室面に接した状態で存在しているが、数時間後には自身の細胞体を脳膜側へ移動しつつ、突起を脳室面から離脱させ、脳室帯から離れていくことが分かった（Fig. 4A-C）。また、その後起こる脳室下帯での分裂（ニューロンペアを生産）も間接蛍光抗体法によって検出された（Fig. 3A）。一方、これまで詳細が不明であった「分化途上細胞の脳室面での分裂」という現象を捉えることもできた（Fig. 3B-D'）。この特殊な分化途上細胞は、脳膜側に突起を保持した状態で脳室面にて分裂し、d4Venus 陽性の娘細胞ペアを生産することが分かった（Fig. 3C, D）。この娘細胞ペアは誕生から約3時間後には細胞周期進行阻害マーカー陽性であったことから（Fig. 3D'）、その後分裂することなくニューロンへと移行する運命にあることが示唆される。

また、両マウスともに、大脳原基と同様に、小脳、網膜、神経管、後根神経節においても分化途上細胞の観察が可能であることが分かった（Fig. 5）。小脳、網膜、神経管においては連続ライブ観察によって、分化途上細胞の核運動及びそれに伴う細胞分裂を捉えることにも成功した（Fig. 5B, F, J, L）。

[結論]

作製した両マウスは、ヘテロな細胞集団で構成される脳室帯のなかで、分化途上細胞のみを漏れなく、すぐれた形態描写性をもってライブ観察することを初めて可能にした。したがって本マウスは、大脳の発生過程での個別の細胞動態や、運命選択にあらずかる細胞間接触の履歴を調べるツールとして有用である。また、両マウスがもたらず網羅性を生かした全分化途上細胞の空間分布の把握は、脳室帯という細胞集団が、限られたスペースの中でどのような細胞混在・隣接のルールを確立し、細胞生産の場として成立しているのか、そしてその様子が哺乳類進化の過程でどう維持または変化したかというシステム生物学的問題に向き合う基盤としても意味を持つ。さらに本マウスは、大脳にとどまらず、神経系全般の分化途上細胞の挙動解析にも有用であることから、本マウスを用いて得られる知見が、神経系発生における細胞運命選択と組織形成に関する普遍的なルールの理解につながることを期待される。