

Hes1 による発現動態依存的な細胞増殖制御機構の解明

前田 勇樹

目次

論文要旨	4
略語表	5
第一章 序論	
1.1 胎仔及び成体の脳における神経幹細胞の役割	7
1.2 成体神経幹細胞の活性状態と休眠状態の制御における Notch シグナルの役割	9
1.3 Hes1 の振動発現の仕組み	10
1.4 神経幹細胞における Hes1 による細胞増殖制御機構	12
1.5 他の細胞種における Hes1 による細胞増殖制御機構	14
1.6 本研究の目的と結果	15
第二章 実験方法	
2.1 遺伝子組み換えマウス	16
2.2 細胞培養	16
2.3 プラスミド設計	17
2.4 レンチウイルスの作製	19
2.5 神経幹細胞の樹立	20
2.6 安定発現株の樹立	20
2.7 p21 遺伝子座ノックイン細胞の樹立	21
2.8 細胞増殖アッセイ	21
2.9 試薬・抗体	22
2.10 タンパク質の半減期測定	23
2.11 ホールマウント <i>in situ</i> hybridization	23
2.12 ウェスタンブロットティング解析	23
2.13 発光タイムラプスイメージング	24
2.14 蛍光タイムラプスイメージング	24
2.15 CL24B-LIC/B を用いた発光シグナルのタイムラプス測定	24
2.16 Tet-On システムによる遺伝子発現誘導	25

2.17	ルシフェラーゼ解析	25
2.18	クロマチン免疫沈降 (ChIP)アッセイ	26
2.19	RNA-seq 解析	27
2.20	画像解析	28
2.21	統計解析	28
第三章 結果		
3.1	神経幹細胞における Hes1 の発現動態の解析	29
3.2	神経幹細胞における Hes1 の細胞増殖への影響についての解析	33
3.3	Hes1 の欠損と Hes1 の持続的な高発現は p21 の発現を促進する	36
3.4	Hes1 の振動発現は p21 の発現を抑制する	38
3.5	神経幹細胞における p21 の発現動態の解析	40
3.6	Hes1 の持続的な高発現は一時的に p21 の発現を抑制するが、最終的に促進する	44
3.7	Hes1 の持続的な高発現による p21 の発現上昇に関与する因子の探索	46
3.8	Hes1 の持続的な高発現は MEK-ERK パスウェイを介して p21 の発現を促進する	51
3.9	Hes1 の持続的な高発現は Dusp7 の発現を抑制することで Erk1/2 のリン酸化を誘導する	53
第四章 考察		
4.1	Hes1 による発現動態依存的な細胞周期制御機構	57
4.2	Hes1 による細胞増殖の抑制における発現レベルの重要性	59
4.3	Ascl1 を介した Hes1 による細胞増殖の制御	59
4.4	ヒト乳癌細胞における Hes1 の発現動態	59
4.5	生体内に近い培養条件の重要性	60
4.6	神経幹細胞における p21 以外の CKI による休眠状態の制御	60
4.7	遺伝子の機能における発現動態の重要性	60
引用文献		62
謝辞		70

論文要旨

胎仔期の神経幹細胞は活発に分裂し、多数の神経細胞やグリア細胞を産生する一方で、一部の神経幹細胞は増殖と分化を行わない休眠状態になる。このような細胞の増殖と休眠の制御に転写抑制因子 **Hairy enhancer of split 1 (Hes1)**が重要であることが知られている。**Hes1**の振動発現は細胞の増殖を促進する一方で、**Hes1**の持続的な高発現は増殖を抑制し、休眠状態を誘導する。しかし、**Hes1**が発現動態依存的に細胞増殖を制御するメカニズムはいまだ不明な点が多く残されている。そこで本研究では、このメカニズムの解明を目指した。

まず、神経幹細胞の増殖への**Hes1**の寄与を確認するため、**Hes1**に加えて、**Hes**関連遺伝子群(**Hes3**、**Hes5**、**Hey1**)を欠損させる、または**Hes1**の持続的な高発現を誘導した。その結果、どちらの条件でも神経幹細胞の増殖が抑制された。したがって**Hes1**の振動発現が神経幹細胞の増殖を促進することが示唆された。次に**Hes1**の振動発現が細胞増殖を促進するメカニズムを調べるために、**RNA sequencing (RNA-seq)**解析によって**Hes1**と**Hes**関連遺伝子群の欠損、及び**Hes1**の持続的な高発現による遺伝子発現の変化を網羅的に調べたところ、**Cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) p21**の発現がどちらの条件でも上昇することが分かった。また、**Hes1**の持続的な高発現に加えて、**p21**の発現をノックダウンすると**Hes1**の持続的な高発現によって抑制された細胞増殖が改善された。以上の結果より、**Hes1**の持続的な高発現は**p21**の発現を促進することで細胞増殖を抑制することが示唆された。次に**p21**プロモーターレポーターと光応答性遺伝子発現システムを用いて、**Hes1**の振動発現による**p21**の発現への影響を調べたところ、**Hes1**の振動発現によって**p21**の発現が抑制された。加えて、クロマチン免疫沈降(**Chromatin immunoprecipitation, ChIP**)アッセイにより、**Hes1**が**p21**プロモーターに直接結合することが分かった。以上の結果より、**Hes1**は直接**p21**の発現を抑制することが示唆された。次に**Hes1**の持続的な高発現によって**p21**の発現が上昇する仕組みを調べた。神経幹細胞に**Hes1**の持続的な高発現を誘導したところ、**Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (Erk1/2)**のリン酸化が上昇した。また、**Hes1**の持続的な高発現を誘導した神経幹細胞に、**Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)**阻害剤を加えたところ、**p21**の発現は低下し、また**Hes1**の持続的な高発現に抑制された細胞増殖が改善された。そこで**Erk1/2**の制御因子の発現変化を調べたところ、**Erk1/2**の脱リン酸化酵素である**Dual-specificity phosphatases 7 (Dusp7)**の発現が**Hes1**の持続的な高発現によって抑制されることが分かった。そこで**Hes1**の持続的な高発現に加えて、**Dusp7**の持続的な高発現を誘導したところ、**Erk1/2**のリン酸化と**p21**の発現が抑制され、抑制された細胞増殖も改善された。以上の結果より**Hes1**の持続的な高発現は**Dusp7**の発現を抑制することによって**Erk1/2**のリン酸化を促進し、その結果**p21**の発現を促進することが示唆された。本研究によって、**Hes1**は発現動態に応じて直接、もしくは**Dusp7-Erk1/2**を介して間接的に**p21**の発現を制御し、神経幹細胞の増殖を制御していることが示された。

略語表

AP1: Activation protein transcription factor 1
Ascl1: Achaete-scute homolog 1
bFGF: basic fibroblast growth factor
bHLH: basic helix-loop-helix
BMP4: Bone morphogenetic protein 4
BrdU: Bromodeoxyuridine
BSD: Blastocidin S deaminase
CAG: CMV enhancer fused to the chicken beta-actin promoter
CaMK2 δ : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta
CBh: Chicken β -actin (CBA) hybrid intron
CDK4: Cyclin-dependent kinase 4
cDNA: complementary DNA
ChIP: Chromatin immunoprecipitation
CHX: Cycloheximide
CKI: Cyclin-dependent kinase inhibitor
DII1: Delta-like 1
DMEM: Dulbecco's modified eagle medium
Dox: Doxycycline
DRA: DDBJ sequence read archive
Dusp7: Dual-specificity phosphatases 7
E: Embryonic day
EGF: Epidermal growth factor
Erk: Extracellular signal-regulated kinase
ES: Embryonic stem
Fgf: Fibroblast growth factor
FPKM: Fragments per kilobase of exon per million mapped reads
FSH: Follicle-stimulating hormone
Fucci: Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator
GO: Gene ontology
hCdt1: humanized Cdc10 dependent transcript 1
Hes: Hairy enhancer of split
Id4: Inhibitor of DNA binding 4
Jag1: Jagged1
KO: Knockout

LHRH: Luteinizing hormone-releasing hormone
Maml: Mastermind-like
MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase
MOI: Multiplicity of infection
Neurog2: Neurogenin 2
NICD: Notch intracellular domain
NLS: Nuclear localization signal
NSC: neural stem cell
OE: Overexpression
PBS: Phosphate-buffered saline
PBST: PBS/0.1 % tween 20
PCNA: Proliferating cell nuclear antigen
PEI: Polyethylenimine
PFA: Paraformaldehyde
PI: Propidium iodide
PVDF: Poly vinylidene difluoride
p53: transformation related protein 53
qPCR: Quantitative polymerase chain reaction
Rbpj: Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
RNA-seq: RNA sequencing
SDS: Sodium dodecyl sulfate
s.e.m.: standard error of the mean
Shh: Sonic hedgehog
Smad2/3: SMAD family member 2/3
Sp1/3: Trans-acting transcription factor 1/3
Stat3: Signal transducer and activator of transcription 3
TBST: Tris-buffered saline/0.1 % tween 20
TEF1: Transcription enhancer factor 1
UAS: upstream activation sequence
UTR: untranslated region
Wnt: Wingless-related integration site
WT: Wild-type
ZLI: Zona limitans intrathalamica

第一章 序論

1.1 胎仔及び成体の脳における神経幹細胞の役割

神経幹細胞は自己複製能を持ち、神経細胞とグリア細胞に分化できる幹細胞である。哺乳類の神経発生の初期において、神経幹細胞である神経上皮細胞は活発に对称分裂を行うことで、自己複製しその数を増やす(Alvarez-Buylla et al., 2001; Fishell and Kriegstein 2003; Fujita 2003; Götz and Huttner 2005; Miller and Gauthier 2007) (図 1A)。神経上皮細胞が増え、神経管の厚みが増すにつれて、徐々に神経上皮細胞は突起を基底膜側に伸ばし、放射状グリア細胞に変化していく。放射状グリア細胞は非対称分裂によって、放射状グリア細胞自身と、幼若な神経細胞または神経前駆細胞に分裂する(Malatesta et al., 2000; Miyata et al., 2001; Noctor et al., 2001)。神経前駆細胞は数回、対称分裂を行うことで数を増やし、最終的に神経細胞に分化する。産生された幼若な神経細胞は、放射状グリア細胞の突起に沿って、既に産生された神経細胞を乗り越えて、基底膜側に移動する。そのため、脳室側から基底膜側に向けて、順番に層構造を形成する。発生後期においては、放射状グリア細胞はオリゴデンドロサイトやアストロサイトのようなグリア細胞に分化する。このように神経幹細胞は対称分裂と非対称分裂を適切に行うことで、幹細胞を維持しつつ、発生時期や層構造に合わせた多様な神経細胞やグリア細胞を産生する。一方で、一部の神経幹細胞は増殖と分化を行わなくなる。例えば、視床内境界域(Zona limitans intrathalamica, ZLI)、中脳後脳境界部(峡部)、蓋板、底板のような境界領域の細胞である(図 1B,C)。これらの細胞は神経管の領域を区別するだけでなく、Fibroblast growth factor (Fgf), Sonic hedgehog (Shh), Wingless-related integration site (Wnt)等のシグナル分子を発現するオーガナイザーとしても機能する(Kiecker and Lumsden 2005)。また、他にも大脳において一部の神経幹細胞はゆっくりと分裂しており、最終的に成体脳の側脳室の脳室下帯や、海馬の歯状回等において休眠状態の神経幹細胞として残る(Furutachi et al., 2015; Harada et al., 2021)。成体脳における神経幹細胞のほとんどは休眠状態であるが、まれに活性化して、一定数の神経細胞を産生する。産生された神経細胞が神経回路に組み込まれることで、学習・記憶機能に貢献する(Zhao et al., 2008; Urbán et al., 2019)。このような神経幹細胞の増殖と休眠を制御する仕組みにはいまだ不明な点が多く残されている。

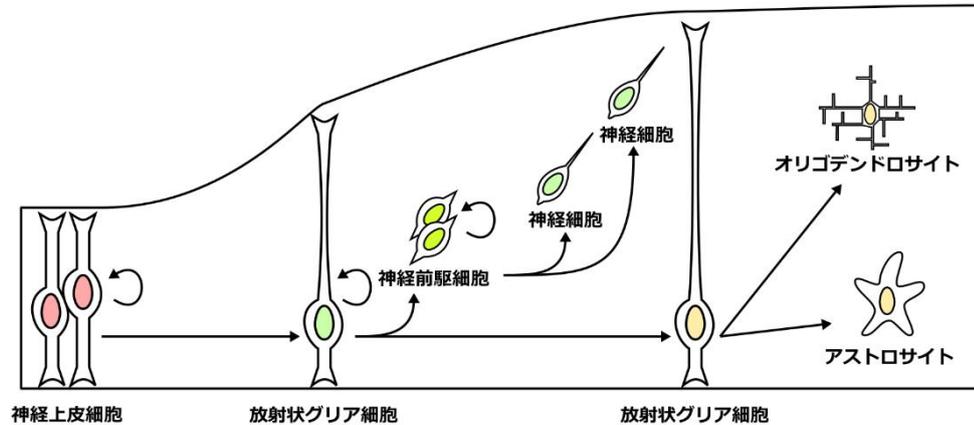
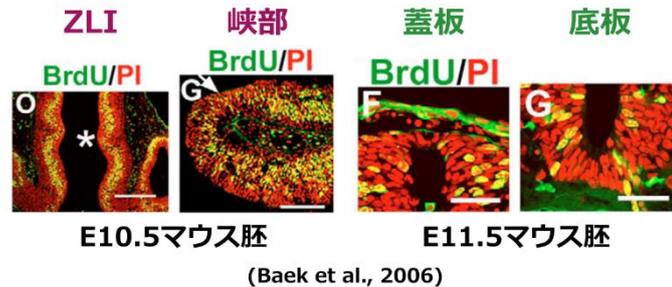
A**B****C**

図 1：神経発生における神経幹細胞の増殖と分化

(A) 神経発生の初期において、神経幹細胞である神経上皮細胞は対称分裂を行うことで、自己複製しその数を増やす。発生が進むにつれて、神経上皮細胞は突起を基底膜側に伸ばし、放射状グリア細胞に変化していく。放射状グリア細胞は非対称分裂によって幼若な神経細胞または神経前駆細胞を産生する。発生後期においては、放射状グリア細胞はオリゴデンドロサイトやアストロサイトのようなグリア細胞に分化する。

(B) 胎仔期の神経管の矢状面の模式図。境界領域の細胞(ZLI、峽部、蓋板、底板)の位置を示す。

(C) 境界領域における細胞増殖。Bromodeoxyuridine (BrdU)(緑色)と Propidium iodide (PI)(赤色)によって、Embryonic day (E) 10.5 マウス胚の ZLI (アスタリスク)、峽部(矢印)、E11.5 マウス胚の蓋板、底板などの境界領域の細胞において細胞増殖が抑制されていることが示されている。

(Baek et al., 2006 より図を引用した。)

1.2 成体神経幹細胞の活性状態と休眠状態の制御における Notch シグナルの役割

Notch シグナルは、細胞間の情報を伝達する経路の 1 つである。隣接細胞の Delta-like 1 (DII1), Jagged1 (Jag1)等のリガンドから受容体である Notch タンパク質にシグナルが伝達されることでエフェクターである転写抑制因子 Hairy enhancer of split (Hes) 1 や Hes5 等の発現が誘導される(図 2)。リガンドが結合すると、Notch タンパク質は γ セクレターゼによって切断され、Notch intracellular domain (NICD)が放出され、核内に移行する。核内に移行した NICD は DNA 結合タンパク質 Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region (Rbpj)と転写共役因子 Mastermind-like (Maml)と複合体を形成して、標的遺伝子である Hes1 や Hes5 の発現を誘導する。

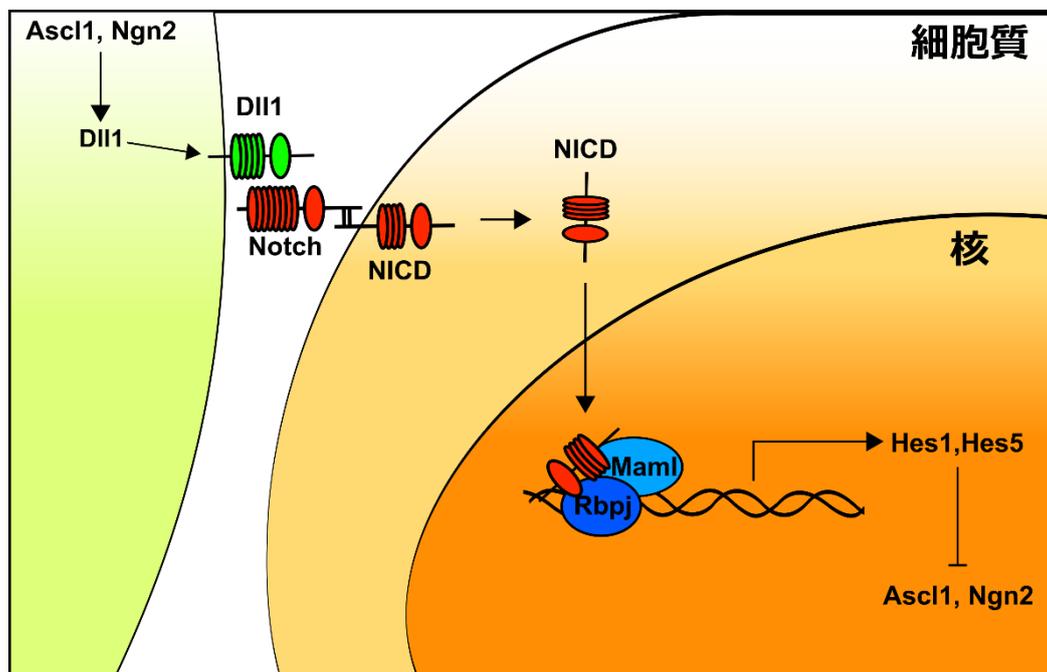


図 2 : Notch シグナルの伝達経路

隣接した細胞の DII1 等のリガンドが Notch 受容体と結合することによってエフェクターである Hes1 や Hes5 の発現が誘導される。

(Shimojo et al., 2013 より図を改変した。)

Notch シグナルは成体神経幹細胞の維持において重要である (Imayoshi et al., 2010)。成体脳において、Notch1 は増殖する神経幹細胞を維持するのに必要な一方で、Notch2、Notch3 は休眠状態の神経幹細胞を維持するのに必要である (Ables et al., 2010; Basak et al., 2012; Engler et al., 2018; Kawai et al., 2017)。また、受容体だけでなく、リガンドである Dll1 や Jag1、Notch シグナルのエフェクターである Hes1 も神経幹細胞の活性状態と休眠状態の制御に必要である (Kawaguchi et al., 2013; Nyfeler et al., 2005; Sueda et al., 2019)。興味深いことに、活性状態と休眠状態の神経幹細胞において Hes1 の発現動態が異なることが報告されている。

1.3 Hes1 の振動発現の仕組み

Hes1 は basic helix-loop-helix (bHLH)型転写抑制因子であり、神経幹細胞においては、プロニューラル因子 Achaete-scute homolog 1 (Ascl1)や Neurogenin 2 (Neurog2)の発現を抑制することで、神経分化を抑制し、神経幹細胞を維持する (Ohtsuka T., 1999; Hatakeyama et al., 2004)。増殖している神経幹細胞において、Hes1 の発現は 2、3 時間周期で振動する (Shimojo et al., 2008; Imayoshi et al., 2013; Sueda et al., 2019)(図 3、図 4A)。NICD によって Hes1 の転写が活性化されると、Hes1 タンパク質は自身のプロモーターに結合し、Hes1 自身の発現を抑制する。すると Hes1 の mRNA とタンパク質は半減期が短いために、速やかに分解される。その結果 Hes1 タンパク質が少なくなり、Hes1 の発現が再開する。このように Hes1 の発現が上昇と低下を繰り返すことで、Hes1 の発現が振動する (Hirata et al., 2002)。

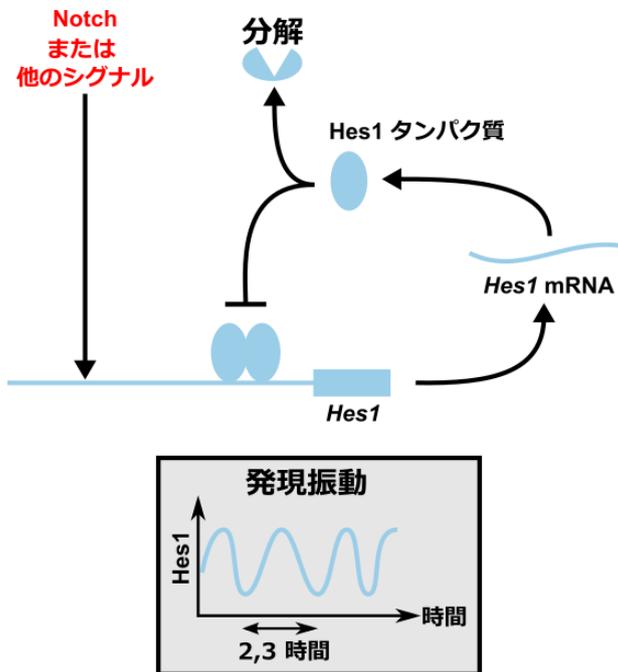


図 3 : Hes1 の振動発現の仕組み

Notch シグナルなどによって *Hes1* の転写が活性化されると、Hes1 タンパク質は自身のプロモーターに結合し、*Hes1* 自身の発現を抑制する。すると *Hes1* の mRNA は半減期が短いために、速やかに分解される。また、Hes1 のタンパク質もユビキチン化されてユビキチン・プロテアソーム系によって速やかに分解される。その結果 Hes1 タンパク質が少なくなり、再度 Hes1 の発現が再開される。このように Hes1 の発現が上昇と低下を繰り返すことで、Hes1 の発現が振動する。

1.4 神経幹細胞における Hes1 による細胞増殖制御機構

活発に増殖する神経幹細胞において、Hes1 の振動発現は Neurog2 と Dll1 の発現を抑制することによって、神経幹細胞を維持する(Shimojo et al., 2008)。また、遺伝子改変によって Hes1 の振動発現が減衰すると、神経幹細胞の増殖が抑制され、小頭症が引き起こされる(Shimojo et al., 2016; Ochi et al., 2020)。

峡部のような境界領域において神経幹細胞の増殖が抑制されており、Hes1 が高レベルで発現している(図 4B)。Hes1、Hes3、Hes5 を欠損させると、これらの神経幹細胞は神経細胞に分化する(Hirata et al., 2001; Baek et al., 2006)。また、成体脳における神経幹細胞も多くは休眠状態であり、Hes1 の発現は高レベルで振動する一方で、まれに神経幹細胞が活性化されると、Hes1 の発現は低レベルで振動する(図 4C)。Hes1 と Hes 関連遺伝子群(Hes3、Hes5、Hey1)を欠損させると、成体脳における神経幹細胞は休眠状態を維持できず、神経細胞に分化する(Sueda et al., 2019)。休眠状態の神経幹細胞において Hes1 が高レベルで発現する仕組みはまだ明らかになっていないが、転写調節因子である Inhibitor of DNA binding 4 (Id4)の関与を示唆する研究がある(Zhang et al., 2019)。成体脳の海馬における休眠状態の神経幹細胞では、Notch2 受容体が活性化されることによって、Hes1 だけでなく、Id4 の発現も上昇し、神経幹細胞の休眠状態が維持される。Id タンパク質は DNA への結合能を失った bHLH 因子であり、Hes1 と結合して、二量体をつくることによって、Hes1 の DNA への結合を抑制する(Bai et al., 2007)。そのため、Hes1 と Id4 のヘテロ二量体は Hes1 自身のプロモーターに結合することができず、結果 Hes1 が高レベルで発現すると考えられる。

以上より、Hes1 の発現動態（振動発現または持続的な高発現）が、神経幹細胞の増殖と休眠の制御に寄与すると考えられる。

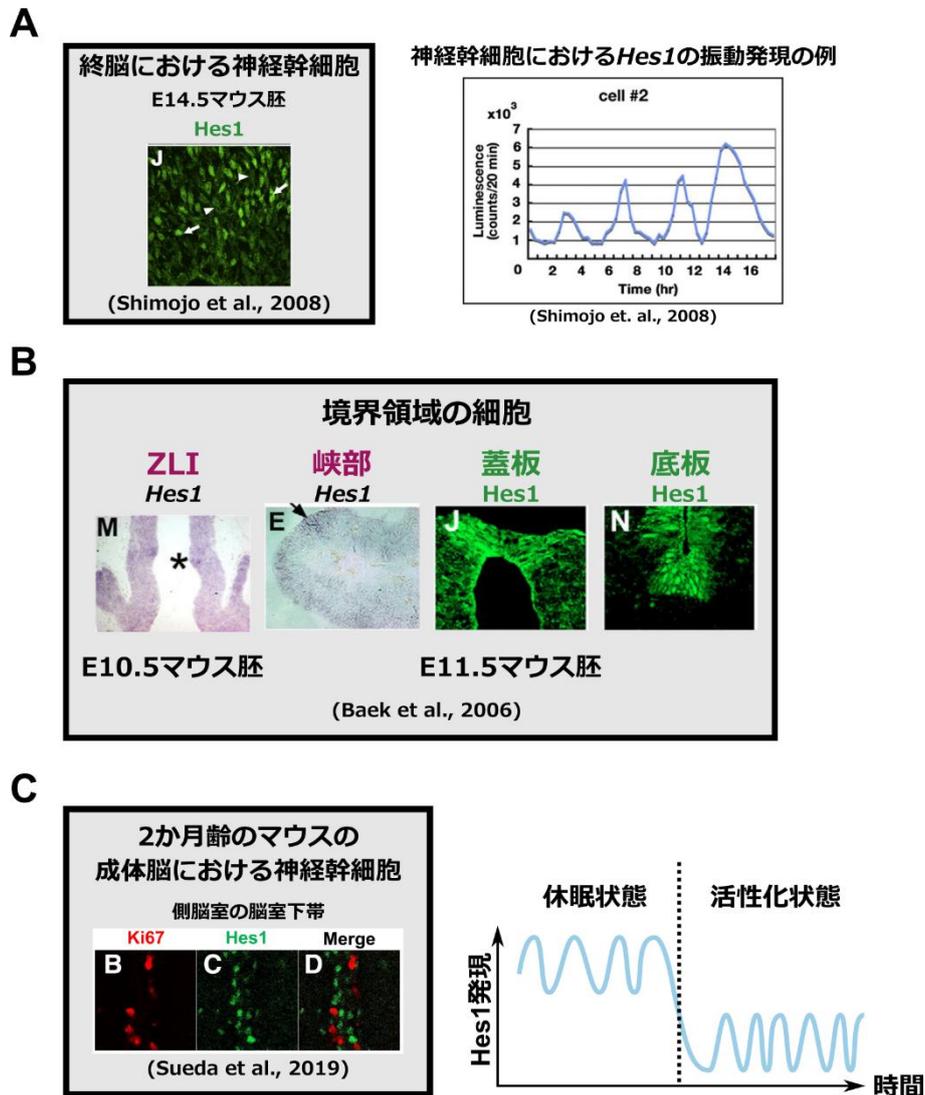


図 4：神経幹細胞における Hes1 の発現動態

(A) 活発に増殖する神経幹細胞における Hes1 の発現。E14.5 マウス胚の終脳において、神経幹細胞は活発に増殖しており、Hes1 の発現が高い細胞と低い細胞が入り混じった Salt-and-pepper パターンを示す (左)。また、単一細胞レベルでの Hes1 の発現は振動する(右)。

(B) 境界領域の細胞における Hes1 の発現。E10.5 マウス胚の ZLI(アスタリスク)、E11.5 マウス胚の峽部(矢印)、蓋板、底板などの境界領域の細胞において Hes1 の発現は高レベルで一定である。

(C) 2 ヶ月齢のマウスの成体脳における神経幹細胞の Hes1 の発現。(左) Ki67 陽性である増殖する神経幹細胞は Hes1 の発現レベルが低い一方で、Ki67 陰性の休眠状態の神経幹細胞は Hes1 の発現レベルが高い。(右) 休眠状態においては Hes1 の発現が高レベルで振動しているが、神経幹細胞が活性化されると、Hes1 の発現が減少し、低レベルで振動する。(Shimojo et al., 2008、Baek et al., 2006、Sueda et al., 2019 より図を引用した。)

1.5 他の細胞種における Hes1 による細胞増殖制御機構

神経幹細胞だけでなく、様々な細胞種で、高発現の Hes1 は細胞増殖を抑制する。例えば、マウス線維芽細胞では、Hes1 の発現は振動しており、Hes1 の抑制、または Hes1 の持続的な高発現の誘導により細胞増殖は抑制される(Yoshiura et al., 2007)。他にもラット褐色細胞腫由来の細胞株 PC12 において、Hes1 の持続的な高発現は Cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) p21 の発現を抑制することで増殖と分化を抑制する(Castella et al., 2000)。他の細胞種においても、Hes1 が CKI p21 と p27 の発現を抑制する報告がある(Castella et al., 2000; Kabos et al., 2002; Murata et al., 2005)。p21、p27 は高レベルで発現している場合、Cyclin D1 と Cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)の複合体の活性を抑制し、細胞周期の進行を抑制するが、低レベルで発現している場合は、Cyclin D1 と CDK4 の複合体の形成を助け、細胞周期の進行を促進する(LaBaer et al., 1997; Cheng et al., 1999; Abbas et al., 2009)。そのため、上述した先行研究(Castella et al., 2000)においては、Hes1 の持続的な高発現が p21、p27 の発現を Cyclin D1 と CDK4 の複合体の形成を助けるレベルよりさらに低レベルに抑制することで、細胞周期の進行を抑制すると考えられる。また、他にも Hes1 の持続的な高発現は、DNA 複製に必須な因子である Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、G1 期から S 期への移行に必要な転写因子 E2F の発現を抑制することで細胞増殖を抑制する(Castella et al., 2000; Ström et al., 2000; Hartman et al., 2004)。

Hes1 は神経幹細胞以外の細胞の休眠状態を制御することが報告されている。例えば線維芽細胞や脂肪前駆細胞において、血清飢餓や接触阻害によって高レベルの Hes1 が誘導され、これらの細胞は休眠状態になる(Sang et al., 2008; Noda et al., 2011)。また、休眠状態の造血幹細胞・前駆細胞、骨格筋の衛星細胞において Hes1 は高発現しており、活性状態になった骨格筋の衛星細胞において Hes1 の発現は振動する(Yu et al., 2006; Mourikis et al., 2012; Lahmann et al., 2019)。興味深いことに、休眠状態のヒト線維芽細胞において、Hes1 の発現が抑制されると、再度細胞の増殖を行う能力が失われ、細胞の老化が起きる一方で、Hes1 の持続的な高発現を誘導することによって細胞の老化が抑制されることが報告されている(Sang et al., 2008)。この結果は、休眠状態のヒト線維芽細胞において Hes1 の発現が細胞の老化を抑制し、休眠状態の維持に重要なことを示唆する。

以上より、Hes1 の持続的な高発現は神経幹細胞を含む多くの細胞種において細胞増殖を可逆的に抑制すると考えられる。

1.6 本研究の目的と結果

本研究では神経幹細胞における Hes1 による発現動態依存的な細胞増殖制御の分子メカニズムを調べた。その結果、CKI p21 が Hes1 の細胞増殖の制御に重要なことが明らかになった。Hes1 の振動発現は p21 の発現を抑制することで細胞の増殖を促進した。一方で、Hes1 の持続的な高発現は p21 の発現を促進することで、細胞の増殖を抑制した。また、Hes1 の振動と比べて、Hes1 の持続的な高発現は Dual-specificity phosphatases 7 (Dusp7) の発現を抑制し、Dusp7 の標的タンパク質である Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (Erk1/2) のリン酸化を促進し、最終的に p21 の発現を促進した。以上の結果より、Hes1 は発現動態に応じて p21 の発現を制御し、神経幹細胞の増殖を制御することが示唆された。

第二章 実験方法

2.1 遺伝子組み換えマウス

全てのマウスはICRマウスをバックグラウンドとして維持し、水と餌が自由に摂取でき、温度、照明(12時間ごとに明暗を繰り返す)が制御された環境で飼育した。全ての実験で同腹の胎仔をコントロールとした。また、マウスのプラグが観察された日の正午を Embryonic day 0.5 (E0.5)と定義した。なお、本研究は「京都大学における動物実験の実施に関する規程」に従って行った。本研究では、以下のマウスを用いた。

- ・ *Hes1^{flox/flox};Hes3^{-/-};Hes5^{-/-};Hey1^{-/-}*マウス(Sueda et al., 2019)

E14.5 胎仔から神経幹細胞を樹立した。

- ・ *Hes1^{-/-};Hes3^{-/-};Hes5^{-/-}*マウス(Hatakeyama et al., 2004)

E9.5 の胎仔は *Hes1^{-/-};Hes3^{-/-};Hes5^{-/-}*マウス同士を交配して採取した。

2.2 細胞培養

Human embryonic kidney (HEK)293T は Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Nacalai Tesque)に 10% ウシ胎児血清(Nichirei)、100 units/mL ペニシリン(Nacalai Tesque)、100 mg/mL ストレプトマイシン(Nacalai Tesque)を加えた培地で、37度、5% CO₂で培養した。

神経幹細胞は DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific)に N-2 MAX Media Supplement (R&D Systems)、20 ng/ml Epidermal growth factor (EGF) (Thermo Fisher Scientific)、20 ng/ml basic Fibroblast growth factor (bFGF) (FUJIFILM Wako)、100 units/mL ペニシリン、100 mg/mL ストレプトマイシンを加えた培地(増殖培地)で、37度、5% CO₂で培養した。細胞を播種する際には、2 µg/ml ラミニン(Wako)または 0.15%マトリゲル(Corning)を含む培地を、ディッシュまたはプレートに添加し、最低 30 分間インキュベーター内に静置した。休眠状態を誘導する場合は、Phosphate-buffered saline (PBS)による洗浄を 2 回行い、DMEM/F-12 に N-2 MAX Media Supplement、20 ng/ml bFGF、50 ng/ml Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) (R&D Systems)、100 units/mL ペニシリン、100 mg/mL ストレプトマイシンを加えた培地(休眠培地)を添加した。

2.3 プラスミド設計

大部分のプラスミドは Tol2 トランスポゼースのベクターシステムを基盤とした (Kawakami et al., 2007; Yagita et al., 2010)。本研究で用いたプラスミドは表 1 に記載した。

プラスミド	用途
CRM5-pHes1-Ub-NLS-Luc2-Hes1 3'UTR	Hes1プロモーターレポーター (Isomura et al., 2017)
p21_promoter-Ub-NLS-Luc2-p21 3'UTR	p21プロモーターレポーター
pEF-GM	コントロールプラスミド
pEF-HA-Hes1	Hes1の持続的な高発現
pRL-TK	ウミシイタケ由来のルシフェラーゼの発現
pCAG-NLS-mCherry-P2A-PuroR	蛍光タンパク質と抗生物質の発現
pCAG-Clover-P2A-PuroR	蛍光タンパク質と抗生物質の発現
pCAG-mTagBFP2-P2A-BSD	蛍光タンパク質と抗生物質の発現
pTRE_3G-HA-Hes1	Tet-Onシステム
pTRE_3G-HA-Hes1-miR-E	Tet-Onシステム
pCAG-rtTA2_3G-P2A-BSD-P2A-NLS-mCherry	Tet-Onシステム
pCAG-hGAVPO-P2A-PuroR-P2A-NLS-mCherry	光応答性遺伝子発現システム (Isomura et al., 2017)
pUAS-HA-Hes1-Hes1 3'UTR	光応答性遺伝子発現システム (Isomura et al., 2017)
pCAGGS-mT2TP	Tol2トランスポゼースの発現 (Kawakami et al., 2007; Yagita et al., 2010)
tRNA-pCBh-eSpCas9(1.1)-P2A-EGFP	Cas9とsgRNAの発現
pBS-HA_left-Achilles-P2A-NeoR-HA_right	マウスp21のC末端へのAchillesノックイン用ベクター
psPAX2	レンチウイルス作成
pMD2.G	レンチウイルス作成
CSII-EF-MCS	レンチウイルス作成 (Imayoshi et al., 2013; Miyoshi et al., 2004)
CSII-EF-HaloTag-hCdt1 (1/100) Cy(-)	レンチウイルス作成
CSII-EF-SNAP-tag-P2A-Venus-3NLS	レンチウイルス作成
CSII-EF-Dusp7-P2A-Venus-3NLS	レンチウイルス作成
CSII-pEF-NLS-mCherry	レンチウイルス作成
CSII-pEF-iCre-mCherry-NLS	レンチウイルス作成
pCAG-iCre-P2A-EGFP	Creの発現

表 1: プラスミド一覧

Hes1 プロモーターレポーターは先行研究で記述があったように、*Hes1* のシス制御モチーフ (CRM5) と *Hes1* のプロモーター領域 (-2567 ~ +223)、ユビキチンと核局在化シグナル (Nuclear localization signal, NLS) を付加したホタル由来のルシフェラーゼ (Ub-NLS-Luc2) と *Hes1* の 3' untranslated region (UTR) で構成される (Isomura et al., 2017)。p21 プロモーターレポーターは p21 のプロモーター領域 (-5248 ~ +93)、Ub-NLS-Luc2 と p21 3'UTR を繋げて作製した。また、*Hes1* の DNA 結合モチーフである N-box (-213 付近) が欠落した p21 プロモーターまたは、様々な長さの p21 プロモーターを用いた p21 プロモーターレポーターも同様にして作製した。本研究では、2.7 kbp (-2702 ~ +93)、1.5 kbp (-1561 ~ +93)、171 bp (-171 ~ +93)、87 bp (-87 ~ +93)、31 bp (-31 ~ +93) の p21 プロモーターを用いた。安定発現株を樹立する際には、これらのレポーターと CMV enhancer fused to the chicken beta-actin promoter (CAG) プロモーターによって誘導される蛍光タンパク質と抗生物質耐性マー

カーが発現するプラスミドを用いた。蛍光タンパク質と抗生物質耐性マーカーは 2A ペプチドである *P2A* で繋げた。

Tet-On システムは CAG プロモーターによって誘導される rtTA_3G、NLS を付加した蛍光タンパク質 mCherry (NLS-mCherry)、抗生物質耐性マーカーの *Aspergillus terreus* 由来 Blasticidin S deaminase (BSD) と、TRE_3G プロモーターによって誘導される特定の遺伝子または *miR-E* (Fellmann et al., 2013) を繋げて作製した。rtTA_3G、NLS-mCherry、BSD は *P2A* で繋げた。*miR-E* の標的配列は以下を用いた。

p21: TTTAAATAACTTTAAGTTTGGA

コントロールとしてスクランブル配列を用いた。

光応答性遺伝子発現システムは CAG プロモーターによって誘導される光感受性人工転写因子 hGAVPO (Wang et al., 2012)、NLS-mCherry、抗生物質耐性マーカー Puromycin N-acetyl-transferase (以後、PuroR と略称) と、upstream activation sequence (UAS) プロモーターによって誘導される HA-Hes1 (3'UTR は *Hes1* 3'UTR を使用) を繋げて作製した (Isomura et al., 2017)。*hGAVPO* と *NLS-mCherry* と *PuroR* は *P2A* で繋げた。コントロールとして、CAG プロモーターによって発現誘導される hGAVPO と NLS-mCherry と PuroR だけで構成されたプラスミドを用いた。

eSpCas9 (1.1) 発現ベクターは “eSpCas9(1.1)” (Addgene, #71814) を基に作製した。このベクターは Chicken β -actin (CBA) hybrid intron (CBh) プロモーターによって誘導される eSpCas9 (1.1) と蛍光タンパク質 EGFP と、グルタミン tRNA によって誘導される sgRNA を繋げて作製した (Mefferd et al., 2015)。*eSpCas9 (1.1)* と *EGFP* は *P2A* で繋げた。ガイド配列は “inDelphi” (<https://indelphi.giffordlab.mit.edu/gene>) (Shen et al., 2018) と “CRISPOR” (<http://crispor.tefor.net/>) (Concordet et al., 2018) を用いて決定した。本研究では以下のガイド配列を用いた。

ggggctcccgtgggcacttca

p21 遺伝子座への蛍光タンパク質 Achilles (Yoshioka-Kobayashi et al., 2020) のノックインに用いた *p21*-Achilles ターゲティングベクターは左側のホモロジーアーム (LHA: 846bp) と *Achilles* と抗生物質耐性マーカー neomycin phosphotransferase II (以後、*NeoR* と略称) を *P2A* で繋げた配列 (*Achilles-P2A-NeoR*) と右側のホモロジーアーム (RHA: 820bp) を繋げて作製した。*p21* の C 末端と *Achilles* はグリシンアラニンリンカー (GAGAGAGAGA) によって繋げた (図 5)。

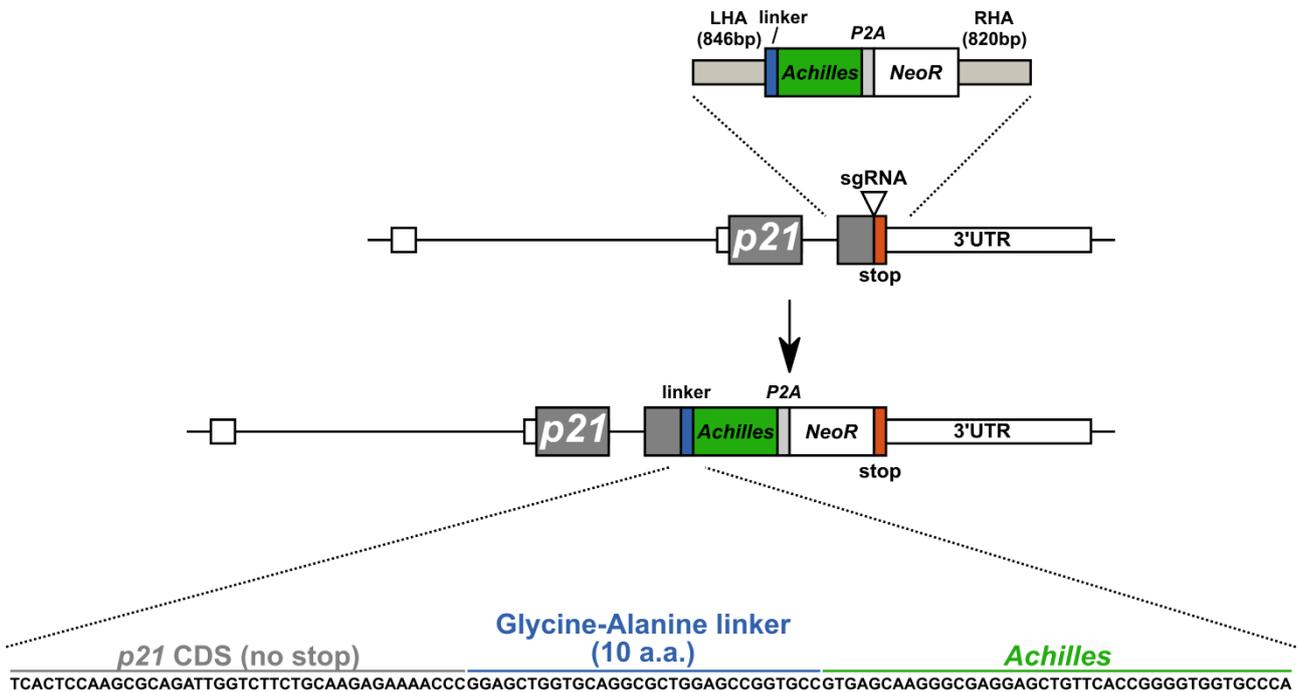


図 5 : p21 遺伝子座への Achilles ノックインの概略図

レンチウイルスベクターを作製する場合は、CSII-EF-MCS ベクター (Imayoshi et al., 2013; Miyoshi et al., 2004) に *HaloTag* を N 末端に繋げた *hCdt1* (1/100) *Cy(-)*、P2A で *SNAP-tag* または *Dusp7* と 3 つ NLS を繋げた蛍光タンパク質 *Venus* (*Venus-3NLS*) を繋いだ配列、*NLS-mCherry*、*iCre* と *NLS* を融合した *mCherry* (*iCre-mCherry-NLS*) を挿入した。

Cre を発現するベクターは、*iCre* と *EGFP* を P2A で繋げ、CAG プロモーターの下流に挿入して作製した。

2.4 レンチウイルスの作製

レンチウイルスの作製は、先行研究に従った (Imayoshi et al., 2013; Miyoshi et al., 2004)。10 cm ディッシュ 5 枚に播種した HEK293T 細胞に Polyethylenimine (PEI) MAX (Polysciences) で CSII プラスミド、第 2 世代レンチウイルスパッケージングプラスミド (psPAX2, Addgene Plasmid # 12260)、VSV-G エンベロープ発現プラスミド (pMD2.G, Addgene Plasmid # 12259) をトランスフェクションした (10 cm ディッシュ 1 枚当たり 86 μ l 1 μ g/ μ l PEI MAX、8.4 μ g CSII プラスミド、6.2 μ g psPAX2、2.6 μ g pMD2.G 使用した)。トランスフェクションから 8~16 時間後に培地交換、24~36 時間後に培地を回収した。回収

した培地を遠心(6000 g、16 時間、4 度)し、上清を除いた後、1 ml PBS を加えた。再度遠心(1.3 kg、4 時間、4 度)し、上清を除いた後、200 μ l PBS で再懸濁し、分注して-80 度で保存した。

2.5 神経幹細胞の樹立

本研究では、神経幹細胞として主にマウス Embryonic stem (ES)細胞由来の NS5 (Pollard et al., 2006)を用いた。胎仔由来の神経幹細胞を使用する場合は、E14.5 の胎仔から神経幹細胞を樹立した。実験に使用するまでに少なくとも 10 回継代することに加えて、数回凍結保存した。*Hes3;Hes5;Hey1*-null 神経幹細胞は *Hes1*^{fllox/fllox};*Hes3*^{-/-};*Hes5*^{-/-};*Hey1*^{-/-}マウスの E14.5 の胎仔から樹立した。*Hes1*^{fllox/fllox} は、Cre リコンビナーゼが発現していないときは野生型の *Hes1* としてふるまう。*Hes1;Hes3;Hes5;Hey1*-null 神経幹細胞は *Hes1*^{fllox/fllox};*Hes3*^{-/-};*Hes5*^{-/-};*Hey1*^{-/-}マウスから樹立した *Hes3;Hes5;Hey1*-null 神経幹細胞に Cre リコンビナーゼを発現させることで *Hes1* を欠損させて、作製した。細胞の増殖速度を比較する実験においては(図 10)、*Hes3;Hes5;Hey1*-null 神経幹細胞にレンチウイルス(CSII-pEF-iCre-mCherry-NLS)で Cre を発現させ、*Hes1* を欠損させた。コントロールとして、CSII-pEF-NLS-mCherry プラスミドで作製したレンチウイルスを用いた。RNA-seq 解析で遺伝子発現を網羅的に比較する実験においては(図 12)、*Hes3;Hes5;Hey1*-null 神経幹細胞に Viafect (Promega)で pCAG-iCre-P2A-EGFP をトランスフェクションし、Cre を発現させ、その 2 日後に EGFP 陽性の細胞を Fluorescence-activated cell sorting (FACS)で回収した。

2.6 安定発現株の樹立

Tol2 トランスポゾンベクターシステムによって安定発現株を作製する場合は、神経幹細胞を 4×10^4 細胞、48 ウェルプレートに播種し、1 日後 ViaFect で 0.1 μ g の pCAGGS-mT2TP を含む 0.5 μ g の DNA をトランスフェクションした。トランスフェクションから 2 日後、1 μ g/ml の Puromycin (InvivoGen)または 20 μ g/ml の Blasticidin (Thermo Fisher Scientific)で薬剤選択を行った。必要な場合は、mCherry 等の蛍光タンパク質を細胞に発現させて、FACS によって蛍光タンパク質陽性の細胞を回収した。クローンは、限界希釈、もしくは FACS で 96 ウェルプレートのウェルごとに 1 細胞ずつ分注することによって、作製した。

レンチウイルスを用いて、安定発現株を作製した。CSII-EF-HaloTag-hCdt1 (1/100) Cy(-) の場合は多重感染度(Multiplicity of infection, MOI)が 0.5 以下になるように、レンチウイルスを添加した。ウイルス感染から 1 週間後、1 nM HaloTag リガンドを含む培地で 30 分以上

培養し、HaloTag 陽性の細胞を FACS で回収した。クローンは、限界希釈、もしくは FACS で 96 ウェルプレートのウェルごとに 1 細胞ずつ分注することによって、作製した。CSII-EF-(SNAP or Dusp7)-P2A-Venus-3NLS の場合は、全ての細胞にレンチウイルスが感染するように、レンチウイルスを添加した(MOI = 5~10)。この細胞は 1 週間以内に実験に用いた。

2.7 p21 遺伝子座ノックイン細胞の樹立

神経幹細胞を 8×10^5 細胞、6 cm ディッシュに播種し、1 日後、ViaFect (Promega) で 5 μ g の eSpCas9 (1.1) 発現ベクター(Glu_tRNA-sgRNA-pCBh-eSpCas9 (1.1)-P2A-EGFP) と 5 μ g のターゲティングベクターをトランスフェクションし、2 日後 EGFP 陽性の細胞を FACS で回収した。トランスフェクションしてから約 1 週間後、100 μ g/ml の G418 (Nacalai Tesque) で薬剤選択を行った。セレクション後、限界希釈、もしくは FACS で 96 ウェルプレートのウェルごとに 1 細胞ずつ分注することによって、クローンを作製した。ノックインの有無はゲノムの配列によって確かめた。

2.8 細胞増殖アッセイ

最終濃度が 10 μ M になるように 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) を培地に添加し、30 分間インキュベーターで培養し、4 % Paraformaldehyde (PFA) で常温、15 分間、処理することで細胞を固定した。Clik-iT EdU Cell Proliferation Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて、EdU を取り込んだ細胞を蛍光で標識した。また、DAPI によって核の染色も行い、キーエンス社製の蛍光顕微鏡 BZ-X710 で画像を取得した。画像解析は、Fiji 画像解析ソフトウェアで行った。StarDist (ImageJ plugin) を使うことで、核を認識して、核内の DAPI、EdU のシグナルを抽出し、EdU 陽性の細胞の割合を調べた。また、G1 期、S 期、G2/M 期の割合を調べるために、細胞を DAPI と EdU のシグナルの強さによって、G1 期(DAPI、EdU とともに弱い細胞)、S 期(EdU が強い細胞)、G2/M 期(DAPI が強く、EdU が弱い細胞)の 3 つに分けた。

2.9 試薬・抗体

使用した抗体(表2)と試薬(表3)を表に記載した。

名前	メーカー	カタログナンバー、RRID
Rabbit polyclonal anti-Actin	Sigma-Aldrich	Cat# A2066; RRID: AB_476693
Mouse monoclonal anti-p21	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-6246; RRID: AB_628073
Mouse monoclonal anti-p15/p16	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-377412; RRID: AB_2936231
Rabbit polyclonal anti-phospho-Stat3 (Tyr705)	Cell Signaling Technology	Cat# 9131; RRID: AB_331586
Rabbit polyclonal anti-Erk1/2	Cell Signaling Technology	Cat# 9102; RRID: AB_330744
Rabbit monoclonal anti-phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology	Cat# 4377; RRID: AB_331775
Mouse monoclonal anti-p53	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-126; RRID: AB_628082
Mouse monoclonal anti-phospho-smad3 (Ser 425)	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-517575; RRID: AB_2892229
Rat monoclonal anti-HA	Sigma-Aldrich	Cat# 11867423001; RRID: AB_390918
Mouse monoclonal anti-PYST2 (Dusp7)	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-377106; RRID: AB_2936232
Rabbit monoclonal anti- α -Actinin	Cell Signaling Technology	Cat# 6487; RRID: AB_11179206
Rabbit monoclonal anti-HES1	Cell Signaling Technology	Cat# 11988; RRID: AB_2728766
Rabbit polyclonal anti-HES1	Kobayashi et al., 2009	
Normal rabbit IgG	Cell Signaling Technology	Cat# 2729; RRID: AB_1031062
HRP-linked Sheep anti-mouse IgG	Cytiva	Cat# NA9310; RRID: AB_772193
HRP-linked Goat anti-rat IgG	Cytiva	Cat# NA935; RRID: AB_772207
HRP-linked Donkey anti-rabbit IgG	Cytiva	Cat# NA9340; RRID: AB_772191
DIG-AP antibody	Roche	Cat# 11 093 274 910, RRID:AB_2313640

表 2:抗体一覧

名前	メーカー	カタログナンバー、RRID
m-IgGk BP-HRP	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-516102; RRID: AB_2687626
DAPI	Thermo Fisher Scientific	Cat# 62248
5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)	Thermo Fisher Scientific	Cat# A10044
Alexa Fluor 488 Azide	Thermo Fisher Scientific	Cat# A10266
Alexa Fluor 647 Azide	Thermo Fisher Scientific	Cat# A10277
HaloTag ligands (SiR700-Halo and JF646-Halo)	Kindly gifted by Daisuke Asanuma	
Doxycycline hyclate (Dox)	Sigma-Aldrich	Cat# D9891
WAY-262611	フナコシ	Cat# 17704
GSK3 Inhibitor IX	CALBIOCHEM	Cat# 361550
CKI-7 dihydrochloride	Sigma-Aldrich	Cat# C0742
AG490	CALBIOCHEM	Cat# 658401
A-83-01	Selleck	Cat# S7692
CHIR99021	Cayman	Cat# 13122
JNK Inhibitor II	CALBIOCHEM	Cat# 420119
PD0325901	Fujifilm Wako	Cat# 162-25291
LY 294002	CALBIOCHEM	Cat# 440202
Cyclopamine	フナコシ	Cat# AG-CN2-0028
LDN193189	Sigma-Aldrich	Cat# SML0559
Cycloheximide (CHX)	Sigma-Aldrich	Cat# C1988
D-luciferin sodium salt	Nacalai Tesque	Cat# 01493-85
ViaFect Transfection Reagent	Promega	Cat# E4981
PEI MAX	Polysciences	Cat# 24765
Puromycin dihydrochloride	InvivoGen	Cat# ant-pr-1
Blasticidin S Hydrochloride	Thermo Fisher Scientific	Cat# R21001
G418 disulfate	Nacalai Tesque	Cat# 09380-44
Click-iT EdU Cell Proliferation Kit	Thermo Fisher Scientific	Cat# C10337
ECL™ Western Blotting Detection Reagent	Cytiva	Cat# RPN2209
ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent	Cytiva	Cat# RPN2236
ピッカジーン®デュアル シーバンジー発光キット	東洋ビーネット	Cat# PD-11

表 3:試薬一覧

2.10 タンパク質の半減期測定

p21 タンパク質と p21-Achilles タンパク質の半減期測定のために、タンパク質合成阻害剤である 10 ng/ml Cycloheximide (CHX, Sigma-Aldrich)を培地に添加して細胞を培養した。p21 タンパク質は CHX を添加後 0、0.5、1、2 時間後にタンパク質を回収して、p21 タンパク質の発現を調べた。p21-Achilles の半減期は Achilles の蛍光強度の低下によって測定した(詳細は 2.14 節に記載)。

2.11 ホールマウント *in situ* hybridization

採取したマウス胚を 4 %PFA で固定(4 度、一晩)した後、メタノール置換で脱水し、-20 度で保存した。PBS/0.1 % tween 20 (PBST)で再水和化した後、6 %H₂O₂/PBST 処理(室温、1 時間)、10 µg/ml Proteinase K/PBST 処理(室温、15 分)、2 mg/ml glycine/PBST 処理(室温、5 分)、4 %PFA/0.2 %Glutaraldehyde/PBST 処理(室温、20 分)を行った。これらの処置後、発色までの工程は自動 *in situ* hybridization システム InsituPro M (Intavis AG 社製)を使用して推奨プロトコルに従って行った。RNA プローブとの反応は 63 度、一晩行い、20 µg/ml RNase 処理 (37 度、1 時間) を行い、AP 認識された抗 DIG 抗体(Roche、11093274910) で 4 度、6 時間反応を行った。発色は NBT と BCIP を使用して行った。RNA プローブとして、p21 complementary DNA (cDNA)の 250-1176 に対するアンチセンス RNA を使用した。

2.12 ウェスタンブロッティング解析

先行研究を参考にウェスタンブロッティングを行った(Kobayashi et al., 2019)。5~20 µg のタンパク質を至適濃度の Sodium dodecyl sulfate (SDS)ポリアクリルアミドゲルで泳動し、ゲルを Poly vinylidene difluoride (PVDF)メンブレンに転写した。転写したメンブレンを 5 % スキムミルク/PBST (または Tris-buffered saline/0.1 % tween 20、TBST)等で室温、1 時間ブロッキングした後に、1 次抗体/5 %スキムミルク/PBST (または TBST)で 4 度、一晩反応させた。抗体によっては 1 次抗体の溶媒にスキムミルクの代わりに、ウシ血清アルブミンを使用した。次の日、メンブレンを PBST (または TBST)で洗浄後、2 次抗体/5 %スキムミルク/PBST (または TBST)で室温、数時間反応させた。メンブレンを PBST (または TBST)で洗浄後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (Cytiva)または ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva)で発光させて、そのシグナルを LAS-3000 mini (Fujifilm) または ChemiDoc™ Touch (Bio-Rad)で検出した。撮影した画像の解析は、Fiji 画像解析ソ

フトウェアで行った。タンパク質の発現量を比較する場合は、Actin または α -Actinin のバンドの量に対する相対値を使用した。使用した 1 次抗体と 2 次抗体は表 2 または表 3 に記載した。

2.13 発光タイムラプスイメージング

撮影方法は先行研究に従った(Isomura et al., 2017)。Hes1 または p21 プロモーターレポーターと Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci)プローブを発現する神経幹細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ(IWAKI)に播種し、約 1 日後 1 mM Luciferin、1 nM SiR700-Halo または JF646-Halo を含む増殖培地で培地交換し、倒立顕微鏡(エビデント IX81 または IX83)上で 37 度、5 % CO₂ で培養した。培地交換から 30 分後、撮影を開始した。5 分または 10 分毎に画像を取得した。発光測定のため、エビデントの対物レンズ(UPLFLN 40 O)と CCD カメラ(Andor iKon-M)を使用した。

2.14 蛍光タイムラプスイメージング

35 mm ガラスボトムディッシュ(IWAKI)に播種した神経幹細胞を倒立共焦点レーザー顕微鏡 (エビデント FV3000 または Carl Zeiss LSM980)上で 37 度、5 % CO₂ で培養した。Achilles、mCherry、SiR700 はそれぞれ 514nm、561nm、633nm レーザーで励起した。画像は 5 分毎に取得した。Z 方向に複数枚画像を取得する場合は 1.4 μ m ごとに画像を取得した。蛍光は Uplsapo 40xS (エビデント)または Plan-Apochromat 20x (Carl Zeiss)の対物レンズを用いて測定した。

Fucci プローブを発現する p21-Achilles ノックイン NS5 を用いた実験では、この細胞を 1 nM SiR700-Halo を含む増殖培地で 30 分培養後、LSM980 で撮影した。

p21-Achilles の半減期測定の場合は、p21-Achilles ノックイン NS5 を増殖培地で培養し、LSM980 で撮影する直前に 10 ng/ml になるように CHX を添加した。

2.15 CL24B-LIC/B を用いた発光シグナルのタイムラプス測定

細胞集団レベルでの発光シグナルを高感度生物発光測定装置(CL24B-LIC/B, Churitsu Electric Corp.)で測定した。この装置は特注で青色 LED 光源(LEDDB-SBOXH, OptoCode)を備え付けており、経時的に発光測定をしながら、光照射可能である。測定は 10 秒露光を 5 分または 10 分毎に行った。光刺激を行う実験では休眠培地に培地交換した後、測定を開始した。光刺激は測定開始から 5 時間後に開始し、3 時間毎に行った。光の強さは 31.2 W/m²

で1回の光刺激で30秒間照射した。

2.16 Tet-On システムによる遺伝子発現誘導

Doxycycline (Dox, Sigma-Aldrich)依存的な遺伝子発現システムである Tet-On システムを用いて、持続的な高発現と *miR-E* システム(Fellmann et al., 2013)によるノックダウンを誘導した(図6)。細胞を播種して1日後、Dox を添加し、更に1日後または、2日後に細胞を解析した。

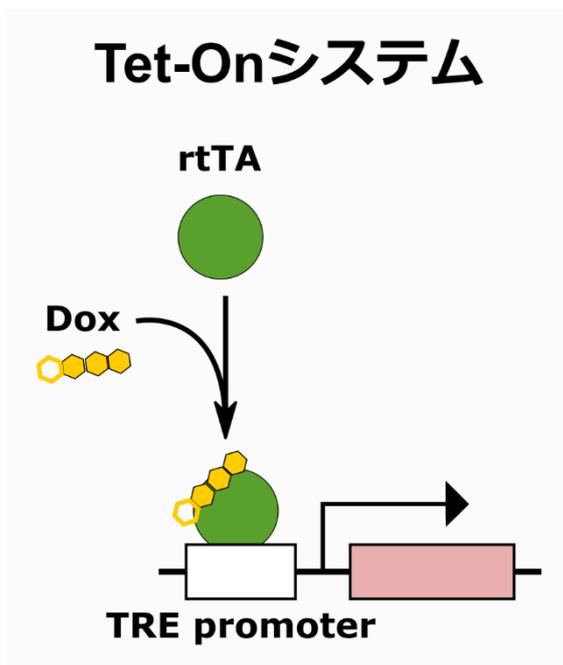


図6：Tet-On システムの概略図

Dox を添加すると、Dox が rtTA タンパク質と結合する。Dox と結合した rtTA は TRE プロモーターに結合し、下流の遺伝子の発現をオンにする。

2.17 ルシフェラーゼ解析

神経幹細胞を24ウェルプレートに播種して1日後、p21プロモーターレポーター(p21_promoter-Ub-NLS-Luc2-p21 3'UTR)、Hes1の持続的な高発現を誘導するプラスミド(pEF-HA-Hes1)、ウミシイタケ由来のルシフェラーゼを発現するプラスミド(pRL-TK)をViaFectでトランスフェクションした。1日後、細胞からタンパク質を回収し、ピッカジー®デュアルシーパングー発光キット(東洋ビーネット、PD-11)によって、発光強度を測定した。発光強度の測定には、Perkin Elmer社製プレートリーダーARVO X3、またはベルト

ールドテクノロジー社製チューブルミノメーターLumat3 LB9509-Dual を使用した。pEF-HA-Hes1 のコントロールとして、pEF-GM を使用した。表4に使用した DNA 量を記載した。

図の番号	p21_promoter-Ub-NLS-Luc2-p21_3'UTR	pEF-GM	pEF-HA-Hes1	pRL-TK
図19B	40 ng	(140, 139, 135, 130, 120, 105, 70, 0) ng	(0, 1, 5, 10, 20, 35, 70, 140) ng	20 ng
図19C	40 ng	140 ng	140 ng	20 ng
図19E, F	40 ng	140 ng	140 ng	20 ng
図19H	80 ng	140 ng	140 ng	20 ng

表4：ルシフェラーゼ解析に使用した DNA 量一覧

2.18 クロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイ

Tet-On システムを用いて Hes1 の持続的な高発現を誘導できる神経幹細胞を使用して、ChIP を行った。細胞を 10 cm ディッシュに播種し 1 日後、100 ng/ml Dox を含む培地と培地交換して、8 時間後または 24 時間後に細胞を回収した。コントロールとして、Dox を含まない培地と培地交換して、24 時間後に細胞を回収した。回収の際には、培地に 1 % となるようにホルムアルデヒドを添加し、室温、15 分反応させて固定し、125 μ M になるようにグリシンを添加し、室温、5 分反応させてホルムアルデヒドによる固定を阻害した。PBS/0.5 % IGE PAL CA-630 (Sigma-Aldrich) で 2 回洗浄し、セルスクレーパーによって細胞をディッシュから回収した。遠心(4 度、800 g、10 分)して、上清を除き、ペレットを液体窒素によって急速凍結させて、-80 度で保存した。ペレットを氷上で溶かした後、200 μ l SDS lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA [pH 8.0], 1 % SDS) で、再懸濁し、氷上で 10 分静置し、Biorupter (ソニック・バイオ株式会社) による DNA 断片化処理(Power high、破碎 30 秒+1 分静置を 5 サイクル)を行った。遠心(4 度、13 krpm、10 分)して、上清を回収し、1.8 ml ChIP dilution Buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 167 mM NaCl, 1.1 % Triton X-100, 0.11 % デオキシコール酸ナトリウム)を加えて、希釈した。このうち 200 μ l をインプットとし、800 μ l をウサギ由来ポリクローナル Hes1 抗体による ChIP、800 μ l を正常ウサギ IgG (CST, 2729)による ChIP に使用した。800 μ l の分画に 10 μ g の抗体を加えて、ローターで 4 度において一晩攪拌した後に、50 % protein A Sepharose ビーズを加えて、ローターで 4 度において 2 時間以上攪拌して ChIP を行った。精製した DNA を Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)で定量した。プライマーの詳細は表 5 に記載した。

プライマー名	配列
ChIP-p21-Forward	ttagtccttcccacagttggtc
ChIP-p21-Reverse	acctgggctattctcttgtcac
ChIP-Dusp7-R1-Forward	gtccctgctgctgctagatt
ChIP-Dusp7-R1-Reverse	aggttgatggccgtctcaat
ChIP-Dusp7-R2-Forward	ttcggcggcgattgactat
ChIP-Dusp7-R2-Reverse	atcagcttccttcgcctac
ChIP-Dusp7-R3-Forward	gtcctcctccgtcatttggg
ChIP-Dusp7-R3-Reverse	gatgccagtggcatttgtg
ChIP-Dusp7-R4-Forward	gaccatgggcctcagtttct
ChIP-Dusp7-R4-Reverse	gtgcacacctgactgtgtct
ChIP-Dusp7-R5-Forward	caaaaaccctccacaccct
ChIP-Dusp7-R5-Reverse	gctctagcctcgtttggtt
ChIP-Dusp7-R6-Forward	ggtggttcccaggccatttat
ChIP-Dusp7-R6-Reverse	ccatgagacaatgatggtggc

表 5: qPCR に使用したプライマー一覧

2.19 RNA-seq 解析

2 組の神経幹細胞(*Hes1;Hes3;Hes5;Hey1*-null と野生型、*Hes1* の持続的な高発現と野生型)における遺伝子発現をそれぞれ比較するために、RNA を回収した。*Hes1;Hes3;Hes5;Hey1*-null と野生型の比較のためには、胎仔由来の *Hes1;Hes3;Hes5;Hey1*-null 神経幹細胞と野生型の神経幹細胞の RNA を回収した。*Hes1* の持続的な高発現と野生型の比較のためには、Tet-On システムを用いて *Hes1* の持続的な高発現を誘導できる神経幹細胞を使用した。0 ng/ml または、100 ng/ml になるように Dox を添加し 1 日後に、RNA を回収した。それぞれの条件に対して 3 サンプル用意し、NucleoSpin® RNA kit (Takara) で RNA を精製した。

RNA はバイオアナライザ(アジレント・テクノロジー株式会社)で RNA integrity number (RIN)が 9 以上であることを確認した。シーケンシングライブラリーは、NEB Next Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB)によって用意した。1 x 75 single-end sequencing を NextSeq 500 (mid-output single-end 75 cycles [Illumina])で行った。cDNA の配列は TopHat でマウスのリファレンスゲノム mm10 にマッピングした。そして、条件間での遺伝子発現の差異を Cuffdiff で調べた。Fragments per kilobase of exon per million

mapped reads (FPKM)が 10 より大きい、かつ *Hes1;Hes3;Hes5;Hey1*-null 及び *Hes1* の持続的な高発現によって増減する遺伝子の中から、細胞周期制御遺伝子を選ぶために、Gene ontology (GO) term "regulation of cell cycle G1/S phase transition" (GO:1902806)を使用した。RNA-seq で得られたトランスクリプトームデータは DDBJ sequence read archive (DRA)に登録した (Accession number は DRA015672)。

2.20 画像解析

画像解析は先行研究の手法に従って、Fiji 画像解析ソフトウェアで行った(Isomura et al., 2017)。発光測定の場合は、Spike Noise Filter (ImageJ plugin)によって画像から宇宙線を除いた。明確な発現動態を得るのに必要な場合は、Savitzky Golay Temporal Filter (ImageJ plugin)を使用した。Z-stack 画像の解析の場合は、最大光度で Z projection を行った後に、Savitzky Golay Temporal Filter (ImageJ plugin)を使用した。必要な場合は Temporal Background Reduction (ImageJ plugin)または Subtract Background (ImageJ command)でバックグラウンドを除いた。それぞれの単一細胞の追跡、そして蛍光と発光の定量は TrackMate (ImageJ plugin)で行った。細胞周期は先行研究を参考にして決めた(Sakaue-Sawano et al., 2017)。Fucci の 1 つである HaloTag-hCdt1 (1/100)Cy(-)のシグナルは S 期に入る際に低下し、G2 期に入る際に上昇する。このシグナルの変化をもとに、G1 期から S 期へ、または S 期から G2 期への移行のタイミングを決定した。

2.21 統計解析

図のデータの表示、サンプルサイズ、統計解析、p 値は図もしくは図の説明文に記載した。図もしくは図の説明文において、p 値は以下のように記載した。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

第三章 結果

3.1 神経幹細胞における Hes1 の発現動態の解析

最初に活発に増殖するマウス神経幹細胞における Hes1 の発現パターンを調べた。神経幹細胞に Hes1 プロモーターで発現制御された不安定化ホタル由来のルシフェラーゼ(Luc2)で構成される Hes1 プロモーターレポーターを導入して、単一細胞レベルでの Hes1 プロモーター活性を調べた(Isomura et al., 2017)(図 7A)。Hes1 の発現は、ルシフェリン存在下で細胞からの生物発光によって調べることができる。また、細胞周期との関連性を調べるため、生細胞の細胞周期の進行をリアルタイムでモニタリングできる蛍光プローブ Fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (Fucci)を細胞に導入した(Sakaue-Sawano et al., 2017)(図 7A,B)。単一細胞レベルでの蛍光強度の変化を測定することで、G1 期、S 期、G2/M 期を区別することができる。

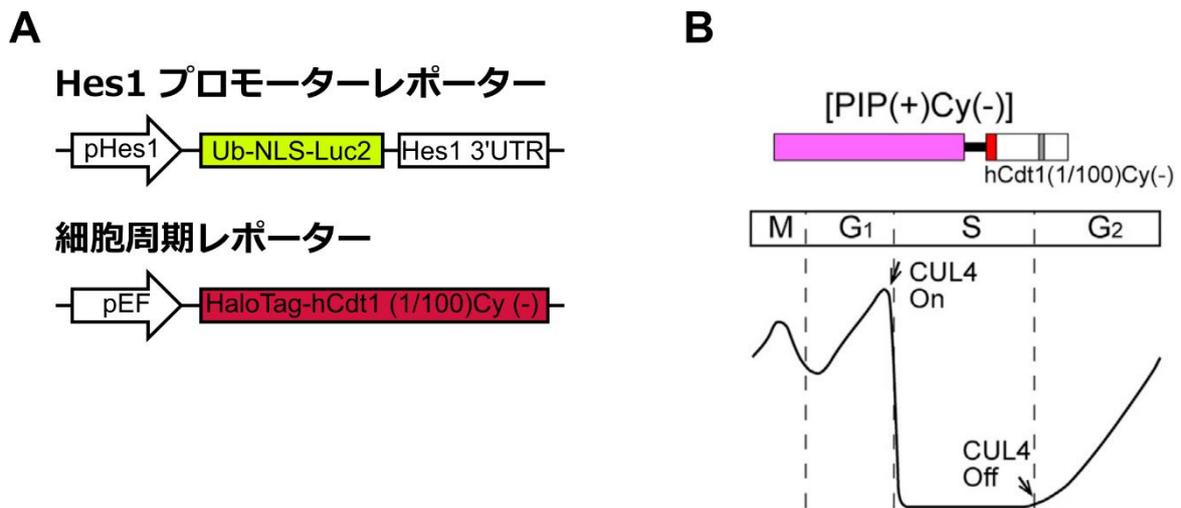


図 7：神経幹細胞における Hes1 プロモーター活性の測定に使用したレポーターについて

(A) Hes1 プロモーターの活性を生物発光で測定できる Hes1 プロモーターレポーターと、細胞周期の進行をモニタリングするための細胞周期レポーターの構成。

(B) 本研究では、Fucci(CA)における humanized Cdc10 dependent transcript 1 (hCdt1)を元とした蛍光プローブを使用した(Sakaue-Sawano et al., 2017)。hCdt1 は DNA 複製のライセンス化制御因子であり、1 サイクルの細胞周期で 1 回のみ複製が起こるように厳密に制御している。hCdt1 は G1 期にのみ発現量が高くなるように、それ以外の時期はユビキチン-プロテアソーム系によって分解される。この分解は 2 つの E3 ユビキチンリガーゼ SCF^{Skp2} と

CUL4^{Ddb1}によって制御されている。Fucci(CA)における hCdt1 を元とした蛍光プローブは、hCdt1 の CUL4^{Ddb1} が作用する部位に、SCF^{Skp2} によって分解されないように一部アミノ酸を変異させた hCdt1(1/100)Cy(-)を使用している。その結果、細胞が S 期に入ると、この蛍光プローブの蛍光強度は著しく低下し、G2 期に入るとその蛍光強度が上昇し始め、再度 S 期に入るまで上昇し続ける。細胞を追跡して、単一細胞レベルでの蛍光強度の変化を測定することで、G1 期、S 期、G2/M 期を区別することができる。

(B は Sakaue-Sawano et al 2017 より図を引用した。)

ライブセルイメージングによって単一細胞レベルの *Hes1* プロモーター活性を調べると、先行研究と同様に(Shimojo et al., 2008; Imayoshi et al., 2013)、*Hes1* の発現が、2-3 時間周期で振動していることがわかった(図 8A,B、図 9)。また、*Hes1* の発現と細胞周期との関連性を調べたところ、細胞分裂の後に *Hes1* の振動発現が同期する傾向があることが分かった(図 8C,D の左)。この *Hes1* の振動発現の同期は、分裂期終了時に起きる転写再活性によるものだと考えられる(Festuccia et al., 2017; Palozola et al., 2019)。また、G1 期から S 期への移行に注目すると、その移行中に *Hes1* の発現が高くなり、その少し前に低くなる傾向があることが分かった(図 8C,D の右)。これは *Hes1* の振動発現が G1 期から S 期への移行を制御している可能性を示唆する。

以上の結果より、活発に増殖する神経幹細胞において、*Hes1* の発現が 2-3 時間周期で振動し、またその *Hes1* の振動発現によって G1 期から S 期への移行が制御されている可能性が示唆された。

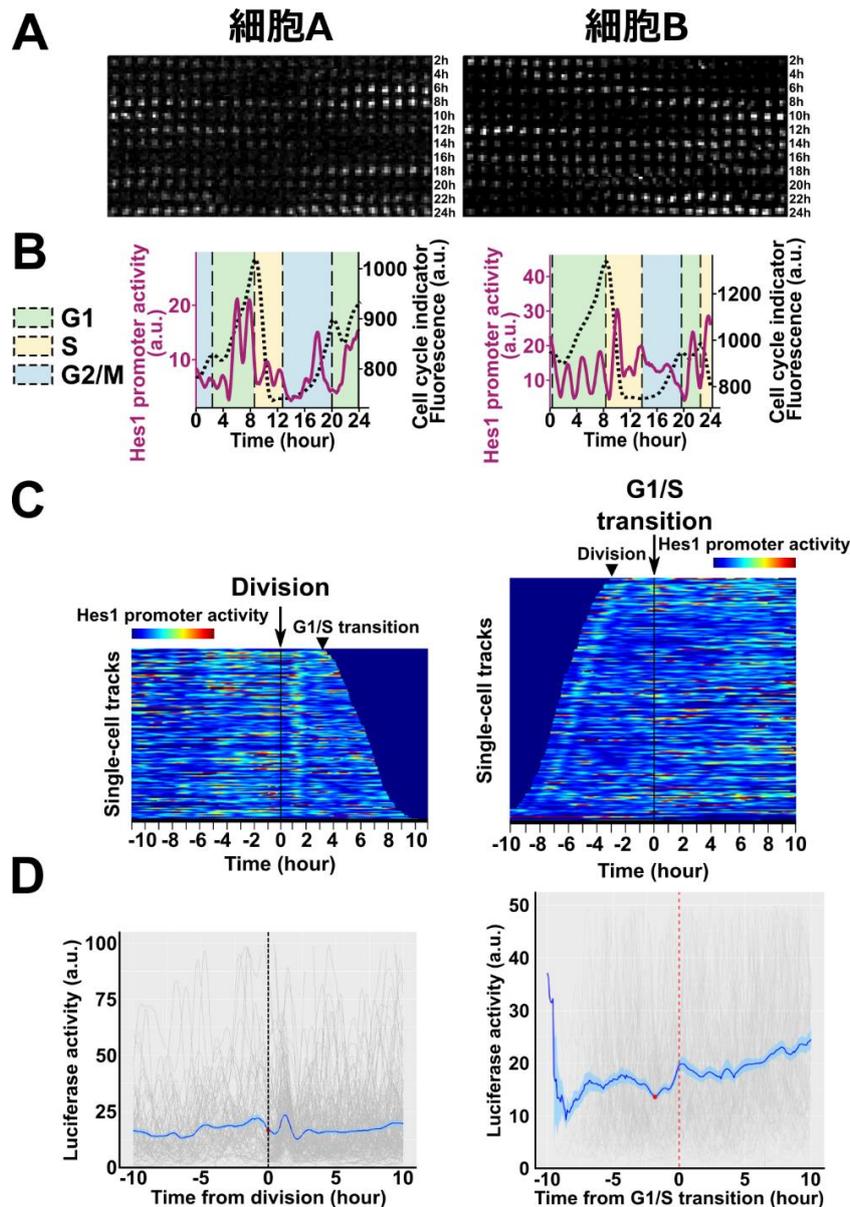


図 8：神経幹細胞における Hes1 プロモーター活性と細胞周期の関連性

(A-B) 単一細胞での Hes1 プロモーター活性の例。Hes1 プロモーター活性の画像(A)と Hes1 プロモーター活性(紫の実線)と細胞周期レポーター(黒の点線)の定量結果(B)。

(C) 単一細胞レベルでの Hes1 プロモーター活性のヒートマップ。細胞分裂を Time = 0 (左、133 細胞)または、G1 期から S 期への移行を Time = 0 (右、209 細胞)とした。この解析は 1 回のライブセルイメージングで得られたデータを用いて行った。

(D) 単一細胞レベルでの Hes1 プロモーター活性のグラフ。単一細胞レベルでのシグナルを灰色の実線、平均値を青色の実線、標準誤差を水色の領域で示し、細胞分裂を Time = 0 (左、黒色の点線)または G1 期から S 期への移行を Time = 0 (右、赤色の点線)とした。この解析は(C)と同じデータを用いて行った。

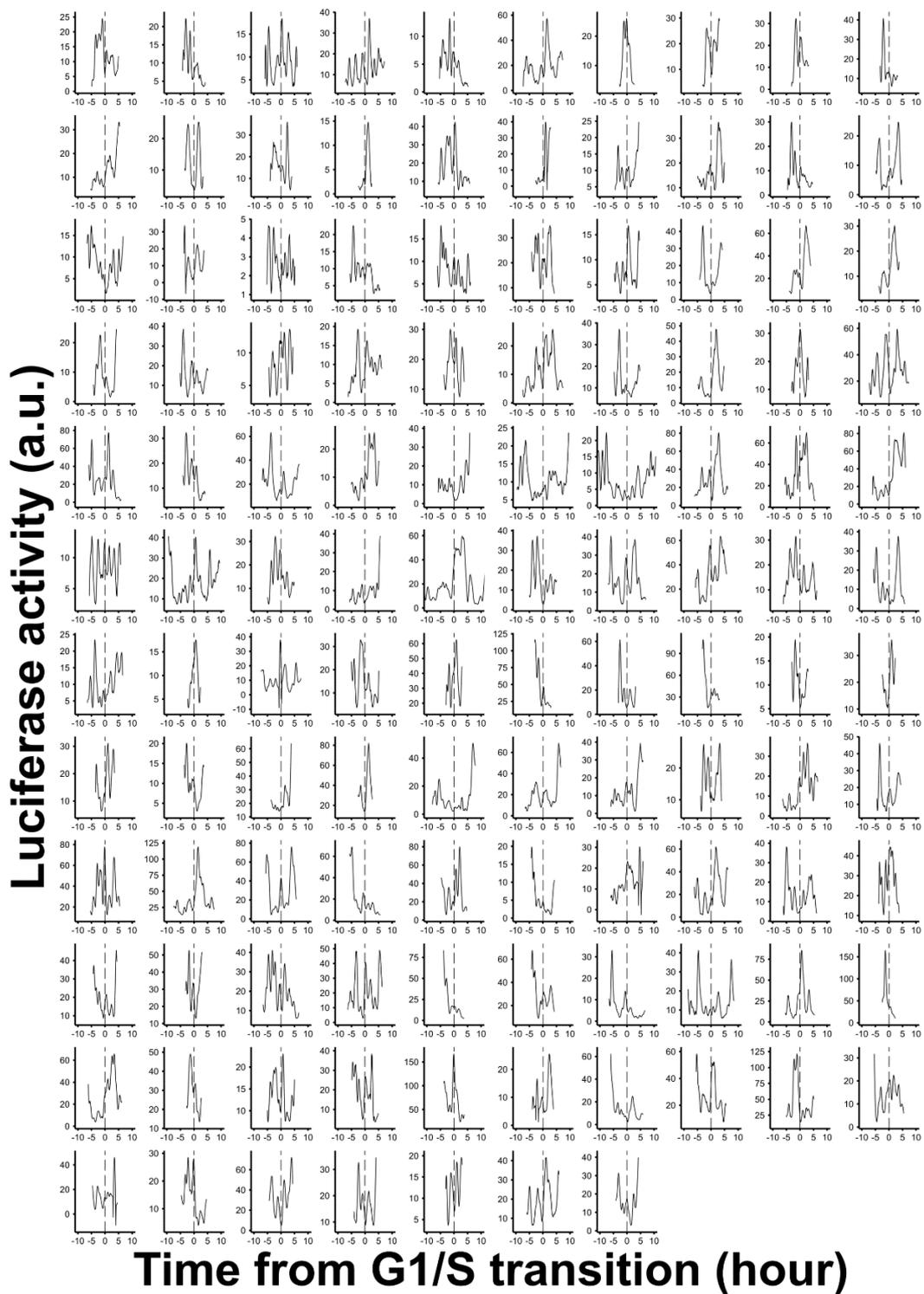


図9：単一細胞レベルでの Hes1 プロモーター活性の例

それぞれのグラフは、X軸が時間、Y軸が Hes1 プロモーターの活性を示す。また、G1 期から S 期への移行を $X=0$ (点線) とした。図8と同じデータを用いて、117 個の細胞のデータを示した。

3.2 神経幹細胞における Hes1 の細胞増殖への影響についての解析

次に神経幹細胞の増殖における Hes1 の必要性を調べるために、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)を取り込んだ細胞の割合によって神経幹細胞の増殖を評価した。胎仔期の神経幹細胞において Hes1 の欠損による増殖への影響はないことが報告されている(Hatakeyama et al., 2004; Sueda et al., 2019)。これは Hes1 の機能が Hes 関連遺伝子(Hes3、Hes5、Hey1 等)によって補償されるためと考えられる。そこで、Hes1^{flox/flox};Hes3^{-/-};Hes5^{-/-};Hey1^{-/-}マウスの胎仔から神経幹細胞を樹立し、その細胞において更に Hes1 を欠損させ、野生型の神経幹細胞と増殖速度を比較した。野生型の神経幹細胞と比べて、Hes3;Hes5;Hey1-null 神経幹細胞の増殖速度は遅かった。加えて Hes1 を欠損させると更に増殖速度が遅くなった(図 10)。以上の結果より、Hes1、Hes3、Hes5、Hey1 が協調的に神経幹細胞の増殖を促進することが示唆された。

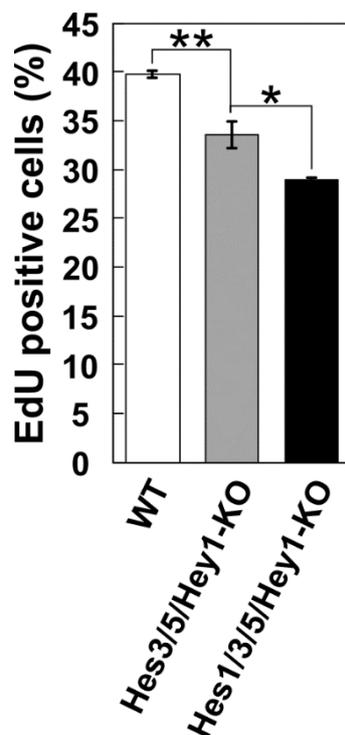


図 10 : Hes1 の発現の抑制による神経幹細胞の増殖への影響

野生型(Wild-type, WT)、Hes3;Hes5;Hey1-null、Hes1;Hes3;Hes5;Hey1-null 神経幹細胞の EdU の取り込みの比較。WT 及び Hes1^{flox/flox};Hes3^{-/-};Hes5^{-/-};Hey1^{-/-}マウスの胎仔から樹立した神経幹細胞を用いて、独立した 3 回の実験を行い、定量した。

図のデータは平均値 ± standard error of the mean (s.e.m.)で表示した(*p<0.05、**p<0.01; Student t-test)。

次に Tet-On システムを用いて Hes1 の持続的な高発現を誘導し、神経幹細胞の増殖への影響を調べた。Tet-On システムは、Doxycycline (Dox) に応答して、Hes1 の持続的な高発現を誘導できる(図 6)。Tet-On システムを導入した神経幹細胞に Dox を添加したところ、Hes1 の持続的な高発現を誘導できた(図 11B)。また、この神経幹細胞の増殖を調べたところ、低濃度の Dox (2 ng/ml) ではほとんど神経幹細胞の増殖に影響が出ないが、高濃度の Dox (50 ng/ml) では増殖が著しく抑制された(図 11C)。また、G1 期、S 期、G2/M 期の割合を調べたところ、高濃度の Dox (50 ng/ml) では G1 期及び G2/M 期の割合が増加し、S 期の割合が減少した(図 11D)。野生型の神経幹細胞に Dox を添加したところ、Dox は増殖に影響を与えなかった(図 11A)。以上の結果より、Hes1 の持続的な高発現は G1 期及び G2/M 期において細胞周期の進行を抑制することで細胞増殖を抑制することが示唆された。

以上より、*Hes1* 遺伝子及び *Hes* 関連遺伝子の抑制、または Hes1 の持続的な高発現が神経幹細胞の増殖を抑制することが示された。Hes1 の振動発現が神経幹細胞の増殖を促進すると考えられる。

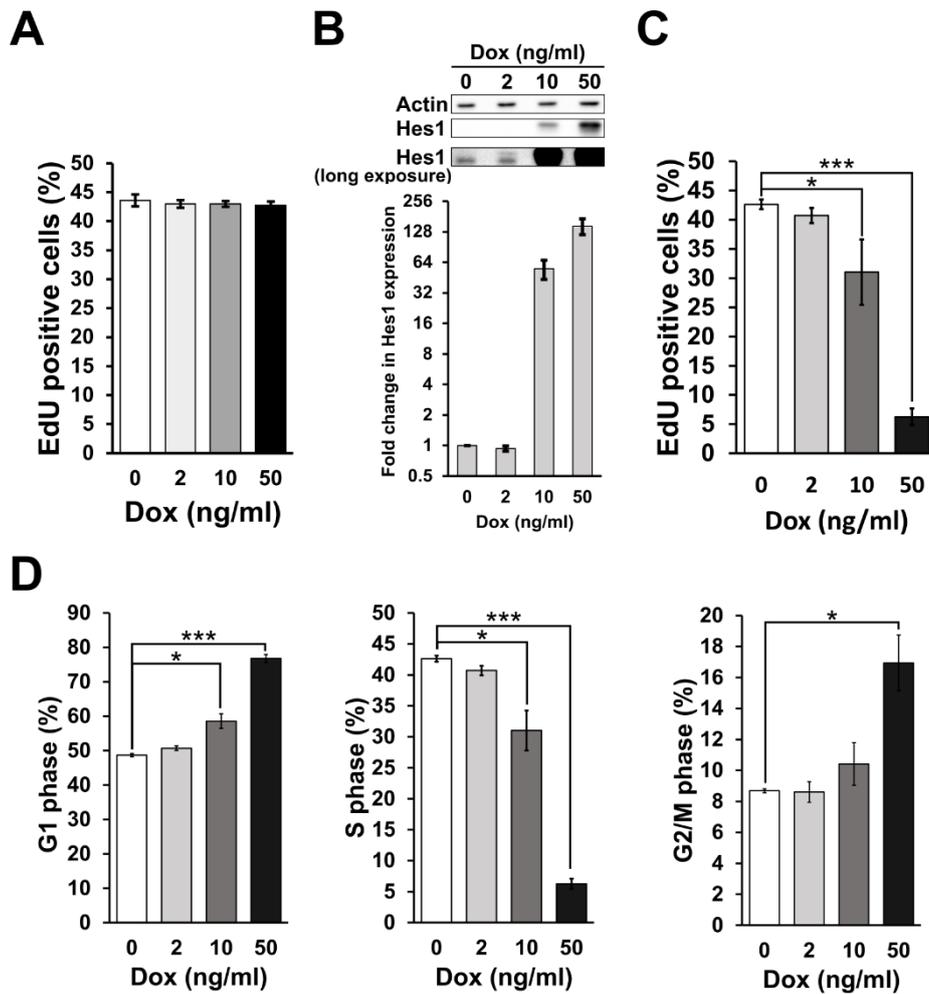


図 11 : Hes1 の持続的な高発現による細胞増殖への影響

- (A) 野生型の神経幹細胞に Dox を添加して、細胞への EdU の取り込みを比較した。
- (B-D) 神経幹細胞に Tet-On システムを用いて、Hes1 の持続的な高発現を誘導した。(B) Dox の濃度に依存した Hes1 タンパク質の発現レベル。(C) EdU の細胞への取り込みの比較。
- (D) G1 期(左)、S 期(中央)、G2/M 期(右)の割合。DAPI と EdU のシグナルを元に割合を計算した。S 期の割合は(C)と同じ数値となっている。
- 独立した 3 回の実験結果を用いて、図のデータを平均値 ± s.e.m. で表示し、定量を行った (*p<0.05、***p<0.001; Student t-test)。

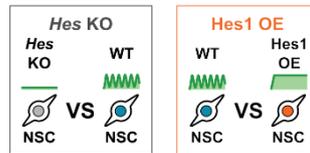
3.3 *Hes1* の欠損と *Hes1* の持続的な高発現は *p21* の発現を促進する

Hes1 が発現動態依存的に神経幹細胞の増殖を制御する仕組みを理解するために、RNA sequencing (RNA-seq)解析を用いて、*Hes1;Hes3;Hes5;Hey1-null* (*Hes* Knockout, *Hes* KO) と野生型の胎仔由来の神経幹細胞、*Hes1* の持続的な高発現(*Hes1* Overexpression, *Hes1* OE)が誘導された NS5 と野生型の NS5 の 2 組の神経幹細胞における遺伝子発現をそれぞれ網羅的に比較した(図 12A)。*Hes* KO と *Hes1* OE はともに、神経幹細胞の増殖を抑制する。そのため、*Hes* KO と *Hes1* OE でともに発現が上昇または低下する、細胞周期の制御に関連する遺伝子が存在することが期待される。そこで RNA-seq 解析により、*Hes* KO、*Hes1* OE でともに発現が上昇または低下する遺伝子を調べたところ、921 個の遺伝子の発現が上昇し、604 個の遺伝子の発現が低下していた(図 12A)。そのうち、G1 期から S 期への移行の制御に関連する遺伝子に注目して解析を行ったところ、5 個の遺伝子の発現が上昇し、1 個の遺伝子の発現が低下していた(図 12B)。特に CKI である *p15*、*p21* の発現が *Hes1* OE で大きく上昇していた。そこで *p15*、*p21* に関してタンパク質レベルでの発現の変化を調べてみたところ、*p15* のタンパク質は検出されなかったが、*p21* のタンパク質の発現は *Hes1* の持続的な高発現によって上昇した(図 13A)。また、*Hes1* の持続的な高発現に加えて、*p21* の発現をノックダウンすると、*Hes1* の持続的な高発現によって抑制された細胞増殖が改善された(図 13B)。以上の結果より、*Hes1* の持続的な高発現は *p21* の発現を促進することによって神経幹細胞の増殖を抑制することが示唆された。

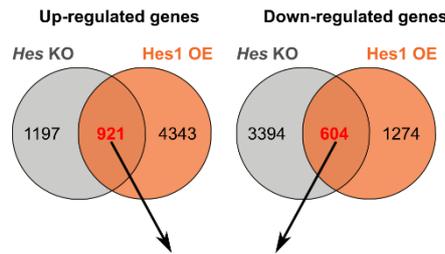
生体内において、培養細胞の実験と同じく *Hes1* の持続的な高発現が *p21* の発現を促進するか確認するため、*p21* の発現が高い細胞で構成された峽部を調べた(Trokovic et al., 2005)。この領域では、*Hes1* と *Hes3* が持続的な高発現を示す(Hirata et al., 2001)。*Hes3;Hes5-null* マウスにおいて峽部での *p21* の発現は正常であったが、更に *Hes1* を欠損させると、*p21* の発現は顕著に抑制された(図 13C)。以上の結果より、峽部における *p21* の発現は *Hes1* の持続的な高発現によって促進されることが示唆された。

A

(1) 比較する細胞



(2) RNA-seq



(3) 細胞周期制御因子の探索

>>> G1期からS期への移行を制御する因子に注目

B

		Hes KO	WT	Hes1 OE
Hes1 direct target	<i>Ascl1</i>	1.96	1	0
	<i>Dll1</i>	3.21	1	0.07
Up-regulated genes	<i>p15</i>	1.49	1	4.95
	<i>p21</i>	1.59	1	3.69
	<i>Pdpn</i>	11.56	1	1.39
	<i>Ankrd17</i>	1.22	1	1.38
	<i>Ak1</i>	1.38	1	1.24
Down-regulated genes	<i>Gas1</i>	0.82	1	0.08

図 12 : Hes1KO または Hes1 の持続的な高発現による p21 の発現上昇

(A) RNA-seq 解析で使用した細胞の模式図。野生型(WT)と *Hes1;Hes3;Hes5;Hey1*-null (*Hes* KO)の神経幹細胞(neural stem cell, NSC)の比較と WT と Hes1 の持続的な高発現(Hes1 OE)が誘導された神経幹細胞の比較を行った。Hes KO と Hes1 OE でともに発現が上昇した遺伝子が 921 個、発現が低下した遺伝子が 604 個見つかった。これらの遺伝子群のうち G1 期から S 期への移行の制御に関連する遺伝子に注目した。

(B) 注目した遺伝子の相対的な発現レベルを示した表。表はそれぞれの遺伝子の発現レベルを WT に対する相対値で示した。例として Hes1 が直接抑制する *Ascl1*、*Dll1* を表に加えた。G1 期から S 期への移行の制御に関連する遺伝子に注目して調べたところ、5 個の遺伝子の発現が上昇、1 個の遺伝子の発現が低下したことが分かった。特に CKI である *p15*、*p21* の発現が Hes1 OE で大きく上昇した(赤字)。

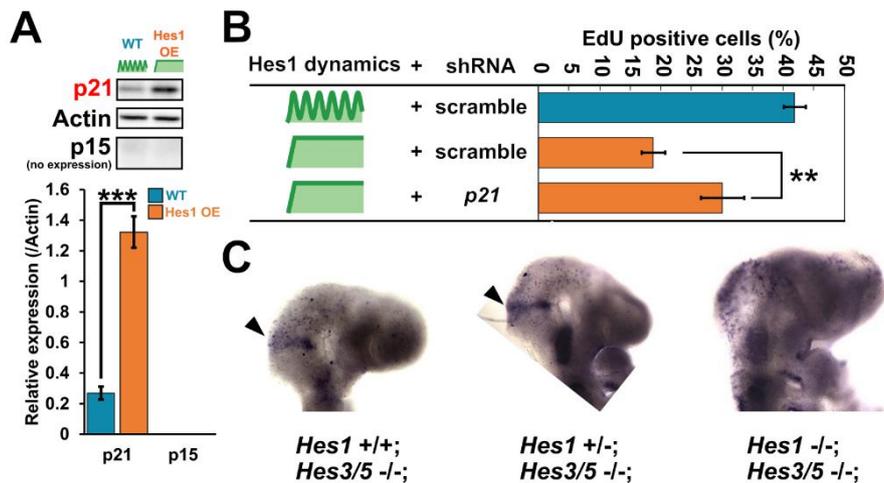


図 13： Hes1 の持続的な高発現は p21 を介して増殖を抑制する

(A) Hes1 の持続的な高発現による p21 と p15 のタンパク質の発現の変化。独立した 3 回の実験結果を用いて定量した。

(B) スクランブル shRNA、Hes1 の持続的な高発現とスクランブル shRNA、Hes1 の持続的な高発現と p21 shRNA を誘導した神経幹細胞における EdU の取り込みの比較。独立した 3 回の実験結果を用いて定量した。

(C) Hes3;Hes5-null (2 匹)、Hes1(+/-);Hes3;Hes5-null (2 匹)、Hes1;Hes3;Hes5-null マウス(3 匹)の E9.5 胚の峡部(矢頭)における p21 の発現をホールマウント *in situ* hybridization を用いて検出した。

図のデータは平均値 ± s.e.m. で表示した (**p<0.01、***p<0.001; Student t-test)。

3.4 Hes1 の振動発現は p21 の発現を抑制する

次に神経幹細胞において、Hes1 の振動発現が p21 の発現を抑制しているか調べた。まず、p21 プロモーターの活性を調べるため、神経幹細胞に p21 プロモーターで発現制御された不安定化 Luc2 で構成される p21 プロモーターレポーターを導入した(図 14A)。そして、Hes1 の振動発現を誘導するため、hGAVPO と upstream activation sequence (UAS) プロモーターを基盤とした光応答性遺伝子発現システムを導入した(Wang et al., 2012; Imayoshi et al., 2013)(図 14A,B)。このシステムでは青色光を当てると UAS プロモーター下に配置した遺伝子の発現がオンになり、光を遮断すると発現がオフになるため、青色光を特定の頻度で照射することで Hes1 の振動発現を誘導できる(図 14B)。この方法によって Hes1 の振動発現を誘導すると p21 の発現は光照射で Hes1 が誘導される毎に抑制された(図 14C)。したがって、Hes1 の振動発現が周期的に p21 の発現を抑制することで p21 の振動発現が誘導されることが示唆された。

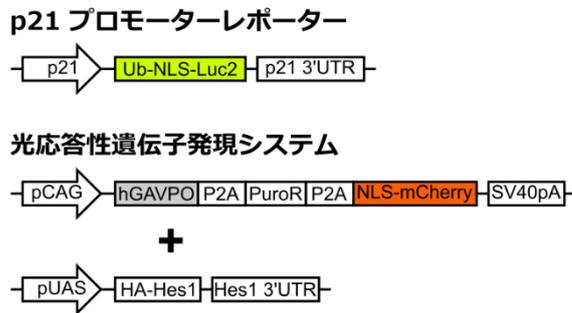
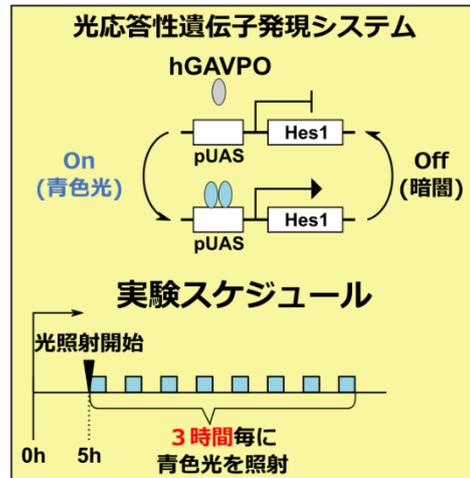
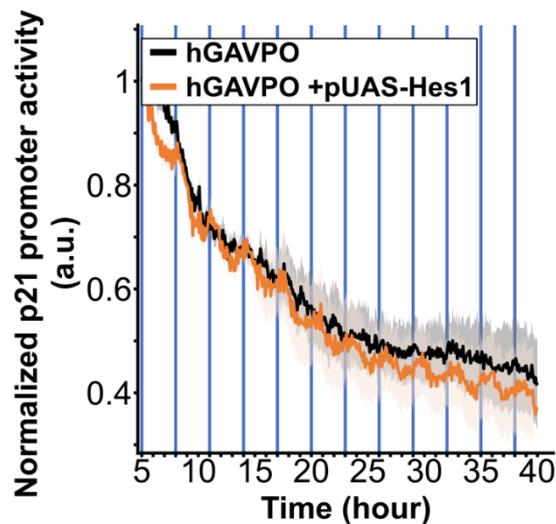
A**B****C**

図 14 : Hes1 の振動発現は p21 の発現を抑制する

(A) p21 のプロモーター活性を調べるための p21 プロモーターレポーター、光応答性遺伝子発現システムの構成。

(B) 光応答性遺伝子発現システムの概略図 (上) と実験スケジュール (下)。測定開始の直前に、休眠培地に培地交換した。光刺激は測定開始から 5 時間後から開始し、3 時間毎に行った。光の強さは 31.2 W/m² で 1 回の光刺激で 30 秒間照射した。

(C) 光応答性遺伝子発現システムによって Hes1 の振動発現を誘導した神経幹細胞 (hGAVPO+pUAS-Hes1、オレンジ色) と、コントロールの神経幹細胞(hGAVPO、黒)の p21 の発現。青色の線は光刺激を行った時間、それぞれの色のついている領域は標準誤差を意味する。独立した 3 回の実験結果を用いて定量した。

3.5 神経幹細胞における p21 の発現動態の解析

DNA ダメージに応答して Transformation related protein 53 (p53)の振動発現の制御の下、p21 が振動発現を示すことが報告されている(Hafner et al., 2020)。しかしながら、活発に増殖する神経幹細胞における p21 の発現動態は明らかになっていない。そこで p21 プロモーターレポーターと Fucci を発現する神経幹細胞を用いて、p21 の発現をライブセルイメージングで調べた。その結果、活発に増殖する神経幹細胞において p21 の発現がダイナミックに変化していることが分かった(図 15A-C、図 16)。また、先行研究と同様に(Nishitani et al., 2008; Hsu et al., 2019)、p21 の発現は G1 期から S 期への移行中に低下した(図 15D)。興味深いことに同じタイミングで Hes1 の発現が上昇した(図 8D 右)。これらの結果は G1 期から S 期への移行の際に、Hes1 の振動発現が p21 の発現を抑制することを示唆する。

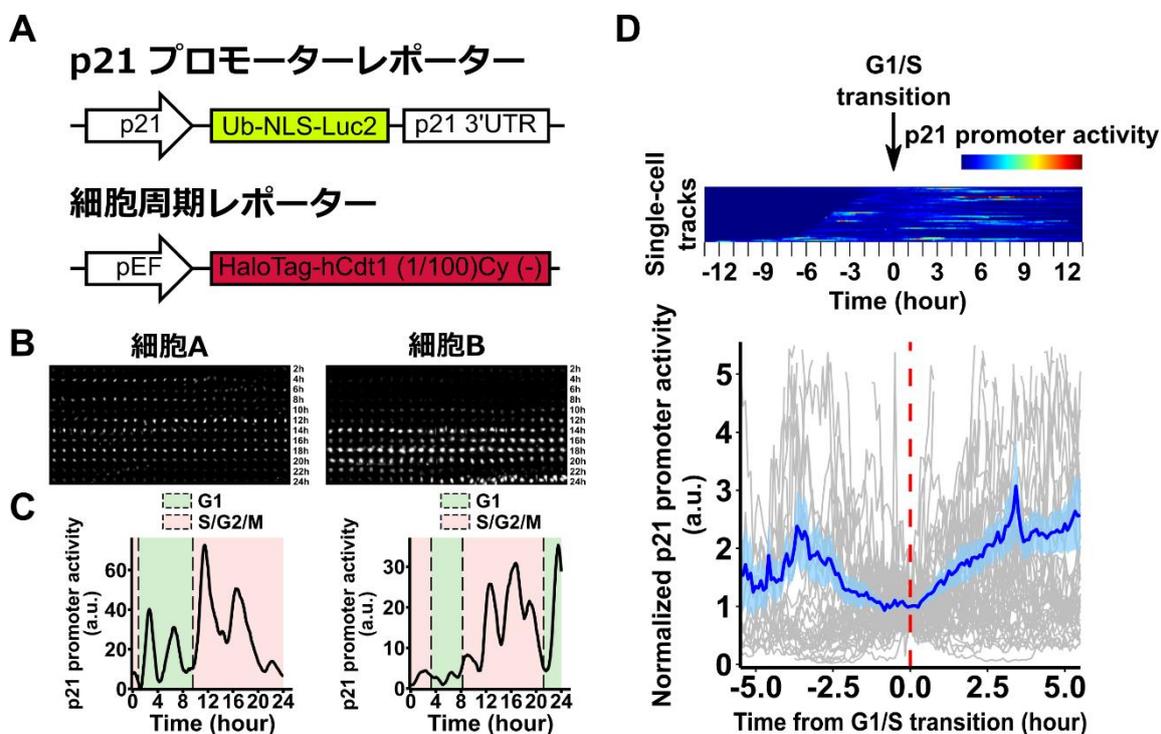


図 15：神経幹細胞における p21 の発現動態

(A) p21 のプロモーター活性を生物発光で測定できる p21 プロモーターレポーター、細胞周期の進行をモニタリングするための細胞周期レポーターの構成。

(B) 単一細胞レベルでの p21 プロモーター活性の例。

(C) 単一細胞レベルでの p21 プロモーター活性(黒色の実線)と細胞周期レポーター(緑色の領域が G1 期、ピンク色の領域が S/G2/M 期を意味する)の定量結果の例。

(D) (上)単一細胞レベルでの p21 プロモーター活性のヒートマップ。G1 期から S 期への移行を Time = 0 とした。(下)単一細胞レベルでの p21 プロモーター活性のグラフ。単一細胞レベルでのシグナルを灰色の実線、平均値を青色の実線、標準誤差を水色の領域で示した。G1 期から S 期への移行を Time = 0 (赤色の点線)とした(46 細胞)。この解析は 1 回のライブセルイメージングで得られたデータを用いて行った。

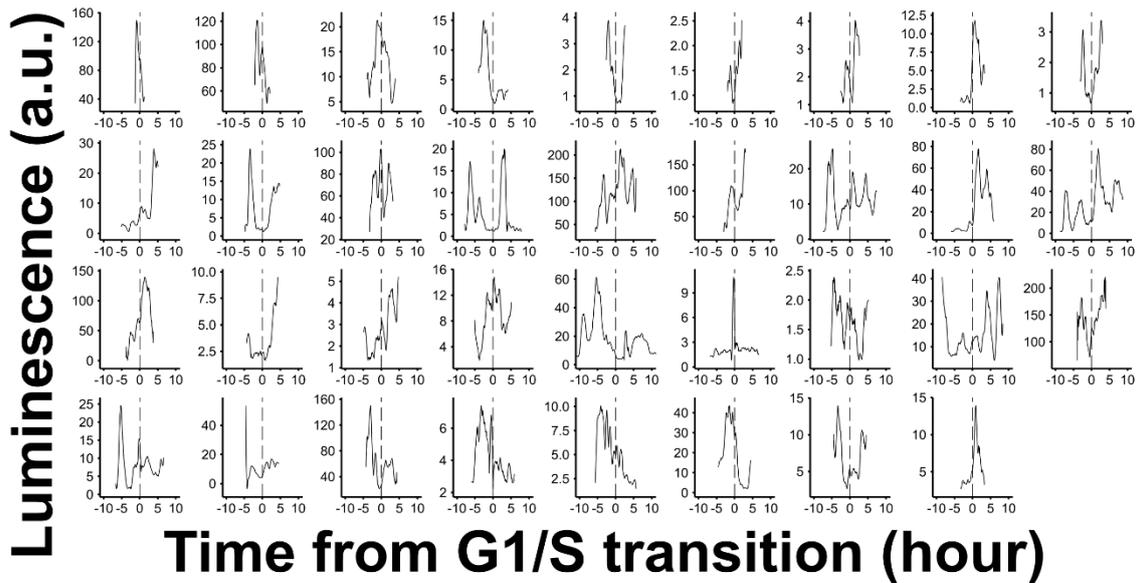


図 16：単一細胞レベルでの p21 プロモーター活性の例

それぞれのグラフは、X 軸が時間、Y 軸が p21 プロモーターの活性を示す。また、G1 期から S 期への移行を X=0(点線)とした。図 15 と同じデータを用いて、35 個の細胞のデータを示した。

次に、蛍光タンパク質である Achilles (Yoshioka-Kobayashi et al., 2020) を *p21* の遺伝子座にノックインすることで(図 5)、*p21*-Achilles 融合タンパク質を神経幹細胞に発現させて、*p21* のタンパク質レベルでの発現もライブセルイメージングで調べた。*p21* タンパク質は転写レベルと同様なダイナミックな発現の変化を示さなかったが、細胞周期に応じて発現が変化した。G1 期では *p21* タンパク質の発現が上昇し、G1 期から S 期への移行の約 1 時間後に低下した(図 17A、図 18)。*p21*-Achilles 融合タンパク質の半減期は約 161.4 分、*p21* のタンパク質の半減期は約 39 分であり、*p21*-Achilles 融合タンパク質は本来の *p21* タンパク質よりも著しく安定であった(図 17B)。そのため G1 期から S 期への移行付近での *p21*-Achilles の発現の低下が、*p21* プロモーター活性の低下のタイミングと比べて遅くなると考えられる。以上より、*p21* のタンパク質も G1 期から S 期への移行中に発現が低下することが示唆された。

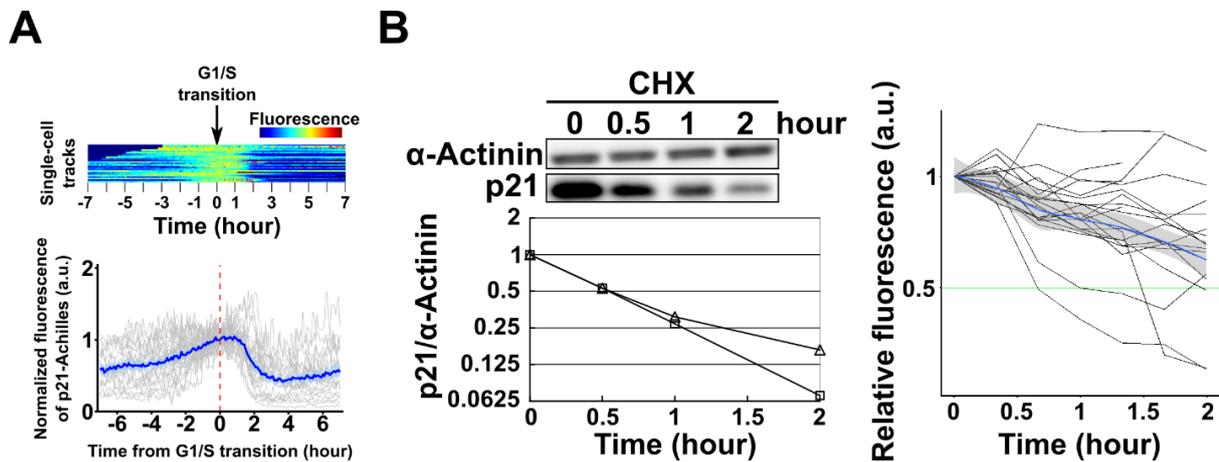


図 17：神経幹細胞における *p21*-Achilles の発現動態

(A) (上)単一細胞レベルでの *p21* タンパク質の発現のヒートマップ。G1 期から S 期への移行を Time = 0 とした。(下)単一細胞レベルでの *p21* タンパク質の発現のグラフ。単一細胞レベルでのシグナルを灰色の実線、平均値を青色の実線、標準誤差を水色の領域で示した。また G1 期から S 期への移行を Time = 0 (赤色の点線)とした(25 細胞)。この解析は 1 回のライブセルイメージングで得られたデータを用いて行った。

(B) *p21* と *p21*-Achilles の半減期測定。(左) Cycloheximide (CHX) を加えてから、0、0.5、1、2 時間後に *p21* タンパク質の発現を測定した。図のデータは独立した 2 回の実験結果を示した。(右) CHX を加えてからの *p21*-Achilles の相対的な蛍光強度の変化を測定した。単一細胞レベルでのシグナルを黒色の実線、平均値を青色の実線、95%信頼区間を灰色の領域で示した。緑色の実線は、相対的な蛍光強度が 0.5 であることを意味する(21 細胞)。この解析は 1 回のライブセルイメージングで得られたデータを用いて行った。

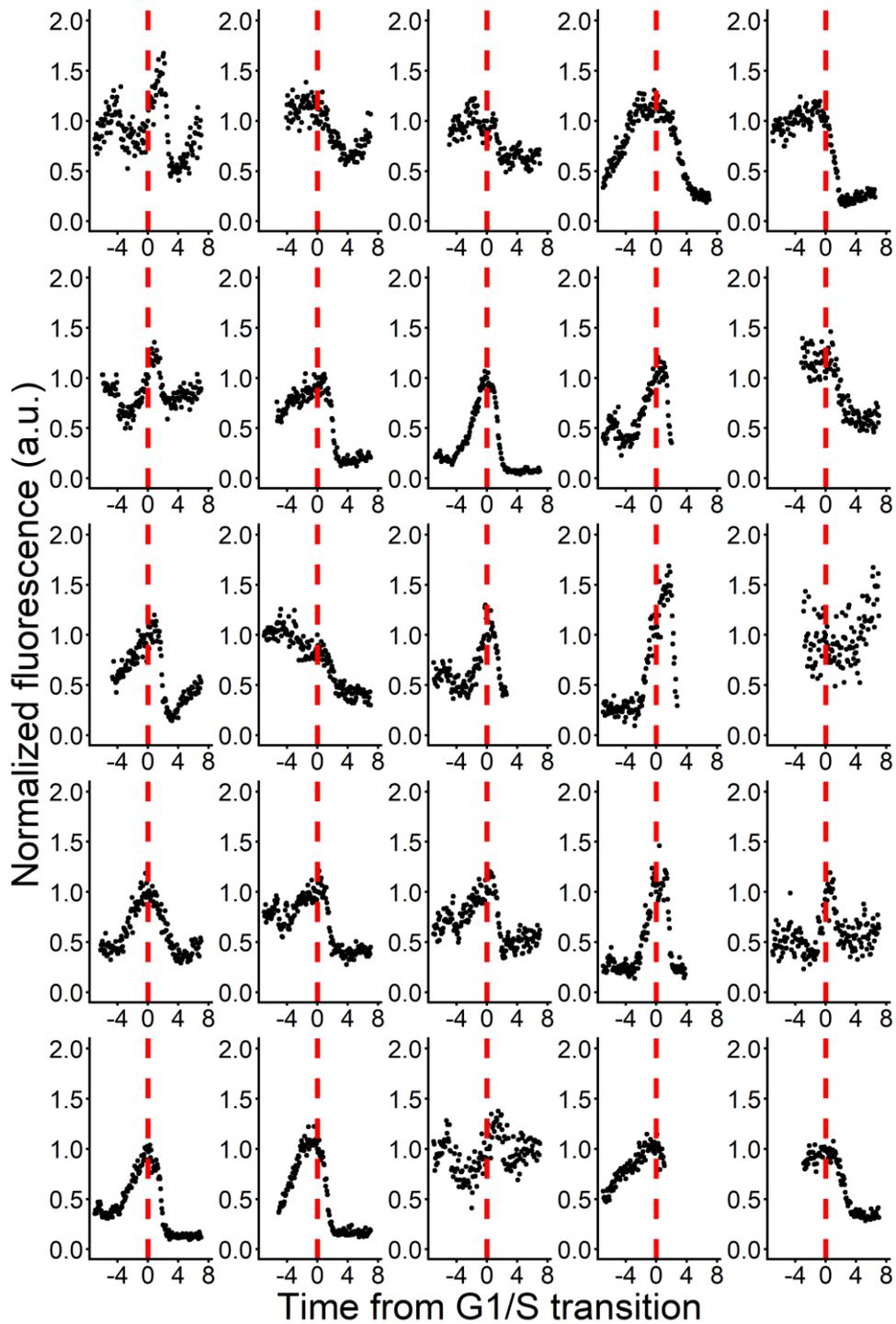


図 18 : 単一細胞レベルでの p21-Achilles の発現の例

それぞれのグラフは、X 軸が時間、Y 軸が p21 タンパク質の発現レベルを示す。また、G1 期から S 期への移行を $X = 0$ (赤色の点線)とした。図 17A と同じデータを用いて、25 個の細胞のデータを示した。

3.6 Hes1 の持続的な高発現は一時的に p21 の発現を抑制するが、最終的に促進する

次に Hes1 の持続的な高発現による p21 の発現への影響を調べた。p21 プロモーターレポーターを発現する神経幹細胞に Tet-On システムを導入して、Dox 依存的に Hes1 の持続的な高発現を誘導し、p21 の発現を経時的に測定した(図 19A,B)。Dox を添加して Hes1 を誘導したところ、最初 p21 の発現は低下するが、約 10 時間後、その発現は上昇に転じた(図 19B)。Dox を添加するだけでは、p21 の発現は変化しなかった(図 19C)。また Hes1 に対する抗体を用いて ChIP アッセイを行ったところ、Dox の添加後、8 時間または 24 時間後において、Hes1 タンパク質が p21 のプロモーター領域に結合することが分かった(図 19D)。

以上の結果より、Hes1 は p21 のプロモーター領域に結合することでその発現を抑制し、また Hes1 の持続的な高発現が続くと間接的に p21 の発現を促進することが示唆された。

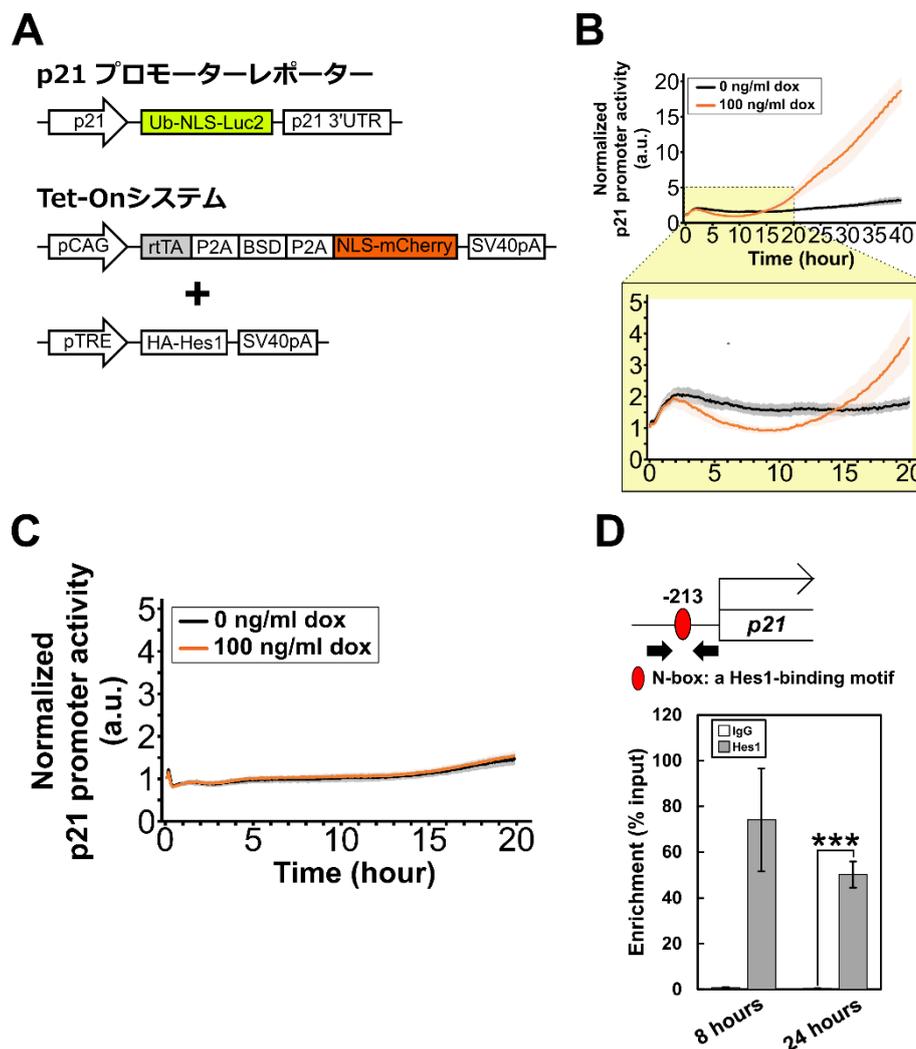


図 19 : Hes1 の持続的な高発現による p21 の発現制御

(A) p21 のプロモーター活性を生物発光で測定できる p21 プロモーターレポーター、Hes1 の持続的な高発現を誘導するための Tet-On システムの構成。

(B) Tet-On システムによって Hes1 の持続的な高発現を誘導した神経幹細胞(橙色、100 ng/ml Dox)とコントロールの神経幹細胞(黒色、0 ng/ml Dox)の p21 の発現。標準誤差はそれぞれの色の領域で示した。下のグラフは上のグラフの拡大図。独立した 5 回の実験結果を用いて定量した。

(C) p21 プロモーターレポーターのみを発現する神経幹細胞における p21 の発現。Dox の有無(0,100 ng/ml)による影響を調べた。独立した 3 回の実験結果を用いて定量した。

(D) ChIP アッセイ。Hes1 抗体とコントロール抗体(IgG)を使って p21 プロモーターへの Hes1 の結合を調べた。神経幹細胞に 100 ng/ml Dox を添加し、Tet-On システムによって Hes1 の持続的な高発現を誘導してから 8, 24 時間後に細胞を回収した。qPCR は概略図(上)に示されている Hes1 の結合領域を増幅できるプライマーで行い、Enrichment はサンプル

の値/インプットの値 $\times 100$ で示した。独立した 3 回の実験結果を用いて定量した。
図のデータは平均値 \pm s.e.m. で表示した (** $p < 0.001$; Student t-test)。

3.7 Hes1 の持続的な高発現による p21 の発現上昇に關与する因子の探索

Hes1 の持続的な高発現によって p21 の発現が上昇する仕組みを明らかにするために、p21 プロモーターレポーターを用いてルシフェラーゼ解析を行った。神経幹細胞に、p21 プロモーターレポーターと Hes1 の持続的な高発現を誘導するプラスミド(pEF-Hes1)をトランスフェクションにて導入したところ、pEF-Hes1 のプラスミドの量依存的に、p21 プロモーターの活性が上昇した(図 20A,B)。また、p21 プロモーターから Hes1 が結合する N-box を欠落させても、Hes1 による p21 プロモーターの活性化は誘導された(図 20C)。以上の結果より、p21 プロモーターの活性化に p21 プロモーターへの Hes1 の結合は必要ないことが示唆された。また、p21 プロモーターにおける Hes1 が制御する領域を探索するため、p21 プロモーターの長さを短くしてルシフェラーゼ解析を行った。p21 プロモーターの長さは、5.2 kbp、2.7 kbp、1.5 kbp、171 bp、87 bp、31 bp を使用した(図 20D,G)。その結果、87 bp までは Hes1 によって p21 プロモーターが活性化されるが、31 bp まで短くすると活性化されなかった(図 20E,F,H)。また、5.2 kbp と 2.7 kbp、または、2.7 kbp と 1.5 kbp で p21 のプロモーター活性が大きく異なった(図 20E)。p21 プロモーターの 5.2 kbp から 2.7 kbp まで、2.7 kbp から 1.5 kbp までに一か所ずつ p53 の結合領域が存在し、また 87 bp から 31 bp までには GC box が存在する(図 20D,G)。以上の結果より、p53 と、GC box に結合できる Trans-acting transcription factor 1/3 (Sp1/3)または SMAD family member 2/3 (Smad2/3)が Hes1 の持続的な高発現による p21 プロモーターの活性化に寄与することが示唆された。

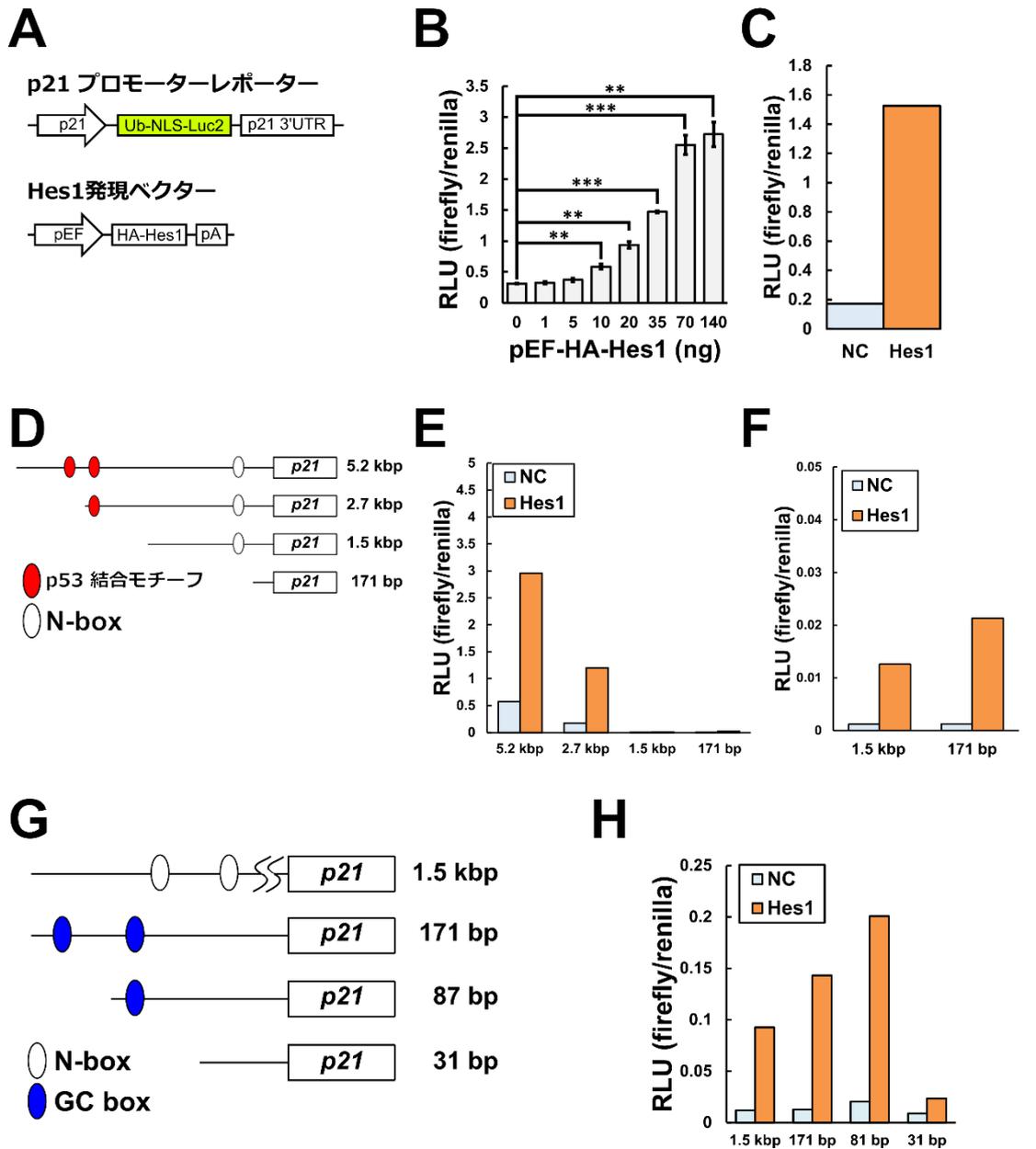


図 20 : Hes1 は p53 結合モチーフまたは GC box を介して p21 プロモーターを活性化する
 (A) p21 のプロモーター活性を生物発光で測定できる p21 プロモーターレポーターと Hes1 発現ベクターの構成。
 (B) 神経幹細胞に p21 プロモーターレポーターと Hes1 発現ベクターと pRL-TK をトランスフェクションにて導入し、ルシフェラーゼ解析を行った。独立した 4 回の実験結果を用いて定量した。
 (C) p21 プロモーターから Hes1 結合モチーフである N-box を除去した p21 プロモーターレポーターでルシフェラーゼ解析を行った(n=1)。
 (D-F) 様々な長さの p21 プロモーター(5.3 kbp、2.7 kbp、1.5 kbp、171 bp)を用いてルシフ

ェラーゼ解析を行った(n=1)。(D)p21 プロモーターの構成。(E)ルシフェラーゼ解析の結果。(F)は(E)の 1.5 kbp、171 bp の部分を拡大した図。(G-H) 更に短くした p21 プロモーター(1.5 kbp、171 bp、87 bp、31 bp) を用いてルシフェラーゼ解析を行った(n=1)。(G)プロモーターの構成。(H)ルシフェラーゼ解析の結果。コントロールとして、pEF-GM を使用した(NC)。図のデータは平均値±s.e.m.で表示した (**p<0.01; ***p<0.001; Student t-test)。

また、Hes1 の持続的な高発現による p21 プロモーターの活性化を抑制する阻害剤の探索を行った。p21 プロモーターレポーターを発現する神経幹細胞に Tet-On システムを導入して、Dox 依存的に Hes1 の持続的な高発現を誘導した(図 19A)。Dox (100 ng/ml)と様々な阻害剤を添加し、p21 のプロモーター活性の変化を調べた(図 21、表 6)。以上の結果より、Erk1/2、Smad2/3、Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)のリン酸化が Hes1 による p21 プロモーターの活性化に寄与することが示唆された。

次に Hes1 が p21 の転写活性化因子として機能する可能性を確かめた。Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta (CaMK2 δ) が Hes1 を転写抑制因子から転写活性化因子に変化させることが報告されている(Ju et al., 2004; Sugita et al., 2015)。しかしながら、CaMK2 δ の阻害剤 KN-62 は Hes1 による p21 の発現上昇を抑制しなかった(図 22)。以上の結果より、CaMK2 δ による Hes1 の機能の切り替えは p21 の発現の誘導に関わっていないことが示唆された。この結果は、図 20C の結果が示唆していた p21 プロモーターの活性化に p21 プロモーターへの Hes1 の結合は必要ないこと合致する。

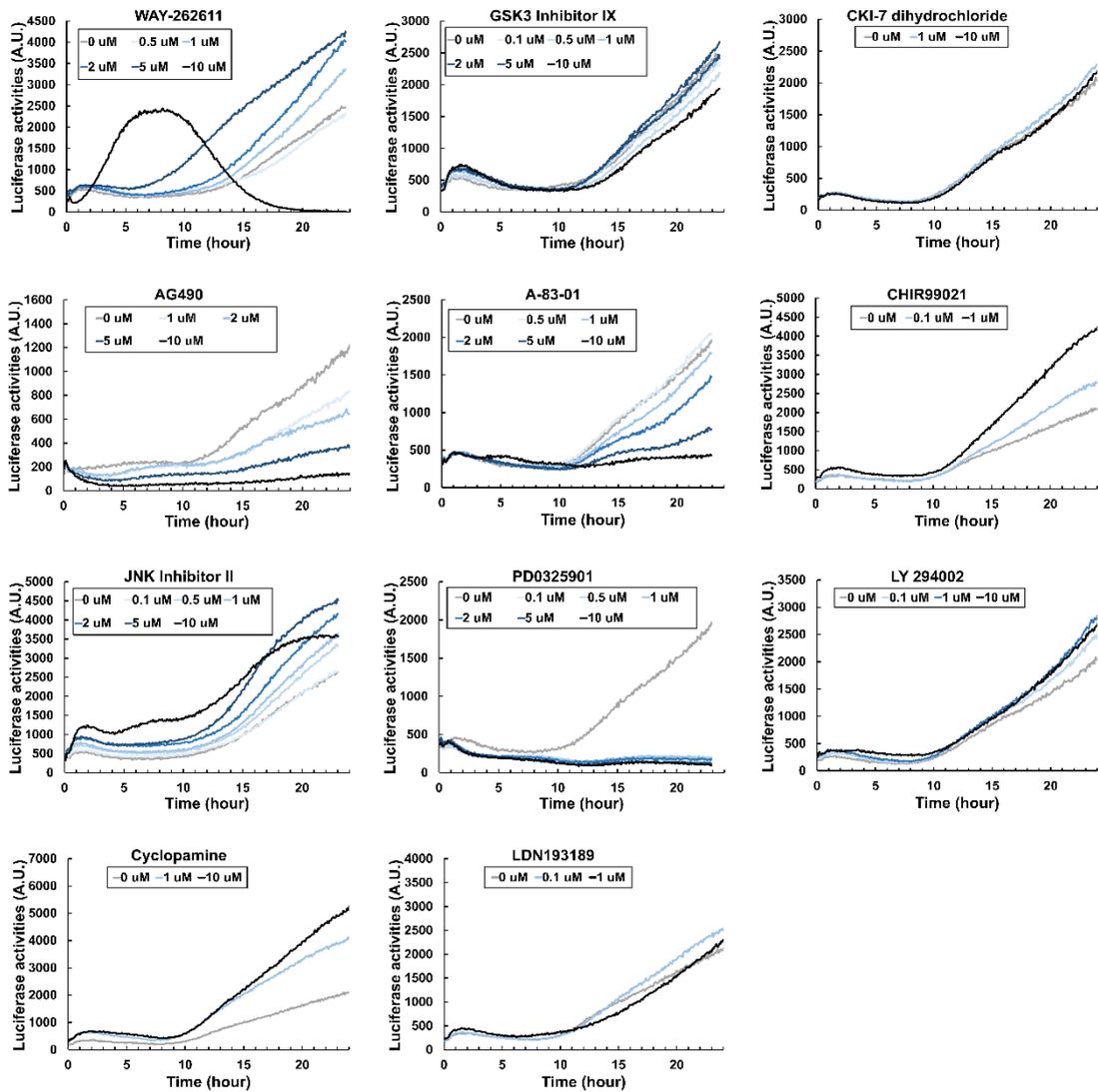


図 21 : Hes1 による p21 プロモーターの活性化への阻害剤の影響

神経幹細胞に p21 プロモーターレポーターを導入して、Tet-On システムで Hes1 の持続的な高発現を誘導すると同時に阻害剤を添加して、p21 の発現変化に影響を与えるか調べた。それぞれの阻害剤に対して 1 回実験を行い、その濃度はグラフに記載した。また、使用した阻害剤、結果は表 6 に記載した。

阻害剤	標的タンパク質	結果
WAY-262611	Dkk1	p21の発現が上昇
GSK3 Inhibitor IX	GSK3	変化なし
CKI-7 dihydrochloride	CK1	変化なし
AG490	JAK2	p21の発現が低下
A-83-01	ALK4/5/7	p21の発現が低下
CHIR99021	GSK3	p21の発現が上昇
JNK Inhibitor II	JNK	p21の発現が上昇
PD0325901	MEK1/2	p21の発現が低下
LY 294002	PI3K	変化なし
Cyclopamine	Shh	p21の発現が上昇
LDN193189	ALK2/3	変化なし

表 6：図 20 の結果

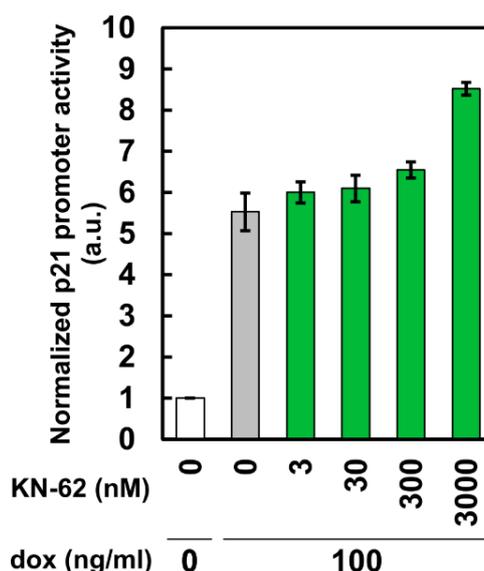


図 22：CaMK2 δ の阻害剤は Hes1 の持続的な高発現による p21 の発現上昇を抑制しない

Tet-On システムによって Hes1 の持続的な高発現を誘導した神経幹細胞における p21 プロモーター活性が CaMK2 δ の阻害剤 KN-62 によって抑制されるか調べた。Dox (0、100 ng/ml) と KN-62 (0、3、30、300、3000 nM) を含む培地で培地交換をして、24 時間後の p21 プロモーター活性を比較した。独立した 3 回の実験結果を用いて定量した。

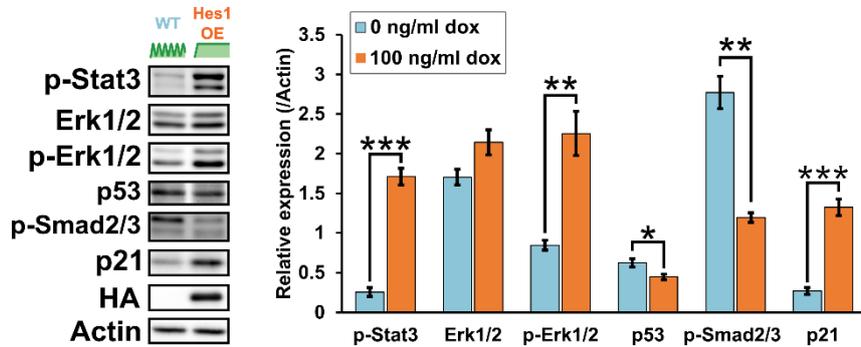
図のデータは平均値 \pm s.e.m. で表示した。

3.8 Hes1 の持続的な高発現は MEK-ERK パスウェイを介して p21 の発現を促進する

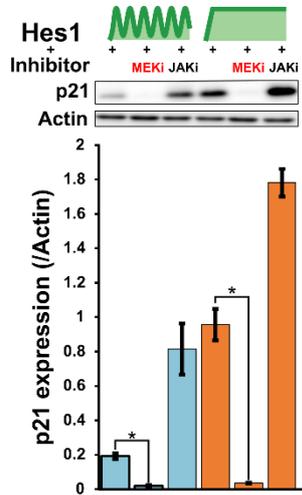
3.7 節の結果より、Smad2/3、p53、Erk1/2、Stat3 に注目して解析を進めた。神経幹細胞において Hes1 の持続的な高発現によってこれらのタンパク質の発現が変化するか調べたところ、Stat3 と Erk1/2 のリン酸化が上昇することが分かった(図 23A)。更に Hes1 の持続的な高発現に加えて、Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)の阻害剤 PD0325901 または JAK の阻害剤 AG490 を添加したところ、AG490 は p21 の発現を抑制しなかったが、PD0325901 は p21 の発現を抑制した(図 23B)。加えて、PD0325901 は Hes1 の持続的な高発現によって抑制された神経幹細胞の増殖を改善した(図 23C)。以上の結果より、Erk1/2 シグナルの活性化が Hes1 の持続的な高発現による p21 の発現の上昇に重要であることが示唆された。Erk1/2 の過剰な活性化は Sp1/3、p53 を介して p21 の発現を促進することが報告されている(Karkhanis et al., 2015)。神経幹細胞においても過剰に活性化された Erk1/2 は、Sp1/3 または p53 を介して p21 の発現を促進すると考えられる。

MEK の阻害剤 PD0325901 は野生型の神経幹細胞においても p21 の発現と増殖を抑制した(図 23B,C)。従って、ある一定レベルでの Erk1/2 のリン酸化と p21 の発現が神経幹細胞の増殖に必要なことが示唆された。興味深いことに、PD0325901 だけ添加された神経幹細胞と、PD0325901 に加えて Dox を添加することで Hes1 の持続的な高発現を誘導した神経幹細胞を比較したところ、細胞間で p21 の発現と増殖速度に差異がなかった。この結果は p21 の発現が増殖速度と相関していることを示唆した。以上の結果より、神経幹細胞においても p21 の発現が低レベルの場合、増殖を活性化する一方で、p21 の発現が大きく上昇すると増殖を抑制することが示唆された。Hes1 の持続的な高発現や振動発現はこの p21 の発現レベルを直接または Erk1/2 のリン酸化を介して間接的に制御し、増殖速度を制御すると考えられる。

A



B



C

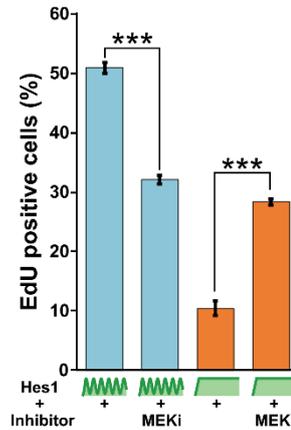


図 23 : MEK-ERK シグナルを介した Hes1 の持続的な高発現による p21 の発現上昇

(A) Hes1 の持続的な高発現によって発現が変化するタンパク質の探索。Dox を含む培地(100 ng/ml)または Dox を含まない培地で 24 時間培養した神経幹細胞におけるタンパク質の発現を比較した。独立した 3 回の実験結果を用いて定量した。

(B) Tet-On システムによる Hes1 の持続的な高発現及び MEK 阻害剤(PD0325901、赤字)、JAK 阻害剤(AG490)による p21 の発現への影響。Dox (0, 100ng/ml)及び阻害剤(100 nM PD0325901、10uM AG490)を含む培地で 24 時間培養した神経幹細胞における p21 の発現を比較した。独立した 3 回の実験結果を用いて定量した。

(C) Tet-On システムによる Hes1 の持続的な高発現及び MEK 阻害剤(PD0325901)による EdU の細胞への取り込みへの影響を調べた。Dox (0, 100ng/ml)及び PD0325901 (0, 100 nM) を含む培地で 48 時間培養した神経幹細胞における EdU の細胞への取り込みを比較した。独立した 6 回の実験結果を用いて定量した。

図のデータは平均値 ± s.e.m. で表示した(*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001; Student t-test)。

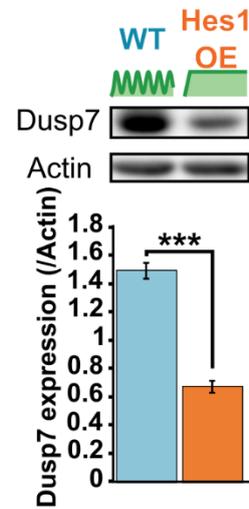
3.9 Hes1 の持続的な高発現は Dusp7 の発現を抑制することで Erk1/2 のリン酸化を誘導する

次に Hes1 の持続的な高発現が Erk1/2 のリン酸化を誘導するメカニズムを調べた。Erk1/2 のタンパク質の発現は Hes1 の持続的な高発現によってほとんど変化しなかったため(図 23A)、Erk1/2 のリン酸化を制御できるキナーゼまたはフォスファターゼの発現が変化すると推測した。そこで、RNA-seq 解析の結果を確認したところ、Erk1/2 のフォスファターゼである Dusp7 の発現が Hes1 の持続的な高発現によって低下することが分かった(図 24A)。また、Dusp7 タンパク質の発現も Hes1 の持続的な高発現によって低下した(図 24B)。そこで、Dusp7 の重要性を調べるため、神経幹細胞に Hes1 の持続的な高発現に加えて、Dusp7 の持続的な高発現を誘導したところ、Erk1/2 のリン酸化および p21 の発現が抑制され、Hes1 の持続的な高発現によって抑制された細胞増殖が改善された(図 24C,D)。次に、ChIP アッセイによって、Dusp7 のプロモーターへの Hes1 の結合能を調べた。Hes1 の DNA 結合モチーフである N-box、E-box、C-site のうち、マウスとヒトの Dusp7 プロモーターで保存されているものを調べると図の 6 つの領域(R1-R6)が見つかった(図 25A)。転写制御領域はオープンクロマチン構造になっている可能性が高いため、UCSC genome Browser を用いて胎児期の神経幹細胞におけるオープンクロマチン構造を調べたところ、Dusp7 の上流領域のうち R1 と R2 がオープンクロマチン構造に含まれていた。この結果は、Hes1 がこの 2 つの領域(R1、R2)に結合して転写を抑制することを示唆した。そこで予備実験として、R1-R6 に対して、ChIP-qPCR を行ったところ、R1 の領域が最も強いシグナルを示した(図 25B)。そのため、R1 に関して再度 ChIP-qPCR を行い、統計的解析を行ったところ、Hes1 は Dusp7 の発現制御領域 R1 に強く結合することが分かった(図 25C)。以上の結果より、Hes1 の持続的な高発現は直接 Dusp7 の発現を抑制し、Erk1/2 のリン酸化を促進し、その結果 p21 の発現が大幅に上昇し、神経幹細胞の増殖を抑制することが示唆された。

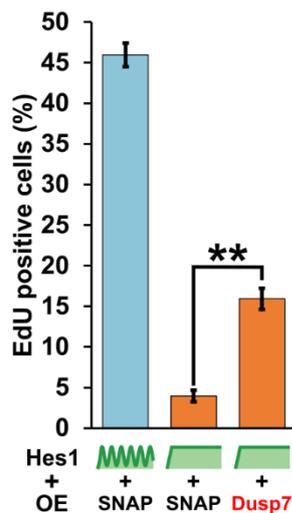
A

DUSPs	WT	Hes1 OE
<i>Dusp6</i>	1	0.87
<i>Dusp7</i>	1	0.11
<i>Dusp11</i>	1	0.83
<i>Dusp14</i>	1	0.74
<i>Dusp16</i>	1	0.52
<i>Dusp22</i>	1	0.35
<i>Dusp28</i>	1	0.37

B



C



D

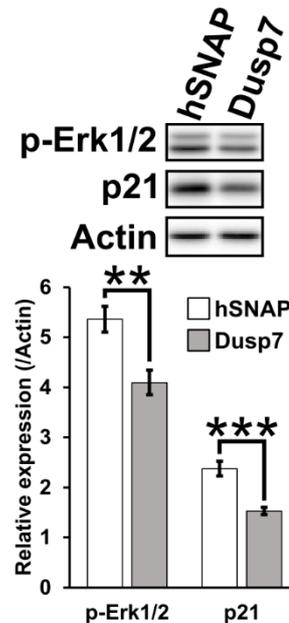


図 24 : Hes1 の持続的な高発現による *Dusp7* の発現減少が *Erk1/2* のリン酸化を誘導する

(A) Hes1 の持続的な高発現によって発現が減少する DUSP ファミリーのうち、ERK1/2 を脱リン酸化できる DUSPs の一覧。WT の発現に対する Hes1 OE の発現の相対値を示した。

Hes1 OE によって *Dusp7* (赤字) の発現が著しく低下した。

(B) Tet-On システムによる Hes1 の持続的な高発現を誘導した神経幹細胞における *Dusp7* の発現。Dox (0、100 ng/ml) を含む培地で 24 時間培養した神経幹細胞における *Dusp7* の発現を比較した。独立した 6 回の実験結果を用いて定量した。

(C) Tet-On システムによる Hes1 の持続的な高発現と Dusp7 を誘導した神経幹細胞における細胞への EdU の取り込み。レンチウイルス(CSII-pEF-Dusp7、CSII-pEF-hSNAP-tag)に感染させた神経幹細胞を Dox (0、50 ng/ml)を含む培地で 48 時間培養し、Hes1 の持続的な高発現を誘導させて、細胞への EdU の取り込みを比較した。独立した 3 回の実験結果を用いて定量した。

(D) Tet-On システムによる Hes1 の持続的な高発現と Dusp7 を誘導した神経幹細胞における p-Erk1/2 と p21 の発現。レンチウイルス(CSII-pEF-Dusp7、CSII-pEF-hSNAP)に感染させた神経幹細胞を Dox (20 ng/ml)を含む培地で 48 時間培養し、Hes1 の持続的な高発現を誘導させて、p-Erk1/2 と p21 の発現を調べた。独立した 5 回の実験結果を用いて定量した。図のデータは平均値±s.e.m.で表示した(**p<0.01、***p<0.001; Student t-test)。

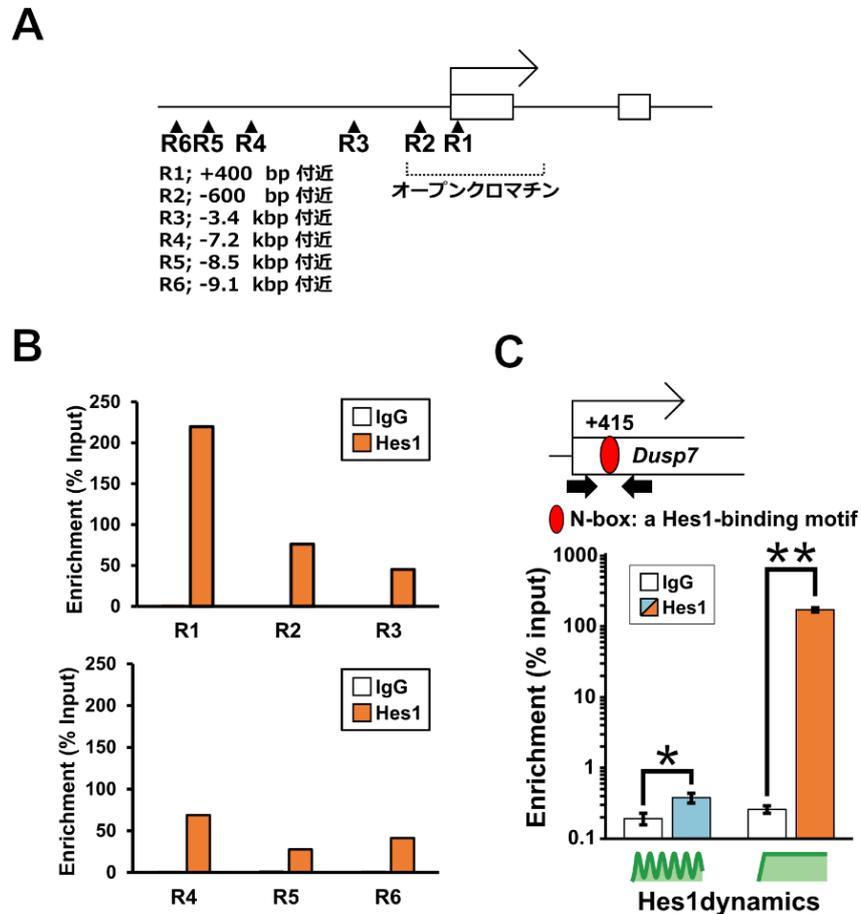


図 25 : Dusp7 の発現制御領域に Hes1 は結合する

(A) Dusp7 プロモーターの模式図。R1-R6 はヒトにも保存されている Hes1 の DNA 結合モチーフ N-box、E-box、C-site が存在する領域。また、R1、R2 の領域はオープンクロマチン構造になっている。

(B-C) ChIP アッセイ。Hes1 抗体とコントロール抗体(IgG)を使用して、Dusp7 の発現制御領域への Hes1 の結合を調べた。細胞は Dox が含まれる培地(100 ng/ml)または Dox が含まれない培地で 24 時間培養することで、Tet-On システムによって Hes1 の持続的な高発現を誘導した神経幹細胞及び、野生型の神経幹細胞から回収した。予備実験として、R1-R6 に対して ChIP-qPCR を行った(B)。R1 が最も増幅されたので、R1 に関して再度 ChIP-qPCR を行い、独立した 3 回の実験結果を用いて定量した(C)。qPCR は(A)に示されている Hes1 の結合領域を増幅できるプライマーで行い、Enrichment はサンプルの値/インプットの値 x100 で示した。

図のデータは平均値 ± s.e.m. で表示した(*p<0.05、**p<0.01; Student t-test)。

第四章 考察

4.1 Hes1 による発現動態依存的な細胞周期制御機構

本研究で、Hes1 が p21 を介して発現動態依存的に神経幹細胞の増殖を制御することが明らかになった(図 26)。神経幹細胞において Hes1 の振動発現は Hes1 が直接 p21 プロモーターに結合し、p21 の発現を抑制し、増殖を促進する。一方で、Hes1 の持続的な高発現も同様に p21 の発現を抑制するが、Hes1 の持続的な高発現が続くと、反対に、p21 の発現を促進し、増殖を抑制する。Hes1 の持続的な高発現は Erk1/2 のフォスファターゼである Dusp7 の発現制御領域に結合することで、Dusp7 の発現を抑制し、その結果、Erk1/2 のリン酸化が促進され、最終的に p21 の発現が上昇する。このように、Hes1 は発現動態に応じて直接もしくは Dusp7-Erk1/2 を介して間接的に p21 の発現を制御し、神経幹細胞の増殖を制御していることが示された。

本研究では、活性化された Erk1/2 が p21 の発現を上昇する仕組みについて検証を行っていない。過剰に活性化された Erk1/2 は p53 または Sp1 の活性化を介して p21 の発現を促進することが報告されている(Karkhanis et al., 2015)。神経幹細胞においても Hes1 の持続的な高発現によって Erk1/2 は過剰に活性化され、p53 または Sp1 を介して p21 の発現を促進すると考えられる。

本研究では、Hes1 の振動発現ではなく、Hes1 の持続的な高発現によって Dusp7 の発現が抑制される仕組みについて検証を行っていない。図 25C の結果が示すように Hes1 の持続的な高発現と比べて、Hes1 の振動発現は Dusp7 の発現制御領域にほとんど結合しない。この結果は振動発現している Hes1 が Dusp7 の発現制御領域に結合できない、もしくは Hes1 の発現レベルが Dusp7 の発現を抑制するには不十分であることを示唆する。また、別の細胞種において Dusp7 のタンパク質の半減期は約 8 時間と報告されている (Peng et al., 2017)。そのため、2, 3 時間周期という短周期の Hes1 の振動発現では、Dusp7 の発現を抑制しても、そのタンパク質が十分に分解される前に Hes1 の発現がオフになり、Dusp7 の機能を抑制できない可能性が考えられる。今後の研究で、この仮説が検証されることを期待したい。

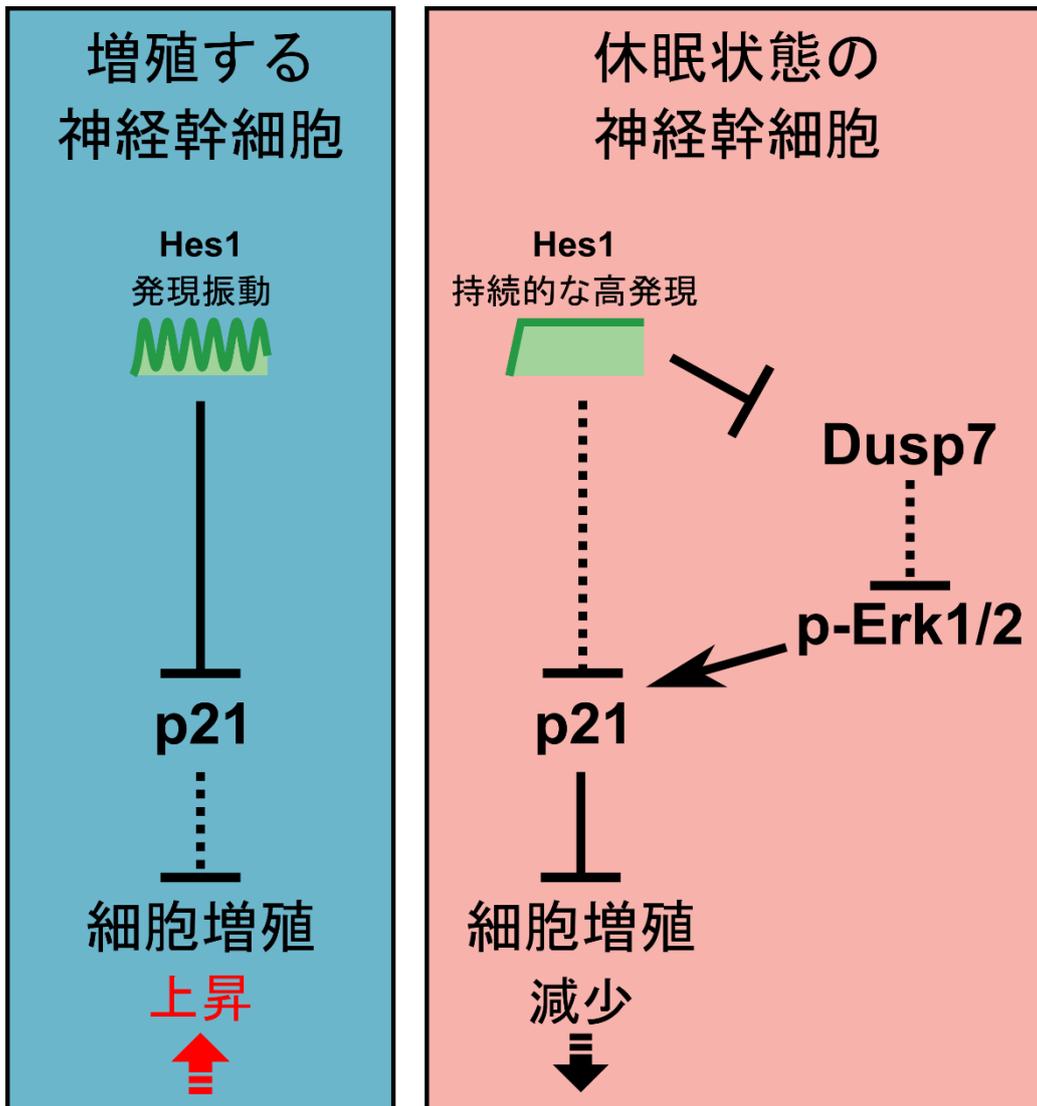


図 26 : Hes1 による発現動態依存的な細胞周期制御機構

4.2 Hes1 による細胞増殖の抑制における発現レベルの重要性

低レベルから中レベルでの Hes1 の持続的な発現は神経幹細胞の増殖を抑制せず、休眠状態の神経幹細胞の再活性化を抑制することが報告されている (Marinopoulou et al., 2021)。本研究でも低レベルでの Hes1 の持続的な発現では神経幹細胞の増殖をほとんど抑制しなかったが、高レベルでの Hes1 の持続的な発現は増殖を強く抑制した(図 11C)。この結果は、Hes1 が神経幹細胞の増殖を抑制するためにはその発現動態(持続的な発現または振動発現)だけではなく、発現レベルも重要であることを示唆する。

4.3 Ascl1 を介した Hes1 による細胞増殖の制御

本研究では、p21 を介した Hes1 の発現動態依存的な細胞増殖の制御機構を示した。一方で、Ascl1 を介した Hes1 による細胞増殖の制御も報告されている (Sueda et al., 2019)。Ascl1 は発現動態に応じて、神経幹細胞の分化だけでなく、細胞の増殖も促進する (Imayoshi et al., 2013; Castro et al., 2011)。活発に増殖する神経幹細胞では、Hes1 の振動発現によって Ascl1 の発現が振動し、細胞増殖を促進する一方で、Hes1 の発現が抑制されると Ascl1 の発現が一定になり、神経分化を誘導する。また、休眠状態の神経幹細胞では、Hes1 が高レベルで振動発現し、Ascl1 の発現を抑制するため、細胞増殖が抑制され休眠状態が維持される (Sueda et al., 2019)。以上より、Hes1 は p21 だけでなく Ascl1 の発現も制御することで、成体脳における神経幹細胞の増殖と休眠の制御をより精密に行っていることが示唆される。また、p21 は Sox2 の過剰な活性化によるゲノムの不安定化を防ぐことで、成体脳における神経幹細胞を正常に長期間維持することを可能にする (Marqués-Torrejón et al., 2013)。そのため、Hes1 の持続的な高発現による p21 の発現上昇は神経幹細胞の増殖を制御するだけでなく、神経幹細胞を正常に長期間維持することにも寄与すると考えられる。

4.4 ヒト乳癌細胞における Hes1 の発現動態

ヒト乳癌細胞において、Hes1 は短周期だけでなく、約 25 時間周期で、振動発現する (Sabherwal et al., 2021)。この細胞において、G1 期から S 期への移行は Hes1 の発現が低下する時に集中しており、本研究で明らかになった神経幹細胞における G1 期から S 期への移行時に Hes1 の発現が低下する傾向と合致する。しかし、ヒト乳癌細胞の分裂は主に Hes1 の発現が上昇する時に集中しており、これは神経幹細胞での Hes1 の発現の傾向とは異なる。先行研究の結果より、発生期の神経系の脳室面において Hes1 タンパク質は主に発現していないことが示唆されている (Shimojo et al., 2008)。脳室面において神経幹細胞は分

裂しているため、*Hes1* の発現が低下する時に神経幹細胞が分裂すると考えられる。以上より、G1 期から S 期への移行時の *Hes1* の発現の低下は増殖する細胞に共通の特徴である可能性が示された。

4.5 生体内に近い培養条件の重要性

Hes1、*Hes3*、*Hes5*、*Hey1* を全て欠損したマウスでは胎生期及び成体の神経系において、神経幹細胞は維持されず、神経に分化する(Sueda et al., 2019)。しかし、本研究で使用した培養条件においては、*Hes1*、*Hes3*、*Hes5*、*Hey1* を全て欠損した神経幹細胞も分化に進まず増殖を続けた。これは神経幹細胞の増殖を促進する EGF、bFGF を含む増殖培地を使用しているためと考えられる。この培養条件では *Hes* 関連遺伝子群が欠損されても神経幹細胞が増殖可能であるため、本研究において、*Hes1* の機能が過少評価されていたと考えられる。そのため、神経幹細胞の増殖制御における *Hes1* の機能の更なる解析のためには、より生体内に近い培養条件の確立が重要である。

4.6 神経幹細胞における p21 以外の CKI による休眠状態の制御

峽部の神経幹細胞において p21 は高発現を示す一方で、p21 の発現が低い休眠状態の神経幹細胞も存在する。例えば、蓋板においては p21 の発現が確認されているが、ZLI や蓋板においては確認されていない(Trokovic et al., 2005; Storer et al., 2013)。また、発生過程において一部の神経幹細胞は *Hey1* と CKI である p57 を高レベルで発現し、増殖速度を遅くし、最終的に成体脳における休眠状態の神経幹細胞となる(Furutachi et al., 2015; Harada et al., 2021)。以上より、*Hes1* 等の *Hes/Hey* ファミリー遺伝子による p21 等の CKI の発現の上昇によって、神経幹細胞の休眠状態が誘導されるという共通のメカニズムの存在が期待される。しかし、このメカニズムの有無を確かめるためには更なる研究が必要である。

4.7 遺伝子の機能における発現動態の重要性

本研究では *Hes1* の振動発現が神経幹細胞の増殖を促進する一方で、*Hes1* の持続的な高発現が細胞の増殖を抑制することが示された。*Hes1* 以外の遺伝子においても、発現動態に応じて機能が変換することが知られている(Levine et al., 2013; Purvis et al., 2013; Isomura et al., 2014)。例えば、ラットの腎臓上皮細胞において、*Erk1/2* の周期的な活性化と持続的な活性化で誘導される遺伝子発現セットが異なる。*Erk1/2* が周期的に活性化される場合、血

清応答因子に制御される遺伝子の発現が誘導される一方で、Erk1/2 が持続的に活性化される場合、Activation protein transcription factor 1 (AP1)や Transcription enhancer factor 1 (TEF1)に制御される遺伝子の発現が誘導される(Aoki et al., 2013)。また、Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)が周期的に血流に放出される時は、LHRH は Luteinizing hormone (LH)または、Follicle-stimulating hormone (FSH)の放出を誘導する一方で、LHRH の持続的な放出は LHRH の受容体がすぐに不応答になるため、LH や FSH の放出を抑制する。そのため、LHRH はその周期的な放出または持続的な放出に応じて、真逆の機能を示すことができる(Belchetz et al., 1978; Wildt et al., 1981)。これらの研究は、多くの生命現象において一つの因子がその発現動態に応じて異なる結果を誘導するという興味深い共通の特徴を示す。遺伝子だけでなく、その発現動態に注目することで、生命現象の理解が更に進むことが期待される。

引用文献

1. Abbas, T., and Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9, 400-414. 10.1038/nrc2657.
2. Ables, J.L., Decarolis, N.A., Johnson, M.A., Rivera, P.D., Gao, Z., Cooper, D.C., Radtke, F., Hsieh, J., and Eisch, A.J. (2010). Notch1 is required for maintenance of the reservoir of adult hippocampal stem cells. *J Neurosci* 30, 10484-10492. 10.1523/JNEUROSCI.4721-09.2010.
3. Alvarez-Buylla, A., García-Verdugo, J.M., and Tramontin, A.D. (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2, 287-293. 10.1038/35067582.
4. Aoki, K., Kumagai, Y., Sakurai, A., Komatsu, N., Fujita, Y., Shionyu, C., and Matsuda, M. (2013). Stochastic ERK activation induced by noise and cell-to-cell propagation regulates cell density-dependent proliferation. *Mol Cell* 52, 529-540. 10.1016/j.molcel.2013.09.015.
5. Baek, J.H., Hatakeyama, J., Sakamoto, S., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2006). Persistent and high levels of Hes1 expression regulate boundary formation in the developing central nervous system. *Development* 133, 2467-2476. 10.1242/dev.02403.
6. Bai, G., Sheng, N., Xie, Z., Bian, W., Yokota, Y., Benezra, R., Kageyama, R., Guillemot, F., and Jing, N. (2007). Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1. *Dev Cell* 13, 283-297. 10.1016/j.devcel.2007.05.014.
7. Basak, O., Giachino, C., Fiorini, E., Macdonald, H.R., and Taylor, V. (2012). Neurogenic subventricular zone stem/progenitor cells are Notch1-dependent in their active but not quiescent state. *J Neurosci* 32, 5654-5666. 10.1523/JNEUROSCI.0455-12.2012.
8. Belchetz, P.E., Plant, T.M., Nakai, Y., Keogh, E.J., and Knobil, E. (1978). Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophthalmic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 202, 631-633. 10.1126/science.100883.
9. Castella, P., Sawai, S., Nakao, K., Wagner, J.A., and Caudy, M. (2000). HES-1 repression of differentiation and proliferation in PC12 cells: role for the helix 3-helix 4 domain in transcription repression. *Mol Cell Biol* 20, 6170-6183. 10.1128/MCB.20.16.6170-6183.2000.
10. Castro, D.S., Martynoga, B., Parras, C., Ramesh, V., Pacary, E., Johnston, C.,

- Drechsel, D., Lebel-Potter, M., Garcia, L.G., Hunt, C., et al. (2011). A novel function of the proneural factor *Ascl1* in progenitor proliferation identified by genome-wide characterization of its targets. *Genes Dev* 25, 930-945. 10.1101/gad.627811.
11. Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M., and Sherr, C.J. (1999). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J* 18, 1571-1583. 10.1093/emboj/18.6.1571.
 12. Concordet, J.P., and Haeussler, M. (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res* 46, W242-W245. 10.1093/nar/gky354.
 13. Engler, A., Rolando, C., Giachino, C., Saotome, I., Erni, A., Brien, C., Zhang, R., Zimmer-Strobl, U., Radtke, F., Artavanis-Tsakonas, S., et al. (2018). Notch2 Signaling Maintains NSC Quiescence in the Murine Ventricular-Subventricular Zone. *Cell Rep* 22, 992-1002. 10.1016/j.celrep.2017.12.094.
 14. Fellmann, C., Hoffmann, T., Sridhar, V., Hopfgartner, B., Muhar, M., Roth, M., Lai, D.Y., Barbosa, I.A., Kwon, J.S., Guan, Y., et al. (2013). An optimized microRNA backbone for effective single-copy RNAi. *Cell Rep* 5, 1704-1713. 10.1016/j.celrep.2013.11.020.
 15. Festuccia, N., Gonzalez, I., Owens, N., and Navarro, P. (2017). Mitotic bookmarking in development and stem cells. *Development* 144, 3633-3645. 10.1242/dev.146522.
 16. Fishell, G., and Kriegstein, A.R. (2003). Neurons from radial glia: the consequences of asymmetric inheritance. *Curr Opin Neurobiol* 13, 34-41. 10.1016/s0959-4388(03)00013-8.
 17. Fujita, S. (2003). The discovery of the matrix cell, the identification of the multipotent neural stem cell and the development of the central nervous system. *Cell Struct Funct* 28, 205-228. 10.1247/csf.28.205.
 18. Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., Imayoshi, I., Nelson, M., Nakayama, K.I., Hirabayashi, Y., and Gotoh, Y. (2015). Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 18, 657-665. 10.1038/nn.3989.
 19. Götz, M., and Huttner, W.B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 777-788. 10.1038/nrm1739.
 20. Hafner, A., Reyes, J., Stewart-Ornstein, J., Tsabar, M., Jambhekar, A., and Lahav, G. (2020). Quantifying the Central Dogma in the p53 Pathway in Live

- Single Cells. *Cell Syst* 10, 495-505.e494. 10.1016/j.cels.2020.05.001.
21. Harada, Y., Yamada, M., Imayoshi, I., Kageyama, R., Suzuki, Y., Kuniya, T., Furutachi, S., Kawaguchi, D., and Gotoh, Y. (2021). Cell cycle arrest determines adult neural stem cell ontogeny by an embryonic Notch-nonoscillatory Hey1 module. *Nat Commun* 12, 6562. 10.1038/s41467-021-26605-0.
 22. Hartman, J., Müller, P., Foster, J.S., Wimalasena, J., Gustafsson, J.A., and Ström, A. (2004). HES-1 inhibits 17beta-estradiol and heregulin-beta1-mediated upregulation of E2F-1. *Oncogene* 23, 8826-8833. 10.1038/sj.onc.1208139.
 23. Hatakeyama, J., Bessho, Y., Katoh, K., Ookawara, S., Fujioka, M., Guillemot, F., and Kageyama, R. (2004). Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development* 131, 5539-5550. 10.1242/dev.01436.
 24. Hirata, H., Tomita, K., Bessho, Y., and Kageyama, R. (2001). Hes1 and Hes3 regulate maintenance of the isthmic organizer and development of the mid/hindbrain. *EMBO J* 20, 4454-4466. 10.1093/emboj/20.16.4454.
 25. Hirata, H., Yoshiura, S., Ohtsuka, T., Bessho, Y., Harada, T., Yoshikawa, K., and Kageyama, R. (2002). Oscillatory expression of the bHLH factor Hes1 regulated by a negative feedback loop. *Science* 298, 840-843. 10.1126/science.1074560.
 26. Hsu, C.H., Altschuler, S.J., and Wu, L.F. (2019). Patterns of Early p21 Dynamics Determine Proliferation-Senescence Cell Fate after Chemotherapy. *Cell* 178, 361-373.e312. 10.1016/j.cell.2019.05.041.
 27. Imayoshi, I., Isomura, A., Harima, Y., Kawaguchi, K., Kori, H., Miyachi, H., Fujiwara, T., Ishidate, F., and Kageyama, R. (2013). Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science* 342, 1203-1208. 10.1126/science.1242366.
 28. Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., and Kageyama, R. (2010). Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. *J Neurosci* 30, 3489-3498. 10.1523/JNEUROSCI.4987-09.2010.
 29. Isomura, A., and Kageyama, R. (2014). Ultradian oscillations and pulses: coordinating cellular responses and cell fate decisions. *Development* 141, 3627-3636. 10.1242/dev.104497.
 30. Isomura, A., Ogushi, F., Kori, H., and Kageyama, R. (2017). Optogenetic perturbation and bioluminescence imaging to analyze cell-to-cell transfer of oscillatory information. *Genes Dev* 31, 524-535. 10.1101/gad.294546.116.

31. Ju, B.G., Solum, D., Song, E.J., Lee, K.J., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2004). Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKinase II δ -dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell* 119, 815-829. 10.1016/j.cell.2004.11.017.
32. Kabos, P., Kabosova, A., and Neuman, T. (2002). Blocking HES1 expression initiates GABAergic differentiation and induces the expression of p21(CIP1/WAF1) in human neural stem cells. *J Biol Chem* 277, 8763-8766. 10.1074/jbc.C100758200.
33. Karkhanis, M., and Park, J.I. (2015). Sp1 regulates Raf/MEK/ERK-induced p21(CIP1) transcription in TP53-mutated cancer cells. *Cell Signal* 27, 479-486. 10.1016/j.cellsig.2015.01.005.
34. Kawaguchi, D., Furutachi, S., Kawai, H., Hozumi, K., and Gotoh, Y. (2013). Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nat Commun* 4, 1880. 10.1038/ncomms2895.
35. Kawai, H., Kawaguchi, D., Kuebrich, B.D., Kitamoto, T., Yamaguchi, M., Gotoh, Y., and Furutachi, S. (2017). Area-Specific Regulation of Quiescent Neural Stem Cells by Notch3 in the Adult Mouse Subependymal Zone. *J Neurosci* 37, 11867-11880. 10.1523/JNEUROSCI.0001-17.2017.
36. Kawakami, K. (2007). Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol* 8 *Suppl 1*, S7. 10.1186/gb-2007-8-s1-s7.
37. Kiecker, C., and Lumsden, A. (2005). Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nat Rev Neurosci* 6, 553-564. 10.1038/nrn1702.
38. Kobayashi, T., Piao, W., Takamura, T., Kori, H., Miyachi, H., Kitano, S., Iwamoto, Y., Yamada, M., Imayoshi, I., Shioda, S., et al. (2019). Enhanced lysosomal degradation maintains the quiescent state of neural stem cells. *Nat Commun* 10, 5446. 10.1038/s41467-019-13203-4.
39. LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., and Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11, 847-862. 10.1101/gad.11.7.847.
40. Lahmann, I., Bröhl, D., Zyrianova, T., Isomura, A., Czajkowski, M.T., Kapoor, V., Griger, J., Ruffault, P.L., Mademtzoglou, D., Zammit, P.S., et al. (2019). Oscillations of MyoD and Hes1 proteins regulate the maintenance of activated muscle stem cells. *Genes Dev* 33, 524-535. 10.1101/gad.322818.118.
41. Levine, J.H., Lin, Y., and Elowitz, M.B. (2013). Functional roles of pulsing in genetic circuits. *Science* 342, 1193-1200. 10.1126/science.1239999.

42. Malatesta, P., Hartfuss, E., and Götz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* *127*, 5253-5263. 10.1242/dev.127.24.5253.
43. Marinopoulou, E., Biga, V., Sabherwal, N., Miller, A., Desai, J., Adamson, A.D., and Papalopulu, N. (2021). HES1 protein oscillations are necessary for neural stem cells to exit from quiescence. *iScience* *24*, 103198. 10.1016/j.isci.2021.103198.
44. Marqués-Torrejón, M., Porlan, E., Banito, A., Gómez-Ibarlucea, E., Lopez-Contreras, A.J., Fernández-Capetillo, O., Vidal, A., Gil, J., Torres, J., and Fariñas, I. (2013). Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression. *Cell Stem Cell* *12*, 88-100. 10.1016/j.stem.2012.12.001.
45. Mefferd, A.L., Kornepati, A.V., Bogerd, H.P., Kennedy, E.M., and Cullen, B.R. (2015). Expression of CRISPR/Cas single guide RNAs using small tRNA promoters. *RNA* *21*, 1683-1689. 10.1261/rna.051631.115.
46. Miller, F.D., and Gauthier, A.S. (2007). Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* *54*, 357-369. 10.1016/j.neuron.2007.04.019.
47. Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., and Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* *31*, 727-741. 10.1016/s0896-6273(01)00420-2.
48. Miyoshi, H. (2004). Gene delivery to hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Methods Mol Biol* *246*, 429-438. 10.1385/1-59259-650-9:429.
49. Mourikis, P., Sambasivan, R., Castel, D., Rocheteau, P., Bizzarro, V., and Tajbakhsh, S. (2012). A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells* *30*, 243-252. 10.1002/stem.775.
50. Murata, K., Hattori, M., Hirai, N., Shinozuka, Y., Hirata, H., Kageyama, R., Sakai, T., and Minato, N. (2005). Hes1 directly controls cell proliferation through the transcriptional repression of p27Kip1. *Mol Cell Biol* *25*, 4262-4271. 10.1128/MCB.25.10.4262-4271.2005.
51. Nishitani, H., Shiomi, Y., Iida, H., Michishita, M., Takami, T., and Tsurimoto, T. (2008). CDK inhibitor p21 is degraded by a proliferating cell nuclear antigen-coupled Cul4-DDB1Cdt2 pathway during S phase and after UV irradiation. *J Biol Chem* *283*, 29045-29052. 10.1074/jbc.M806045200.
52. Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Dammerman, R.S., and Kriegstein, K. (2001). Neural stem cells contribute self-renewing multipotent subventricular zone neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuron* *32*, 289-297. 10.1016/s0896-6273(01)02210-2.

- A.R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409, 714-720. 10.1038/35055553.
53. Noda, N., Honma, S., and Ohmiya, Y. (2011). Hes1 is required for contact inhibition of cell proliferation in 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Cells* 16, 704-713. 10.1111/j.1365-2443.2011.01518.x.
 54. Nyfeler, Y., Kirch, R.D., Mantei, N., Leone, D.P., Radtke, F., Suter, U., and Taylor, V. (2005). Jagged1 signals in the postnatal subventricular zone are required for neural stem cell self-renewal. *EMBO J* 24, 3504-3515. 10.1038/sj.emboj.7600816.
 55. Ochi, S., Imaizumi, Y., Shimojo, H., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2020). Oscillatory expression of Hes1 regulates cell proliferation and neuronal differentiation in the embryonic brain. *Development* 147. 10.1242/dev.182204.
 56. Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J* 18, 2196-2207. 10.1093/emboj/18.8.2196.
 57. Palozola, K.C., Lerner, J., and Zaret, K.S. (2019). A changing paradigm of transcriptional memory propagation through mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 55-64. 10.1038/s41580-018-0077-z.
 58. Peng, W.X., Huang, J.G., Yang, L., Gong, A.H., and Mo, Y.Y. (2017). Linc-RoR promotes MAPK/ERK signaling and confers estrogen-independent growth of breast cancer. *Mol Cancer* 16, 161. 10.1186/s12943-017-0727-3.
 59. Pollard, S.M., Conti, L., Sun, Y., Goffredo, D., and Smith, A. (2006). Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cereb Cortex* 16 Suppl 1, i112-120. 10.1093/cercor/bhj167.
 60. Purvis, J.E., and Lahav, G. (2013). Encoding and decoding cellular information through signaling dynamics. *Cell* 152, 945-956. 10.1016/j.cell.2013.02.005.
 61. Sabherwal, N., Rowntree, A., Marinopoulou, E., Pettini, T., Hourihane, S., Thomas, R., Soto, X., Kursawe, J., and Papalopulu, N. (2021). Differential phase register of Hes1 oscillations with mitoses underlies cell-cycle heterogeneity in ER. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118. 10.1073/pnas.2113527118.
 62. Sakaue-Sawano, A., Yo, M., Komatsu, N., Hiratsuka, T., Kogure, T., Hoshida, T., Goshima, N., Matsuda, M., Miyoshi, H., and Miyawaki, A. (2017). Genetically Encoded Tools for Optical Dissection of the Mammalian Cell Cycle. *Mol Cell* 68, 626-640.e625. 10.1016/j.molcel.2017.10.001.
 63. Sang, L., Coller, H.A., and Roberts, J.M. (2008). Control of the reversibility of cellular quiescence by the transcriptional repressor HES1. *Science* 321, 1095-

1100. 10.1126/science.1155998.
64. Shen, M.W., Arbab, M., Hsu, J.Y., Worstell, D., Culbertson, S.J., Krabbe, O., Cassa, C.A., Liu, D.R., Gifford, D.K., and Sherwood, R.I. (2018). Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. *Nature* 563, 646-651. 10.1038/s41586-018-0686-x.
 65. Shimojo, H., Isomura, A., Ohtsuka, T., Kori, H., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2016). Oscillatory control of Delta-like1 in cell interactions regulates dynamic gene expression and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 30, 102-116. 10.1101/gad.270785.115.
 66. Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008). Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron* 58, 52-64. 10.1016/j.neuron.2008.02.014.
 67. Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., and Keyes, W.M. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* 155, 1119-1130. 10.1016/j.cell.2013.10.041.
 68. Ström, A., Arai, N., Leers, J., and Gustafsson, J.A. (2000). The Hairy and Enhancer of Split homologue-1 (HES-1) mediates the proliferative effect of 17beta-estradiol on breast cancer cell lines. *Oncogene* 19, 5951-5953. 10.1038/sj.onc.1203990.
 69. Sueda, R., Imayoshi, I., Harima, Y., and Kageyama, R. (2019). High Hes1 expression and resultant Ascl1 suppression regulate quiescent vs. active neural stem cells in the adult mouse brain. *Genes Dev* 33, 511-523. 10.1101/gad.323196.118.
 70. Sugita, S., Hosaka, Y., Okada, K., Mori, D., Yano, F., Kobayashi, H., Taniguchi, Y., Mori, Y., Okuma, T., Chang, S.H., et al. (2015). Transcription factor Hes1 modulates osteoarthritis development in cooperation with calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 3080-3085. 10.1073/pnas.1419699112.
 71. Trokovic, R., Jukkola, T., Saarimäki, J., Peltopuro, P., Naserke, T., Weisenhorn, D.M., Trokovic, N., Wurst, W., and Partanen, J. (2005). Fgfr1-dependent boundary cells between developing mid- and hindbrain. *Dev Biol* 278, 428-439. 10.1016/j.ydbio.2004.11.024.
 72. Urbán, N., Blomfield, I.M., and Guillemot, F. (2019). Quiescence of Adult Mammalian Neural Stem Cells: A Highly Regulated Rest. *Neuron* 104, 834-848.

- 10.1016/j.neuron.2019.09.026.
73. Wang, X., Chen, X., and Yang, Y. (2012). Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nat Methods* 9, 266-269. 10.1038/nmeth.1892.
 74. Wildt, L., Häusler, A., Marshall, G., Hutchison, J.S., Plant, T.M., Belchetz, P.E., and Knobil, E. (1981). Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 109, 376-385. 10.1210/endo-109-2-376.
 75. Yagita, K., Yamanaka, I., Emoto, N., Kawakami, K., and Shimada, S. (2010). Real-time monitoring of circadian clock oscillations in primary cultures of mammalian cells using Tol2 transposon-mediated gene transfer strategy. *BMC Biotechnol* 10, 3. 10.1186/1472-6750-10-3.
 76. Yoshioka-Kobayashi, K., Matsumiya, M., Niino, Y., Isomura, A., Kori, H., Miyawaki, A., and Kageyama, R. (2020). Coupling delay controls synchronized oscillation in the segmentation clock. *Nature* 580, 119-123. 10.1038/s41586-019-1882-z.
 77. Yoshiura, S., Ohtsuka, T., Takenaka, Y., Nagahara, H., Yoshikawa, K., and Kageyama, R. (2007). Ultradian oscillations of Stat, Smad, and Hes1 expression in response to serum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 11292-11297. 10.1073/pnas.0701837104.
 78. Yu, X., Alder, J.K., Chun, J.H., Friedman, A.D., Heimfeld, S., Cheng, L., and Civin, C.I. (2006). HES1 inhibits cycling of hematopoietic progenitor cells via DNA binding. *Stem Cells* 24, 876-888. 10.1634/stemcells.2005-0598.
 79. Zhang, R., Boareto, M., Engler, A., Louvi, A., Giachino, C., Iber, D., and Taylor, V. (2019). Id4 Downstream of Notch2 Maintains Neural Stem Cell Quiescence in the Adult Hippocampus. *Cell Rep* 28, 1485-1498.e1486. 10.1016/j.celrep.2019.07.014.
 80. Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660. 10.1016/j.cell.2008.01.033.

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方々にご指導・ご協力をいただきました。特に本研究は影山龍一郎チームリーダー（理化学研究所、脳神経科学研究センター）と磯村彰宏特定准教授（京都大学、医生物学研究所）の研究指導の下でしかなしえなかったものだと思います。大変感謝しております。

また、今吉格教授（京都大学、生命科学研究所）は、今回の論文博士の審査の主査を引き受けていただき、申請手続きから博士論文の作成まで大変お世話になりました。また、京都大学ウイルス再生研究所影山研究室に在籍されていた頃には、樹立したマウスを分与していただいたり、研究内容について鋭い助言をいただいたり、様々な面で助けていただきました。大変感謝しております。

影山研究室、今吉研究室の方々にも大変お世話になりました。大塚俊之先生、小林妙子准教授（京都大学、生命科学研究所）には、様々な実験手法を教えていただき、また研究内容について相談にのっていただき、大変お世話になりました。下條博美助教（大阪大学、生命機能研究所）にはまだ研究のことをなにも知らない頃から実験方法や研究を進める上での考え方など様々なことを教えていただきました。山田真弓特定准教授（京都大学、医生物学研究所）には今回の学位論文の作成や普段の研究内容に関しても様々なご助言をいただきました。

最後に、長い間応援してくれた両親に深く感謝しております。

本学位論文は以下の論文に基づいて書かれたものである。

Maeda Y, Isomura A, Masaki T, Kageyama R. Differential cell-cycle control by oscillatory versus sustained Hes1 expression via p21. *Cell Rep.* 2023 May 30;42(5):112520. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112520. Epub 2023 May 17. PMID: 37200191.