DEPARTMENT OF CELL BIOLOGY LABORATORY OF GROWTH REGULATION

The research interest of this laboratory is to understand the molecular mechanism of cell differentiation and organogenesis. Particularly, we are interested in basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors that regulate mammalian neural development. We are characterizing their functions by misexpressing the genes with retrovirus and electroporation (gain-of-function study) and by generating knock-out mice (loss-of-function study). During neural development, the following steps occur sequentially: (1) maintenance of neural stem cells, (2) neurogenesis and (3) gliogenesis. Our results indicate that all three steps are regulated by bHLH genes. However, bHLH genes alone are not sufficient but homeodomain genes are additionally required for neuronal subtype specification. We are also interested in biological clocks that regulate embryogenesis. We have recently found that the bHLH genes *Hes1* and *Hes7* display oscillatory gene expression with two-hour periodicity and regulate the timing of the developmental processes.

1) Visualization of embryonic neural stem cells using Hes promoters in transgenic mice: T. OHTSUKA, I. IMAYOSHI, H. SHIMOJO, E. NISHI, R. KAGEYAMA and S.K. MCCONNELL

In the central nervous system, neural stem cells proliferate in the ventricular zone (VZ) and sequentially give rise to both neurons and glial cells in a temporally and spatially regulated manner, suggesting that stem cells may differ from one another in different brain regions and at different developmental stages. For the purpose of marking and purifying neural stem cells to ascertain whether such differences exist, we generated transgenic mice using promoters from Hes genes (pHes1 or pHes5) to drive expression of destabilized enhanced green fluorescent protein. In the developing brains of these transgenic mice, GFP expression was restricted to undifferentiated cells in the VZ, which could asymmetrically produce a Numb-positive neuronal daughter and a GFP-positive progenitor cell in clonal culture, indicating that they retain the capacity to self-renew. Our results suggest that pHes-EGFP transgenic mice can be used to explore similarities and differences among neural stem cells during development.

2) Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cell: Y. MASAMIZU, T. OHTSUKA, Y. TAKASHIMA, H. NAGAHARA, Y. TAKENAKA, K. YOSHIKAWA, H. OKAMURA, and R. KAGEYAMA

Notch signaling components such as the bHLH gene *Hes1* are cyclically expressed by negative feedback in the presomitic mesoderm (PSM) and constitute the somite segmentation clock.

Because Hes1 oscillation occurs in many cell types, this clock may regulate the timing in many biological systems. While the Hes1 oscillator is stable in the PSM, it damps rapidly in other cells, suggesting that the oscillators in the former and the latter could be intrinsically different. Here, we have established the real-time bioluminescence imaging system of Hes1 expression and found that, although the Hes1 oscillation is robust and stable in the PSM, it is unstable in the individual dissociated PSM cells, as in fibroblasts. Thus, the Hes1 oscillators in the individual PSM cells and fibroblasts are intrinsically similar, and these results, together with mathematical simulation, suggest that the cell-cell communication is essential not only for synchronization but also for stabilization of cellular oscillators.

3) *Hes1* and *Hes5* regulate development of the cranial and spinal nerve systems: J. HATAKEYAMA, S. SAKAMOTO, and R. KAGEYAMA

The bHLH genes *Hes1* and *Hes5*, known Notch effectors, regulate maintenance of neural stem cells and development of the central nervous system (CNS). In the absence of *Hes1* and *Hes5*, the size, shape and cytoarchitecture of the CNS are severely disorganized, but development of the peripheral nervous system remains to be analyzed. Here, we found that in *Hes1;Hes5* double-mutant mice, the cranial and spinal nerve systems are also severely disorganized. In these mutant mice, axonal projections from the mesencephalic neurons to the trigeminal (V) ganglion become aberrant and the proximal parts of the glossopharyngeal (IX) and vagus (X) nerves are fused. The hypoglossal (XII) nerve is also formed poorly. Furthermore, the dorsal root ganglia are fused with the spinal cord, and the dorsal and ventral roots of the spinal nerves are lacking in many segments. These results indicate that *Hes1* and *Hes5* play an important role in formation of the cranial and spinal nerve systems.

4) Temporal regulation of Cre recombinase activity in neural stem cells: I. IMAYOSHI, T. OHTSUKA, D.METZGER, P. CHAMBON, and R.KAGEYAMA

Neural stem cells are known to give rise to distinct subtypes of neurons and glial cells over time by changing their competency. However, precise characterization of neural stem cells at various developmental stages remains to be performed. For such analysis, a tool to manipulate neural stem cells at different time points is necessary. Here, we generated transgenic mice that express Cre-ER^{T2} in the ventricular zone of the developing nervous system under the control of the nestin promoter and enhancer (Nes-CreER^{T2}). In mice expressing Cre-ER^{T2} at appropriate levels, Cre recombinase activity was mostly inactive but efficiently activated by tamoxifen within one day. When such mice were crossed with the ROSA-26 or Z/EG reporter mice, neural stem cells were permanently labeled after administration of tamoxifen. Thus, Nes-CreER^{T2} mice offer a powerful

tool to manipulate neural stem cells genetically at desired time points.

5) Persistent and high levels of Hes1 expression regulate boundary formation in the developing central nervous system: J.H. BAEK, J. HATAKEYAMA, S. SAKAMOTO, T. OHTSUKA, and R. KAGEYAMA

The developing central nervous system is partitioned into compartments by boundary cells, which have different properties than compartment cells such as forming neuron-free zones, proliferating more slowly, and acting as organizing centers. We now report that the bHLH factor Hes1 is persistently expressed at high levels by boundary cells but at variable levels by non-boundary cells. Expression levels of Hes1 display an inverse correlation to those of the proneural bHLH factor Mash1, suggesting that down-regulation of Hes1 leads to up-regulation of Mash1 in non-boundary regions while persistent and high Hes1 expression constitutively represses Mash1 in boundaries. In agreement with this notion, in the absence of *Hes1* and its related genes *Hes3* and *Hes5*, proneural bHLH genes are ectopically expressed in boundaries, resulting in ectopic neurogenesis and disruption of the organizing centers. Conversely, persistent Hes1 expression in neural progenitors prepared from compartments blocks neurogenesis and reduces cell proliferation rates. These results indicate that the mode of Hes1 expression is different between boundary and non-boundary cells and that persistent and high levels of Hes1 expression constitutively repress proneural bHLH gene expression and reduce cell proliferation rates, thereby forming boundaries that act as the organizing centers.

6) High levels of Cre expression in neuronal progenitors cause defects in brain development leading to microencephaly and hydrocephaly: P.E. FORNI, C. SCUOPPO, I. IMAYOSHI, R. TAULLI, W. DASTRU, V. SALA, U.A.K. BETZ, P.MUZZI, D. MARTINUZZI, A.E. VERCELLI, R. KAGEYAMA, and C. PONZETTO

Hydrocephalus is a common and variegated pathology often emerging in newborn children after genotoxic insults during pregnancy (Hicks and D' Amato, 1980). Cre recombinase is known to have possible toxic effects that can compromise normal cell cycle and survival. Here we show, by using three independent nestin Cre transgenic lines, that high levels of Cre recombinase expression into the nucleus of neuronal progenitors can compromise normal brain development. The transgenics analyzed are the nestin Cre Balancer (Bal1) line, expressing the Cre recombinase with a nuclear localization signal, and two nestin CreERT2 (Cre recombinase fused with a truncated estrogen receptor) mice lines with different levels of expression of a hybrid CreERT2 recombinase that translocates into the nucleus after tamoxifen treatment. All homozygous Bal1 nestin Cre embryos displayed reduced neuronal proliferation, increased aneuploidy and cell death, as well as

defects in ependymal lining and lamination of the cortex, leading to microencephaly and to a form of communicating hydrocephalus. An essentially overlapping phenotype was observed in the two nestin CreERT2 transgenic lines after tamoxifen mediated-CreERT2 translocation into the nucleus. Neither tamoxifen-treated wild-type nor nestin CreERT2 oil-treated control mice displayed these defects. These results indicate that some forms of hydrocephalus may derive from a defect in neuronal precursors proliferation. Furthermore, they underscore the potential risks for developmental studies of high levels of nuclear Cre in neurogenic cells.

7) Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis: X. ZHU, J. ZHANG, J. TOLLKUHN, R. OHSAWA, E.H. BRESNICK, F. GUILLEMOT, R. KAGEYAMA, and M.G. RESENFELD

Mammalian organogenesis results from the concerted actions of signaling pathways in progenitor cells that induce a hierarchy of regulated transcription factors critical for organ and cell type determination. Here we demonstrate that sustained Notch activity is required for the temporal maintenance of specific cohorts of proliferating progenitors, which underlies the ability to specify late-arising cell lineages during pituitary organogenesis. Conditional deletion of *Rbp-J*, which encodes the major mediator of the Notch pathway, leads to premature differentiation of progenitor cells, a phenotype recapitulated by loss of the basic helix-loop-helix (bHLH) factor Hes1, as well as a conversion of the late (Pit1) lineage into the early (corticotrope) lineage. Notch signaling is required for maintaining expression of the tissue-specific paired-like homeodomain transcription factor, *Prop1*, which is required for generation of the Pit1 lineage. Attenuation of Notch signaling is necessary for terminal differentiation in post-mitotic Pit1+ cells, and the Notch-repressed Pit1 target gene, *Math3*, is specifically required for maturation and proliferation of the GH-producing somatotrope. Thus, sustained Notch signaling in progenitor cells is required to prevent conversion of the late-arising cell lineages to early-born cell lineages, permitting specification of diverse cell types, a strategy likely to be widely used in mammalian organogenesis.

8) Ectopic pancreas formation in *Hes1* knockout mice reveals plasticity of endodermal gut/bile duct/pancreatic progenitors: A. FUKUDA, Y. KAWAGUCHI, K. FURUYAMA, S. KODAMA, M. HORIGUCHI, T. KUHARA, M. KOIZUMI, D.F. BOYER, K. FUJIMOTO, R. DOI, R. KAGEYAMA, C.V.E. WRIGHT, and T. CHIBA

Ectopic pancreas is a developmental anomaly occasionally found in humans. Hes1, a main effector of Notch signaling, regulates the fate and differentiation of many cell types during development. To gain insights into the role of the Notch pathway in pancreatic fate determination, we combined the use of Hes1-knockout mice and lineage tracing employing the Cre/loxP system to

specifically mark pancreatic precursor cells and their progeny in Ptf1a-cre and Rosa26 reporter mice. We show that inactivation of Hes1 induces misexpression of Ptf1a in discrete regions of the primitive stomach and duodenum and throughout the common bile duct. All ectopic Ptf1a-expressing cells were reprogrammed, or transcommitted, to multipotent pancreatic progenitor status and subsequently differentiated into mature pancreatic exocrine, endocrine, and duct cells. This process recapitulated normal pancreatogenesis in terms of morphological and genetic features. Furthermore, analysis of Hes1/Ptf1a double mutants revealed that ectopic Ptf1a-cre lineage-labeled cells adopted the fate of region-appropriate gut epithelium or endocrine cells similarly to Ptf1a-inactivated cells in the native pancreatic buds. Our data demonstrate that the Hes1-mediated Notch pathway is required for region-appropriate specification of pancreas in the developing foregut endoderm through regulation of Ptf1a expression, providing novel insight into the pathogenesis of ectopic pancreas development in a mouse model.

LIST OF PUBLICATIONS Department of Cell Biology Laboratory of Growth Regulation

- Masamizu, Y., Ohtsuka, T., Takashima, Y., Nagahara, H., Takenaka, Y., Yoshikawa, K., Okamura, H., and Kageyama, R. (2006) Real-time imaging of the somite segmentation clock: revelation of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cell. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 103, 1313-1318.
- Ohtsuka, T., Imayoshi, I., Kageyama, R., and McConnell, S.K. (2006) Visualization of embryonic neural stem cells using Hes promoters in transgenic mice. **Mol. Cell. Neurosci.** 31, 109-122.
- Hatakeyama, J., Sakamoto, S., and Kageyama, R. (2006) *Hes1* and *Hes5* regulate development of the cranial and spinal nerve systems. **Dev. Neurosci.** 28, 92-101.
- Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Metzger, D., Chambon, P., and Kageyama, R. (2006) Temporal regulation of Cre recombinase activity in neural stem cells. **Genesis** 44, 233-238.
- 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.
- Hatakeyama, J., and Kageyama, R. (2006) *Notch1* expression is spatiotemporally correlated with neurogenesis and negatively regulated by *Notch1*-independent *Hes* genes in the developing nervous system. **Cerebral Cortex** 16, i132-i137.
- Ong, C., Cheng, H., Chang, L.W., Ohtsuka, T., Kageyama, R., Stormo, G.D., and Kopan, R. (2006) Target selectivity of vertebrate notch proteins: Collaboration between discrete domains and CSL-binding site architecture determines activation probability. J. Biol. Chem. 281,

5106-5119.

- Moriyama, M., Osawa, M., Mak, S.-S., Ohtsuka, T., Yamamoto, N., Han, H., Delmas, V., Kageyama, R., Beermann, F., Larue, L., and Nishikawa, S.-I. (2006) Notch signaling via *Hes1* transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. J. Cell Biol. 173, 333-339.
- Fukuda, A., Kawaguchi, Y., Furuyama, K., Kodama, S., Horiguchi, M., Kuhara, T., Koizumi, M., Boyer, D.F., Fujimoto, K., Doi, R., Kageyama, R., Wright, C.V.E., and Chiba, T. (2006) Ectopic pancreas formation in *Hes1* knockout mice reveals plasticity of endodermal gut/bile duct/pancreatic progenitors. J. Clin. Invest. 116, 1484-1493.
- Forni, P.E., Scuoppo, C., Imayoshi, I., Taulli, R., Dastru, W., Sala, V., Betz, U.A.K., Muzzi, P., Martinuzzi, D., Vercelli, A.E., Kageyama, R., and Ponzetto, C. (2006) High levels of Cre expression in neuronal progenitors cause defects in brain development leading to microencephaly and hydrocephaly. J. Neurosci. 26, 9593-9602.
- Zhu, X., Zhang, J., Tollkuhn, J., Ohsawa, R., Bresnick, E.H., Guillemot, F., Kageyama, R., and Rosenfeld, M.G. (2006) Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis. Genes & Dev. 20, 2739-2753.
- Liu, A., Li, J., Marin-Husstege, M., Kageyama, R., Fan, Y., Gelinas, C., and Casaccia-Bonnefil, P. (2006) A molecular insight of Hes5-dependent inhibition of myelin gene expression: old partners and new players. EMBO J. 25, 4833-4842.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., and Hatakeyama, J. (2006) Roles of Hes bHLH factors in neural development. In *Transcription Factors in the Nervous System* (Ed. G. Thiel). *Wiley-VCH Verlag, Weinheim.* Pp3-22.
- 影山龍一郎:発生をコントロールする生物時計. 医学のあゆみ、216:215-218.2006.
- 影山龍一郎: 幹細胞のシグナル伝達—bHLH 因子. 再生医療のための分子生物学: 再生医療の基礎シリーズ、3: 239-246. 2006.
- 影山龍一郎:短周期発現リズムを刻む遺伝子. 医学のあゆみ、219:663-668.2006.
- 大澤亮介、影山龍一郎:転写因子・転写制御キーワードブック: 57, 111, 145-146, 199-200, 272-273. 2006.
- 畠山淳、影山龍一郎: Hes 遺伝子群による神経幹細胞の維持―神経幹細胞の分化にブレー キをかける分子.実験医学、24: 162-168. 2006.
- Kageyama, R.: Roles of *Hes* bHLH genes in neural development. 7th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry. Singapore, 2006.
- Kageyama, R.: Roles of bHLH genes in neural development. 16th Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience. Banff, Canada, 2006.

- Kageyama, R.: Molecular mechanism of the somite segmentation clock. The 13th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research: From Genes to Therapeutics. Seoul, Korea, 2006.
- Kageyama, R.: Molecular mechanism of the somite segmentation clock. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Kyoto, 2006.
- Kageyama, R.: Roles of *Hes* genes in neural development. JBS International Symposium. Karuizawa, 2006.
- Kageyama, R.: Molecular mechanism of the somite segmentation clock. The 2nd International Symposium of the Institute Network. Kyoto, 2006
- Masamizu, Y., Ohtsuka, T., Takashima, Y., Nagahara, H., Takenaka, Y., Yoshikawa, K., Okamura, H. and Kageyama, R.: Real-time imaging of Hes1 oscillation and simulation of the somite segmentation clock. Notch signaling in vertebrate development and disease. Madrid, Spain, 2006.
- Imayoshi, I., Ohtsuka, T. and Kageyama, R.: Roles of *Hes* genes in development of cerebral cortex and choroids plexus. 16th Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience. Banff, Canada, 2006.
- Imayoshi, I., Ohtsuka, T. and Kageyama, R.: Temporal regulation of Cre recombinase activity in neural stem cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Kyoto, 2006.
- Masamizu, Y., Ohtsuka, T., Takashima, Y., Nagahara, H., Takenaka, Y., Yoshikawa, K., Okamura,
 H. and Kageyama, R.: Real-time imaging of Hes1 oscillation and simulation of the somite segmentation clock. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Kyoto, 2006.
- Takashima, Y., Masamizu, Y., Ohtauka, T., Yamada, S. and Kageyama, R.: Visualization of the segmentation clock by real-time imaging of Hes7 expression. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. Kyoto, 2006.
- 影山龍一郎:bHLH 因子 Hes1 による神経分化制御。第2回宮崎サイエンスキャンプ、宮崎、 2006.
- 影山龍一郎: Roles of the bHLH genes Hes1/Hes3/Hes5 in neural development. 第 83 回日本生 理学会大会、前橋、2006.
- 影山龍一郎: Hes bHLH 因子群による神経分化制御分子脳科学・タンパク 3000(脳・神経系)合同セミナー、大阪、2006.
- 影山龍一郎: Molecular mechanism of the somite segmentation clock. 数理分子生命理学専攻 第2回公開シンポジウム「生命科学と数理科学の融合」、広島、2006.
- 影山龍一郎:短周期遺伝子発現リズムと形態形成。第39回日本発生生物学会大会、広島、 2006.
- 丹羽康貴、正水芳人、中尾和貴、本庶佑、Deng Chu-Xia、影山龍一郎: Hes7 オシレーショ

ンを制御する新たな分子メカニズム。日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋、2006. Imayoshi, I., Ohtsuka, T. and Kageyama, R.: Patterning of the dorsal telencephalic midline by bHLH transcriptional factors. 日本分子生物学会2006フォーラム、名古屋、2006.

畠山淳、Baek Joung-Hee、影山龍一郎:神経上皮の区画分けをする境界細胞の形成・維持 についてーbHLH 型転写因子 Hes1 による境界の形成・維持の制御。日本分子生物学会 2006 フォーラム、名古屋、2006.

吉浦茂樹、大塚俊之、武仲能子、長原寛樹、吉川研一、影山龍一郎: Stat、Smad および Notch シグナリングは培養細胞において2時間周期でオシレーションする。日本分子 生物学会 2006 フォーラム、名古屋、2006. 細胞生物学部門 増殖制御学分野

当研究室には、平成18年4月から医学研究科博士課程1年の丹羽康貴と修士課程1年の 松永充博が、5月から医学研究科博士課程3年(耳鼻科)の楯谷智子が、8月からポスド クとしてスペイン出身のAitor Gonzalez が、また10月から技術職員として野村安記が新 たに加わった。さらに、秘書の西島千登勢の後任に玉尾麻衣子がきた。一方、医学研究科 の阪田良一は博士課程を終え、生命科学研究科のBaek Joung-Hee は研究員としてソウルに もどった。

5月に、正水はスペイン・マドリッドで開かれた Notch ミーティングで発表した。また、 6月には影山、正水、今吉、高嶋が京都で開かれた第 20 回 IUBMB 大会で発表した。8月に は、影山と今吉はカナダ・バンフで開催された第 16 回国際発生神経科学会大会に参加し、 発表・討論を行った。12月には、吉浦、今吉、丹羽は名古屋で開かれた日本分子生物学会 2006フォーラムに参加し、発表・討論を行った。また、7月下旬~9月上旬にトルコから Seda Yerlikaya が来日し、summer student として研究を行った。Seda や Aitor の来日を きっかけに研究室内のミーティングは英語で行うことになった。

当研究室のテーマは、哺乳動物の発生過程を転写因子のレベルで明らかにするというもので、方法としては主としてレトロウイルスやエレクトロポレーションによる強制発現実験とノックアウトマウスを用いた機能喪失実験を行っている。転写因子の中でも塩基性領域- ヘリックス・ループ・ヘリックス構造を持つ因子(bHLH 因子)に注目しており、抑制性bHLH 因子 Hes および促進性 bHLH 因子 Math や Mash などを解析している。また、Hes1 や Hes7は2時間周期の生物時計として機能するが、その分子機構や役割については不明の点が多く、今後探っていく予定である。



図:神経系は境界(boundary)によって幾つものコンパートメントに区切られる。 Hes1 の 発現は、境界では高レベルで持続するが、コンパートメントではダイナミックに変化して いる。Hes1 が高レベルで持続発現すると神経分化や細胞増殖が抑制される。 (1) Hes プロモーターを利用した胎仔神経幹細胞の可視化

発生途中の中枢神経系では、脳室周囲層に存在する神経幹細胞は、増殖しつつ、異なっ た種類のニューロンとグリア細胞を順番に産生する。このことから、神経幹細胞は時間と ともにその性質を変えていると考えられているが、詳細についてはよくわかっていない。 今回、神経幹細胞の同定を容易にするために、Hes1 あるいは Hes5 プロモーターから不安 定化 EGFP を発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスの胎仔の脳では、 EGFP の発現は脳室周囲層に存在する未分化細胞に限局して見られた。また、この EGFP 陽 性細胞を分散培養したところ、Numb 陽性細胞と Numb 陰性細胞とに非対称分裂した。Numb 陽性細胞はニューロンに分化し、Numb 陰性細胞は Hes の発現を維持したままで未分化であ った。以上の結果から、Hes1 あるいは Hes5 プロモーターを用いて可視化した細胞は、大 部分が神経幹細胞であることが示された。今後、この可視化システムを用いて、神経幹細 胞の遺伝子発現動態を解析する予定である。(医学研究科・大塚俊之)

(2)分節時計のリアルタイム・イメージング

bHLH 因子 Hes1 のような Notch シグナル分子は、未分節中胚葉においてネガティブフィ ードバックを介して周期的な発現変動(オシレーション)を示し、分節時計を構成してい る。また、Hes1 オシレーションはその他の細胞でも幅広くみられ、多くの細胞で生物時計 として機能すると考えられている。しかし、未分節中胚葉における Hes1 オシレーションは 安定に持続するのに対して、その他の細胞ではHes1 オシレーションは持続せず、すぐに定 常状態になる。このことから、未分節中胚葉の Hes1 オシレーターはその他の細胞の Hes1 オシレーターとは異なった機序で発現変動することが示唆されている。今回、Hes1プロモ ーター下にルシフェラーゼ遺伝子をつないだものをレポーターとして用いることによって、 Hes1の発現をリアルタイムで可視化することに成功した。その結果、Hes1は未分節中胚葉 では安定なオシレーションを示すが、分散培養した未分節中胚葉の個々の細胞では不安定 なオシレーションしか示さなかった。この不安定なオシレーションは、線維芽細胞のそれ とよく似ていた。このことから、未分節中胚葉の個々の細胞は他の細胞と同じような不安 定な Hes1 オシレーターしか持っていないことが明らかとなり、安定なオシレーションには 細胞間相互作用が重要なことが示唆された。また、数理モデルを用いることによって、不 安定なオシレーター同士を相互作用させて安定なオシレーターをつくることがシミュレー ションできた。(医学研究科・正水芳人)

(3) 神経幹細胞における Cre リコンビナーゼ活性の時間的制御

神経幹細胞は、発生の進行とともにコンピテンシーを変えて異なるサブタイプのニュー ロンやグリア細胞を生み出す。しかし、いろいろな時期の神経幹細胞の性質についてはよ くわかっていない。そこで、神経幹細胞をいろいろなステージで遺伝子操作するための新 しい方法を開発した。タモキシフェン投与によってリコンビナーゼ活性が賦活化される CreER^{T2}を Nestin プロモーターおよびエンハンサー下で発現するトランスジェニックマウ ス(Nes-CreER¹²マウス)を作製した。このマウスにタモキシフェンを投与すると、1日以内に神経幹細胞でCreリコンビナーゼ活性が得られた。また、このマウスとROSA-26やZ/EGレポーターマウスと掛け合わせたところ、タモキシフェン投与で神経幹細胞が特異的にラベルされた。以上の結果から、Nes-CreER¹²マウスはいろいろな時期の神経幹細胞の遺伝子操作を可能にする強力なツールになることが示された。(生命科学研究科・今吉格)

(4) 持続的で高レベルな Hes1 の発現が中枢神経系の境界形成を制御する

発生途中の神経系は、境界構造によっていくつものコンパートメントに区切られている。 コンパートメント内の領域特異的な細胞分化は、境界細胞から分泌されるモルフォゲンに よって制御される。境界は特殊な放射状グリア細胞により構成されるが、コンパートメン ト内の放射状グリア細胞に比べて一般に増殖能が低く、またニューロンにも分化しないこ とが知られている。しかしながら、コンパートメントと境界の構成細胞の性質の差を決め る分子機構についてはよくわかっていなかった。そこで、Hes1の発現を解析したところ、 コンパートメント内の放射状グリア細胞ではHes1の発現量は変化しており、オシレーショ ンする可能性が示唆された。また、Hes1の発現が低下した細胞ではプロニューラル遺伝子 Mash1の発現がみられ、ニューロンに分化しつつあると考えられた。一方、境界内の放射 状グリア細胞では常に高レベルに Hes1 が発現しており、プロニューラル遺伝子の発現はま ったく見られなかった。しかし、Hes1;Hes3;Hes5 欠損マウスでは、境界においてプロニュ ーラル遺伝子が発現し異所性のニューロン分化が起こるとともに、モルフォゲンの発現が 消失あるいは低下した。また、隣接する 0tx2 陽性のコンパートメントと Gbx2 陽性のコン パートメントが一部癒合していた。すなわち、Hesを欠損すると、境界は形成されないか、 形成されても維持されないことが示された。逆に、コンパートメントの細胞に Hes1 を持続 発現させるとニューロン分化が抑制されるとともに、細胞増殖能が低下した。以上の結果 から、Hes1の発現が高レベルで持続すると増殖能やニューロンへの分化能が抑制されて境 界細胞としての性質を獲得すること、一方、コンパートメント内の放射状グリア細胞が高 い増殖能を維持するにはHes1の発現が持続しないこと(おそらくオシレーションするこ と)が必要であることが示された。(生命科学研究科・Baek Joung-Hee)