

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 found that the bHLH genes *Hes1* and *Hes7* display oscillatory expression with two-hour periodicity and regulate the timing of developmental processes. In addition, we have recently revealed the structural and functional significance of continuous neurogenesis in the adult brain.

1) *Mash1* is required for enteroendocrine cell development in the glandular stomach: H. KOKUBU, T. OHTSUKA and R. KAGEYAMA

In the epithelium of the developing glandular stomach, neuroendocrine cells differentiate from common progenitors, but the mechanism of how these cells are specified remains to be determined. Here, we show that the basic helix-loop-helix (bHLH) gene *Mash1* is highly expressed in the glandular stomach epithelium. In *Mash1*-null mice, almost all gastric neuroendocrine cells are missing, whereas development of non-neuroendocrine cells is not significantly affected. The bHLH gene *Neurogenin3* (*Ngn3*), which is known to regulate formation of subsets of gastric neuroendocrine cells (gastrin-, glucagon-, and somatostatin-producing cells), is expressed normally in the *Mash1*-null stomach. Thus, *Ngn3* alone is not sufficient but *Mash1* is additionally required for differentiation of these neuroendocrine cells. Taken together, these results indicate that formation of gastrin-, glucagon-, and somatostatin-producing cells depends on both *Mash1* and *Ngn3*, while that of other neuroendocrine cells depends on *Mash1* alone, suggesting that combinations of bHLH genes may contribute to cell type diversity.

2) Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors: H. SHIMOJO, T. OHTSUKA and R. KAGEYAMA

Expression of the Notch effector gene *Hes1* is required for maintenance of neural progenitors in the embryonic brain, but persistent and high levels of *Hes1* expression inhibit

proliferation and differentiation of these cells. Here, by using a real-time imaging method, we found that *Hes1* expression dynamically oscillates in neural progenitors. Furthermore, sustained overexpression of *Hes1* down-regulates expression of proneural genes, Notch ligands and cell cycle regulators, suggesting that their proper expression depends on *Hes1* oscillation. Surprisingly, the proneural gene *Neurogenin2* (*Ngn2*) and the Notch ligand *Delta-like1* (*Dll1*) are also expressed in an oscillatory manner by neural progenitors, and inhibition of Notch signaling, a condition known to induce neuronal differentiation, leads to down-regulation of *Hes1* and sustained up-regulation of *Ngn2* and *Dll1*. These results suggest that *Hes1* oscillation regulates *Ngn2* and *Dll1* oscillations, which in turn lead to maintenance of neural progenitors by mutual activation of Notch signaling.

3) Requirement of multiple lysine residues for the transcriptional activity and the instability of Hes7: A.ISHII, T. KOBAYASHI and R. KAGEYAMA

The basic helix-loop-helix (bHLH) gene *Hes7* is expressed in an oscillatory manner and regulates the periodic somite formation. Oscillatory expression of *Hes7* depends on negative feedback and rapid degradation of the gene products, but the precise mechanisms of how the transcriptional activity and the degradation of Hes7 protein are regulated remain to be analyzed. Here, we found that lysine residues (K22, K52 and K55) in the bHLH domain are essential not only for the instability of Hes7 protein but also for the transcriptional repressor activity. Introduction of lysine-to-arginine mutations into the bHLH domain led to stabilization of Hes7 protein and to abnormalities in either the N box-binding activity or partner preference in heterodimer formation. These results indicate that common amino acid residues are involved in both the transcriptional repressor activity and the instability of Hes7 protein, suggesting of a critical link between the transcription and degradation control.

4) Hes genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline: I. IMAYOSHI, T. SHIMOGORI, T. OHTSUKA and R. KAGEYAMA

The choroid plexus in the brain is unique because it is a non-neural secretory tissue. It secretes the cerebrospinal fluid and functions as a blood-brain barrier, but the precise mechanism of specification of this non-neural tissue has not yet been determined. Using mouse embryos and lineage-tracing analysis, we found that the prospective choroid plexus region initially gives rise to Cajal-Retzius cells, specialized neurons that guide neuronal migration. Inactivation of the bHLH repressor genes *Hes1*, *Hes3* and *Hes5* up-regulated expression of the proneural gene *Neurogenin2* (*Ngn2*) and prematurely depleted Bmp-expressing progenitor cells, leading to enhanced formation of Cajal-Retzius cells and complete loss of choroid plexus epithelial cells. Overexpression of *Ngn2*

had similar effects. These data indicate that *Hes* genes promote specification of the fate of choroid plexus epithelial cells rather than the fate of Cajal-Retzius cells by antagonizing *Ng2* in the dorsal telencephalic midline region, and thus this study has identified a novel role for bHLH genes in the process of deciding which cells will have a non-neural versus a neural fate.

5) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain: I. IMAYOSHI, M. SAKAMOTO, T. OHTSUKA, K. TAKAO, T. MIYAKAWA, M. YAMAGUCHI, K. MORI, T. IKEDA, S. ITOHARA and R. KAGEYAMA

Neurogenesis occurs continuously in the forebrain of the adult mammals, but the functional significance of adult neurogenesis is still unclear. Here, using a genetic labeling method, we show that in adult mice, continuous neurogenesis results in replacement of the majority of granule neurons in the olfactory bulb and significant addition of granule neurons to the hippocampal dentate gyrus. Strikingly, genetic ablation of newly formed neurons in adult mice leads to gradual decrease of the granule cell number in the olfactory bulb, inhibition of increases in the granule cell number in the dentate gyrus, and impairment of behaviors in contextual and spatial memory, which is known to be involved in hippocampus. These results suggest that continuous neurogenesis is required for maintenance and reorganization of the whole system in the olfactory bulb, modulation and refinement of the existing neuronal circuits in the dentate gyrus, and normal behaviors involved in hippocampal-dependent memory.

6) Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition: R. KAGEYAMA, T. OHTSUKA, H. SHIMOJO and I. IMAYOSHI

In the developing mammalian nervous system, neural progenitor cells first express the Notch effector *Hes1* at variable levels and then proneural genes and Notch ligands in salt-and-pepper patterns. Recent real-time imaging analysis indicates that *Hes1* expression in these cells oscillates with a period of about 2-3 hours. Furthermore, the proneural gene *Neurogenin2* (*Ng2*) and the Notch ligand *Delta-like1* (*Dll1*) are expressed cyclically in neural progenitor cells under the control of *Hes1* oscillation but are expressed continuously in postmitotic neurons, which lose *Hes1* expression. *Hes1*-driven *Ng2* and *Dll1* oscillations seem to be advantageous for maintenance of a group of cells in an undifferentiated state by mutual activation of Notch signaling. This dynamic mode of gene expression would require a revision of the traditional view of how Notch-mediated lateral inhibition operates in the developing mammalian nervous system.

7) Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors: R.

OHSAWA and R. KAGEYAMA

Retinal cell fate specification is strictly regulated by multiple transcription factors. Regarding regulation of cell proliferation and differentiation, basic helix-loop-helix (bHLH) type repressors and activators function in an antagonistic manner. Repressor-type bHLH factors maintain retinal progenitor cells, whereas activator-type bHLH factors promote neuronal cell fate determination. However, bHLH genes alone are not sufficient for acquiring proper neuronal subtype identity. Recent findings have shown that retinal cell fate specification is regulated by combinations of bHLH and homeobox genes. It is conceivable that homeobox genes confer positional identity whereas bHLH genes regulate neuronal determination and differentiation. Moreover, it has been shown that bHLH genes implicated in retinal cell fate determination regulate expression of other bHLH genes, implying that there is a complicated transcription network regulating retinal development.

LIST OF PUBLICATIONS

Department of Cell Biology

Laboratory of Growth Regulation

- Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008) Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron* 58, 52-64.
- Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., Takao, K., Miyakawa, T., Yamaguchi, M., Mori, K., Ikeda, T., Itohara, S., and Kageyama, R. (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neurosci.* 11, 1153-1161.
- Imayoshi, I., Shimogori, T., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008) Hes genes and neurogenin regulate non-neural versus neural fate specification in the dorsal telencephalic midline. *Development* 135, 2531-2541.
- Kokubu, H., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2008) *Mash1* is required for enteroendocrine cell development in the glandular stomach. *Genes Cells* 13, 41-51.
- Ishii, A., Kobayashi, T., and Kageyama, R. (2008) Requirement of multiple lysine residues for the transcriptional activity and the instability of Hes7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 142-146.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H., and Imayoshi, I. (2008) Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nature Neurosci.* 11, 1247-1251.
- Ohsawa, R., and Kageyama, R. (2008) Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain Res.* 1192, 90-98.
- Kageyama, R. Ohtsuka, T., and Kobayashi, T. (2008) The roles of *Hes* genes in neural development.

Dev. Growth Diff. 50, S97-S103

- Hojo, M., Kita, A., Kageyama, R., and Hashimoto, N. (2008) Notch-Hes signaling in pituitary development. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* 3, 91-100.
- Nakayama, K., Satoh, T., Igari, A., Kageyama, R., and Nishida, E. (2008) FGF induces oscillations of *Hes1* expression and Ras/ERK activation. *Curr. Biol.* 18, R332-R334.
- Nakamura, T., Ohtsuka, T., Sekiyama, E., Cooper, L.J., Kokubu, H., Fullwood, N.J., Barrandon, Y., Kageyama, R., and Kinoshita, S. (2008) *Hes1* Regulates Corneal Development and the Function of Corneal Epithelial Stem/progenitor Cells. *Stem Cells* 26, 1265-1274.
- Hu, X., Chung, A.Y., Wu, I., Foldi, J., Chen, J., Ji, J.D., Tateya, T., Kang, Y.J., Han, J., Gessler, M., Kageyama, R., and Ivashkiv, L.B. (2008) Integrated regulation of Toll-like receptor responses by Notch and interferon- γ pathways. *Immunity* 29, 691-703.
- Kinameri, E., Inoue, T., Aruga, J., Imayoshi, I., Kageyama, R., Shimogori, T., and Moore, A.W. (2008) *Prdm* proto-oncogene transcription factor family expression and interaction with the notch-hes pathway in mouse neurogenesis. *PLoS ONE* 3, e3859.

影山龍一郎、小林妙子：bHLH 因子 *Hes1* による神経分化制御。蛋白質核酸酵素、53： 318-323. 2008.

影山龍一郎：脳形成を制御する転写因子ネットワーク。脳と発達、40： 204-207. 2008.

影山龍一郎：神経発生を制御する転写因子ネットワーク。神経研究の進歩、60： 329-333. 2008.

下條博美：神経幹細胞の未分化性を Notch シグナルのつくるリズムが維持。Medical Bio、5： 12-13. 2008.

Kageyama, R.: Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. 2nd International Congress on Stem Cells and Tissue Formation. Dresden, Germany, July 6-9, 2008.

Kageyama, R.: Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitor cells. 18th International Congress of Eye Research, Beijing, China, Sept 24-29, 2008.

Kageyama, R.: Oscillations in Notch signaling regulate proliferation and differentiation of neural progenitor cells. 9th International Congress on Cell Biology, Seoul, Korea, Oct 7-10, 2008.

Kageyama, R.: Oscillations in Notch signaling regulate proliferation and differentiation of neural progenitor cells. 11th Kyoto University International Symposium, Shanghai, China, Oct 9-11, 2008.

Kageyama, R.: Ultradian oscillations in somite segmentation and other events. The Uehara

Memorial Foundation Symposium, Tokyo, June 30-July 2, 2008.

Takashima, Y., Ohtsuka, T., and Kageyama, R.: Visualization of the segmentation clock by real-time imaging of *Hes7* expression. 15th East Asia Joint Conference on Biomedical Research, Seoul, Korea, July 20-23, 2008.

Kobayashi, T.: Oscillatory expression of *Hes1* in mouse embryonic stem cells. 3rd International Symposium of the Institute Network. Oita, Feb 1-2, 2008.

Takashima, Y., Miyachi, H., Gonzalez, A.G., Ohtsuka, T., and Kageyama, R.: Intron delays are essential for *Hes7* oscillations in the somite segmentation clock. Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology, Sept 13-17, 2008.

Niwa, Y., Masamizu, Y., Liu, T., Nakayama, R., Deng, C.-X., and Kageyama, R.: The initiation and propagation of *Hes7* oscillation are cooperatively regulated by Fgf and Notch signaling in the somite segmentation clock. Joint Meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology, Sept 13-17, 2008.

影山龍一郎：発生過程における短周期遺伝子発現リズム。東北大学・加齢医学研究所・ゲノムリサーチセンター・ワークショップ、仙台、2008。

影山龍一郎：短周期遺伝子発現リズムの動作原理と生物学的意義。第4回ゲノムネットワークプロジェクト公開シンポジウム、東京、2008。

影山龍一郎：Uladian oscillations in somite segmentation and other events. 第3回Notch研究会、三島、2008。

影山龍一郎：神経幹細胞の維持を制御する分子機構。第1回Retina Research Meeting、東京、2008。

影山龍一郎：神経幹細胞の維持を制御する分子機構。第38回日本免疫学会総会・学術集会、京都、2008。

影山龍一郎：成体脳の神経幹細胞とニューロン新生。第4回新適塾「脳と心の神秘に迫る」、大阪、2008。

下條博美：Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. 発生生物学会サマースクール2008、長野、2008。

丹羽康貴：分節時計からみた体節形成の分子メカニズム。発生生物学会サマースクール2008、長野、2008。

下條博美、大塚俊之、影山龍一郎：Notch シグナルのオシレーションによって神経前駆細胞の維持が制御される。第6回幹細胞シンポジウム、東京、2008。

Gonzalez, A., and Kageyama, R.: Modeling of the *Hes7* regulation by the Fgf and Notch pathways during the mouse somitogenesis. 第41回日本発生生物学会、徳島、2008。

Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R.: Oscillations in Notch signaling regulate maintenance

of neural progenitors.第 31 回日本神経科学会、東京、2008.

当研究室には、平成 20 年 4 月からマレーシア出身の Tan Siok Lay が医学研究科博士課程 1 年に、播磨有希子が生命科学研究科修士課程 1 年に入学した。また、4 月から西田佳代がテクニシャンとして、6 月から医学部 4 年の和泉清隆が自主研究生として加わった。一方、医学研究科博士課程の石井章子、國分寛司、正水芳人は 3 月に卒業し、生命科学研究科修士課程の劉天暁は 10 月からオーストリア・ウィーンの IMP に留学した。6 月～9 月には、コロンビアから Andres Hurtado が来日し、summer student として研究を行った。また、11 月にはポルトガルから Fernanda Bajanca が共同研究のため来日し、約 2 週間滞在した。影山は、6 月には米国アシロマの ISDN meeting に、7 月にはドイツ・ドレスデンの Stem Cell Congress に、9 月には北京での国際眼学会に、10 月にはソウルの国際細胞生物学会および上海での第 11 回京都大学国際シンポジウムに参加し、発表を行った。高嶋は 7 月にソウルでの東アジアシンポジウムに、また、高嶋と丹羽は 9 月にフランスでの日仏合同発生生物学会に参加し、発表を行った。その他、教室員の多くが、発生生物学会（徳島）、神経科学会（東京）、BMB2008（神戸）等の多数の国内学会で発表した。

当研究室のテーマは、哺乳動物の細胞分化過程を転写因子のレベルで明らかにするというもので、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、特に抑制性 bHLH 因子 Hes を中心に解析している。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。

また、本年は、以下に記すようにいくつかの重要な研究成果をあげることができた。そのうちの 2 つの論文に関しては、Neuron 誌と Nature Neuroscience 誌の表紙を飾った。

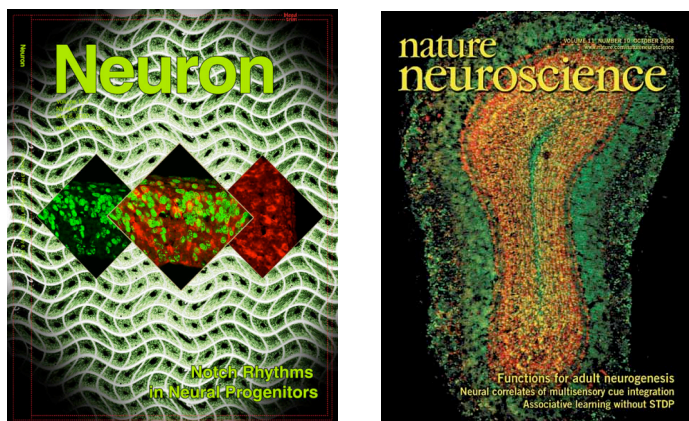


図: (左側) 神経幹細胞における Hes1 や Notch シグナル分子の発現オシレーションの意義を解明し、Neuron 誌の表紙を飾った。(右側) 成体脳におけるニューロン新生の意義を解明し、Nature Neuroscience 誌の表紙を飾った。

(1) 腺胃の内分泌細胞形成に Mash1 が必要

腺胃の上皮では、前駆細胞から内分泌細胞やその他の細胞が分化するが、その細胞分化制御機構はよくわかっていない。腺胃の上皮に bHLH 因子 Mash1 が高レベルに発現していたので、Mash1 欠損マウスにおける腺胃上皮の発生を解析した。その結果、Mash1 欠損マウスでは、腺胃上皮の内分泌細胞がほぼ完全に欠損していたが、それ以外の細胞は正常に形成されていた。腺胃の内分泌細胞のうち、ガストリン、グルカゴン、ソマトスタチン産生細胞の形成は bHLH 因子 Neurogenin3 に依存することが以前報告されていたが、Mash1 欠損マウスでは Neurogenin3 が正常に発現するにも関わらず、ガストリン、グルカゴン、ソマトスタチン産生細胞が欠損していた。以上から、内分泌細胞のうち、ガストリン、グルカゴン、ソマトスタチン産生細胞は Neurogenin3 だけでなく、Mash1 にも依存すること、それ以外の内分泌細胞は Neurogenin3 ではなく、Mash1 にのみ依存することが明らかになった。これらの結果から、bHLH 因子の組み合わせが内分泌細胞のサブタイプ決定に関与することが示唆された。(医学研究科・國分寛司)

(2) Notch シグナル系の発現振動が神経前駆細胞の維持を制御

Notch シグナルのエフェクターである bHLH 型転写抑制因子 Hes1 は胎児脳の神経前駆細胞の維持に必要であるが、高レベルで Hes1 を持続発現させると、神経前駆細胞の増殖と分化が抑制される。Hes1 は未分節中胚葉や様々な培養細胞でネガティブフィードバックによって発現が増減（オシレーション）することがわかっている。神経前駆細胞における Hes1 の発現動態を明らかにするために、単一細胞レベルでリアルタイムに可視化を行った。ユビキチンを付加して半減期を短くした不安定化ルシフェラーゼを Hes1 プロモーター下につないだレポーターを用いて Hes1 の発現動態を解析したところ、神経前駆細胞では Hes1 の発現がオシレーションしていた。さらに、Hes1 の下流因子であるプロニューラル遺伝子 Neurogenin2 (Ngn2) や Notch リガンド Delta-like1 (Dl11) の発現が Hes1 の発現と負の相関を示すこと、また、Ngn2 と Dl11 の発現が神経前駆細胞ではオシレーションしているが、Hes1 の発現を失いニューロンに分化を始めた細胞では持続的に起こっていることが明らかになった。以上の結果から、Hes1 オシレーションによって Ngn2 および Dl11 のオシレーションが惹起され、神経前駆細胞は相互に Dl11-Notch シグナルを刺激しあって細胞を未分化状態に維持するという可能性が示唆された。また、Ngn2 は持続的に発現するとニューロンへの分化を引き起こすが、発現がオシレーションする場合はニューロンに分化せず、むしろ Notch を活性化しあって神経前駆細胞の維持に働くと考えられた。(医学研究科・下條博美)

(3) Hes7 蛋白の転写抑制活性と不安定性には共通のリジン残基が関与

bHLH 因子 Hes7 は発現が振動（オシレーション）し、周期的な体節形成を制御する。この発現オ

シレーションは、Hes7 が自身の発現を抑制するネガティブフィードバックと Hes7 遺伝子産物の迅速な分解に依存するが、Hes7 蛋白の転写抑制活性と不安定性がどのように制御されているのかは、よくわかっていない。点変異を導入した Hes7 蛋白の機能解析の結果、bHLH ドメイン内に存在する 22 番目、52 番目、および 55 番目のリジン残基が、転写抑制活性だけでなく、不安定性にも重要であることがわかった。それぞれのリジン残基をアルギニンに置換する点変異を作製したところ、いずれも安定になり、転写抑制活性を失っていた。すなわち、共通のアミノ酸残基が蛋白の安定性と転写抑制活性の両方に関与することが明らかになり、蛋白安定性と転写抑制活性の制御に共通の分子機構が存在する可能性が示唆された。(医学研究科・石井章子)

(4) Hes と Neurogenin は終脳背側中央部において神経細胞と脈絡叢細胞の運命決定を制御

脳の脈絡叢は non-neural な分泌組織であるという点で独特である。脈絡叢は脳脊髄液を分泌し、脳血管関門として機能する、しかし、この non-neural な組織が運命決定される詳細な機序は、未だ明らかになっていない。マウスの胎仔と細胞運命追跡実験を行う事で、脈絡叢予定領域は、初めはニューロンの細胞移動を制御する Cajal-Retzius 細胞を産生する事を発見した。bHLH 抑制因子である Hes1、Hes3、および Hes5 を不活性化すると、proneural 遺伝子である Neurogenin2 (Ngn2) の発現が上昇し、Bmp を発現する前駆細胞が枯渇し、Cajal-Retzius 細胞が過剰産生され、脈絡叢上衣細胞が完全に欠損した。Ngn2 を過剰発現させると同様の効果が見られた。これらの結果から、dorsal telencephalic midline 領域において、Hes 遺伝子群は、Ngn2 の発現を抑制する事で Cajal-Retzius 細胞ではなく、脈絡叢上衣細胞の運命決定を促進することが示唆された。本研究は、どの細胞が non-neural もしくは neural の運命をたどるかという運命決定過程における bHLH 遺伝子群の新規の役割を明らかにした。(生命科学研究科・今吉格)

(5) 成体脳の構造と機能における恒常的ニューロン新生の役割

哺乳動物の成体の前脳においては、ニューロン新生が恒常的に起きている、しかし、成体脳におけるニューロン新生の機能的な重要性は未だ不明である。本論文では、遺伝学的標識法を用いて、成体マウスの脳におけるニューロン新生を長期間モニターした。その結果、恒常的にニューロン新生が起こることで、嗅球においては顆粒細胞の大部分が新生ニューロンにより置き換えられているが、ニューロンの総数には大きな変化が無いこと、一方、海馬・歯状回においては顆粒細胞の追加が起きており、ニューロンの総数が増加することを発見した。成体マウスにおいて新生ニューロンを遺伝学的に除去すると、嗅球では顆粒細胞の数が経時的に減少して組織が空洞化すること、海馬では顆粒細胞の総数の増加が阻害されて、海馬依存的な状況記憶や空間記憶の低下が見られることが明らかになった。これらの結果は、恒常的なニューロン新生は、嗅球では介在ニューロンシステムの維持と再構築に、海馬では既存の神経回路の修飾と洗練に必要であり、さらには、海馬依存的な記

憶・学習に必須であることを示している。(生命科学研究科・今吉格)