

Title	脳の肥大化機構の解明
Sub Title	Mechanisms of brain enlargement
Author	仲嶋, 一範(Nakajima, Kazunori)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2021
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>哺乳類大脳皮質神経細胞は脳室に面した脳室帯、もしくはそれと隣接する脳室下帯で産生される。進化過程でヒトが巨大脳を獲得した主要な要因の一つは脳室下帯で分裂する神経幹細胞の増加であると考えられている。本研究課題ではその分子メカニズムの解明を目標として、その責任遺伝子の候補としてJA1を同定し、ヒト進化過程でJA1の発現強度が増強したことが、脳室帯からの脳室下帯神経幹細胞の産生増加をもたらした可能性を示唆した。すなわち(1)ヒトとマウスのJA1遺伝子の5kbp上流～1.5kbp下流の配列において、ヒトの配列はマウスよりも強い転写活性を示すこと、(2)その違いをもたらす責任領域として、下流側の特にexon #2周辺の配列が重要であること、(3) exon #1からintron #2の最初の約800bpの領域において、ヒトではG-C対が集積しており、大きなCpGアイランドを形成すること、(4)ヒトJA1転写調節領域でマウスJA1を発現するプラスミドを子宮内電気穿孔法によりマウス胎仔脳に導入すると、脳室下帯において外来JA1が強く発現し、その周囲において神経幹細胞のマーカー (Pax6) を異所性に発現させることが確認された。CpGアイランドは転写因子を多く結合させ、その遺伝子の転写を制御する。そこでさらにCpGアイランド内の配列に注目し、ヒトとマウスで結合モチーフが変化した転写因子を生物情報学的に探索した。その中の一つとしてCT遺伝子が同定された。この転写因子の結合モチーフはマウスではCpGアイランド内に1つだけだが、ヒトでは3カ所見つかった。CT遺伝子のハプロ不全は知的障害を伴う小頭症を発症し、さらに患者血清のRNA-seqによりJA1遺伝子発現の有意な減少が観察されていることから、JA1遺伝子の直接の上流因子としてCTが重要な候補と考えられた。そこで、この遺伝子のノックダウンベクターを子宮内電気穿孔法によりマウス胎仔脳に導入した結果、ヒトJA1転写調節領域の転写活性が低下することがガリシフェラーゼ解析により観察された。以上の結果から、CT遺伝子はヒトJA1遺伝子の転写活性を促進させる働きを持つことが示唆された。</p> <p>During development of mammalian brains, cortical neurons are produced from the ventricular zone (VZ) lining the lateral ventricles or adjacent subventricular zone (SVZ). One of the main factors that enable the human brain enlargement during evolution is thought to be the increase in the number of neural stem cells within the SVZ. In the aim of understanding its molecular mechanisms, we have identified JA1 as a candidate gene in this research project, and suggested the possibility that the elevated expression level of JA1 during the human evolution has led to the increase of neural stem cells in the SVZ. More specifically, (1) human JA1 genomic sequence encompassing upstream 5 kbp and downstream 1.5 kbp from the transcription start site had stronger transcriptional activity than the mouse sequence, (2) the responsible region for the species-specific difference in the transcriptional activity was found in the downstream sequence (from exon #1 to intron #2), (3) in this region, G-C pairs were enriched and formed a large CpG island in human, (4) introduction of a mouse JA1 expression vector under the control of the human JA1 transcription regulatory region using in utero electroporation induced ectopic Pax6-positive cells, a marker for neural stem cells, in the SVZ. Further, we bioinformatically searched for the transcription factors whose predicted binding sites were found in the human CpG island and not in the mouse homologous region. Among them, we identified the CT gene. We found 2 human specific predicted binding sites of the CT. It has been reported that haploinsufficiency of CT results in microcephaly with intellectual disability, and RNA-seq of lymphocytes from patients has revealed the expression of JA1 is significantly reduced. We therefore hypothesized that CT is an important candidate as a direct regulator of the JA1 gene expression. We introduced knockdown vectors against CT using in utero electroporation, and observed that the transcription activity of the human sequence was significantly reduced, suggesting that CT is a positive regulator of JA1.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2020000010-20200012

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	教授	補助額	900 千円
	氏名	仲嶋 一範	氏名（英語）	Kazunori NAKAJIMA		
研究課題（日本語）						
脳の肥大化機構の解明						
研究課題（英訳）						
Mechanisms of brain enlargement						
研究組織						
氏 名 Name		所属・学科・職名 Affiliation, department, and position				
仲嶋 一範（Kazunori Nakajima）		医学部・解剖学教室・教授				
榊原 康文（Yasubumi Sakakibara）		理工学部・生命情報学科・教授				
1. 研究成果実績の概要						
<p>哺乳類大脳皮質神経細胞は脳室に面した脳室帯、もしくはそれと隣接する脳室下帯で産生される。進化過程でヒトが巨大脳を獲得した主要な要因の一つは脳室下帯で分裂する神経幹細胞の増加であると考えられている。本研究課題ではその分子メカニズムの解明を目標として、その責任遺伝子の候補として JA1 を同定し、ヒト進化過程で JA1 の発現強度が増強したことが、脳室帯からの脳室下帯神経幹細胞の産生増加をもたらした可能性を示唆した。すなわち(1)ヒトとマウスの JA1 遺伝子の 5kbp 上流～1.5kbp 下流の配列において、ヒトの配列はマウスよりも強い転写活性を示すこと、(2)その違いをもたらす責任領域として、下流側の特に exon #2 周辺の配列が重要であること、(3) exon #1 から intron #2 の最初の約 800bp の領域において、ヒトでは G-C 対が集積しており、大きな CpG アイランドを形成すること、(4)ヒト JA1 転写調節領域でマウス JA1 を発現するプラスミドを子宮内電気穿孔法によりマウス胎仔脳に導入すると、脳室下帯において外来 JA1 が強く発現し、その周囲において神経幹細胞のマーカー(Pax6)を異所性に発現させることが確認された。CpG アイランドは転写因子を多く結合させ、その遺伝子の転写を制御する。そこでさらに CpG アイランド内の配列に注目し、ヒトとマウスで結合モチーフが変化した転写因子を生物情報学的に探索した。その中の一つとして CT 遺伝子が同定された。この転写因子の結合モチーフはマウスでは CpG アイランド内に1つだけだが、ヒトでは3カ所見つかった。CT 遺伝子のハプロ不全は知的障害を伴う小頭症を発症し、さらに患者血清の RNA-seq により JA1 遺伝子発現の有意な減少が観察されていることから、JA1 遺伝子の直接の上流因子として CT が重要な候補と考えられた。そこで、この遺伝子のノックダウンベクターを子宮内電気穿孔法によりマウス胎仔脳に導入した結果、ヒト JA1 転写調節領域の転写活性が低下することがルシフェラーゼ解析により観察された。以上の結果から、CT 遺伝子はヒト JA1 遺伝子の転写活性を促進させる働きを持つことが示唆された。</p>						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
<p>During development of mammalian brains, cortical neurons are produced from the ventricular zone (VZ) lining the lateral ventricles or adjacent subventricular zone (SVZ). One of the main factors that enable the human brain enlargement during evolution is thought to be the increase in the number of neural stem cells within the SVZ. In the aim of understanding its molecular mechanisms, we have identified JA1 as a candidate gene in this research project, and suggested the possibility that the elevated expression level of JA1 during the human evolution has led to the increase of neural stem cells in the SVZ. More specifically, (1) human JA1 genomic sequence encompassing upstream 5 kbp and downstream 1.5 kbp from the transcription start site had stronger transcriptional activity than the mouse sequence, (2) the responsible region for the species-specific difference in the transcriptional activity was found in the downstream sequence (from exon #1 to intron #2), (3) in this region, G-C pairs were enriched and formed a large CpG island in human, (4) introduction of a mouse JA1 expression vector under the control of the human JA1 transcription regulatory region using in utero electroporation induced ectopic Pax6-positive cells, a marker for neural stem cells, in the SVZ. Further, we bioinformatically searched for the transcription factors whose predicted binding sites were found in the human CpG island and not in the mouse homologous region. Among them, we identified the CT gene. We found 2 human specific predicted binding sites of the CT. It has been reported that haploinsufficiency of CT results in microcephaly with intellectual disability, and RNA-seq of lymphocytes from patients has revealed the expression of JA1 is significantly reduced. We therefore hypothesized that CT is an important candidate as a direct regulator of the JA1 gene expression. We introduced knockdown vectors against CT using in utero electroporation, and observed that the transcription activity of the human sequence was significantly reduced, suggesting that CT is a positive regulator of JA1.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
田畑秀典、八谷剛史、下田耕治、林周宏、永田浩一、榊原康文、仲嶋 一範	ヒト巨大脳獲得への関与が示唆される遺伝子とその転写調節領域の進化	第 43 回日本分子生物学会年会	2020 年 12 月			
仲嶋一範	中枢神経系の構造と発生過程	東京大学理学部生物学科生物科学特別講義 II	2021 年 1 月			
仲嶋一範	動く細胞が大脳皮質を作るしくみ	東京大学大学院理学系研究科生物科学セミナー	2021 年 1 月			