

Title	脳が大きくなるメカニズムの解明
Sub Title	Mechanisms of brain enlargement
Author	仲嶋, 一範(Nakajima, Kazunori)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2024
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2023.)
JaLC DOI	
Abstract	JA1の転写調節領域に見られるCpGアイランドの進化的解析を行なった結果、CpGの増加は霊長類が分岐する以前に遡ることがわかった。この結果は新世界ザルのマーモセットにおいても、マウスに比してJA1の発現領域が拡大している観察事実と一致する。次に、ヒトiPS細胞のJA1当該配列をマウス型に置き換えるための実験を行なった。CpGアイランド内において、仮想的な共通祖先からのCpG配列の進化的変化を予測したところ、イントロン1の前半部は霊長類で獲得、後半部ではマウスで消失が集中して生じていた。そこでこのイントロン1をマウスの配列に置き換えることを目指した。マウスのイントロン1(約450塩基対)と、その両端に約250bpのヒト配列と相同なホモロジーアームからなる1本鎖DNAを精製し、ヒトのイントロン1の両端をターゲットとするcrRNAおよびCas9タンパク質と混合してiPS細胞に導入、単一細胞に由来するクローンをマトリゲル上で単離し、PCRにより目的の配列にゲノム編集されたクローンを探索した。このような長鎖DNA置換は効率が悪く、これまでのところ目的のクローンは得られていないが、さらに探索を進める。イントロン1内にはヒト進化過程で獲得された転写因子Xの結合モチーフがあり、ヒトiPS細胞由来神経幹細胞におけるノックダウンによりJA1の遺伝子発現が低下する予備的結果を得ているが、同時にiPS細胞自体の増殖が低下し、安定なデータが得られない難点があった。そこでiPS細胞の段階で遺伝子導入し、神経幹細胞に分化誘導した後にノックダウンができるベクター開発を行なった。増殖過程で安定的に細胞内に維持されるよう、ゲノムに組み込まれるトランスポゾンベクターを用い、そこにタモキシフェン誘導型Creと、Cre依存的に標的RNAに対するmiRNAの発現が開始されるカセットを同時に持たせたベクターを作成した。転写因子Xを標的とするベクターは完成しており、JA1遺伝子発現への影響を解析する準備が整った。 Evolutionary analysis of CpG islands in the JA1 transcriptional regulatory region showed that the increase in CpGs dates back to before primate divergence and is strongly conserved within primates. This result is consistent with the observation that the expression region of JA1 is expanded in New World monkey marmosets compared to mice. Next, we performed experiments to replace the relevant JA1 sequence in human iPS cells with the mouse counterpart, and found that the first half of intron 1 was acquired in primates, while the second half was lost in mice, indicating that the evolutionary changes in CpG sequences from a hypothetical common ancestor within the CpG island were concentrated in the first half of intron 1. Therefore, we aimed to replace this intron 1 with a mouse sequence. Single-stranded DNA consisting of mouse intron 1 (about 450 base pairs) and homology arms homologous to the human sequence of about 250 bp at both ends was purified, mixed with crRNA targeting both ends of the human intron 1 and Cas9 protein, and introduced into iPS cells. Clones derived from single cells were isolated on Matrigel, and PCR was performed to search for clones whose genome had been edited to the desired sequence. Such long-strand DNA substitutions are inefficient, and so far no clones with desired sequences have been obtained, but further exploration will be conducted. There is a binding motif for transcription factor X in intron 1, which was acquired during human evolution. We have obtained preliminary results that knockdown of JA1 in human iPS cell-derived neural stem cells results in decreased gene expression of JA1, but at the same time the proliferation of iPS cells themselves was decreased, making it difficult to obtain stable data. Therefore, we developed a vector that allows gene transfer at the iPS cell stage and knockdown after induction of differentiation into neural stem cells. In order to maintain the vector stably in the cell during the proliferation process, a transposon vector that is integrated into the genome was used, and a vector that simultaneously contains tamoxifen-induced Cre and a cassette that initiates miRNA expression for the target RNA in a Cre-dependent manner was created. The vector targeting transcription factor X is complete and ready for analysis of its effect on JA1 gene expression.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2023000014-20230007

2023年度 学事振興資金（部門横断型共同研究） 研究成果実 績報告書

研究代表者	所属	医学部基礎教室	職名	教授	補助額	1,300千円
	氏名	仲嶋 一範	氏名（英語）	Kazunori Nakajima		
研究課題（日本語）						
脳が大きくなるメカニズムの解明						
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						
JA1の転写調節領域に見られるCpGアイランドの進化的解析を行なった結果、CpGの増加は霊長類が分岐する以前に遡ることがわかった。この結果は新世界ザルのマーモセットにおいても、マウスに比してJA1の発現領域が拡大している観察事実と一致する。次に、ヒトiPS細胞のJA1当該配列をマウス型に置き換えるための実験を行なった。CpGアイランド内において、仮想的な共通祖先からのCpG配列の進化的変化を予測したところ、イントロン1の前半部は霊長類で獲得、後半部ではマウスで消失が集中して生じていた。そこでこのイントロン1をマウスの配列に置き換えることを目指した。マウスのイントロン1（約450塩基対）と、その両端に約250bpのヒト配列と相同なホモロジーアームからなる1本鎖DNAを精製し、ヒトのイントロン1の両端をターゲットとするcrRNAおよびCas9タンパク質と混合してiPS細胞に導入、単一細胞に由来するクローンをマトリゲル上で単離し、PCRにより目的の配列にゲノム編集されたクローンを探索した。このような長鎖DNA置換は効率が悪く、これまでのところ目的のクローンは得られていないが、さらに探索を進める。イントロン1内にはヒト進化過程で獲得された転写因子Xの結合モチーフがあり、ヒトiPS細胞由来神経幹細胞におけるノックダウンによりJA1の遺伝子発現が低下する予備的結果を得ているが、同時にiPS細胞自体の増殖が低下し、安定なデータが得られない難点があった。そこでiPS細胞の段階で遺伝子導入し、神経幹細胞に分化誘導した後にノックダウンができるベクター開発を行なった。増殖過程で安定的に細胞内に維持されるよう、ゲノムに組み込まれるトランスポゾンベクターを用い、そこにタモキシフェン誘導型Creと、Cre依存的に標的RNAに対するmiRNAの発現が開始されるカセットを同時に持たせたベクターを作成した。転写因子Xを標的とするベクターは完成しており、JA1遺伝子発現への影響を解析する準備が整った。						
2. 研究成果実績の概要（英訳）						
Evolutionary analysis of CpG islands in the JA1 transcriptional regulatory region showed that the increase in CpGs dates back to before primate divergence and is strongly conserved within primates. This result is consistent with the observation that the expression region of JA1 is expanded in New World monkey marmosets compared to mice. Next, we performed experiments to replace the relevant JA1 sequence in human iPS cells with the mouse counterpart, and found that the first half of intron 1 was acquired in primates, while the second half was lost in mice, indicating that the evolutionary changes in CpG sequences from a hypothetical common ancestor within the CpG island were concentrated in the first half of intron 1. Therefore, we aimed to replace this intron 1 with a mouse sequence. Single-stranded DNA consisting of mouse intron 1 (about 450 base pairs) and homology arms homologous to the human sequence of about 250 bp at both ends was purified, mixed with crRNA targeting both ends of the human intron 1 and Cas9 protein, and introduced into iPS cells. Clones derived from single cells were isolated on Matrigel, and PCR was performed to search for clones whose genome had been edited to the desired sequence. Such long-strand DNA substitutions are inefficient, and so far no clones with desired sequences have been obtained, but further exploration will be conducted. There is a binding motif for transcription factor X in intron 1, which was acquired during human evolution. We have obtained preliminary results that knockdown of JA1 in human iPS cell-derived neural stem cells results in decreased gene expression of JA1, but at the same time the proliferation of iPS cells themselves was decreased, making it difficult to obtain stable data. Therefore, we developed a vector that allows gene transfer at the iPS cell stage and knockdown after induction of differentiation into neural stem cells. In order to maintain the vector stably in the cell during the proliferation process, a transposon vector that is integrated into the genome was used, and a vector that simultaneously contains tamoxifen-induced Cre and a cassette that initiates miRNA expression for the target RNA in a Cre-dependent manner was created. The vector targeting transcription factor X is complete and ready for analysis of its effect on JA1 gene expression.						
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)
仲嶋一範	細胞たちが脳を作るしくみ	慶應義塾大学薬学部「先端医科学研究」	2023年7月
Kazunori Nakajima	Cell migration in the developing cerebral cortex	Invited seminar at Center for Neuroscience Research, Children' s National Hospital, Washington, D.C. (U.S.A.)	2023年11月
仲嶋一範	大脳皮質ニューロンの挙動を制御するメカニズム	生理研研究会「神経活動パターンと遺伝子発現から紐解く脳・神経回路発達メカニズムの解明」	2024年2月
廣田ゆき、仲嶋一範	大脳新皮質形成におけるニューロン移動を制御する分子機構	シンポジウム：“脳形成を制御する細胞外シグナル”、第129回日本解剖学会総会・全国学術集会	2024年3月
Takao Honda, Yuki Hirota, and Kazunori Nakajima	Heterozygous Dab1 null mutation disrupts neocortical and hippocampal development.	eNeuro	2023年4月