

学位論文

放射状グリア細胞の神経分化における
Gタンパク質共役受容体 GPR157
の役割解析

(The G protein-coupled receptor GPR157 regulates
neuronal differentiation of radial glial progenitors
through the Gq-IP₃ pathway)

平成 27 年 12 月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

武尾 優

目次

	頁
Abstract	1
序論	3
結果	8
考察	32
結論	38
材料と方法	39
謝辞	46
引用文献	47
公表論文	56

Abstract

In the developing neocortex, radial glial progenitors (RGPs) residing in the ventricular zone generate neurons and glia in a developmental stage-dependent manner. The fate of radial glial progenitors (RGPs) is largely altered by local extracellular factors and the signaling pathways intrinsic to RGPs. Here we found that GPR157, an orphan G protein-coupled receptor, is expressed in the neocortex, and that GPR157 localizes to RGPs' primary cilium extended into the lateral ventricle and exposed to the cerebrospinal fluid (CSF). GPR157 couples with Gq-class of the heterotrimeric G-proteins and activates through IP₃-mediated Ca²⁺ cascade. In cultured RGPs, activation of GPR157/Gq signaling enhances neuronal differentiation of RGPs, whereas the enhanced neurogenesis is attenuated by interfering with GPR157-Gq-IP₃ cascade in RGPs. Furthermore, in vivo depletion of GPR157 and attenuation of Gq/IP₃ signaling suppressed neuronal differentiation of RGPs. Also, we found that putative ligand(s) for GPR157 is present in the CSF, and revealed that the ability of the CSF to activate GPR157 increased at neurogenic phase. Together, GPR157-Gq signaling in RGPs is activated by neurogenic factor(s) in the CSF and contributes to neurogenesis. These results will pave the way for deciphering the complex machinery of GPCR signaling as the interface between RGPs and the CSF in the neurogenic phase.

要旨

大脳新皮質を構成する神経細胞やグリア細胞は、発生期大脳新皮質の脳室帯を占める放射状グリア細胞から産み出され、放射状グリア細胞の細胞運命は発生時期に応じて規定されている。この細胞運命の決定には、細胞外因子およびその受容体シグナリングが大きく寄与することが知られる。しかしながら、そのシグナリングには未だ不明な点が数多く残っている。本研究において、リガンドが未知のオーファン G タンパク質共役受容体の一つである GPR157 が、放射状グリア細胞の神経分化に重要な役割を担っていることを明らかにした。GPR157 はマウス胎仔の大脳新皮質に発現しており、放射状グリア細胞が脳室内に突出させている一次繊毛に局在していた。また、GPR157 は Gq クラスの三量体型 G タンパク質と共役し、IP₃ を介して細胞内カルシウム濃度を制御した。重要な事に、培養した放射状グリア細胞において、GPR157/Gq シグナリングを活性化させることによって神経分化が顕著に亢進した。さらに、この神経分化の亢進は Gq-IP₃ シグナリングを阻害することによって抑制された。生体内において、GPR157 の発現抑制および Gq/IP₃ シグナリングの阻害が、放射状グリア細胞の神経分化を顕著に抑制した。また、脳脊髄液中に GPR157 のリガンドが存在し、この GPR157 に対する活性化能は神経分化が盛んな時期に増加していた。以上の結果から、GPR157-Gq-IP₃ シグナリング経路が脳脊髄液によって活性化し、神経分化に寄与していることが示唆された。このことは、幹細胞ニッチとしての脳脊髄液と放射状グリア細胞との相互作用において、GPCR シグナリングが重要な役割を担っている可能性を提示している。

序論

大脳新皮質は、記憶・認知や運動の制御などの高次脳機能を司る。大脳新皮質を構成する神経細胞およびグリア細胞は、発生期大脳の脳室を取り囲む領域(脳室帯)を占める放射状グリア細胞から産み出される(図1A)(Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009; Kwan *et al.*, 2012; Greig *et al.*, 2013)。この放射状グリア細胞の細胞運命は発生時期に依存して規定される(Shen *et al.*, 2006)ことが知られる(図1B)。実際、大脳新皮質の発生初期においては、放射状グリア細胞は対称分裂による自己複製を繰り返し、その細胞数を増大させる。発生の進行に伴い、放射状グリア細胞は非対称分裂し、1つの放射状グリア細胞と1つの神経細胞系譜にのった細胞という、異なる2つの細胞を生み出す様になる。この非対称分裂では次の2つの様式が知られている(図1C)。放射状グリア細胞から1つの放射状グリア細胞と1つの神経細胞が誕生する場合、または、1つの放射状グリア細胞と1つのintermediate progenitorとよばれる細胞が誕生する場合である(Noctor *et al.*, 2004)(図1C)。Intermediate progenitorはその後、細胞分裂して2つの神経細胞を生み出す。大脳新皮質の放射状グリア細胞から誕生する神経細胞の約70%はintermediate progenitor由来であり(Kowalczyk *et al.*, 2009)、intermediate progenitorを介した神経分化は、神経産生の主要な様式となっている。このようにして誕生した神経細胞はその後、誕生した場所(脳室帯)から脳表層側へと移動して皮質板を形成し(Higginbotham & Gleeson, 2007)、最終的に六層構造を呈するようになる(Greig *et al.*, 2013)。他方、神経細胞生成期の後に、放射状グリア細胞はアストロサイトのようなグリア細胞に分化するようになる。

放射状グリア細胞の細胞運命の変化には、細胞内プログラムが重要な役割を担っている。実際、放射状グリア細胞は培養条件下において、自己複製→神経分化→グ

リア細胞への分化という流れで分化が進行する (Shen *et al.*, 2006)。一方、細胞外因子およびその受容体シグナリングもまた、細胞運命の規定や運命変化タイミングの制御にとって重要である。この様な細胞外因子の由来としては、隣接する神経細胞や放射状グリア細胞、血管内皮細胞、髄膜、脳脊髄液が知られる (Shen *et al.*, 2004; Siegenthaler *et al.*, 2009; Lehtinen and Walsh, 2011)。髄膜由来の因子としては、神経分化を促進するレチノイン酸が知られる (Siegenthaler *et al.*, 2009)。また、脳脊髄液中のインスリン様成長因子が放射状グリア細胞の自己複製に寄与することが知られる (Lehtinen *et al.*, 2011)。この様に外界シグナリングを介した運命制御の実態は近年明らかにされ始めたばかりであり、このようなシグナリングの統合的理解は、複雑な細胞運命決定機序の理解に必要不可欠であると考えられる。

放射状グリア細胞は脳脊髄液に面し脳室壁から一次繊毛と呼ばれる構造を伸ばしている。一次繊毛の機能不全によって、大脳形成不全症が発症する (Delous *et al.*, 2007) ことから判る通り、放射状グリア細胞の一次繊毛は正常な大脳新皮質形成において重要な役割を担っている (Han and Alvarez-Buylla, 2010; Louvi and Grove, 2011)。この一次繊毛の役割としては、外界のセンサーとしての役割が知られており、例えばソニックヘッジホッグ分子を介したシグナリングが一次繊毛を介していることは有名である (Louvi and Grove, 2011)。このことから放射状グリア細胞の一次繊毛は脳脊髄液由来のシグナリングを放射状グリア細胞に伝達すると考えられる。興味深いことに、脳脊髄液の構成成分は大脳発生期を通じて大きく変動している (Zappaterra *et al.*, 2007)。このことは脳脊髄液を介したシグナリングが放射状グリア細胞を発生時期に応じて制御している可能性を示唆している。

従来、様々な膜受容体およびそのリガンドが放射状グリア細胞の運命を制御することが報告されている。例えば、上皮成長因子 (EGF) や線維芽細胞増殖因子 (FGF)

等受容体型チロシンキナーゼ経路、白血病阻止因子 (LIF) /毛様体神経栄養因子 (CNTF) 等を介したJAK-STAT経路、Wnt- β カテニン経路等である。Gタンパク質共役受容体 (以下GPCR) は膜受容体の中でも最大のスーパーファミリーを構成し、下流の三量体Gタンパク質を活性化させることで外界シグナリングを細胞内へと伝達している。三量体Gタンパク質は配列の相同性から、Gs、Gi、Gq、G12/13の4種類のファミリーへと大別することができる (Neves *et al.*, 2002)。興味深いことに、近年、放射状グリア細胞の挙動に関わるGPCRシグナリングについて少しずつ解明されてきている。例えば、両側性前頭頭頂葉型多小脳回症の原因遺伝子として同定されたGPR56というGPCRは放射状グリア細胞と基底膜の適切な相互作用に深く関わっている (Piao *et al.*, 2004; Singer *et al.*, 2013)。また、放射状グリア細胞に発現するGPCR5Bの機能欠損は、グリア細胞への分化を促進させる (Kurabayashi *et al.*, 2013)。さらに、発生期大脳新皮質においてGaiを障害すると、放射状グリア細胞の自己複製が妨げられ (Shinohara *et al.*, 2004) たり、Gq-IP₃シグナリング経路を活性化すると放射状グリア細胞の自己複製が盛んになる (Lin *et al.*, 2007; Nishimoto *et al.*, 2007)。

この様に、放射状グリア細胞の動態におけるGPCRシグナリングの役割は近年になってようやく明らかにされ始めてきた。しかし、放射状グリア細胞の神経分化にGPCRシグナリングが寄与しているのかについては依然として不明である。さらに、脳脊髄液などの外部環境と放射状グリア細胞間の相互作用において、GPCRシグナリングがどのように関わっているのかについては調べられていない。本研究においては、放射状グリア細胞におけるGPCRに着目して研究を遂行した。

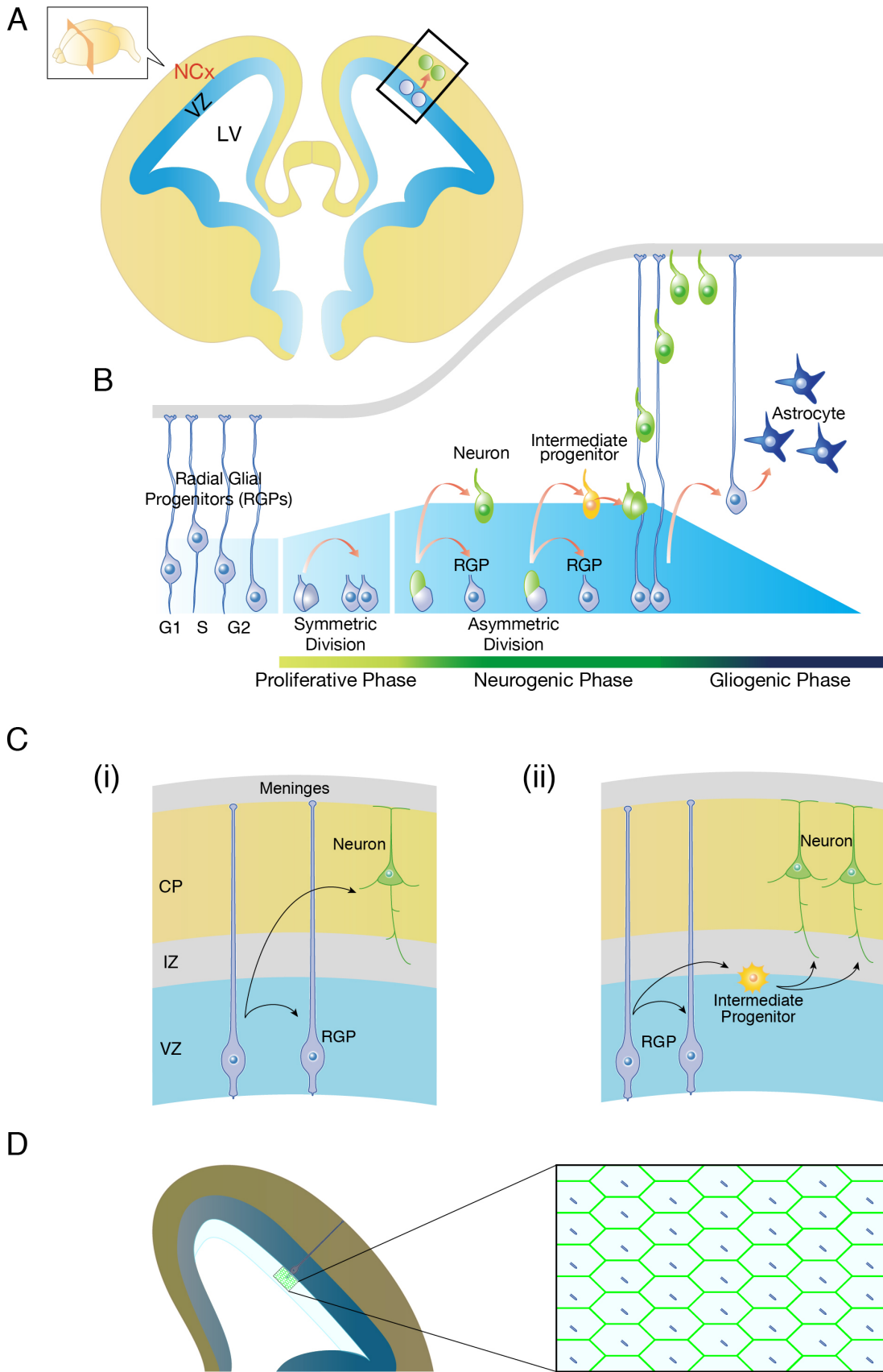


図1. 大脳新皮質形成の模式図

(→次頁へ)

結果、リガンド未知のオーファン受容体であるGPR157が放射状グリア細胞の一次繊毛に局在し、脳脊髄液中の神経分化促進因子に応答して下流のGq-IP₃シグナリング経路を活性化することによって神経分化を促進することを明らかにした。

(→前頁から)

(A) (左) マウス胎仔脳の模式図。(右) マウス胎仔大脳の冠状断面の模式図。大脳新皮質を構成する興奮性神経細胞は背側脳室帯を占める放射状グリア細胞から誕生する。

NCx : 大脳新皮質、VZ : 脳室帯、LV : 側脳室。

(B) 大脳背側領域 ((A) で示された四角形の部分) における放射状グリア細胞の挙動の模式図。脳室帯 (脳室を取り囲む領域、水色で示した領域) に存在する放射状グリア細胞は細胞周期 (G1、S、G2) に応じて脳室帯内を上下にエレベーター運動し、脳室に面した領域で細胞分裂する。大脳新皮質の発生初期には自己複製し、発生の進行に伴って、神経細胞、さらにはグリア細胞を産生する。(詳細は本文参照)

(C) 放射状グリア細胞の非対称分裂の 2 つの様式。(i) 放射状グリア細胞から 1 つの放射状グリア細胞と 1 つの神経細胞が誕生する場合 (ii) 放射状グリア細胞から 1 つの放射状グリア細胞と 1 つの **intermediate progenitor** とよばれる細胞が誕生する場合。**Intermediate progenitor** はその後、細胞分裂して 2 つの神経細胞を生み出す。

CP : 皮質帯、IZ : 中間帯、VZ : 脳室帯、Meninges : 髄膜。

(D) (左) 脳室壁 (淡青色の領域) の模式図。(右) (左) で示された四角形の部分の拡大図。F-アクチンリング (緑色) の中心付近に一次繊毛が位置している。

結果

1. GPR157 は発生期大脳新皮質の放射状グリア細胞の一次繊毛に局在している

本研究ではまず、発生期の大脳新皮質に発現する GPCR を探索した。特に、新たな GPCR シグナリングの同定を目指し、オーファン GPCR に着目して解析を進めた。そこで、胎生 13 日目 (E13; Embryonic day 13) のマウス大脳新皮質と生後 0 日齢 (P0; Postnatal day 0) のマウス大脳新皮質から RNA を抽出し、cDNA を作製した。さらに、約 50 種類のオーファン GPCR について、E13 と P0 における発現量をリアルタイム PCR によって比較した。その結果、複数種類のオーファン GPCR が E13 の大脳新皮質に多く発現していた。これら GPCR の中から、その機能がほとんど解明されていない GPR157 についての解析を行うことにした。

GPR157 は約 36kDa (マウス GPR157 : 330a.a.) のリガンド未知のオーファン GPCR である。現在に至るまで、その機能に関する報告はない。胎生 13 日目 (E13; Embryonic day 13) のマウス大脳新皮質と生後 0 日齢 (P0; Postnatal day 0) のマウス大脳新皮質から RNA を抽出し、cDNA を作製した後に、PCR 解析を行ったところ、P0 における *Gpr157* の発現は殆ど見られなかったのに対し、E13 においては発現が確認された (図 2A)。E13 の大脳新皮質には神経細胞と共に、放射状グリア細胞が数多く存在するが、P0 の大脳新皮質では、放射状グリア細胞は極めて少なくなっている。このことから GPR157 は放射状グリア細胞に選択的に発現している可能性が考えられた。そこで、発生期の大脳新皮質における GPR157 の発現部位を特定するために、GPR157 に対する抗体を作製した。E13 のマウス胎仔脳の冠状切片を作製して、免疫組織染色法を用いて調べた。その結果、GPR157 の免疫蛍光シグナルは脳室帯の脳室壁 (脳室に面している領域) において強く検出

された (図 2B)。さらに発現部位を精査したところ、斑点状の強い免疫蛍光シグナルが、脳室壁の外側 (アピカル側) に検出された。放射状グリア細胞は一次繊毛を持ち、脳室内へと突出させている。このことから、GPR157 が一次繊毛上に分布している可能性が考えられた。そこで、一次繊毛の軸糸に凝集するアセチル化チューブリン (Tong *et al.*, 2014) に対する抗体で共染色を行った。その結果、GPR157 とアセチル化チューブリンの免疫蛍光シグナルは重なり合った (図 2C)。

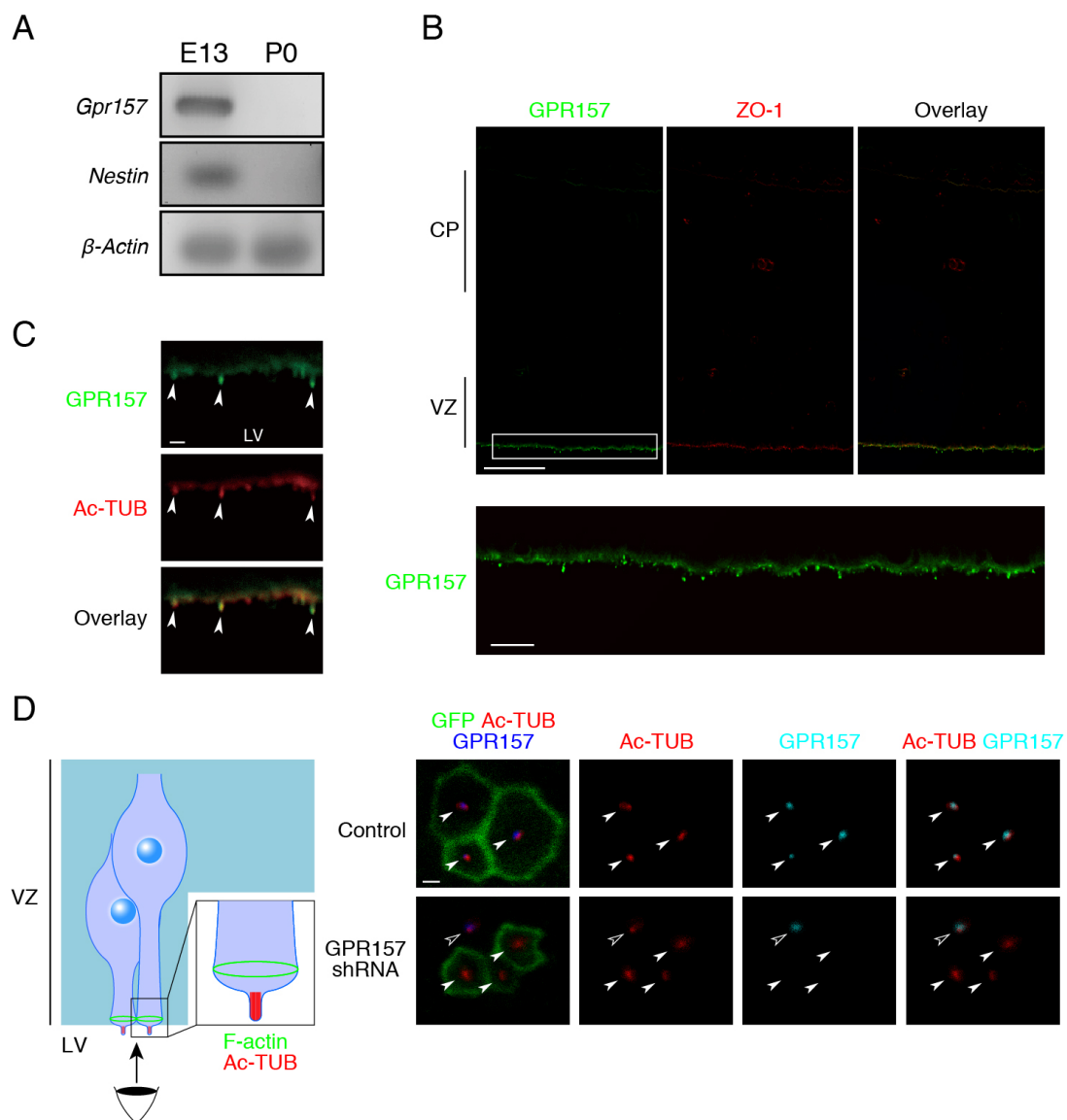


図 2. 発生期の脳新皮質における GPR157 の発現

(A) E13マウス大脳新皮質とP0マウス大脳新皮質における *Gpr157* の発現量を RT-PCR によって比較解析した。 *Nestin* は放射状グリア細胞のマーカー。 *β-Actin* はコントロール。

(B) E13マウス胎仔脳の冠状切片を GPR157 に対する抗体 (緑) と ZO-1 に対する抗体 (赤) を用いて免疫染色した。 ZO-1 はアドヘレンスジャンクションに集積する分子で、放射状グリア細胞の脳室壁近傍に集中して局在するため、脳室壁のマーカーとして用いられる。(上) 大脳新皮質全体の染色像 (下) 四角で囲われた領域の拡大図。 VZ : 脳室帯、 CP : 皮質板

(C) GPR157 抗体 (緑) とアセチル化チューブリン (Ac-tub) 抗体 (赤) を用いて免疫染色した E13マウス大脳新皮質の脳室壁近傍の強拡大像。 矢頭はアセチル化チューブリン陽性の一次繊毛を示している。

(→次頁へ)

GPR157 が放射状グリア細胞の一次繊毛に局在していることを確認するために、脳室側から脳室壁を観察 (en face view imaging ; 図 2D を参照) した。脳室壁近傍では放射状グリア細胞が互いにアドヘレンスジャンクションを形成している。そのため、en face view imaging では、F-アクチンの環状構造 (F-アクチンリング) が蜂の巣状に並んでおり、F-アクチンリングの中心付近に一次繊毛が位置している (図 1 D)。そこで本実験では、F-アクチンリングを標識するために、F-アクチンに特異的に結合する Lifeact-EGFP (Riedl *et al.*, 2008) を放射状グリア細胞に子宮内電気穿孔法 (図 3) によって遺伝子導入した。また、GPR157 と一次繊毛を、それぞれの抗体で免疫染色した。図 2 D で示した様に、Lifeact-EGFP 由来の免疫蛍光シグナルは蜂の巣状を呈し、その中心付近に一次繊毛が位置していた。さらに、GPR157 抗体に由来する免疫蛍光シグナルは、一次繊毛と共局在していた。一方 Lifeact-EGFP と共に GPR157 に対する shRNA (後述) を遺伝子導入し、GPR157 の発現抑制した場合、F-アクチンリングおよび一次繊毛は検出されたが、GPR157 抗体に由来するシグナルは、検出できなくなった (図 2D)。これらの結果から、GPR157 は発生期大脳新皮質の放射状グリア細胞の一次繊毛に局在していることが示された。

(→前頁から)

(D) (左) en face view imagingの模式図。(右) 子宮内電気穿孔法を施した大脳新皮質の脳室壁のen face view imaging。GPR157抗体とアセチル化チューブリン抗体 (赤) を用いて免疫染色した。白矢頭および黒矢頭はそれぞれ、遺伝子導入された細胞および遺伝子導入されていない細胞の一次繊毛の位置を指し示している。(上) Lifeact-EGFPを遺伝子導入した大脳新皮質。(下) Lifeact-EGFP及びGPR157 shRNAを遺伝子導入した大脳新皮質。

Scale Bars=50 μm (B上) ; 10 μm (B下) ; 1 μm (C, D) 。

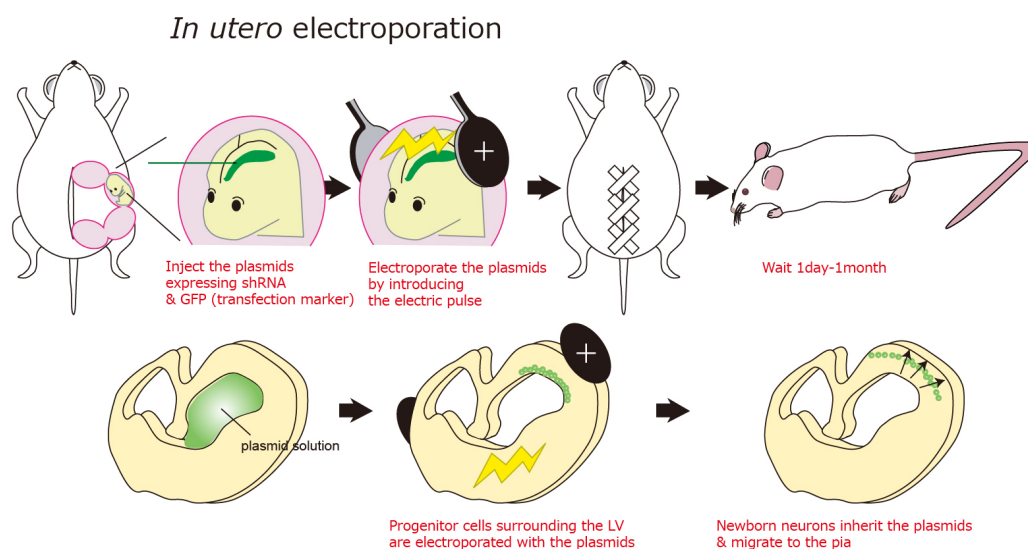


図3. 子宮内電気穿孔法

(上) 麻酔をかけた妊娠マウスから子宮を露出し、shRNA 発現プラスミドを GFP 発現ベクター（遺伝子導入マーカー）と共に、子宮内の胎仔の側脳室に注入する。次に、子宮壁を介して胎仔の頭部をピンセット型電極ではさみ、電気穿孔法によってプラスミドを大脳新皮質の細胞に導入する。その後、子宮を母親マウスに戻して縫合し、目的の時期まで母マウスを飼育する。

(下) 遺伝子導入直後には、脳室に面した放射状グリア細胞のみがプラスミドを有する。その後放射状グリア細胞から産生される神経細胞にもプラスミドは受け継がれる。遺伝子導入後、母マウスを目的の時期まで飼育して胎仔脳を解析することにより、導入した遺伝子を発現する細胞の種類や分布を解析することができる

2. GPR157 の発現抑制は放射状グリア細胞の神経分化を阻害する。

発生期大脳新皮質の放射状グリア細胞における GPR157 の役割を調べた。この目的のために、GPR157 に対する shRNA 発現ベクターを作製した。まず、GPR157 発現ベクターと共に、shRNA 発現ベクターもしくは GPR157 shRNA 発現ベクターを U-2 OS 細胞に導入し、GPR157 の発現量を評価した。その結果、GPR157 の発現を抑制する二つの異なる shRNA 発現ベクター (shRNA#1、shRNA#2) を同定することができた (図 4)。また、shRNA#2 の標的配列中に二つのサイレント変異を加えた変異 GPR157 (GPR157^{res}) を発現させた場合、shRNA#2 によって発現抑制されなかった (図 4)。

次に、これらの shRNA 発現ベクターを用いて放射状グリア細胞の運命における GPR157 の機能を解析した。Control shRNA 発現ベクターまたは GPR157 shRNA 発現ベクターを GFP 発現ベクターと共に E13 のマウス胎仔脳の放射状グリア細胞に遺伝子導入した。48 時間後 (E15) において GFP 陽性細胞の細胞種を免疫組織染色法によって調べた。GPR157 shRNA を遺伝子導入した大脳新皮質では、コントロールと比較して、PAX6 陽性細胞 (放射状グリア細胞) の割合が著しく増加していた (図 5)。このことから、放射状グリア細胞の神経分化が抑制され、その結果として放射状グリア細胞の割合が増加した可能性が考えられた。また、細胞周期が障害され、その結果として、放射状グリア細胞のまま留まっている細胞が多くなった可能性もある。そこで後者の可能性を検討するため、放射状グリア細胞をチミン類似体であるブロモデオキシウリジン (BrdU) を用いてパルス標識 (30 分間) して、S 期の細胞の割合を調べた。その結果、GFP 陽性の放射状グリア細胞 (GFP/PAX6 二重陽性細胞) 中における BrdU 陽性細胞の割合は、コントロールと GPR157 shRNA 導入細胞の間で変化していなかった (図 6)。このことから、

GPR157 shRNA の導入によって細胞周期が影響を受けている可能性は低く、上記の結果は、放射状グリア細胞の神経分化が抑制されたことに依るものであることが推察された。

そこで、GPR157 shRNA の導入に伴う放射状グリア細胞の増加が、神経分化の抑制によるものであるのかを確かめるために、intermediate progenitor のマーカーである TBR2 (Englund *et al.*, 2005) に対する抗体を利用して免疫組織染色を行った。その結果、GPR157 shRNA の遺伝子導入にともなって、TBR2 陽性の細胞の割合が顕著に減少した (図 5)。これらの表現型が、GPR157 タンパク質の発現抑制によって引き起こされているものであることを確かめるために、shRNA#2 の影響を受けない GPR157^{res} を shRNA#2 と同時に遺伝子導入し、同様の解析を施した。その結果、GPR157 shRNA によって誘発された異常 (PAX6 陽性細胞の割合の上昇並びに TBR2 陽性細胞の割合の減少) は GPR157^{res} の共発現によって顕著に緩和された (図 5)。また、コントロールまたは、GPR157 shRNA の遺伝子導入に伴ってアポトーシスを起こした細胞は極めて少なく (<1%)、両者に有意差はなかった。このことから、以上の表現型に対する細胞死の影響は極めて少ないものと考えられた。

畢竟するに、放射状グリア細胞において GPR157 の発現を抑制すると、神経分化が抑制されることが明らかになった。

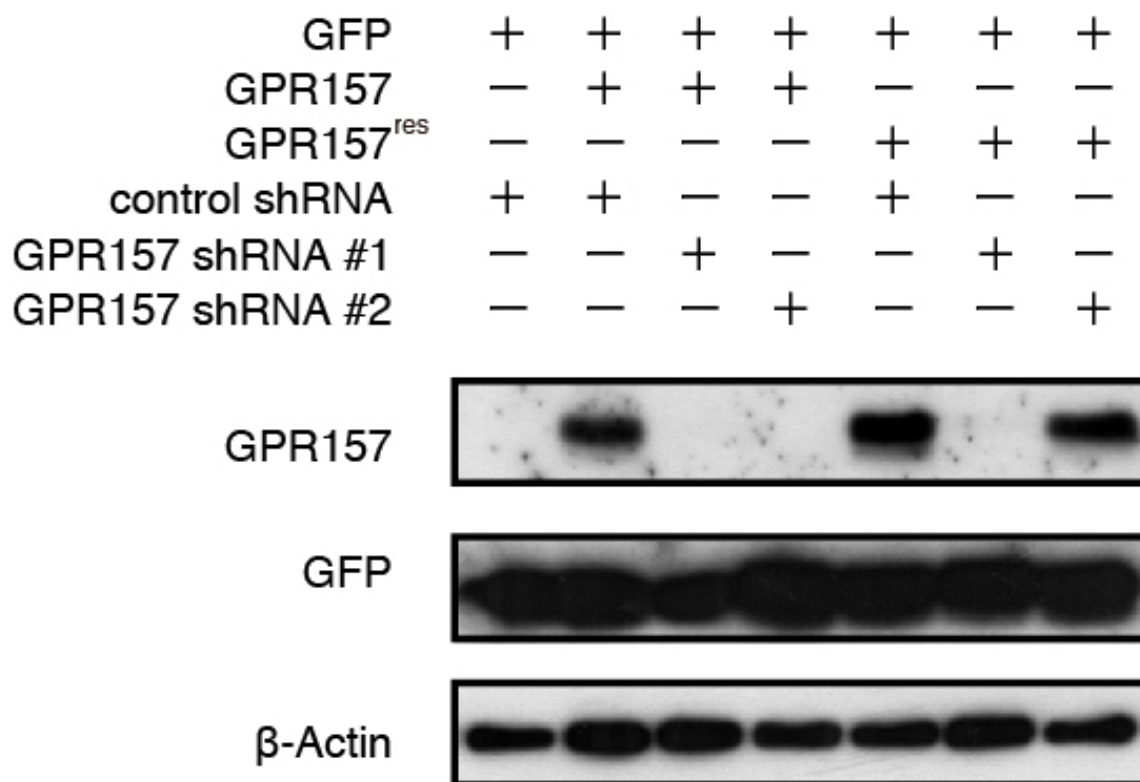


図4. GPR157に対するshRNA発現ベクターの評価

図に示した組み合わせのプラスミド[GFP 発現ベクター、GPR157 発現ベクター、変異 GPR157 (GPR157^{res}) 発現ベクター、Control shRNA 発現ベクター、GPR157 shRNA 発現ベクター #1、GPR157 shRNA 発現ベクター #2] を U-2 OS 細胞に導入した。24 時間後に細胞懸濁液を作製し、GPR157、GFP、及び β -Actin に対する抗体を用いたウェスタンブロット解析に供した。

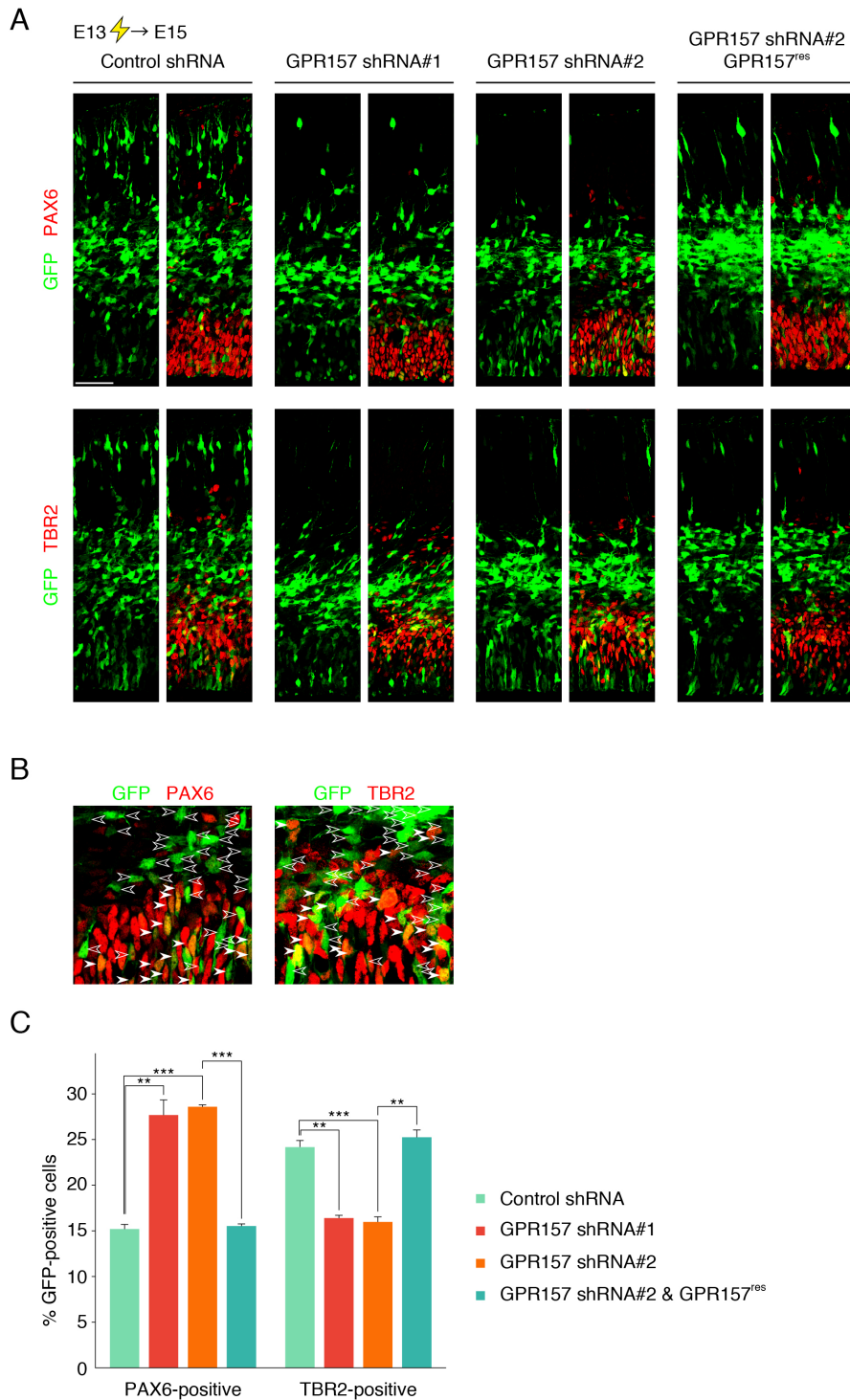


図5. GPR157の発現抑制は神経分化を抑制する

(A) Control shRNA 発現ベクター、GPR157 shRNA 発現ベクター#1、GPR157 shRNA 発現ベクター#2 または GPR157 shRNA 発現ベクター#2 及び変異 GPR157 (GPR157^{res}) を GFP 発現ベクターと共に、E13 マウス胎仔の脳新皮質に導入した。遺伝子導入 2 日後 (E15) に脳を単離して固定し、冠状切片を作製した。PAX6 抗体および TBR2 抗体による蛍光免疫染色像を示した。

(→次頁へ)

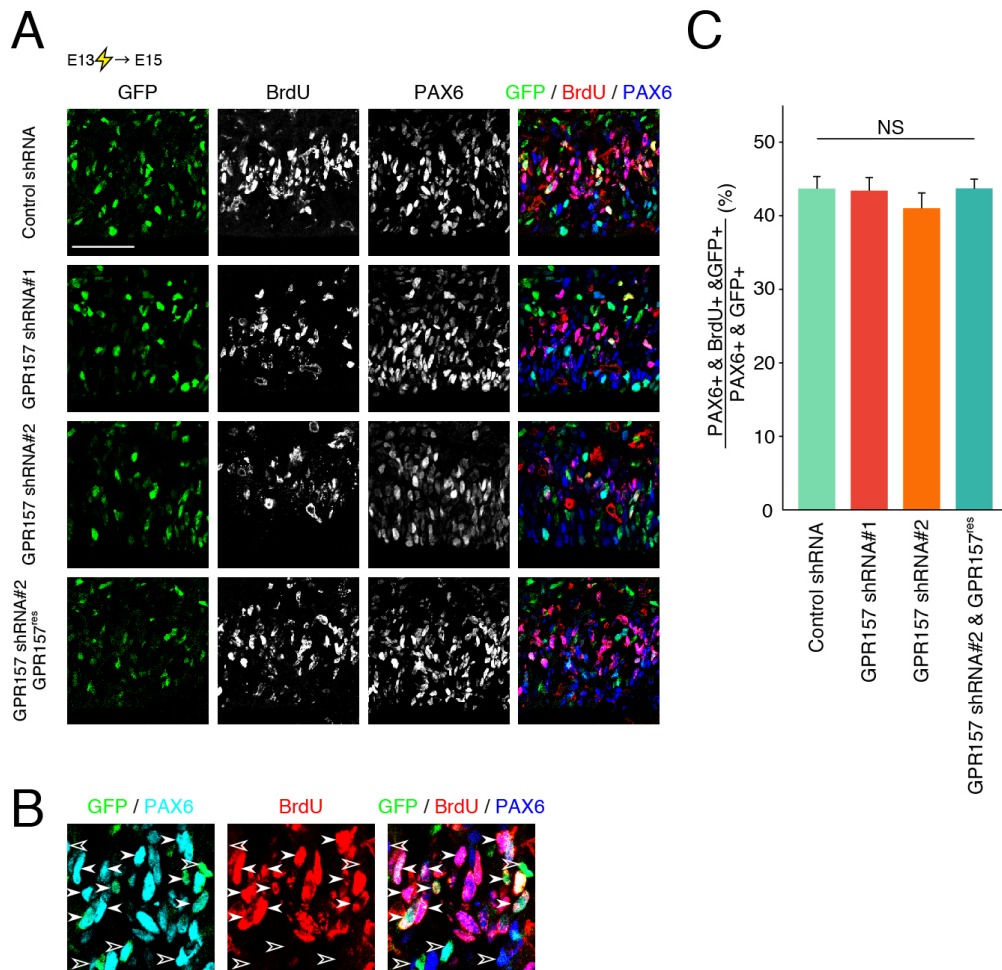


図6. GPR157の発現抑制による放射状グリア細胞のBrdUの取り込み量への影響

(A) 図中に示されたプラスミドを、GFP発現ベクターと共に、E13マウス胎仔の脳新皮質に導入した。遺伝子導入の2日後 (E15) にBrdUを投与した。30分後に脳を単離して固定し、冠状切片を作製した。GFP抗体、PAX6抗体、およびBrdU抗体による蛍光免疫染色像。図は、脳室帯の拡大像を示した。

(B) GFP/PAX6/BrdU三重陽性細胞の例。白矢頭はGFP+/PAX6+/BrdU+細胞を、中抜き矢頭はGFP+/PAX6+/BrdU-細胞を指し示している。

(C) GFP陽性およびPAX6陽性細胞中のBrdU陽性細胞の割合 (平均値±標準誤差、n=3)。NS : 有意差無。Scale Bar = 50 μ m。

(→前頁から)

(B) GFPおよびPAX6の二重陽性細胞の例(左)と、GFPおよびTBR2の二重陽性細胞の例(右)。白矢頭はGFP+/PAX6+細胞 (左)、GFP+/TBR2+細胞 (右) を示している。中抜き矢頭はGFP+/PAX6-細胞 (左)、GFP+/TBR2-細胞 (右) を指し示している。

(C) 全GFP陽性細胞中での、PAX6陽性細胞の割合およびTBR2陽性細胞の割合 (平均値±標準誤差、n=3)。**p<0.01、***p<0.001。Scale Bar = 50 μ m。

3. GPR157 は Gq クラスの三量体 G タンパク質と共役する

GPCR は下流の三量体 G タンパク質の活性化を介して外界シグナルを細胞へと伝達する。三量体 G タンパク質 α サブユニットは大別すると、Gas、Gai、Gaq、および Ga12 の 4 種類が存在し、それぞれ独自の経路を介して下流のシグナリングを活性化させる (Neves *et al.*, 2002)。多くの GPCR は構成的活性化能を持ち、細胞に過剰発現すると、リガンド非依存的に下流の三量体 G タンパク質を活性化することが知られる (Milligan, 2003)。本研究において、GPR157 を U-2 OS 細胞に過剰発現した場合、細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が顕著に上昇することを見出した (図 7)。三量体 G タンパク質 α サブユニットの中で、Gaq は PLC β -IP $_3$ を介して $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こすことがよく知られる。そこで、GPR157 が Gq シグナリングを介して $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こしているのかについて以下の方法で確かめた。Ga タンパク質の C 末端領域断片は、対応する GPCR に結合することで、GPCR-三量体 G タンパク質シグナリングを拮抗阻害する (Gilchrist *et al.*, 1999)。そこで、Gaq シグナリングを阻害する Ga の C 末端領域断片 (Gaq-CT) を GPR157 と共に発現したところ、GPR157 の過剰発現によって誘発された $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が顕著に抑えられた (図 7)。各条件において、Ionomycin を培地に添加して細胞内カルシウム濃度を上昇させた場合、ほぼ全ての細胞において非常に強い Rhod4 の蛍光シグナルが観察された (図 7A)。このことから、Rhod4 は、ほぼ均一に細胞内に取り込まれていることが確認された。

さらに、GPR157-Gq シグナリングによって引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が、IP $_3$ を介しているかを確かめるために、IP $_3$ 吸着タンパク質 (IP $_3$ sponge) (Uchiyama *et al.*, 2002) を利用した。IP $_3$ sponge は、IP $_3$ 受容体の IP $_3$ 結合領域を含む部分断

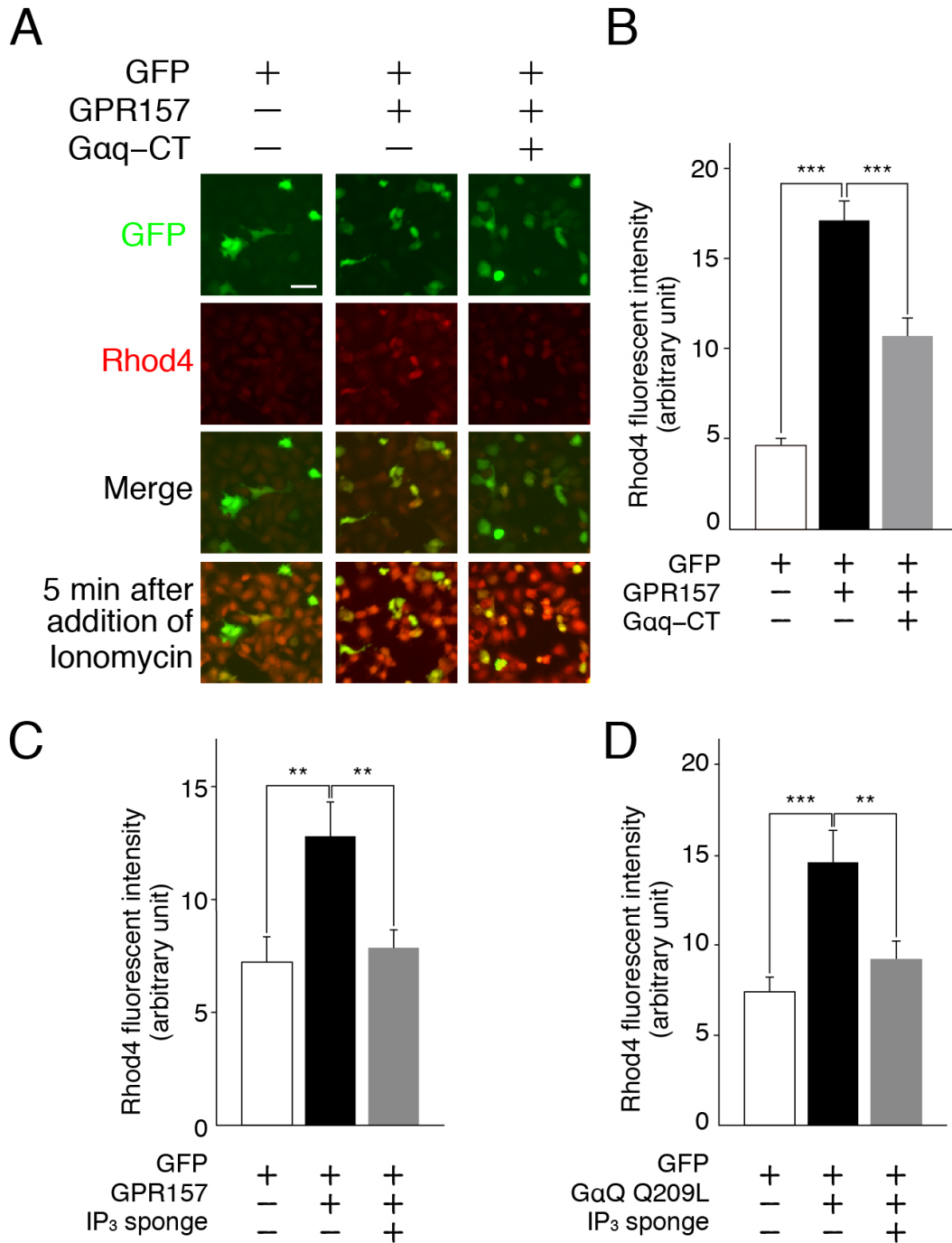


図 7. GPR157 は Gaq と共役している

(A) 図に示した組み合わせの発現ベクターをU2OS細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入の一日後に、カルシウム蛍光指示薬Rhod-4 NWを含む培地に交換し、Rhod-4 NWを細胞に導入した後、蛍光像を取得した(1-3列目)。その後、いずれの細胞にも、ほぼ一樣にRhod-4 NWが取り込まれているのを確認するために、Ionomycinを添加し、細胞内カルシウム濃度の上昇に伴ってRhod-4 NW由来の蛍光が強くなるのを確認した(4列目)。

(→次頁へ)

片である。膜貫通領域を欠失しているため、細胞質中に発現し IP₃ を吸着することによって IP₃ シグナリングを阻害する (Uchiyama *et al.*, 2002)。そこで、GPR157 と共に IP₃ sponge を発現すると、GPR157 の過剰発現によって引き起こされた [Ca²⁺]_i の上昇が著しく抑えられた (図 7)。一方、Gaq の恒常活性型変異体 Gaq Q209L を U-2 OS 細胞に遺伝子導入すると、GPR157 を過剰発現した場合と同様に、[Ca²⁺]_i が顕著に上昇した。IP₃ sponge を Gaq Q209L と共に発現すると [Ca²⁺]_i の上昇は著しく減弱した (図 7)。以上の結果から、GPR157 が Gq クラスの三量体 G タンパク質と共役し、PLCβ-IP₃ を介して [Ca²⁺]_i の上昇を引き起こすことが明らかになった。

(→前頁から)

(B) GFP陽性細胞における Rhod-4 NW の蛍光強度を測定し、その値からバックグラウンド値 (細胞の無い領域の蛍光強度) を差し引いた値を平均値±標準誤差で示した。各条件において 40個以上の細胞の蛍光強度を測定した。**p<0.01、***p<0.001。Scale Bar = 10 μm。

4. Gq および IP₃ シグナリングは放射状グリア細胞の神経分化を制御している

これまでの解析により GPR157 が Gq-IP₃ を介したシグナリングを活性化していることを見出した (図 7)。そこで、Gq-IP₃ シグナリングを阻害した場合に、GPR157 の発現抑制と同様の表現型が観察できるか生体内において確かめた。前節で述べた Gαq-CT または IP₃ sponge を子宮内電気穿孔法によって E13 マウス胎仔脳に導入し、E15 において GFP 陽性細胞の細胞種を免疫組織染色によって調べた。その結果、GPR157 の発現抑制の場合と同様に PAX6 陽性細胞 (放射状グリア細胞) の割合が増え、TBR2 陽性細胞 (intermediate progenitor) の割合が減少した (図 8、9)。加えて、BrdU パルス標識によって細胞周期の進行への影響を調べた結果、GFP および PAX6 二重陽性細胞中の BrdU 陽性細胞の割合には変化がなかった (図 10) ことから、Gq シグナリングおよび IP₃ シグナリングの阻害は、GPR157 を発現抑制した場合と同様に、放射状グリア細胞の神経分化を抑制することが示された。

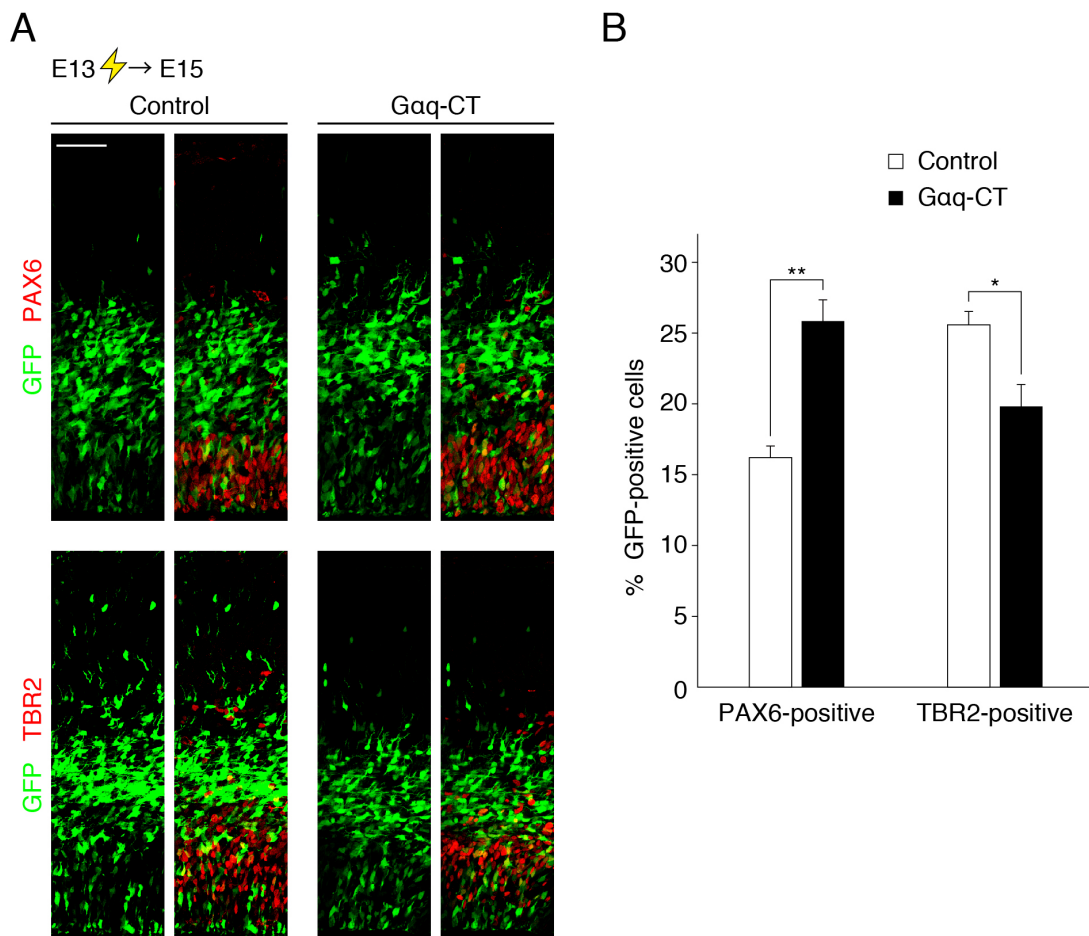


図8. Gaq-CTの発現は神経分化を抑制する

(A) ControlベクターまたはGaq-CT発現ベクターを、GFP発現ベクターと共に、E13マウス胎仔の脳新皮質に導入した。遺伝子導入2日後 (E15) に脳を単離して固定し、冠状切片を作製した。PAX6抗体およびTBR2抗体による蛍光免疫染色像を示した。

(B) 全GFP陽性細胞中での、PAX6陽性細胞の割合およびTBR2陽性細胞の割合 (平均値±標準誤差、n=3)。*p<0.05、**p<0.01。Scale Bar = 50 μm。

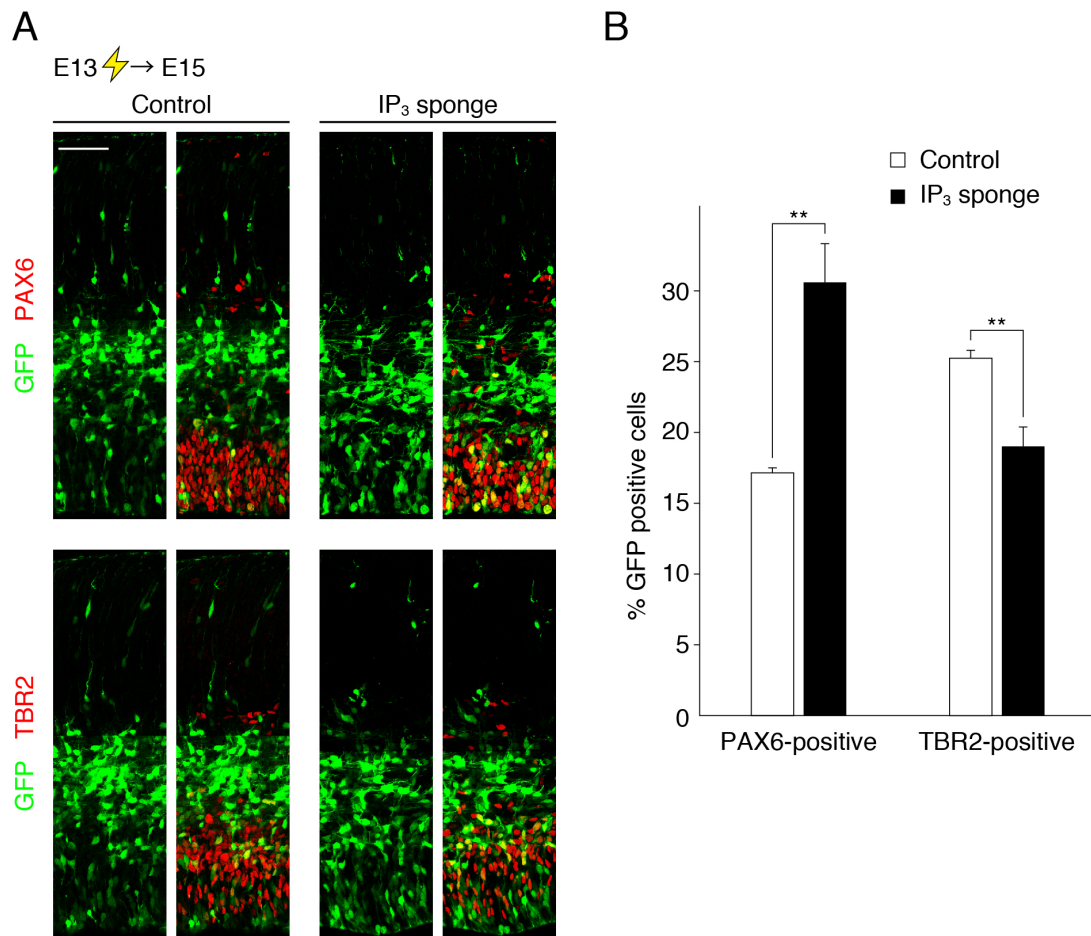


図9. IP₃ spongeの発現は神経分化を抑制する

(A) ControlベクターまたはIP₃ sponge発現ベクターを、GFP発現ベクターと共に、E13マウス胎仔の脳新皮質に導入した。遺伝子導入2日後 (E15) に脳を単離して固定し、冠状切片を作製した。PAX6抗体およびTBR2抗体による蛍光免疫染色像を示した。

(B) 全GFP陽性細胞中での、PAX6陽性細胞の割合およびTBR2陽性細胞の割合 (平均値±標準誤差、n=3)。**p<0.01。Scale Bar = 50 μm。

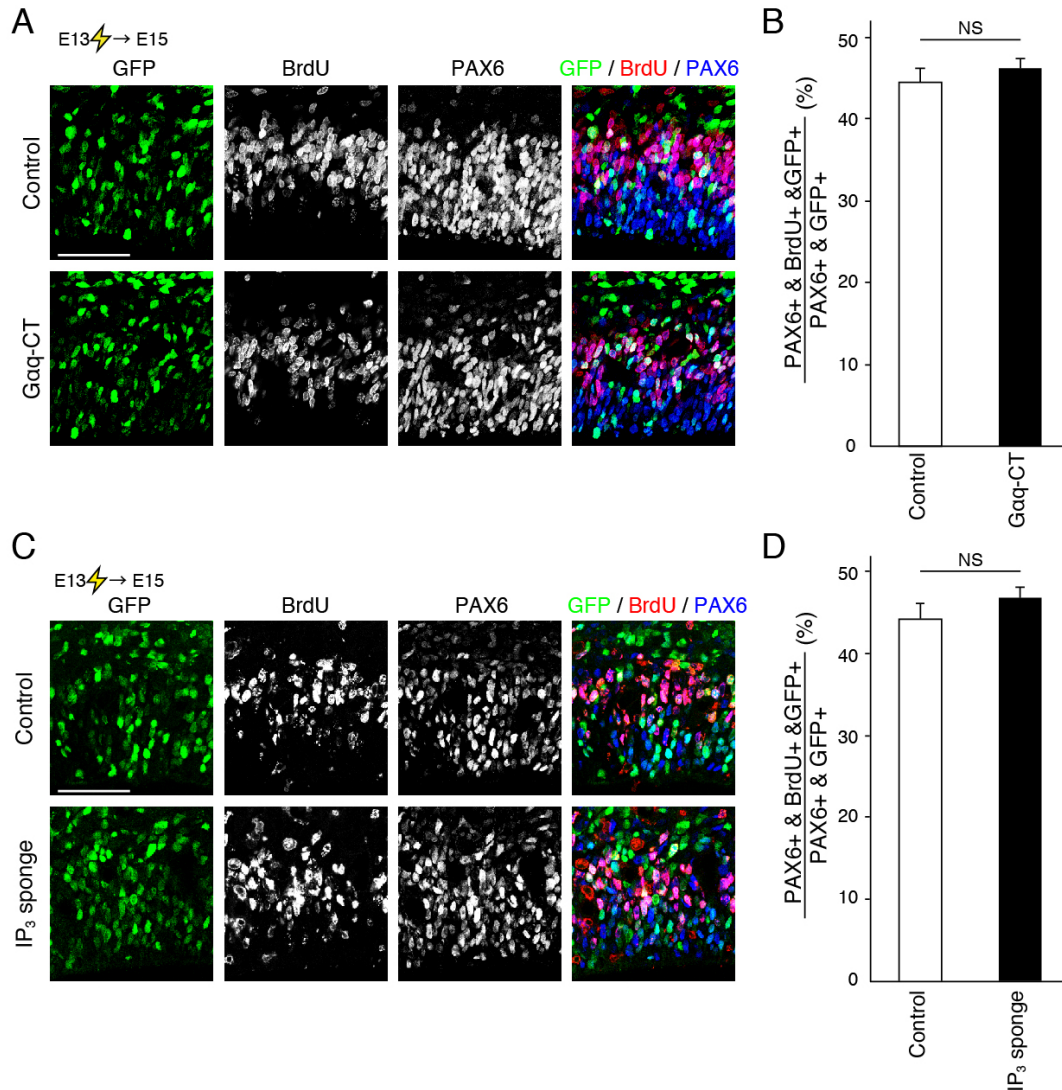


図10. Gaq-CTまたはIP₃ spongeの発現による放射状グリア細胞のBrdUの取り込み量への影響

(A) ControlベクターまたはGaq-CT発現ベクターを、GFP発現ベクターと共に、E13マウス胎仔の脳新皮質に導入した。遺伝子導入2日後 (E15) に脳を単離して固定し、冠状切片を作製した。GFP抗体、PAX6抗体、およびBrdU抗体による蛍光免疫染色像。図は脳室帯の拡大像を示した。

(B) GFP陽性、PAX6陽性細胞中の、BrdU陽性細胞の割合 (平均値±標準誤差、n=3)。NS : 有意差無

(C) ControlベクターまたはIP₃ sponge発現ベクターを、GFP発現ベクターと共に、E13マウス胎仔の脳新皮質に導入した。遺伝子導入2日後 (E15) に脳を単離して固定し、冠状切片を作製した。GFP抗体、PAX6抗体、およびBrdU抗体による蛍光免疫染色像。図は脳室帯の拡大像を示した。

(D) GFP陽性、PAX6陽性細胞中の、BrdU陽性細胞の割合 (平均値±標準誤差、n=3)。NS : 有意差無。Scale Bar = 50 μm。

5. GPR157-Gq-IP₃ シグナリングカスケードは放射状グリア細胞の神経分化を促進する。

これまでの実験により、GPR157、Gq シグナリング、IP₃ シグナリングが神経分化に影響を及ぼすことが判明した。しかし、これらのシグナリングが独立の経路を介して神経分化に寄与している可能性があり、GPR157-Gq-IP₃ が同一の経路 (linear pathway) 上にあるとは言い切れない。そこで、このことを明らかにするため、培養した放射状グリア細胞を用いて解析を行った。E13 のマウス胎仔脳の放射状グリア細胞に GFP、GPR157、Gaq-CT、IP₃ sponge、および Gaq Q209L を発現するベクターを種々の組み合わせで導入した (図 11)。子宮内電気穿孔法による遺伝子導入後に、大脳新皮質を単離して、大脳新皮質由来の細胞を初代培養した。培養三日目に細胞を固定し、神経細胞マーカーである TUJ1、放射状グリア細胞のマーカーである SOX2 に対する抗体を用いて免疫染色を施した。GFP のみを遺伝子導入したコントロールでは、GFP 陽性細胞の約 85% は SOX2 陽性細胞であり、残りの約 15% のみが TUJ1 陽性の細胞であった。一方、GPR157 を過剰発現させた場合では、30% を超える細胞が TUJ1 陽性細胞であった (図 11)。つまりコントロールと比較して、GPR157 が導入された放射状グリア細胞は、神経分化しやすくなったと考えられた。また、この神経細胞の増加は Gaq-CT もしくは IP₃ sponge を共発現させることによって顕著に抑制された。他方、Gaq Q209L を発現させた場合、40% 近い細胞が TUJ1 陽性細胞であったが、この神経細胞の増加も IP₃ sponge を共発現させることにより抑制された (図 11)。これらの初代培養細胞を BrdU でパルス標識した結果、いずれの状況においても GFP および SOX2 二重陽性細胞中の BrdU 陽性細胞の割合に変化は見出だせなかった (図 12)。加えて、GFP 陽性細胞中のアポトーシスを引き起こしている細胞の割合は、いずれの条件

においても大きく変化していなかった (<1%)。これらの結果から、GPR157 シグナリングは放射状グリア細胞の神経分化を Gq-IP₃ シグナリング経路を介して促進していることが明らかになった。

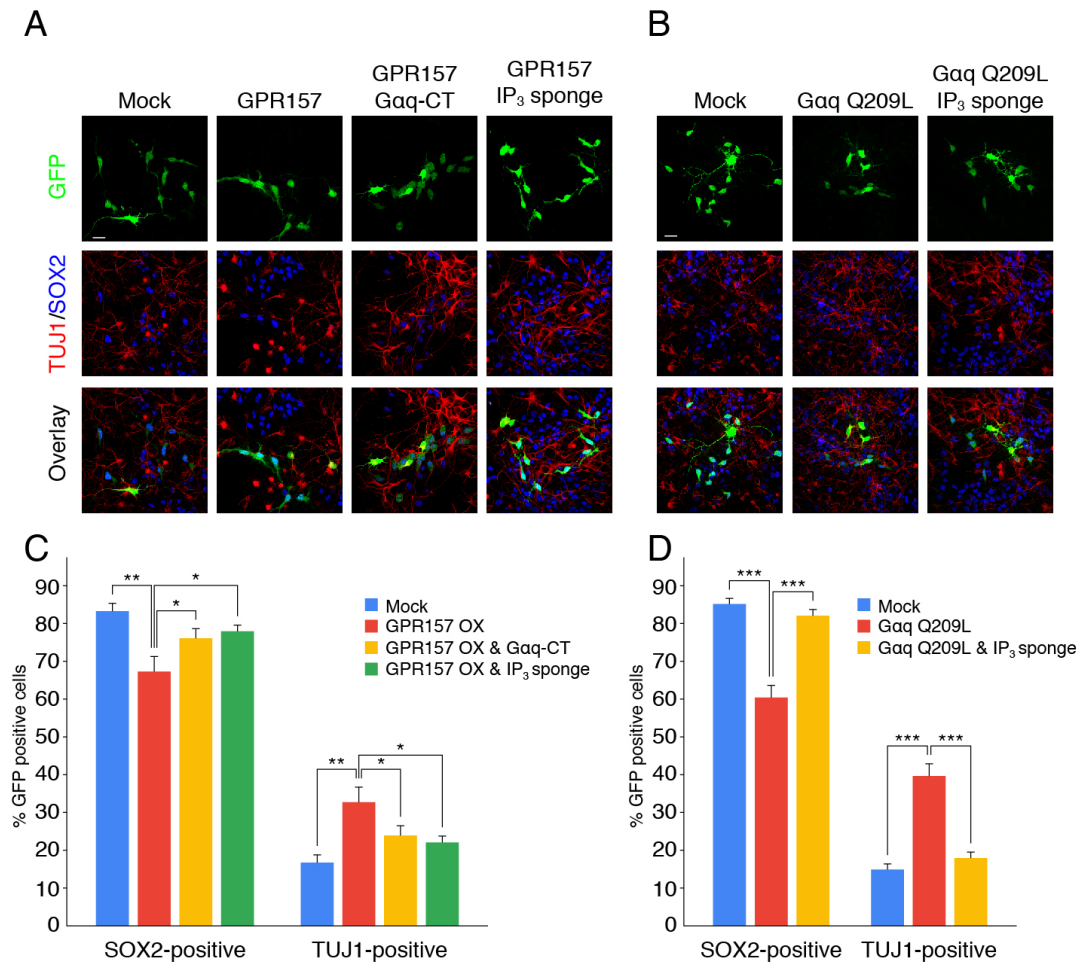


図 11. GPR157-Gq-IP₃ シグナリングは神経分化を促進する

(A) GPR157、GPR157 と Gaq-CT、または GPR157 と IP₃ sponge 発現ベクターを、GFP 発現ベクターと共に、E13 マウス胎仔の脳新皮質に導入した。遺伝子導入直後に脳新皮質を単離し、組織由来の細胞を初代培養した。培養三日目に、SOX2 (青)、および TUJ1 (赤) に対する抗体で免疫染色した。

(B) GaqQ209L、または GaqQ209L と IP₃ sponge 発現ベクターを、GFP 発現ベクターと共に、E13 マウス胎仔の脳新皮質に導入した。遺伝子導入直後に脳新皮質を単離し、組織由来の細胞を初代培養した。培養三日目に、SOX2 (青)、TUJ1 (赤) に対する抗体で免疫染色した。

(C) 全 GFP 陽性細胞中の SOX2 陽性細胞の割合および TUJ1 陽性細胞の割合 (平均値±標準誤差、n=3)。*p<0.05、**p<0.01。

(D) 全 GFP 陽性細胞中の SOX2 陽性細胞の割合および TUJ1 陽性細胞の割合 (平均値±標準誤差、n=3)。***p<0.001。Scale Bar = 20 μm。

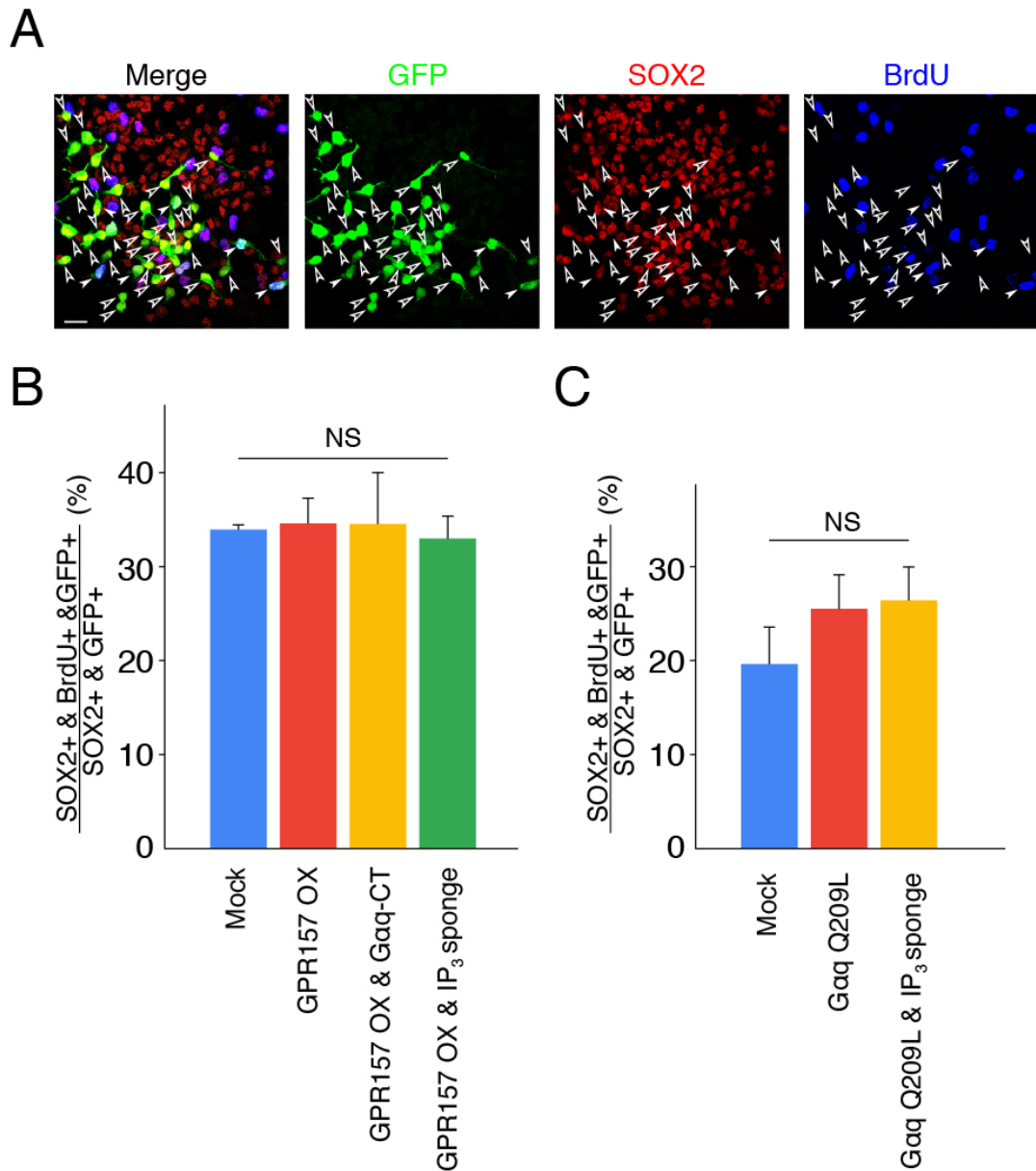


図 12. 放射状グリア細胞における GPR157-Gq-IP₃ シグナリングに干渉した場合の BrdU の取り込み量の影響

GPR157、Gaq-CT、IP₃ sponge、GaQ209L 発現ベクターを図 11 で示した様に組み合わせて、GFP 発現ベクターと共に E13 マウス胎仔の脳新皮質に導入した。遺伝子導入直後に脳新皮質を単離し、組織由来の細胞を初代培養した。培養三日目に BrdU を投与し、1 時間後に固定した。その後、SOX2 (赤)、BrdU (青) に対する抗体で免疫染色した。

(A) 培養した放射状グリア細胞に BrdU を投与させた場合の例。

(B、C) GFP 陽性、SOX2 陽性細胞中の、BrdU 陽性細胞の割合 (平均値±標準誤差、n=3)。

NS : 有意差無

6. GPR157 のリガンドは脳脊髄液中に存在する

GPR157 が脳脊髄液へと突出している一次繊毛に局在している (図 2) ことから、GPR157 のリガンドが脳脊髄液中にある可能性が考えられる。この可能性を検証するため、GPR157 を発現させた U-2 OS 細胞を用いて脳脊髄液が GPR157 を活性化するかについて調べた。その方法として、TGF α 切断アッセイ (Inoue *et al.*, 2012) を利用した。このアッセイ系では、まず TGF の細胞外ドメインにアルカリフォスファターゼ (AP) を連結した融合タンパク質 (AP-TGF α) を U-2 OS 細胞に発現させる。これと同時に GPR157 も発現させる。この状態において、GPR157 にリガンドが結合して活性化すると、細胞に内在する膜型プロテアーゼ TACE が Gq シグナリングによって活性化され、TGF α の細胞外ドメインを切断する。その結果、AP が培養上清中へと放出される。そこで、細胞に残る AP-TGF α 由来の AP 活性と、培養上清中の AP 活性を測定し、AP 活性全体に対する培養上清中の AP 活性を計算した。これを GPR157 の活性指標 (relative AP activity) として定義した (図 13A)。このアッセイ系を用いて、E10 並びに E13 のマウス胎仔脳の側脳室から採取した脳脊髄液の relative AP activity を測定した。GPR157 発現細胞と Mock 発現細胞をハンクス緩衝塩に曝露しても、relative AP activity に違いはなかった (図 13B)。一方、E13 脳脊髄液に曝露した場合、GPR157 発現細胞における relative AP activity は Mock 発現細胞に比べて顕著に上昇した (図 13B)。Mock 発現細胞において、ハンクス緩衝塩と比較して E13 脳脊髄液に曝露した場合に relative AP activity の上昇が認められた。これは、U-2 OS 細胞に内在する GPCR シグナリングの活性化に依るものと考えられる。重要なことに、E10 脳脊髄液と比較して、E13 脳脊髄液の方が、GPR157 をより強く活性化することが判明した (図 13B)。

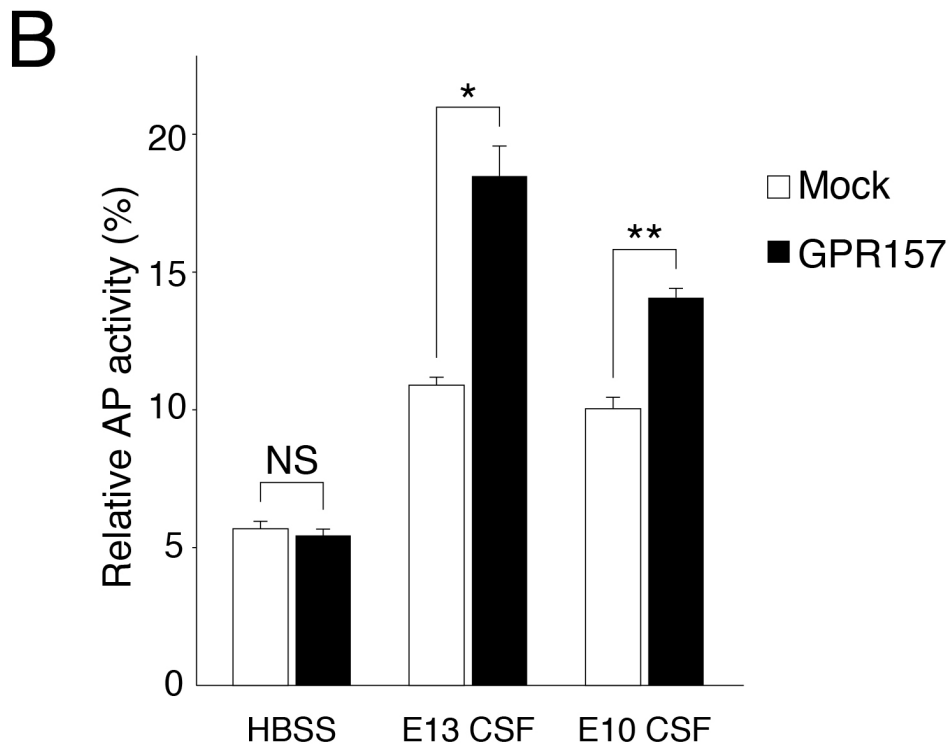
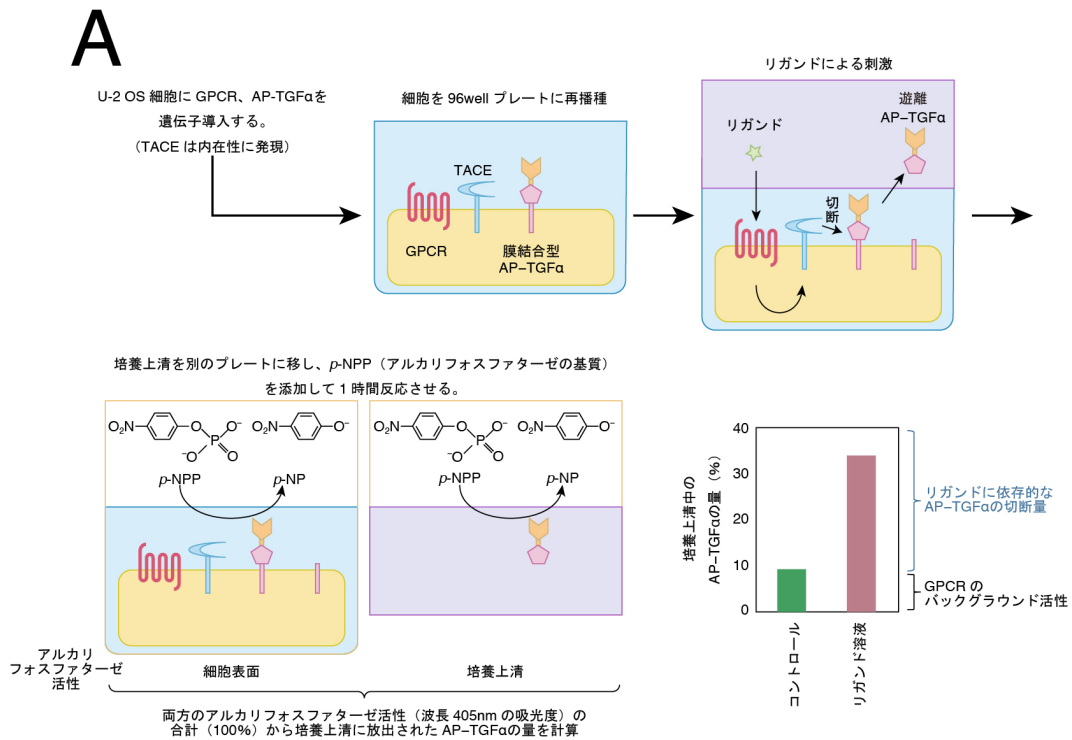


図 13. GPR157 のリガンドは脳脊髄液中に存在する

(A) TGF α 切断アッセイの模式図。Inoue *et al.*, 2012を参照。

(→次頁へ)

これらの結果から、GPR157のリガンドはマウス胎仔脳の脳脊髄液中に存在し、その活性化能はE10に比べてE13の方がより高いことが判明した。

(→前頁から)

(B) U-2 OS細胞にAP-TGF α 発現プラスミドと共に、MockプラスミドまたはGPR157発現プラスミドを遺伝子導入した。ハンクス緩衝塩 (HBSS)、E10脳脊髄液 (HBSSで八倍希釈)、E13脳脊髄液 (HBSSで八倍希釈) を加えた場合のrelative AP activityを測定した。平均値 \pm 標準誤差、n=3。*p<0.05、**p<0.01。

考察

1. 放射状グリア細胞の運命制御における Gq-IP₃ シグナリング

放射状グリア細胞の運命は、発生時期に応じて変化する。この変容には外界シグナルが大きく寄与する。この外界シグナルの実態を理解することは、大脳新皮質の発生、そして神経新生の礎となる機構を理解する上で欠かすことのできないものである。GPCR および G タンパク質を介したシグナル伝達系が細胞の増殖や形質転換に関わっている (Julius *et al.*, 1989; van Corven *et al.*, 1989) ことが明らかになってきた 1980 年代後半から、胎生期大脳に発現する GPCR に関して報告され始め、脳室帯特異的に発現しているオーファン GPCR が同定される (Hecht *et al.*, 1996) など、GPCR が放射状グリア細胞の運命動態に関与している可能性が出てきた。しかし、GPCR シグナリングの役割についての解析は近年まで進んでいなかった。本研究において GPR157 が放射状グリア細胞の一次繊毛に発現していることを見出した。また、GPR157 は Gq クラスの三量体 G タンパク質と共役していた。加えて、GPR157 の発現抑制、Gq-CT の発現や、IP₃ sponge の発現によって、GPR157/Gq/IP₃ シグナリングを阻害すると、放射状グリア細胞の神経分化が抑制された。重要なことに、GPR157、Gq、および IP₃ が linear pathway の構成因子として神経分化を促進することを、培養した放射状グリア細胞を用いて明らかにした。これらの結果から、GPR157-Gq-IP₃ シグナリングが放射状グリア細胞の神経分化の亢進に寄与していることが判明した。加えて IP₃ が IP₃ 受容体と結合することで機能することを考慮すると、本経路は [Ca²⁺]_i の上昇を介して神経分化を促進していると推察される。

三量体 G タンパク質の Gαq ファミリーは、Gαq、Gα11、Gα14、Gα15 および Gα16 のサブタイプから構成されている (Simon *et al.*, 1991)。従来の研究から、Gαq

のノックアウトマウスは出生後の生存率が約三割低下すると共に、小脳において登上線維の刈り込みが正常に行われず、運動機能障害を呈する (Offermanns *et al.*, 1997)。また、Gaq の近縁分子である Ga11 のノックアウトマウスは特に異常は報告されていない。しかし、Gaq と Ga11 の二重ノックアウトマウスは、心筋形成不全による胎生致死である (Offermanns *et al.*, 1998)。このことから、Gaq ファミリーは redundant に機能して個体発生に重要な役割を担っていることが考えられる。しかしながら、大脳新皮質の発生における機能については解析が進んでいない。また、Gq の下流で機能する IP₃ 受容体についても遺伝子欠損マウスが作成されている (Matsumoto *et al.*, 1996; Futatsugi *et al.*, 2005) が、Gaq の場合と同様に、大脳新皮質の発生における機能については解析が進んでいない。このような状況もあり、Gq-IP₃ シグナリング経路の大脳新皮質の発生における役割が不明であった。本研究により、Gq-CT や IP₃ sponge を用いることで発生時の生体内における役割を初めて見出した。このことは大脳新皮質の発生の理解を大きく前進させた。

2. カルシウムと放射状グリア細胞

放射状グリア細胞における [Ca²⁺]_i の変化が、細胞周期や自己複製に影響を与えることがこれまでに報告されている (Lin *et al.*, 2007; Nishimoto *et al.*, 2007; Weissman *et al.*, 2004; Malmersjö *et al.*, 2013)。例えば、胎生期ラット脳スライス等を用いた実験により、脳室帯においてカルシウム波の伝播が観察されている。このカルシウム波は放射状グリア細胞間のギャップ結合および電位依存性カルシウムチャンネルに依存して発生する。このギャップ結合やカルシウムチャンネルの阻害はカルシウム波を消失させ、同時に自己複製を減衰させる。一方、放射状グリア細胞には、プリン受容体 P2Y₁ および PACAP 受容体 (いずれも GPCR) が発

現しており、培養した放射状グリア細胞に ATP や PACAP を作用させると、Gq-IP₃ シグナリング経路を活性化して、細胞周期を加速し、自己複製を促進することが報告されている。(Lin *et al.*, 2007; Nishimoto *et al.*, 2007)。この様に、[Ca²⁺]_i の上昇は細胞周期の進行に影響し、自己複製を制御することが知られていた。本研究において、Gq-IP₃-Ca²⁺シグナリングが放射状グリア細胞の神経分化の亢進に寄与していることを示した。また、放射状グリア細胞の BrdU の取り込みに変化を与えていないことから、細胞周期の進行に与える影響は極めて小さいと考えられた。このことは発生時期に応じて、Ca²⁺のターゲットが変化し、異なる反応をする可能性を示唆している。または、[Ca²⁺]_i の上昇が放射状グリア細胞の異なる部位で引き起こされたり、[Ca²⁺]_i の上昇の振幅や持続時間が異なるなど、カルシウムシグナリングの時空間的なパターンが経路によって異なっており、その結果、細胞の反応が異なっているのかもしれない。(Thomas *et al.*, 1996)。

カルシウム濃度上昇によって引き起こされる神経分化の要因の一つとして、カルパインの活性化が考えられる。培養細胞において Gq シグナリングはカルパインを介して β-カテニンの分解を引き起こすという報告(Li and Iyengar, 2002)がある。β-カテニンシグナリングは放射状グリア細胞の自己複製、神経分化の両方に大きく寄与している (Chenn and Walsh, 2002; Mutch *et al.*, 2010)。このことから、Gq-IP₃-Ca²⁺シグナリングは、β-カテニンの量を統制することで放射状グリア細胞の運命制御に寄与しているのかもしれない。

3. 脳脊髄液と放射状グリア細胞

脳脊髄液は脳室を満たしている体液であり、絶えず循環することで流体クッションとしての役割や細胞外イオンバランスを保つ媒体としての役割を担っている。マ

ウスにおいては、神経管が形成される E8.5-E9 に神経管閉鎖 (neural tube closure) に伴って、羊水が神経管腔に取り込まれて脳脊髄液となる (Lowery & Sive, 2009)。この時期における脳脊髄液の構成成分は、神経上皮細胞に由来する。その後、E11 頃に脈絡叢が形作られると、そこから脳脊髄液が産生されるようになる (Sturrock, 1979; Zaki, 1981)。脳脊髄中にはインスリン様成長因子、ソニックヘッジホッグまたはレチノイン酸などの放射状グリア細胞の運命制御に関わる因子が数多く存在し、これらの構成要素の量および種類は時期特異的に大きく変動している (Zappaterra *et al.*, 2007)。これらの知見から、流体クッションとして、また細胞外イオンバランスを保つ媒体としての役割に加えて、脳脊髄液は放射状グリア細胞の挙動に大きな影響を与えていると考えられている。事実、脳脊髄液由来のシグナリングが放射状グリア細胞の自己複製を制御しているという報告 (Lehtinen *et al.*, 2011) がある。脳脊髄液由来のシグナリングのセンサーとして放射状グリア細胞の一次繊毛が重要な役割を担っている (Lehtinen and Walsh, 2011)。本研究では、GPR157 が一次繊毛に局在し、脳脊髄液中の構成成分によって活性化されうることを示した。興味深いことに、GPR157 に対する活性化能は、自己複製が盛んな時期 (E10) と比較して、神経分化が盛んな時期 (E13) に上昇していた。このことは、脳脊髄液中因子によって、神経細胞産生期に GPR157 シグナリングのスイッチが入ることを示唆している。脳脊髄液を構成する様々なシグナリング因子が脈絡叢から分泌されること (Lehtinen and Walsh, 2011; Johansson *et al.*, 2010)、さらに、脈絡叢が E11 頃から発達することを合わせて考慮すると、GPR157 のリガンドが脈絡叢から分泌される可能性が十分想定される。以上のことを統合すると、GPR157 は神経産生期において、脳脊髄液と放射状グリア細胞との相互作用を媒介する分子であり、脳脊髄液中の神経産生因子に反応し、Gq/IP₃/Ca²⁺シグ

ナリングを介して神経分化を促進するというモデルが提示できた (図 14)。

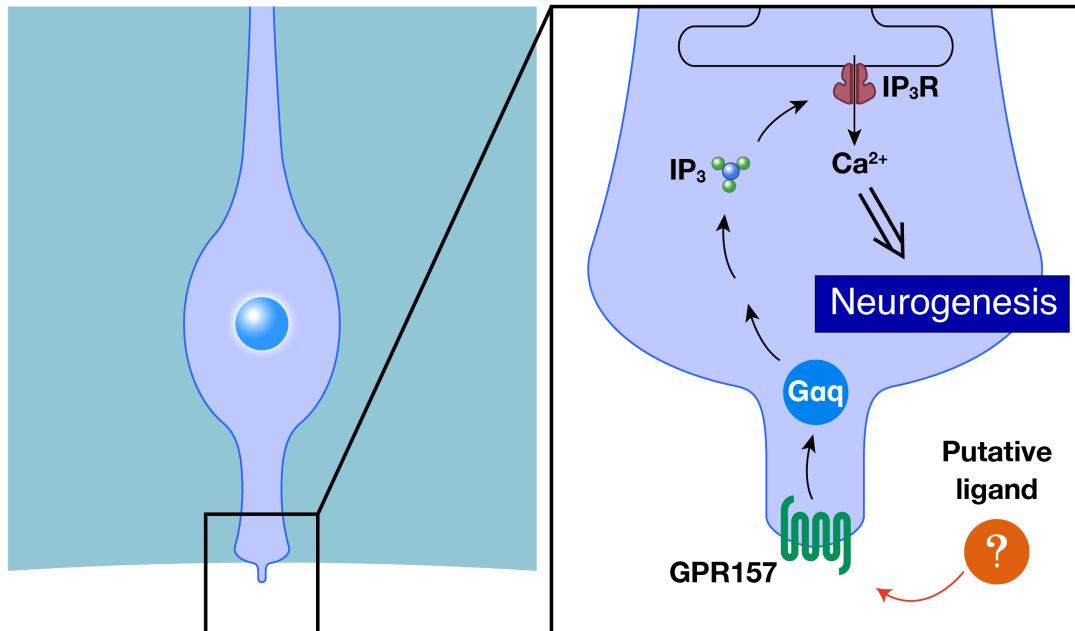


図 14. 放射状グリア細胞における GPR157 シグナリングの作用機序のモデル図

(左) 放射状グリア細胞は発生期大脳新皮質の脳室帯 (水色) に位置し、脳脊髄液で満たされている脳室に向かって一次繊毛を突出させている。(右) 一次繊毛近傍の拡大図。神経細胞産生期になると脳脊髄液内に存在する GPR157 のリガンドによって、一次繊毛上にある GPR157 が活性化される。GPR157 シグナリングは Gq-PLC-IP₃ シグナリングを介して小胞体からカルシウムイオンを放出し、放射状グリア細胞の神経分化を亢進する。

結論

本研究では、放射状グリア細胞の一次繊毛に局在する GPR157 の存在を示し、GPR157 の放射状グリア細胞における機能解析を通じて、GPCR シグナリングが脳脊髄液と放射状グリア細胞との相互作用において重要な役割を担っていることを明らかにすることができた。近年、GPR157 も含め、放射状グリア細胞特異的に発現する様々な GPCR の存在が報告されている (Lui *et al.*, 2014; Florio *et al.*, 2015)。また、放射状グリア細胞において重要な役割を担っている GPCR の存在が明らかにされてきている (Kurabayashi *et al.*, 2013; Bae *et al.*, 2014; Yung *et al.*, 2015)。今後さらなる GPCR-G α シグナリングの解析や、それら GPCR に対するリガンドの同定が、放射状グリア細胞の新たな運命制御機構の発見につながるのみならず、発生大脳新皮質における放射状グリア細胞-脳脊髄液間の相互関係の基調となる複雑な機構の理解へと繋がる道標となることが期待される。

材料と方法

1. 実験動物

動物実験には、Jcl:ICR マウスの胎仔、および新生仔を用いた。全ての動物実験は、東京大学の定めるガイドラインに従って実施した。

2. プラスミド

pCAG-IRES-GFP (pCAGIG) プラスミドおよび pCAGEN プラスミドは京都大学の松田孝彦博士から分与していただいた。Gaq-CT 発現プラスミド (306 番目から 359 番目のアミノ酸残基を発現) は、金沢大学の多久和陽教授に分与していただいた。pBS/U6 プラスミドはハーバード大学の Dr. Yang Shi から分与していただいた。pAlph-TGF-alpha プラスミドは愛媛大学の東山繁樹教授に分与していただいた。Lifeact-EGFP 発現プラスミド (Riedl *et al.*, 2008) は MGVDLIKKFESISKEE-EGFP のコーディング配列を pCAGEN プラスミドに挿入することによって作製した。マウス *Gpr157* のオープンリーディングフレームは、マウス由来の cDNA から PCR によって増幅し、pCAGEN プラスミドにクローニングした。二つのサイレント変異を加えた変異 GPR157 は以下のプライマーを利用して、QuikChange mutagenesis 法で行った。

Fw: 5'-GCGTCCTTCAGGGCGCTCTATCTACCTTCGCCAACACCAGC-3'

Rv: 5'-GCTGGTGTGGCGAAGGTAGATAGAGCGCCCTGAAGGACGC-3'

Gaq 恒常活性型変異体 (Gaq Q209L) 発現プラスミド (CloneID: GNA0Q000C0) は UMR (University of Missouri-Rolla) から購入した。IP₃ sponge 発現プラスミドを作製するために、マウス IP₃ 受容体 1 型の IP₃ 結合部位 (224 残基目から 604 残基目) を pCAGEN プラスミドにクローニングした。GPR157 に対する shRNA

コンストラクトは以下のオリゴヌクレオチドを、pBS/U6 プラスミドにクローニングした。

GPR157 shRNA #1,

5'-GGTGTCCCGTTGGCCATCACAAGCTTGTGATGGCCAACGGGACACCCTT
TTTG-3'、および

5'-AATTCAAAAAGGGTGTCCCGTTGGCCATCACAAGCTTGTGATGGCCAAC
GGGACACC-3'。

GPR157 shRNA#2,

5'-GGCGCTCTCTACTTTCGCAAGCTTGCGAAAGTAGAGAGAGCGCCCTT
TTTG-3'、および

5'-AATTCAAAAAGGGCGCTCTCTACTTTCGCAAGCTTGCGAAAGTAGAG
AGAGCGCC-3'。

3. 子宮内電気穿孔法

妊娠 11、13 日目の妊娠マウスにペントバルビタールを腹腔内投与し、深麻酔した。麻酔下において子宮を外科的に露出し、DNA 溶液（後述）を子宮内の胎仔の側脳室に注入した。その後、子宮壁を介して胎仔の頭部をピンセット型電極ではさみ、電気パルス（E11：45V、30ms 方形波×4 回、970ms インターバル、E13：40V、50ms 方形波×4 回、950ms インターバル）を与えた。この操作を複数の胎仔に対して行った後、子宮を母親マウスに戻して、縫合した。

DNA 溶液は 0.02%ファストグリーン含有リン酸緩衝生理食塩水（PBS）にプラスミドを溶かして作製した。DNA 溶液中の最終プラスミド濃度は以下の通り。
pCAGIG プラスミド (4 μ g/ μ l)、Lifeact-EGFP 発現プラスミド (0.8 μ g/ μ l)、pBS/U6

プラスミド (4 μ g/ μ l)、GPR157 shRNA プラスミド (4 μ g/ μ l)、GPR157 発現プラスミド (4 μ g/ μ l)、変異 GPR157 発現プラスミド (3.2 μ g/ μ l)、Gaq Q209L 発現プラスミド (4 μ g/ μ l)、Gaq-CT 発現プラスミド (8 μ g/ μ l、初代培養用には 4 μ g/ μ l)、および IP₃ sponge 発現プラスミド (10.5 μ g/ μ l、初代培養用には 4 μ g/ μ l)。BrdU 標識実験のために、胎仔から脳を単離する 30 分前に BrdU (E15 において体重 1g あたり 100mg) を妊娠マウスの腹腔内に投与した。

4. GPR157 の抗体作成および免疫染色

マウス GPR157 の 314-329 番目のアミノ酸配列に対応する領域のペプチドを抗原として、ウサギに免疫した。GPR157 抗体は、得られた抗血清から抗原ペプチドを用いてアフィニティー精製した。本抗体の作製は、Sigma genosys に委託した。GPR157 を免疫染色する際にはマウス胎仔 (E13) から脳を単離し、4% paraformaldehyde 含有 PBS を用いて固定した (4°C で 22 時間)。その後、振動刃マイクロトーム (Leica) にて切片 (40 μ m 厚) を作製した後、免疫染色を施した。en face imaging を行う際には、Histo VT One 溶液 (ナカライテスク) 中で 70°C、15 分間抗原賦活化処理を行った後、免疫染色を施し、脳室壁を上向きにしてスライドグラスに載せて観察を行った。

5. 抗体

免疫染色法の一次抗体として以下の抗体を用いた。抗 GPR157 ウサギポリクローナル抗体 (1:100)、抗 ZO-1 マウスモノクローナル抗体 (1:100; Zymed)、抗 Ac-tub マウスモノクローナル抗体 (1:500; Sigma-Aldrich)、抗 GFP ラットモノクローナル抗体、抗 GFP ウサギポリクローナル抗体 (1:1000; Invitrogen)、抗 PAX6

ウサギポリクローナル抗体 (1:1500; Covance)、抗 TBR2 ウサギポリクローナル抗体 (1:5000; Abcam)、抗 SOX2 ヤギポリクローナル抗体 (1:200; Santa Cruz)、抗 TUJ1 マウスモノクローナル抗体 (1:5000; Covance)、抗 DYKDDDDK マウスモノクローナル抗体 (1:200; Wako)、抗 BrdU ラットモノクローナル抗体 (1:500; Bio Rad)、および抗 BrdU マウスモノクローナル抗体 (1:500; Dako)。

ウェスタンブロット解析の一次抗体として以下の抗体を用いた。抗 GPR157 ウサギポリクローナル抗体 (1:1000)、抗 GFP ウサギポリクローナル抗体 (1:1000; Thermo Fisher)、抗 β -アクチン (1:15000; Sigma Aldrich)。

二次抗体として以下の抗体を用いた。Alexa488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:1,000; Molecular Probes) および DyLight549 標識抗マウス IgG 抗体 (1:500; Jackson Immunoresearch)。

6. 免疫組織染色

マウス胎仔から脳を単離し、4%paraformaldehyde含有PBSを用いて室温で30分間固定した。固定後の脳は、30%Sucrose含有PBSに浸し、4°Cで一晩インキュベートした後、33%OCTコンパウンド (Sakura Tissue Tek) 含有PBSに包埋し、液体窒素にて凍結した。その後、クライオスタット (Leica) にて切片 (25 μ m厚) を作製した。PAX6またはTBR2を免疫染色する際は、Histo VT Oneを用いて賦活化処理を施した後、ブロッキング溶液 (5%ウシ胎仔血清 (FBS)、3%BSA、および0.2%TritonX-100含有PBS) 中で切片を1時間インキュベートし、さらに一次抗体と反応させた。BrdUを免疫染色する際は室温で4規定の塩酸に25分間浸して賦活化処理を行った後、ブロッキング溶液 (5%FBS、および0.2%TritonX-100含有PBS) 中で切片を1時間インキュベートし、さらに一次抗体と反応させた。

7. 細胞培養、トランスフェクションおよびウェスタンブロット

U-2 OS 細胞は 10%FBS およびペニシリン・ストレプトマイシンを添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いて維持した。プラスミド DNA のトランスフェクションには Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用した。トランスフェクションの 24 時間後に RIPA Lysis Buffer (10 mM Na⁺-phosphate, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1.0% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1.0% TritonX-100, pH 7.4) を用いて可溶化した。この細胞懸濁液を氷上で 10 分間静置した後、15,500×g で 10 分間遠心し、上清を回収した。この上清をウェスタンブロット解析に供した。ウェスタンブロット解析の一次抗体として以下の抗体を用いた。二次抗体として以下の抗体を用いた。HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:3,000; Amersham Biosciences)。

8. 放射状グリア細胞の初代培養および免疫細胞染色

放射状グリア細胞を分散培養する場合、まず E13 のマウス胎仔に子宮内電気穿孔法によってプラスミド DNA をトランスフェクションした。その後、胎仔から大脳新皮質を単離してハンクス緩衝塩類溶液中に回収し、ピペットマン P-1000 を用いてピペッティング処理を施すことで細胞を分散した。分散した放射状グリア細胞は Poly-D-lysine (Sigma-Aldrich) でコートした細胞培養プレート上に $\sim 2.0 \times 10^5$ 細胞/cm² の濃度で播種した。放射状グリア細胞は D-MEM/F12 (終濃度 0.6%の glucose 含有) に 2% B27 supplement (Invitrogen)、1% N-2 supplement (Invitrogen) および 0.5% bFGF (Invitrogen) を添加した培地を用いて維持した。培養した放射状グリア細胞は、培養三日目に、4% paraformaldehyde 含有 PBS

を用いて 37°C で 20 分間固定した。続いて、0.2% TritonX-100 含有 PBS を用いて細胞を透過処理した。その後、ブロッキング溶液中で細胞を 1 時間インキュベートし、さらに抗体反応を行った。全ての反応が終わった後、Prolong Gold mounting solution を用いて封入し、観察を行った。BrdU 標識実験では、固定する 1 時間前に最終濃度が 10 μ M になるように BrdU を培地に添加した。固定後、2 規定の塩酸を用いて 30 分間室温で賦活化処理を施した。

9. RT-PCR

マウス胎仔大脳新皮質由来の全 RNA は RNA easy (Quiagen) を用いて抽出した。RNA は Superscript II (Invitrogen) を利用して逆転写を行った。作製した cDNA は以下のプライマーを用いて PCR 反応に供した。

Beta-actin-Fw,

5'-CCTTCTACAATGAGCTGCGTGTG-3';

Beta-actin-Rv

5'-AGAGGCATACAGGGACAGCACAG-3';

Nestin-Fw

5'-GCTGAGAACTCTCGCTTGCAGAC-3';

Nestin-Rv

5'-AAGAGAAGGATGTTGGGCTGAGG-3';

GPR157-Fw

5'-TTGGTCAGAAAGCACATCAACAG-3';

GPR157-Rv

5'-TGCTTGGTCTCCTAATCCTGAAG-3'.

10. 細胞内カルシウム濃度変化の測定

U-2 OS 細胞は 24 well プレート上に 1.0×10^5 細胞/cm² の濃度で播種し、10% FBS 添加 DMEM で培養した。プラスミド DNA のトランスフェクションには Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用した。培養開始から 24 時間後に、Quest Rhod-4™ Rhod-4 NW Calcium Assay Kit (AAT Bioquest) を使用して、細胞内に Rhod-4 カルシウム指示薬を取り込ませ、蛍光顕微鏡を用いてイメージを取得した。さらに、Rhod4 に由来する蛍光の強度を測定した。

11. TGF α 切断アッセイ

TGF α 切断アッセイは Inoue *et al.*, 2012 で報告された方法に一部変更を加えて行った。U-2 OS 細胞は 24 well プレート上に 1.0×10^5 細胞/cm² の濃度で播種し、10% FBS 添加 DMEM で 24 時間培養した。AP-TGF α 発現プラスミドおよび GPCR 発現プラスミドを lipofectamine 3000 を使用してトランスフェクションした。24 時間後、PBS で洗浄して、トリプシンで細胞を剥がし 96 well プレートに再播種した。24 時間後、培地を無血清培地に置換し、血清飢餓を行った。その後、HBSS で二回洗浄した後、HBSS または脳脊髄液 (HBSS で八倍希釈) を 30 μ l 加えて 37°C で一時間反応させた。反応後、70 μ l の HBSS を加え、80 μ l の上清を別の空いている well に移した。p-NPP 含有溶液 80 μ l を元の well、上清を加えた well のそれぞれに添加し 405nm の波長における吸光度を添加直後と、37°C 一時間の反応後の二回測定した。Relative AP activity の計算方法は Inoue *et al.*, 2012 に準じた。マウス胎仔側脳室からの脳脊髄液の採取は Johansson *et al.*, 2013 に準じた。

謝辞

本研究を行うにあたって、多くの方々のご指導とご協力を賜りました。眞田佳門准教授には、研究の立案から考察に至るまで、懇切丁寧なご指導、ご助言をいただきました。ハーバード大学医学部の Dr. Yang Shi には、pBS-U6 プラスミドを分与していただきました。京都大学の松田孝彦博士には、pCAGEN ベクターを分与していただきました。金沢大学の多久和陽教授には、Gaq-CT 発現ベクターを分与していただきました。愛媛大学の東山繁樹教授には、pAlph-TGF-alpha プラスミドを分与していただきました。

眞田研究室並びに遺伝子実験施設の皆様方には日頃より様々な点においてお世話になりました。両親には、長きに渡る学生生活の間温かく見守っていただきました。本研究をご支援していただいた方々にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Bae BI, Tietjen I, Atabay KD, Evrony GD, Johnson MB, Asare E, Wang PP, Murayama AP, Im K, Lisgo SN, Overman L, Šestan N, Chang BS, Barkovich AJ, Grant PE, Topçu M, Politsky J, Okano H, Piao X, Walsh CA. 2014. Evolutionarily dynamic alternative splicing of GPR56 regulates regional cerebral cortical patterning. *Science* **343**: 764–68. doi: 10.1126/science.1244392.
- Delous M, Baala L, Salomon R, Laclef C, Vierkotten J, Tory K, Golzio C, Lacoste T, Besse L, Ozilou C, Moutkine I, Hellman NE, Anselme I, Silbermann F, Vesque C, Gerhardt C, Rattenberry E, Wolf MT, Gubler MC, Martinovic J, Encha-Razavi F, Boddaert N, Gonzales M, Macher MA, Nivet H, Champion G, Berthéléme JP, Niaudet P, McDonald F, Hildebrandt F, Johnson CA, Vekemans M, Antignac C, Rütger U, Schneider-Maunoury S, Attié-Bitach T, Saunier S. 2007. The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nature Genetics* **39**: 875–881. doi: 10.1038/ng2039.
- Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RAM, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF. 2005. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *The Journal of Neuroscience* **25**: 247–251. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2899-04.2005.
- Florio M, Huttner WB. 2014. Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development* **141**: 2182–2194. doi:

10.1242/dev.090571.

Florio M, Albert M, Taverna E, Namba T, Brandl H, Lewitus E, Haffner C, Sykes A, Wong FK, Peters J, Guhr E, Klemroth S, Prüfer K, Kelso J, Naumann R, Nüsslein I, Dahl A, Lachmann R, Pääbo S, Huttner WB. 2015. Human-specific gene ARHGAP11B promotes basal progenitor amplification and neocortex expansion. *Science* **347**: 1465–1470. doi: 10.1126/science.aaa1975.

Futatsugi A, Nakamura T, Yamada MK, Ebisui E, Nakamura K, Uchida K, Kitaguchi T, Takahashi-Iwanaga H, Noda T, Aruga J, Mikoshiba K. 2005. IP₃ receptor types 2 and 3 mediate exocrine secretion underlying energy metabolism. *Science* **309**: 2232–2234 doi: 10.1126/science.1114110.

Gilchrist A, Bünemann M, Li A, Hosey MM, Hamm HE. 1999. A dominant-negative strategy for studying roles of G proteins in vivo. *The Journal of biological chemistry* **274**: 6610–6616.

Greig LC, Woodworth MB, Galazo MJ, Padmanabhan H, Macklis JD. 2013. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nature Reviews Neuroscience* **14**: 755–769. doi: 10.1038/nrn3586.

Han YG, Alvarez-Buylla A. 2010. Role of primary cilia in brain development and cancer. *Current Opinion in Neurobiology* **20**: 58–67. doi: 10.1016/j.conb.2009.12.002.

Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J. 1996. Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of

- the developing cerebral cortex. *The Journal of Cell Biology* **135**: 1071–1083.
- Higginbotham HR, Gleeson JG. 2007. The centrosome in neuronal development. *Trends in Neuroscience* **30**: 276–283. doi: 10.1016/j.tins.2007.04.001.
- Inoue A, Ishiguro J, Kitamura H, Arima N, Okutani M, Shuto A, Higashiyama S, Ohwada T, Arai H, Makide K, Aoki J. 2012. TGF α shedding assay: an accurate and versatile method for detecting GPCR activation. *Nature Methods* **9**: 1021–1029. doi: 10.1038/nmeth.2172.
- Johansson PA, Cappello S, Götz M. 2010. Stem cell niches during development - lessons from the cerebral cortex. *Current Opinion in Neurobiology* **20**: 1–8. doi: 10.1016/j.conb.2010.04.003.
- Johansson PA, Irmeler M, Acampora D, Beckers J, Simeone A, Götz M. 2013. The transcription factor Otx2 regulates choroid plexus development and function. *Development* **140**: 1055–1066. doi: 10.1242/dev.090860.
- Julius D, Livelli TJ, Jessell TM, Axel R. 1989. Ectopic expression of the serotonin 1c receptor and the triggering of malignant transformation. *Science* **244**: 1057–1062.
- Kageyama R, Ohtsuka T, Shimojo H, Imayoshi I. 2010. Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells. *Current opinion in cell biology* **21**: 733–740. doi: 10.1016/j.ceb.2009.08.009.
- Kowalczyk T, Pontious A, Englund C, Daza RA, Bedogni F, Hodge R, Attardo A, Bell C, Huttner WB, Hevner RF. 2009. Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cerebral Cortex* **19**: 2439–2450. doi: 10.1093/cercor/bhn260.

- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience* **32**: 149–184. doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135600.
- Kurabayashi N, Nguyen MD, Sanada K. 2013. The G protein-coupled receptor GPRC5B contributes to neurogenesis in the developing mouse neocortex. *Development* **140**: 4335–4346. doi: 10.1242/dev.099754.
- Kurabayashi N, Sanada K. 2014. Increased dosage of DYRK1A and DSCR1 delays neuronal differentiation in neocortical progenitor cells. *Genes & development* **27**: 2708–2721. doi: 10.1101/gad.226381.113.
- Kwan KY, Šestan N, Anton ES. 2012. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development* **139**: 1535–1546. doi: 10.1242/dev.069963.
- Lehtinen MK, Zappaterra MW, Chen X, Yang YJ, Hill AD, Lun M, Maynard T, Gonzalez D, Kim S, Ye P, D'Ercole AJ, Wong ET, LaMantia AS, Walsh CA. 2011. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron* **69**: 893–905. doi: 10.1016/j.neuron.2011.01.023.
- Lehtinen MK, Walsh CA. 2011. Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **27**: 653–679. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154026.
- Li G, Iyengar R. 2002. Calpain as an effector of the Gq signaling pathway for inhibition of Wnt/beta -catenin-regulated cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 13254-13259.

- Lin JH, Takano T, Arcuino G, Wang X, Hu F, Darzynkiewicz Z, Nunes M, Goldman SA, Nedergaard M. 2007. Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Developmental Biology* **302**: 356–366. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.09.017.
- Louvi A, Grove EA. 2011. Cilia in the CNS: the quiet organelle claims center stage. *Neuron* **69**: 1046–1060. doi: 10.1016/j.neuron.2011.03.002.
- Lowery LA, Sive H. 2009. Totally tubular: the mystery behind function and origin of the brain ventricular system. *BioEssays* **31**:446–58. doi: 10.1002/bies.200800207
- Lui JH, Nowakowski TJ, Pollen AA, Javaherian A, Kriegstein AR, Oldham MC. 2014. Radial glia require PDGFD-PDGFR β signalling in human but not mouse neocortex. *Nature* **515**: 264–268. doi: 10.1038/nature13973.
- Malmersjö S, Rebellato P, Smedler E, Planert H, Kanatani S, Liste I, Nanou E, Sunner H, Abdelhady S, Zhang S, Andäng M, El Manira A, Silberberg G, Arenas E, Uhlén P. 2013. Neural progenitors organize in small-world networks to promote cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: E1524–E1532. doi: 10.1073/pnas.1220179110.
- Matsumoto M, Nakagawa T, Inoue T, Nagata E, Tanaka K, Takano H, Minowa O, Kuno J, Sakakibara S, Yamada M, Yoneshima H, Miyawaki A, Fukuuchi Y, Furuichi T, Okano H, Mikoshiba K, Noda T. 1996. Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Nature* **379**: 168–171. doi: 10.1038/379168a0.

- Mikoshiha K. 2015. Role of IP₃ receptor signaling in cell functions and diseases. *Advances in Biological Regulation* **57**: 217-227. doi: 10.1016/j.jbior.2014.10.001. Epub 2014.
- Milligan G. 2003. Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Molecular Pharmacology* **64**: 1271–1276. doi: 10.1124/mol.64.6.1271.
- Mutch CA., Schulte JD, Olson E, Chenn, A. 2010. Beta-catenin signaling negatively regulates intermediate progenitor population numbers in the developing cortex. *PLoS ONE* **5**: e12376. doi: 10.1371/journal.pone.0012376
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R. 2002. G protein pathways. *Science* **296**: 1636–1639. doi: 10.1126/science.1071550.
- Nishimoto M, Furuta A, Aoki S, Kudo Y, Miyakawa H, Wada K. 2007. PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells. *Glia* **55**: 317–327. doi: 10.1002/glia.20461.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nature Neuroscience* **7**: 136–144. doi: 10.1038/nn1172.
- Offermanns S, Hashimoto K, Watanabe M, Sun W, Kurihara H, Thompson RF, Inoue Y, Kano M, Simon MI. 1997. Impaired motor coordination and persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking Gαq. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 14089–14094.
- Offermanns S, Zhao LP, Gohla A, Sarosi I, Simon MI, Wilkie TM. 1998.

- Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in Gαq/Gα11-mutant mice. *The EMBO Journal*. **17**: 4304–4312. doi: 10.1093/emboj/17.15.4304
- Piao X, Hill RS, Bodell A, Chang BS, Basel-Vanagaite L, Straussberg R, Dobyns WB, Qasrawi B, Winter RM, Innes AM, Voit T, Ross ME, Michaud JL, Descarrie JC, Barkovich AJ, Walsh CA. 2004. G protein-coupled receptor-dependent development of human frontal cortex. *Science* **303**: 2033–2036. doi: 10.1126/science.1092780.
- Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z, Sixt M, Wedlich-Soldner R. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature Methods* **5**: 605–607. doi: 10.1038/nmeth.1220.
- Sanada K, Tsai LH. 2005. G protein βγ subunits and AGS3 control spindle orientation and asymmetric cell fate of cerebral cortical progenitors. *Cell* **122**: 119–131. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.009.
- Shinohara H, Udagawa J, Morishita R, Ueda H, Otani H, Semba R, Kato K, Asano T. 2004. Gi2 signaling enhances proliferation of neural progenitor cells in the developing brain. *J. Biol. Chem.* **279**: 41141–41148. doi: 10.1074/jbc.M406721200.
- Shen Q, Goderie SK., Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S. 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* **304**: 1338–1340. doi: 10.1126/science.1095505

- Shen Q, Wang Y, Dimos JT, Fasano CA, Phoenix TN, Lemischka IR, Ivanova NB, Stifani S, Morrisey EE, Temple S. 2006. The timing of cortical neurogenesis is encoded within lineages of individual progenitor cells. *Nature Neuroscience* **9**: 743–751. doi: 10.1038/nn1694
- Siegenthaler JA, Ashique AM, Zarbalis K, Patterson KP, Hecht JH, Kane MA, Folias AE, Choe Y, May SR, Kume T, Napoli JL, Peterson AS, Pleasure SJ. 2009. Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell* **139**: 597–609. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.004.
- Simon MI, Strathmann MP, GAUTAM N. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**: 802–808.
- Singer K, Luo R, Jeong SJ, Piao X. 2013. GPR56 and the developing cerebral cortex: cells, matrix, and neuronal migration. *Molecular Neurobiology* **47**: 186–196. doi: 10.1007/s12035-012-8343-0.
- Sturrock RR. 1979. A morphological study of the development of the mouse choroid plexus. *Journal of Anatomy* **129**: 777–793.
- Sui G, Soohoo C, Affar B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. 2002. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 5515-5520. doi: 10.1073/pnas.082117599.
- Thomas AP, Bird GS, Hajnóczky G, Robb-Gaspers LD, Putney JW. 1996. Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB Journal* **10**: 1505-1517.
- Tong CK, Han YG, Shah JK, Obernier K, Guinto CD, Alvarez-Buylla A. 2014.

- Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 12438–12443. doi: 10.1073/pnas.1321425111.
- Uchiyama T, Yoshikawa F, Hishida A, Furuichi T, Mikoshiba K. 2002. A novel recombinant hyperaffinity inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) absorbent traps IP₃, resulting in specific inhibition of IP₃-mediated calcium signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 8106–8113. doi: 10.1074/jbc.M108337200.
- van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH. 1989. Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* **59**: 45–54.
- Weissman TA, Riquelme PA, Ivic L, Flint AC, Kriegstein AR. 2004. Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron* **43**: 647–661. doi: 10.1016/j.neuron.2004.08.015.
- Yung YC, Stoddard NC, Mirendil H, Chun J. 2015. Lysophosphatidic acid signaling in the nervous system. *Neuron* **85**: 669–682. doi: 10.1016/j.neuron.2015.01.009.
- Zaki W. 1981. Ultrastructure of the choroid plexus and its development in the mouse. *Zeitschrift fur Mikroskopisch-Anatomische Forschung*. **95**: 919–935.
- Zappaterra MD, Lisgo SN, Lindsay S, Gygi SP, Walsh CA, Ballif BA. 2007. A comparative proteomic analysis of human and rat embryonic cerebrospinal fluid. *Journal of Proteome Research* **6**: 3537–3548. doi: 10.1021/pr070247w.