

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「生命システムの動作原理と基盤技術」
研究課題「短周期遺伝子発現リズムの動作原理」

研究終了報告書

研究期間 平成18年10月～平成24年3月

研究代表者：影山 龍一郎
(京都大学ウイルス研究所、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

細胞の増殖や分化過程では、多くの遺伝子群が正しいタイミングで発現するが、このタイミングを制御する生物時計の実体はよくわかっていない。我々は、bHLH型転写因子 *Hes1* や *Hes7* が2時間を刻む生物時計として働くことを明らかにしたが、その詳細な分子機構や意義は不明であった。そこで、本研究では、短周期リズムを刻む遺伝子発現動態の分子基盤と意義の解明を目指し、以下のことを明らかにした。

体節は未分節中胚葉の前端が周期的に分節することにより形成されるが、マウスの場合には約2時間毎に起こる。この体節形成を制御する分節時計のリズムは、*Hes7* の発現がネガティブ・フィードバックによって自律的に振動(オシレーション)することによって刻まれる。この発現機構をもとに微分方程式からなる数理モデルを構築したところ、安定な *Hes7* オシレーションには、*Hes7* の遺伝子産物が十分に不安定であること、さらに *Hes7* 遺伝子の発現からネガティブ・フィードバックに至るまで十分な時間の遅れが必要であると予測された。このうち、*Hes7* 遺伝子産物の不安定性に関しては、以前、検証実験によって数理モデルの予測が正しいことを示した。さらに、もう一つの予測に関して検証するために、イントロン・スプライシングに注目したところ、イントロンの存在によって *Hes7* の発現が約19分遅れることがわかった。数理モデルからは、ネガティブ・フィードバックにかかる時間が19分短くなると発現がオシレーションしなくなることが予測された。そこで、*Hes7* 遺伝子からイントロンを除去したマウスを作製したところ、*Hes7* の発現がオシレーションしなくなり、体節は癒合し、体節由来の組織である椎骨や肋骨も癒合した。以上の結果から、数理モデルの予測が正しいことが示され、このモデルは分節時計の動態を正確に反映していると考えられた。

未分節中胚葉における *Hes7* の上流を解析したところ、*Hes7* オシレーションは *Fgf* シグナルによって開始され、*Notch* シグナルによって増幅と前側への伝搬が起こっていた。逆に、*Hes7* は *Fgf* シグナルや *Notch* シグナルを周期的に抑制することによって両方のシグナル系の活性を振動させた。したがって、*Hes7*-*Notch*-*Fgf* 系はお互いに発現振動を制御し合うオシレーター・ネットワークを形成することが明らかになった。さらに、*Notch* シグナルの振動によって体節のサイズが、*Fgf* シグナルの振動によって体節形成の時間的周期性が制御されていた。以上の影山グループの結果をもとに、吉川グループとの共同で分節時計の中心的な役割を担う *Hes7*-*Notch*-*Fgf* オシレーター・ネットワークの全体を包括した数理モデルを構築した。

次に、体節形成以外での短周期遺伝子発現振動の意義を探るために、線維芽細胞を用いて2時間周期で発現変動する遺伝子を網羅的に検索した。その結果、リン酸化 *Stat3* (*pStat3*) および *Socs3* がネガティブ・フィードバックを形成して約2時間周期で発現振動すること(*pStat3*-*Socs3* オシレーション)、この発現振動を抑制すると *Hes1* の発現振動が阻害されることがわかった。この影山グループの結果は、吉川グループによる数理モデルの結果とよく一致し、体節形成以外での短周期遺伝子発現振動の分子基盤が明らかになった。*pStat3* の形成に *Hes1* が必要であることから、*Hes1* オシレーションおよび *pStat3*-*Socs3* オシレーションはお互いに依存・協調していること、さらに、この発現振動は細胞増殖に非常に重要であることもわかった。他にも、*Smad* や *Fgf* シグナルの因子群も発現振動を示し、短周期の発現振動は特殊なものではなく、一般的な現象であることが強く示唆された。線維芽細胞以外に神経幹細胞を解析したところ、その維持に必須な役割を持つ *Hes1* の発現が2-3時間周期で振動しており、そのためプロニューラル遺伝子 *Ngn2* や *Notch* リガンド *Dll1* の発現も振動していた。この結果から、神経幹細胞では *Notch* シグナルは双方向性にダイナミックに働くこと、そのため神経幹細胞同士で *Notch* シグナルを活性化し合って細胞集団全体の未分化性維持に働くことがわかった。また、胚性幹細胞では *Hes1* の発現は3-5時間周期で振動しており、分化誘導時に *Hes1* の発現が高いと中胚葉系に、低いと神経系に分化しやすかった。したがって、*Hes1* の発現振動が胚性幹細胞の多様な分化応答に関わっ

ていることが示された。

以上から、短周期リズムを刻む遺伝子動態の分子基盤と各種生命現象における意義が明らかになった。

(2) 顕著な成果

1. Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008) Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. **Neuron** 58, 52-64.

概要: 神経幹細胞において Hes1 の発現が2-3時間周期で振動しており、そのためプロニューラル遺伝子 Ngn2 や Notch リガンド Dll1 の発現も振動していた。この結果から、神経幹細胞では Notch シグナルは双方向性にダイナミックに働くことがわかった。

2. Kobayashi, T., Mizuno, H., Imayoshi, I., Furusawa, C., Shirahige, K., and Kageyama, R. (2009) The cyclic gene *Hes1* contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. **Genes & Dev.** 23, 1870-1875.

概要: 胚性幹細胞において Hes1 の発現が3-5時間周期で振動しており、分化誘導時に Hes1 の発現が高いと中胚葉系に、低いと神経系に分化しやすかった。したがって、Hes1 の発現振動が胚性幹細胞の多様な分化応答に関わっていることが明らかになった。

3. Niwa, Y., Shimojo, H., Isomura, A., González, A., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2011) Different types of oscillations in Notch and Fgf signaling regulate the spatiotemporal periodicity of somitogenesis. **Genes & Dev.** 25, 1115-1120.

概要: 分節時計において、Hes7 の発現振動によって Notch や Fgf シグナルの活性が振動すること、Notch シグナルによって体節のサイズが、Fgf シグナルによって体節形成の時間的周期性が制御されることがわかり、これらを組み込んだ数理モデルを構築した。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

細胞の生存、増殖、分化過程では、多くの遺伝子群が正しいタイミングで発現する。この遺伝子発現のタイミングを正確に決める生物時計の存在が以前から示唆されていたが、実体は長らく不明であった。発生過程で働く生物時計は、概日時計（約 24 時間周期）より短周期であることが予想されていた。例えば、体節形成過程を制御する生物時計、いわゆる分節時計の周期は、マウスの場合 2 時間である。我々は、bHLH 型転写抑制因子 Hes7 の発現がネガティブ・フィードバックを介して自律的に 2 時間周期で増減を繰り返すこと（オシレーション）、下流遺伝子で分節を制御する *Lfng* の発現は Hes7 に依存してオシレーションすること、Hes7 を欠損すると 2 時間という周期性が失われて体節が激しく癒合することを示し、Hes7 が 2 時間を刻む分節時計の本体であることを明らかにした。しかし、Hes7 や *Lfng* 以外にもオシレーションを示す遺伝子がいくつか発見されているが、Hes7 オシレーションとの関係はよくわかっておらず、分節時計の全体像の解明には至っていない。さらに、我々は、Hes7 と同じ遺伝子ファミリーに属する Hes1 の発現が体節形成過程だけでなく、いろいろな細胞においてネガティブ・フィードバックを介して自律的に 2 時間周期でオシレーションすることを見出した。しかし、体節形成過程の Hes1 や Hes7 オシレーションは安定に持続するのに対して、それ以外の細胞での Hes1 オシレーションは不安定である。この違いがどのような機序によるのかはよくわかっていない。さらに、体節形成過程以外で、2 時間という短周期の遺伝子発現リズムを刻む意義は全くわかっていない。

最近、我々は、1 細胞レベルで Hes1 の発現をリアルタイムで可視化するシステムを開発した。その結果、今まで定常状態と考えられていた条件下でも、実は個々の細胞では Hes1 の発現はダイナミックにオシレーションしていることがわかった。ただ、オシレーションの位相が細胞間でずれているため、集団としては発現が一定のようにみえていただけであった。また、Hes1 を持続発現させると細胞増殖能や分化能が著しく阻害されることから、Hes1 オシレーションの重要性が強く示唆された。一方、Hes1 オシレーションが同期する条件下でマイクロアレー解析を行ったところ、多くの遺伝子の発現が Hes1 と同じような短周期リズムを刻むことがわかった。これらの結果から、2 時間という短周期の発現リズムを刻むことは多くの遺伝子に普遍的な現象で、細胞増殖や分化に重要なのではないかと考えられた。本研究では、短周期発現リズムの動作原理と意義を明らかにする目的で、以下の解析を計画した。

1. 分節時計に関わるオシレーション分子群の動態と相互作用の全体像について
2. 上記の結果を元にした数理モデルの構築
3. 数理モデルから予測される現象の検証実験
4. 体節形成過程以外の細胞でのオシレーション分子群の動態と機能について

上記 1～3 の解析から、分節時計の正確な数理モデルを構築し、上記 4 の結果と比較することによって、安定なリズムと不安定なリズムを刻む条件を明らかにしたいと考えた。さらに、上記 4 では、マイクロアレー解析から見つかるオシレーション分子の機能をしらべ、短周期遺伝子発現リズムの意義を明らかにしようと試みた。

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

研究は予定通り行われ、修正等は特に無い。

§3 研究実施体制

(1)「影山」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
影山 龍一郎	京都大学ウイルス研究所	教授	H18.10～
大塚 俊之	同上	准教授	H18.10～
小林 妙子	同上	助教	H18.10～
Aitor González	同上	非常勤研究者	H19.4～
下條 博美	同上	非常勤研究者	H18.10～
今吉 格	同上	日本学術振興会 特別研究員、 非常勤研究者	H18.10～H.21.9
丹羽 康隆	同上	日本学術振興会 特別研究員	H18.10～H22.3
磯村 彰宏	同上	非常勤研究者	H21.4～
都留 常央	同上	D1～3	H19.4～H22.3
Tan SiokLay	同上	D1～4	H20.4～
松永 充博	同上	D1～3	H19.4～H23.3
坂本 雅行	同上	D1～3 D1 のときのみ CREST 専任 RA	H21.4～
播磨 有希子	同上	D1～2	H20.5～
渡邊 直希	同上	D1	H22.4～
立岩 友香里	同上	技能補佐員	H21.4～
野村 安記	同上	技能補佐員	H18.10～H21.5

② 研究項目

- 短周期遺伝子発現リズムの動作原理

(2)「吉川」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
吉川 研一	京都大学理学研究科	教授	H18.10～
Marcel Hoerning	同上	研究補助員	H19.4～
高島 英弥	同上	M2～D1	H22.4～
山本 暁久	同上	M2～D1	H22.4～
劉 偉智	同上	M1～M2	H22.4～
Lee, Yo-Ju	同上	M2	H23.4～
北畑 裕之	同上	助教	H18.10～H21.3
武仲 能子	同上	D1～D3	H18.10～H21.3
磯村 彰宏	同上	D1～D3	H18.10～H21.3
住野 豊	同上	D1～D3	H18.10～H21.3
永井 健	同上	D1～D3	H18.10～H21.3

② 研究項目

- 短周期遺伝子発現リズムの数理モデルの構築

§ 4 研究実施内容及び成果

4. 1 短周期遺伝子発現リズムの動作原理(京都大学 影山グループ)

(1)研究実施内容及び成果

(回)分節過程における Hes7 を中心としたオシレーションネットワークの解明

(1)Hes7 オシレーションモデルの検証実験:イントロン・スプライシングによるネガティブ・フィードバックの遅れがHes7 オシレーションに必須

これまで、分節過程において、Hes7 がネガティブ・フィードバックを介して発現オシレーションすることを明らかにし、この結果をもとに微分方程式からなる数理モデルを提唱した。この数理モデルから、安定な Hes7 の発現オシレーションには、Hes7 の遺伝子産物が十分に不安定であること、さらに発現からネガティブ・フィードバックに至るまで十分な時間の遅れがあることが重要であると予測された(図1)。

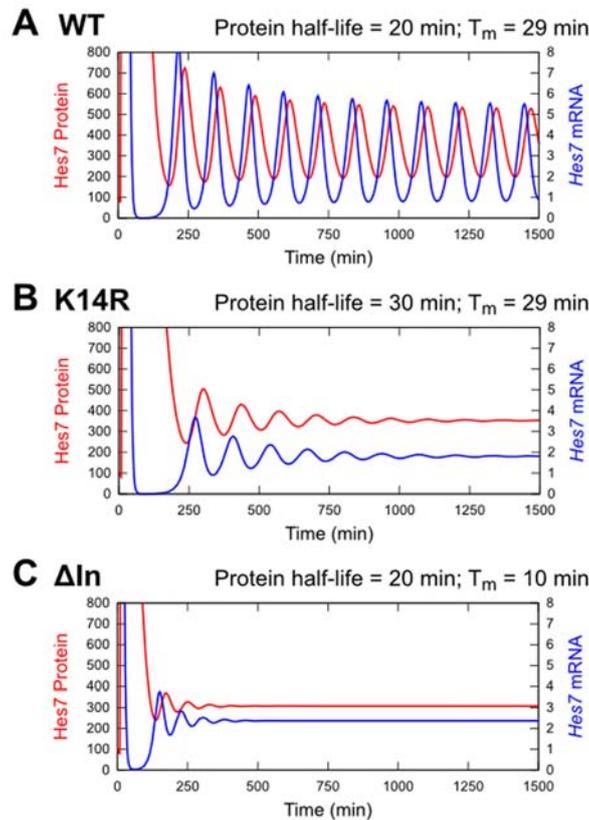


図1:Hes7 の発現振動と数理モデル。(A)正常では、Hes7 mRNA および Hes7 蛋白の発現が振動する。(B) Hes7 蛋白の 14 番目のリジン残基をアルギニンに置換(K14R)すると、Hes7 蛋白の半減期が約 10 分程度安定化する。このとき、Hes7 の発現は2-3回振動した後、定常になる。(C) Hes7 遺伝子のイントロン除去(ΔIn)により negative autoregulation が 19 分早く起こると、Hes7 の発現は振動しなくなる。

このうち、Hes7 遺伝子産物の不安定性に関しては、以前、検証実験によって数理モデルの予測が正しいことを示した(図1B)。本年度は、もう一つの予測に関して検証することにした。そのために、イントロン・スプライシングに注目して、Hes7 遺伝子のイントロンを含むレポーターと含まないレポーターをもつ遺伝子改変マウスを作製した。Hes7 プロモーターからレポーターの発光が起こるまでのタイミングを測定したところ、イントロンの存在によって約19分の遅れが見られた(図2)。

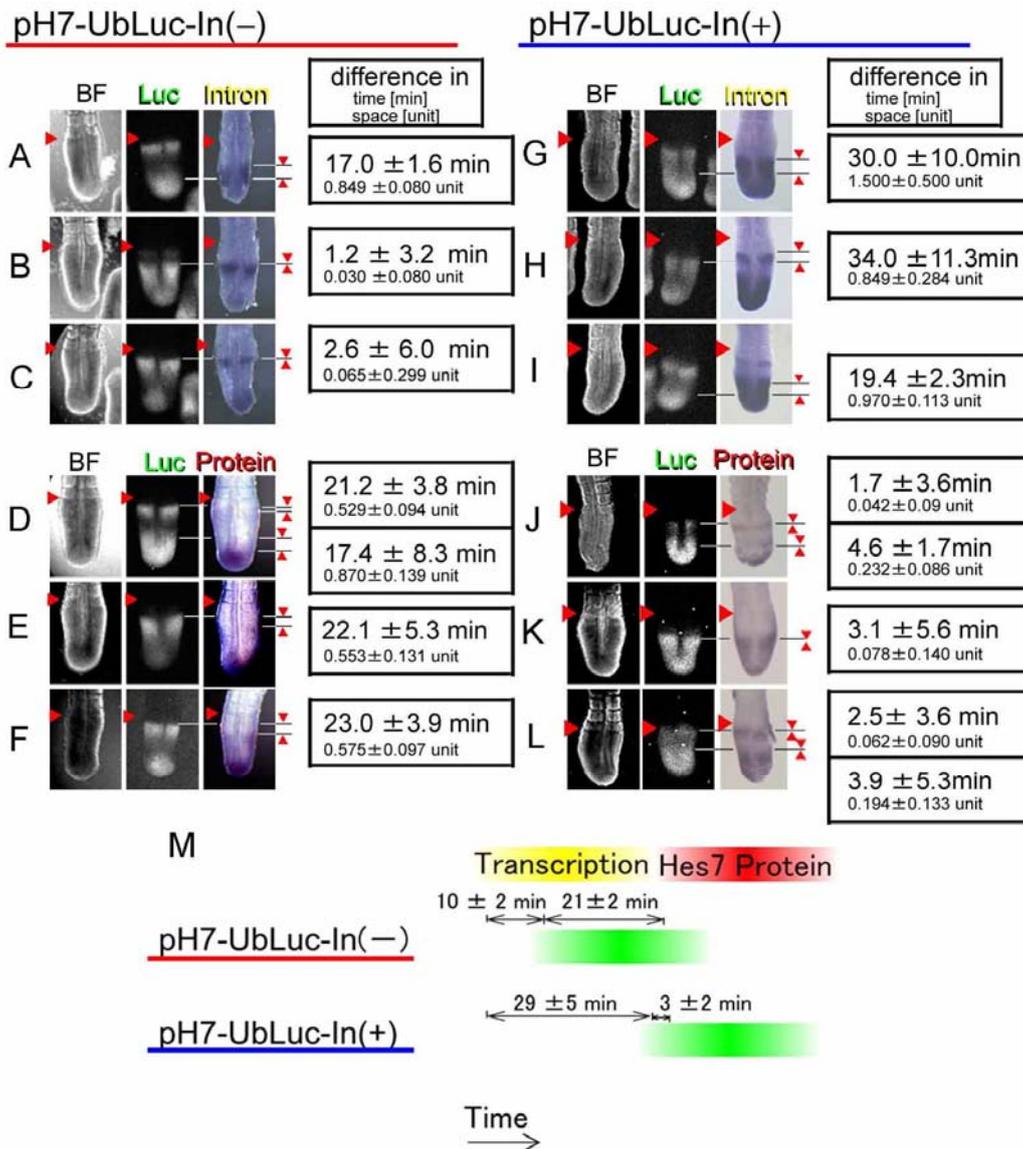


図2: Hes7 遺伝子のイントロンを含むレポーターと含まないレポーターの発現を内在性 Hes7 の発現と比較した。レポーターの発現は、イントロンの存在によって約19分遅れた。

数理モデルからは、発現からネガティブ・フィードバックに至るまでの時間が19分短くなると、発現がオシレーションしなくなることが予測された(図1C)。そこで、Hes7 遺伝子からイントロンを取り除いて時間の遅れを短くしたマウスを作製したところ、Hes7 の発現オシレーションが起こらなくなることがわかった。その結果、このマウスの体節は癒合し、体節由来の組織である椎骨や肋骨も激しく癒合した(図3)。

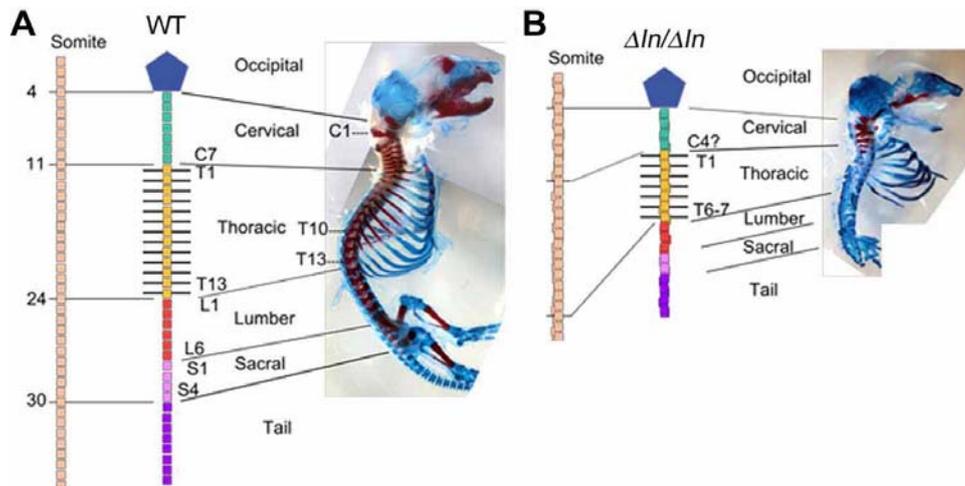


図3:(A)正常マウスの椎骨と肋骨。(B) *Hes7* 遺伝子からイントロンを除去したマウスの椎骨と肋骨。激しく癒合している。

しかし、イントロン除去によって *Hes7* の発現レベルも低下していたので、発現量を増やしてもオシレーションが起こらなくなるかどうかを検討することにした。そのために、イントロンを持つ *Hes7* トランスジーンおよびイントロンを持たない *Hes7* トランスジーンを作り、これらを *Hes7* 欠損マウスに導入した(図4A)。いずれのトランスジーンでも *Hes7* の発現レベルは十分に回復した(図4G)。しかし、イントロンを持つ *Hes7* トランスジーンを導入すると *Hes7* の発現オシレーションや分節が回復したのに対して(図4D)、イントロンを取り除いた *Hes7* トランスジーンを導入してもオシレーションや分節は回復しなかった(図4E)。これらの結果から、イントロンに依存したネガティブフィードバックの時間の遅れが、安定な *Hes7* の発現オシレーションに必須であることが示され、数理モデルの予測の正しさが検証できた。

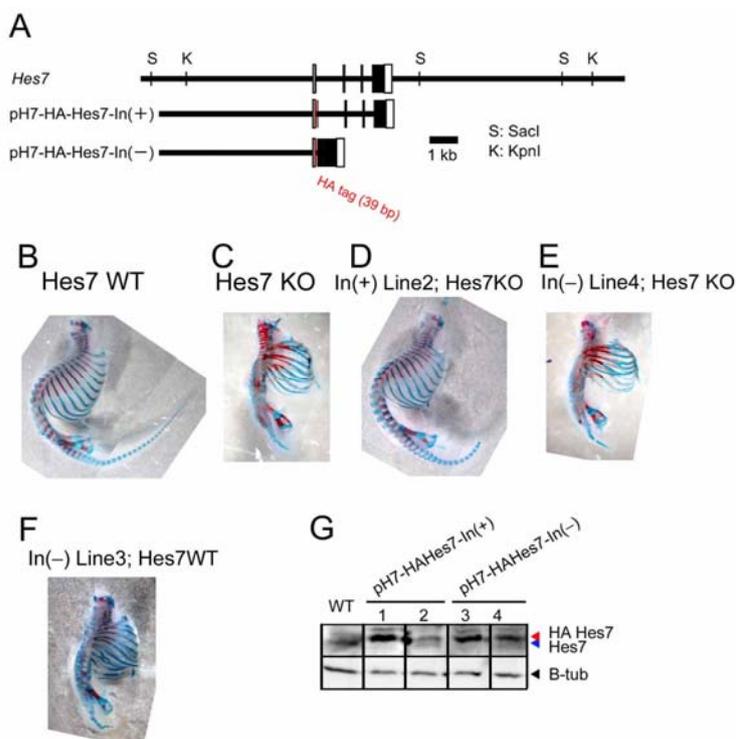


図4：イントロンを持つ *Hes7* トランスジーンおよびイントロンを持たない *Hes7* トランスジーンを *Hes7* 欠損マウスへの導入。(A) *Hes7* トランスジーン構造。(B-F) イントロンを持つ *Hes7* トランスジーンを導入すると分節が回復したが(D)、イントロンを取り除いた *Hes7* トランスジーンを導入しても分節は回復しなかった(E)。(G) いずれの *Hes7* トランスジーンを導入しても、*Hes7* の発現レベルは十分に回復した。

(2) *Hes7*-Notch-Fgfオシレーター・ネットワークの形成

未分節中胚葉における Hes7 の標的遺伝子群を網羅的に探索した結果、Notch シグナル系だけでなく Fgf シグナル系もその活性がオシレーションすることがわかった。すなわち、Fgf シグナル系によって活性化された ERK (リン酸化型、pERK) の量、およびリン酸化 ERK を脱リン酸化して非活性化する Dusp4 の発現量がオシレーションしていた。また、この発現オシレーションは Hes7 によって制御されており、同じく Hes7 によって制御されている Notch シグナル系のオシレーションとリンクしていた。さらに、遺伝子改変マウスの解析から、Hes7 の発現オシレーションは、Fgf シグナルによって開始され、Notch シグナルによって増幅と前側への伝搬が起こることがわかった。したがって、Fgf シグナルと Notch シグナルが協調して Hes7 の発現を制御し、逆に Hes7 は Fgf シグナルと Notch シグナルの発現オシレーションを制御することがわかった (図5)。以上から、分節過程におけるオシレーションネットワークの全体像が明らかになった。

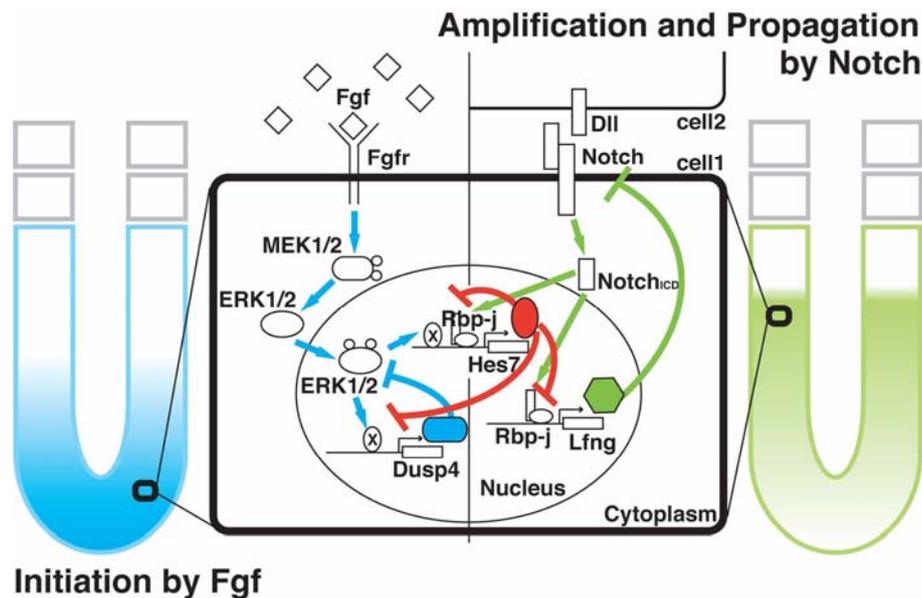


図5: 分節過程における Hes7 を中心としたオシレーションネットワーク

(3) 分節時計における Hes7-Notch-Fgf オシレーター・ネットワークの発現動態と機能

分節過程では、未分節中胚葉の中で次に体節になる領域(前端部分、S₀)のその次に体節になる領域(S₁)に Mesp2 が発現する。S₁ 領域全体に Mesp2 がほぼ同じタイミングで発現することが、体節形成に重要である。Mesp2 の発現は、Notch シグナルによって活性化され、Fgf シグナルによって抑制されることが報告されていた。しかし、これらのシグナル系の発現動態はよくわかっていなかったため、分節時計における Hes7-Notch-Fgf オシレーター・ネットワークの発現を解析した。その結果、Notch シグナルのエフェクター分子 NICD および Fgf シグナルのエフェクター分子 pERK の発現は、ともに Hes7 に依存して振動すること、NICD と pERK の発現は未分節中胚葉の後端ではほぼ同じ位相で振動するが、前側では位相が逆転することがわかった (図6)。NICD は Hes7 の発現とは逆位相で波状に振動した (図6)。それに対して、pERK の発現は未分節中胚葉全体でオンかオフかという発現動態を示した (図6)。その結果、NICD が S₁ より後側に発現しているときは、pERK も発現しており、Mesp2 の発現は抑制されるが、NICD が S₁ に発現するときには、pERK の発現は消え、NICD によって S₁ に Mesp2 の発現が誘導されることがわかった (図6、図7A)。これらの結果から、NICD は Mesp2 の発現領域を決めることによって体節のサイズを制御し、pERK の振動は Mesp2 の発現のタイミングを決めることによって体節形成の時間的周期性を制御することが明らかになった。また、Hes7 遺伝子を欠損すると、NICD や pERK の発現振動が消失し、Mesp2 は S₁ 領域あたりを徐々に後側へ移動するように発現することが示された (図7B)。この場合、Mesp2 は S₁ 領域全体にほぼ同じタイミングで発現するのではなく、S₁ の前側から徐々に後側へ広がるような発現を示すことから、この異常な発現動態によって分節過程が乱れることが強く示唆された。

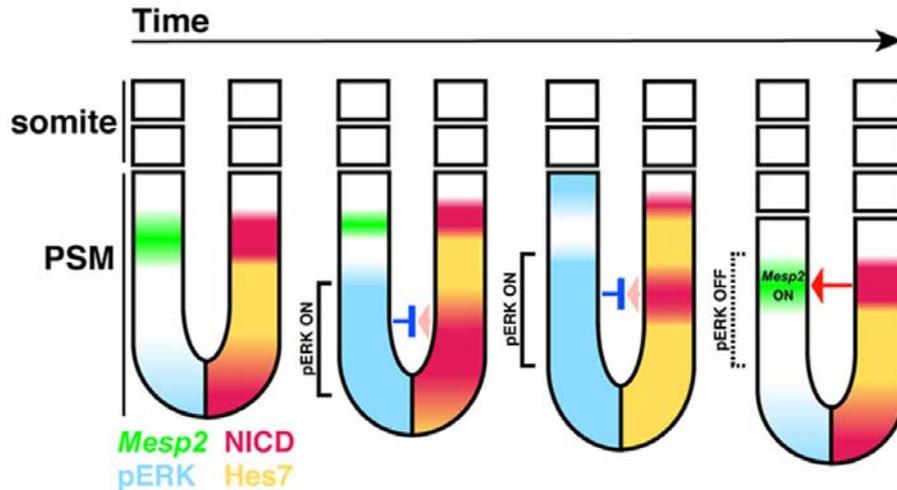


図6:分節過程での Hes7, Mesp2, NICD, pERK の発現動態。NICD と pERK の発現は未分節中胚葉の後端ではほぼ同じ位相で振動するが、前側では位相が逆転する。その結果、NICD は S1 領域全体に Mesp2 の発現を誘導する。

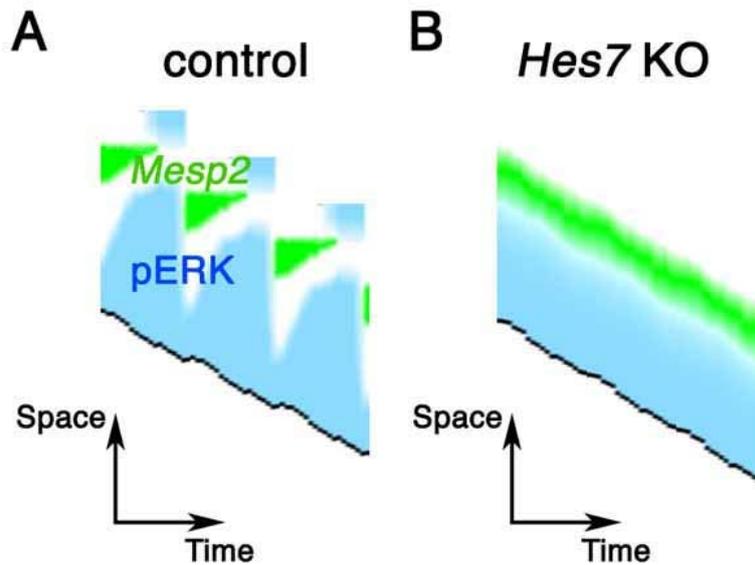


図7:pERK と Mesp2 の発現の時空間プロット。(A)正常では、pERK の発現が無くなると、NICD が Mesp2 の発現を誘導する。(B)一方、Hes7 遺伝子を欠損すると、NICD や pERK の発現振動が消失し、Mesp2 は S1 領域あたりを徐々に後側へ移動するように発現する。

(月)線維芽細胞、神経幹細胞、胚性幹細胞における Hes1 オシレーション

(1)線維芽細胞におけるHes1 を中心としたオシレーション・ネットワーク

線維芽細胞を用いて2時間周期で発現変動する遺伝子群を網羅的に検索した結果、数種類の新規オシレーション分子を同定した。特に、リン酸化 Stat3 (pStat3) および Socs3 はネガティブ・フィードバック・ループを形成し、それにより両者の発現量は約2時間周期でオシレーションすること (pStat3-Socs3 オシレーション)、この発現オシレーションを抑制すると Hes1 の発現オシレーションが阻害されることがわかった。pStat3の形成に Hes1 が必要であることから、Hes1 オシレーションおよび pStat3-Socs3 オシレーションはお互いに依存・協調していることが示された(図8)。また、この発現オシレーションは細胞増殖に非常に重要であることがわかった。さらに、線維芽細胞において Smad 系因子群や Fgf シグナルの因子群も発現オシレーションを示した。これらの結果から、発現オシレーションは特殊なものではなく、一般的な現象であることが強く示唆された。

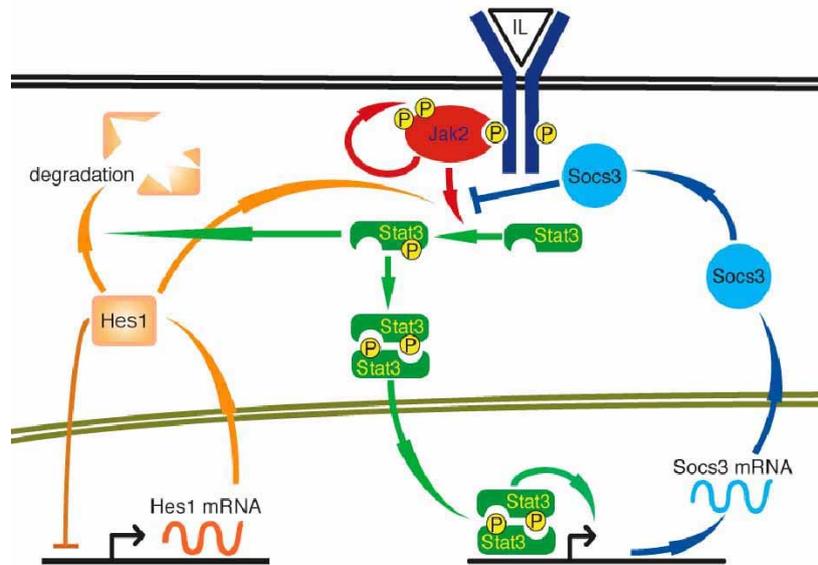


図8:線維芽細胞における Hes1 を中心としたオシレーションネットワーク

(2) 神経幹細胞における Hes1 を中心としたオシレーション・ネットワーク

Hes1 の発現をリアルタイムで可視化するシステムを用いて神経幹細胞における Hes1 の発現動態を解析したところ、ノザンやウェスタン法では一定レベルで持続発現しているようにみえる条件下でも、シングルセルレベルではダイナミックに発現オシレーションすることがわかった。Hes1 の標的遺伝子群を網羅的に探索し発現動態を解析したところ、プロニューラル遺伝子 Neurogenin2 (Ngn2)や Notch リガンド Deltalike1 (Dll1)の発現も神経幹細胞でオシレーションすることが明らかになった(図9)。しかし、Hes1 の発現が無くなってニューロンに分化途中の細胞では、ほぼ一定レベルで発現が持続していた(図9)。さらに、この発現オシレーションは、神経幹細胞の維持に重要な役割を担うことが明らかになった。

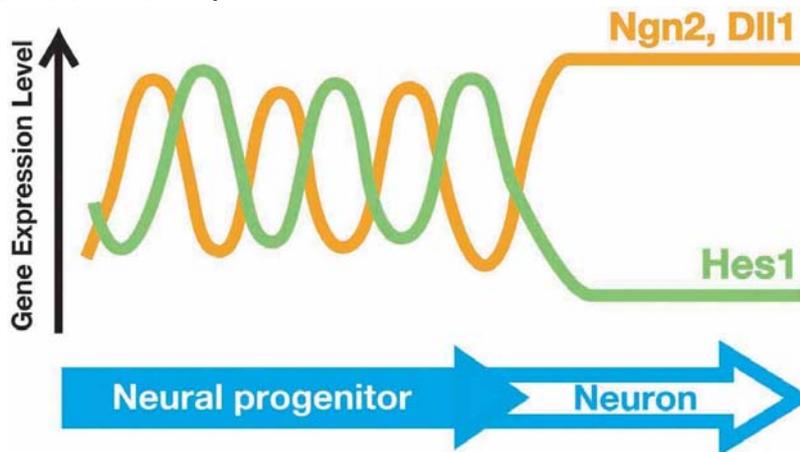


図9:神経幹細胞と分化途中のニューロンにおける Hes1,Ngn2,Dll1 の発現動態

以上の結果から、Ngn2は発現動態の違いで異なる活性を持つことが強く示唆された。すなわち、Ngn2 の発現が持続すると下流遺伝子もすべて発現が誘導されてニューロンへ分化するが、Ngn2 の発現が振動すると大部分の下流遺伝子は発現せず、神経幹細胞にとどまると考えられた。Ngn2 の発現が振動するときは、Dll1 のように素早く反応する一部の遺伝子のみの発現が誘導されていた。Dll1 の発現が振動することによって、神経幹細胞同士がお互いに Notch シグナルを活性化することが可能になり、細胞集団全体の未分化性が維持されると考えられた(図10)。このことから、Notch シグナルはニューロンから神経幹細胞へ方向性に活性化するだけでなく、発現オシレ

ーションを利用して神経幹細胞間同士で双方向性に活性化できることがわかった。

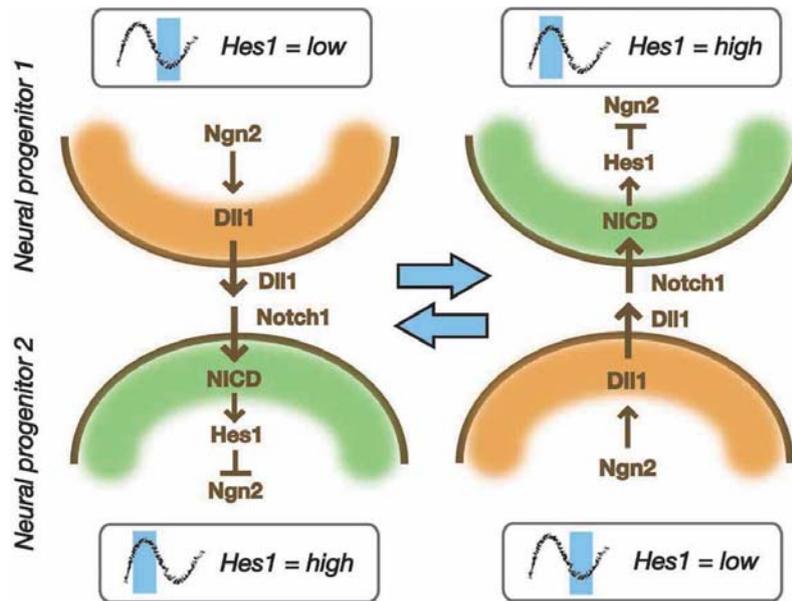


図10: 神経幹細胞における発現オシレーション。ある神経幹細胞の Delta1 の発現が高いと(左上)隣接する神経幹細胞の Notch シグナルを活性化し、その細胞の Hes1 の発現が増え、Ngn2 と Delta1 の発現が減る(左下)。しかし、オシレーションのために約1時間後には Hes1 の発現が減少して Ngn2 と Delta1 の発現が増加し(右下)、前者の神経幹細胞の Notch シグナルを活性化する(右上)。このように、神経幹細胞同士がお互いに Notch シグナルを活性化し、細胞集団全体の未分化性が維持される

神経発生初期には、Ngn2 や Dll1 が salt-and-pepper 状に神経幹細胞に発現することが知られている。このような発現パターンは、免疫染色や in situ hybridization によって示されており、一般に、もともと均一な神経幹細胞が Notch シグナルによって細胞間で Ngn2 や Dll1 の発現レベルが徐々に異なるようになり、やがて強く発現ようになった細胞がいち早くニューロンに分化すると信じられている。しかし、今回の我々の解析から、この salt-and-pepper 状の発現パターンはニューロンになる細胞の選別過程を反映しているのではなく、オシレーションの一瞬間をみていることが強く示唆され、この分野のパラダイムシフトを引き起こした。

一方、Hes1 に関しても発現動態が重要であることがわかった。発生途中の神経系は境界構造によっていくつも区画に区切られている。それぞれの区画内では、多くの神経幹細胞が盛んに増殖し、ニューロンを産生する。一般に、神経幹細胞やニューロンは境界を越えて遊走することはなく、区画内にとどまっている。区画内の神経幹細胞と異なり、境界構造を構成する細胞は、ほとんど増殖せず、ニューロンも産生しない。区画内の神経幹細胞では Hes1 の発現は振動していたが、境界構造を構成する細胞は Hes1 を持続的に発現していた。また、区画内の神経幹細胞に Hes1 を持続発現させると、増殖やニューロン産生能が抑制された。以上の結果から、区画内の神経幹細胞と境界構造を構成する細胞との増殖・分化能の違いは、Hes1 の発現動態の違いで決められていることが強く示唆された。

(3) 胚性幹細胞における Hes1 を中心としたオシレーション・ネットワーク

胚性幹(ES)細胞における Hes1 を中心としたオシレーション・ネットワークの全体像およびその意義について解析した。ES 細胞は多分化能をもち、半永久的に増殖することから、再生医療への応用が期待されている。しかし、ES 細胞は、多分化能をもつが故に均一な細胞集団に分化させるのが非常に困難で、不要なタイプの細胞あるいは未分化な細胞が混入してしまう。さらに、未分化な細胞は腫瘍を形成することが知られている。すなわち、ES 細胞の性質は、利点でもあるが欠点でも

あり、再生医療への応用に向けて大きな壁となっている。しかし、ES 細胞がいろいろな刺激に対して示す多様な分化応答の分子基盤については、よくわかっていなかった。そこで、我々は、ES 細胞が示す多様な分化応答に Hes1 が関与する可能性について検討し、以下のことを明らかにした。

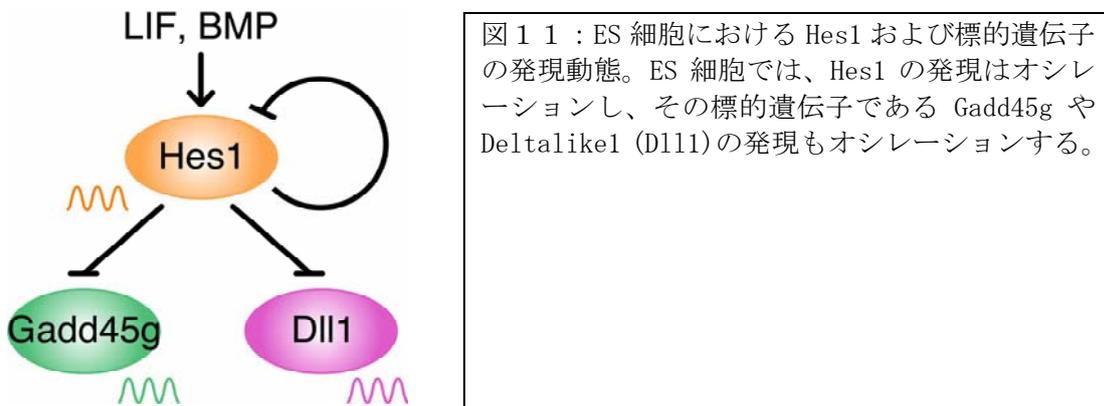


図11: ES 細胞における Hes1 および標的遺伝子の発現動態。ES 細胞では、Hes1 の発現はオシレーションし、その標的遺伝子である Gadd45g や Deltalike1 (Dll1) の発現もオシレーションする。

まず、ES 細胞における Hes1 の発現を免疫染色法にて検討したところ、細胞毎に発現レベルが異なること、また発現は Notch シグナルではなく、LIF および BMP によって制御されていることがわかった(図11)。さらに、ES 細胞に Hes1 レポーターを導入してリアルタイムで Hes1 の発現を可視化したところ、ノザンやウェスタン法では一定レベルで持続発現しているようにみえる条件下でも、シングルセルレベルでは3-5時間周期で発現がオシレーションしていた。次に、胚性幹細胞における Hes1 の標的遺伝子群をマイクロアレイ法および ChIP-on-Chip 法によって網羅的に探索したところ、多くの遺伝子が Hes1 によって発現抑制を受けることがわかった。その中には、Notch のリガンドである Deltalike1 (Dll1) および細胞増殖を抑制する Gadd45g も含まれており、それぞれの発現レポーターを ES 細胞に導入して、リアルタイムで発現動態を解析した。その結果、Dll1 や Gadd45g の発現も Hes1 と同様にオシレーションすることがわかった(図11)。このことから、ES 細胞の増殖・分化能は、Hes1 オシレーションとともに時々刻々と変化すると考えられた。

この点を明らかにするために、ES 細胞の Hes1 遺伝子に Venus 蛍光遺伝子をノックインして Venus-Hes1 の融合蛋白が発現するようにし、蛍光強度に従って Hes1-high および Hes1-low の ES 細胞を分離した。分離後すぐに、これらの細胞の分化能を検討したところ、Hes1-high ES 細胞は遅いタイミングで中胚葉系に、Hes1-low ES 細胞は早いタイミングで神経系に分化しやすいことが明らかになった(図12)。これらの結果から、Hes1 オシレーションは ES 細胞の多様な分化応答に寄与すると考えられた。この点をさらに検討するために、Hes1 遺伝子をノックアウトした ES 細胞を作製して分化能をしらべたところ、早いタイミングで均一に神経系に分化した。以上の結果から、Hes1 発現オシレーションが ES 細胞の多様な分化応答性に重要な役割を担うことが明らかになった(図12)。また、Hes1 ノックアウト ES 細胞は、均一に神経系に分化することから、神経系の再生医療への応用が期待された。

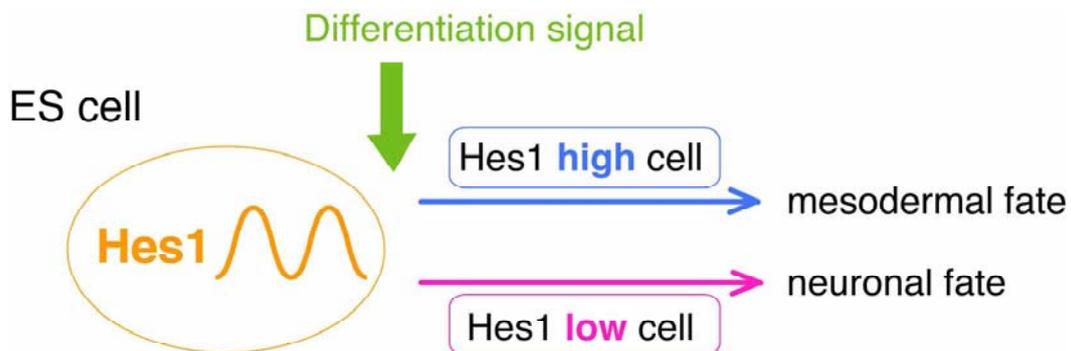


図12: ES 細胞の多様な分化応答に Hes1 オシレーションが寄与。ES 細胞では Hes1 の発現がオシ

レーションしている。分化誘導したときに、Hes1 の発現レベルが高いと中胚葉系に分化しやすいが、Hes1 の発現レベルが低いと神経系に分化しやすい。したがって、Hes1 の発現オシレーションは、ES 細胞の多様な分化応答性に寄与する。

(2)研究成果の今後期待される効果

成体脳神経幹細胞はほとんど増殖せず、ニューロンを生み出す効率も低く、休止状態にあることが知られている。Hes1 は胎児の神経幹細胞だけでなく、成体脳の神経幹細胞の維持にも必須であることが明らかになったが(未発表)、予備的な観察から、成体脳神経幹細胞は Hes1 を持続的に発現することが示唆された。そこで、今後、リアルタイムイメージング法を用いて成体脳神経幹細胞における Hes1 の発現動態を単一細胞レベルで解析する。Hes1 が持続発現すると、細胞増殖や分化能が阻害されることから、Hes1 の発現動態の違いが、胎児と成体脳の神経幹細胞の性質の差を引き起こしている可能性が考えられた。持続的発現が確認できれば、Hes1 の発現をオシレーションさせると逆に成体脳神経幹細胞が胎児の神経幹細胞のように盛んに増殖して多くのニューロンを生み出すようになるのかどうかを調べる。これらの解析から、胎児と成体で異なる各種臓器の幹細胞の性質が、Hes1 の発現動態の差で説明できるのかどうかを検討する。本研究成果は、成体脳に内在する休止状態の神経幹細胞の活性化する技術の開発につながり、今後、再生医療への応用が期待される。

4. 2 短周期遺伝子発現リズムの数理モデルの構築(京都大学 吉川グループ)

(1)研究実施内容及び成果

影山グループにより収集された実験データを分析し、吉川グループが生物時計の遺伝子発現リズムの斬新的な数理モデルの構築を目指して研究を行った。提案するモデルは、単に現象を再現するだけでなく、本質を捕らえることができ、実験を予測可能であるようなものを目指した。

得られた成果の概要としては、体節形成を特に意識したモデル化手法の検討とその物理学的な基礎づけ、やや大きいスケールと汎用性を考慮した反応拡散場の制御の2つを述べる事ができる。1つ目として、シグナルの性質をより良くモデル化できる activator 結合にて動的な進行波を含む動態を再現する事に成功した。チューリングパターンに代表される様な inhibitor 結合による旧来の「動かないパターン」では無く、生体組織をより良く表現しつつ進行波を再現した点が重要である。これは細胞を単位とする拡散場を考慮する事で初めて現出するものであり、生体組織との比較に於いて大きな意味を持つ。更に、この細胞空間モデルを理論や計算機実験の中で定義できる物理学的根拠を与える事に成功した。本研究のなかで理論化を進めた、非チューリン型のモデルは形態形成に関する革新的な仮説となっており、リズム現象のみならず、興奮性の組織についても一般化できるものとなっている。実際、心筋不整に対して、従来のkVオーダの刺激による AED 型の救命方法では無く、数 V のオーダでの電位刺激により、正常の拍動に復帰することのできる、手法を理論的に見出し、心筋細胞培養系で有用性を確認するに至っている。

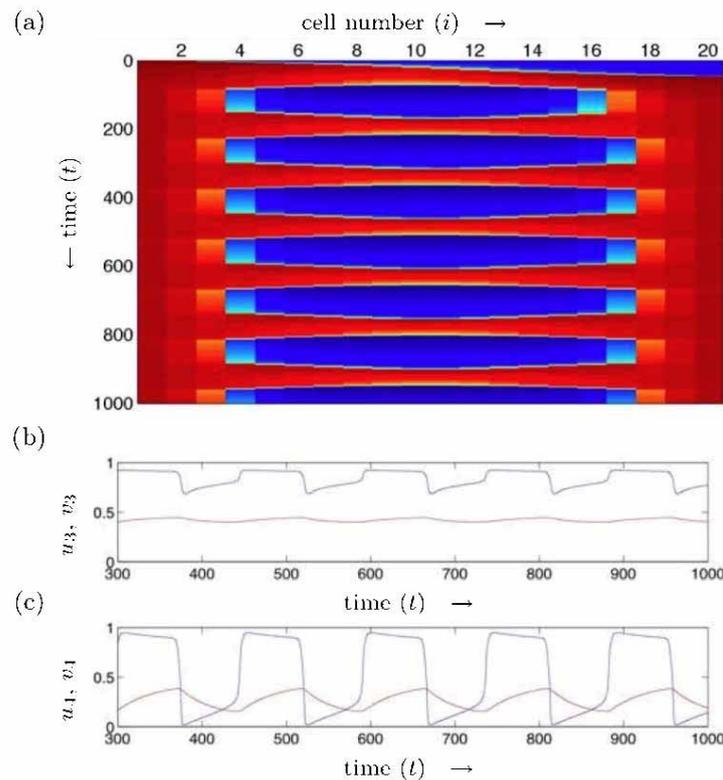


図13:細胞の振動状態と空間分布。色の違いは、細胞内部の反応回路が異なる回り方をしている事に対応する。それが分化に関わるものであれば、色に応じて分化していくであろう。

(A-1)非振動性の細胞の相互作用による同期リズムの発現

生物時計の一般的な理論として知られているのは、結合振動子の同期である。その際、数々の細胞の遺伝子発現ネットワークは負のフィードバックにより振動性を持たなければいけない。しかし、多くの細胞は振動状態より、安定状態に収束する傾向があるため、同期現象の理論は通用から、

自発的な集団振動が生じえることを明らかにした。図13で示すように、環境パラメータは周辺から中へ減衰的に拡散し、定常的な濃度勾配を形成するとする。境界に近い細胞は双安定であり、中央付近の細胞は単安定となる。このような(非振動性の)興奮細胞の集団に、外部刺激を与えると、進行波が発生する。濃度勾配と結合強度を制御パラメータとすることにより、多彩な時空間パターンが発生する。図13はその一例である。このような計算結果は、振動性のない細胞集団が、activator 結合により、自発振動を起こし、時空間構造を形成しえることを明らかにしている。

(A-2) 活性因子の結合による定常パターンの生成(非チューリング・モデル)

体節形成など生物の形づくりは、時空間情報の精密な処理を通じて実現されている。これまでの形態形成の数理モデルの多くは、偏微分で記述される空間連続系でパターン形成を調べてきた。その中でも、拡散不安定性によって安定な定常パターンが誘導される Turing パターンは特に精力的に研究されている。しかし、連続変数を用いた偏微分方程式系の数理モデルによる定常パターンの数値解析は、細胞という生体組織の最小単位に起因する離散性がパターンに及ぼす影響を正しく評価できないという欠点がある。そこで、本研究では新たに体節形成を模した空間離散の数理モデルに基づき、空間パターンの形成過程を数値シミュレーションによって研究した。本研究では、未分節中胚葉(PSM)の後端にある分節時計、FGF などの濃度勾配、胚の成長、そして PSM 内での遺伝子発現波の伝搬と停止など、実験で観察された要素をモデルに取り込み、数値シミュレーションを行った。その結果、図14で示すように規律正しい空間周期パターンを形成する結果を得た。これは、空間連続の系とは全く異なる現象である。

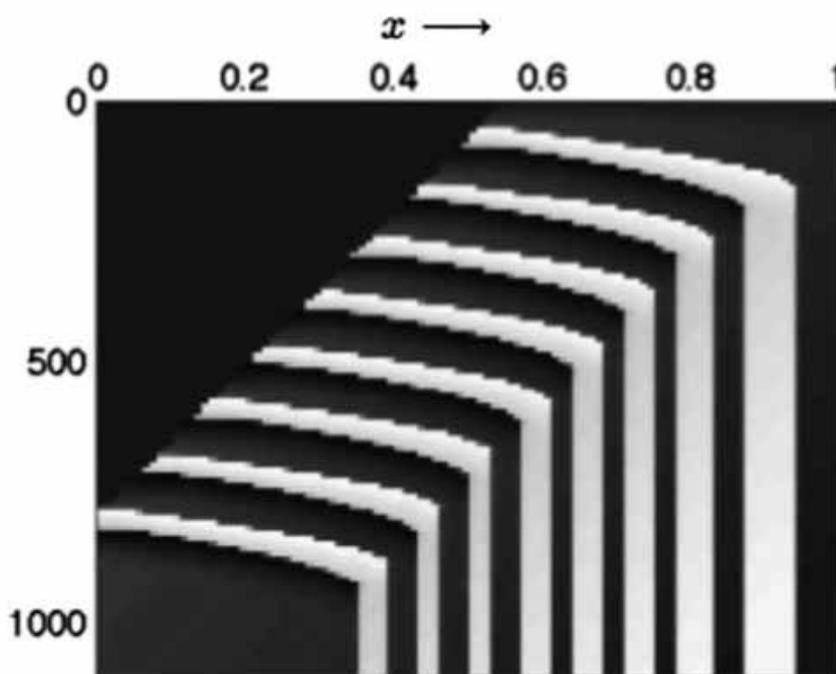


図14: 空間離散の数理モデルで得られた活性因子の空間分布の時間変化。

(A-3) 鍵と鍵穴の数ゆらぎからロバストな自律制御の生じる仕組み(新シナリオ)

以上に示してきた空間離散の効果は、細胞集団のモデルとして数々の利点と現実に対する再現性を持っているが、連続系と離散系とのミックスであり、細胞という単位はあるものの、その位置づけは曖昧で複雑である。そこに物理的な裏付けを与えたのがこの研究である。この理論を用いる事で、シグナルや対象物質の数、反応と拡散の性質から、細胞間の協同現象を示している対象の中で、離散的に扱うべきか、連続的に扱えるか等が分かる。

セルオートマトンと生化学反応等のリッチな化学反応が数十 μm の細胞サイズ内で行われている場合の反応や反応速度の安定性に関して理論的な議論を行った。数十 μm サイズの空間内でシグナル等に相当する少数分子を考えた場合、大きな数揺らぎとそれに起因する非線形反応の不安定性が与える影響が数理モデルの構築の上で大きな問題となっている。しかし、実際の生物はこの問題を何らかの方法で解決する事で、一定の安定性(ロバストネス)を獲得している事は間違いないであろう。本研究では、遺伝子群等の協同的な発現が総計として速度式の中で作用する際に、その協同性の程度によってロバストネスが高くなる事を理論的に示した(図15)。これは、例えば細胞周期等に付随する多数の遺伝子の発現や多量のRNAの生成そのものが環境パラメータと出来る場合に、大きな安定性が得られる事を意味している。また、数式上の協同性は、縮約した際にまとめられる複数の因子の作用として表現される為、協同因子は必ずしも実際に相同的な物である必要は無い。体節形成等の遅いダイナミクスに対しては、断熱消去できる多数の速い因子を含める形で適切に縮約する事で、ここでいう協同性が実現できる。この様な数理的アプローチはこれまで無い斬新な物であり、より現実的なモデルの構築に寄与するものである。

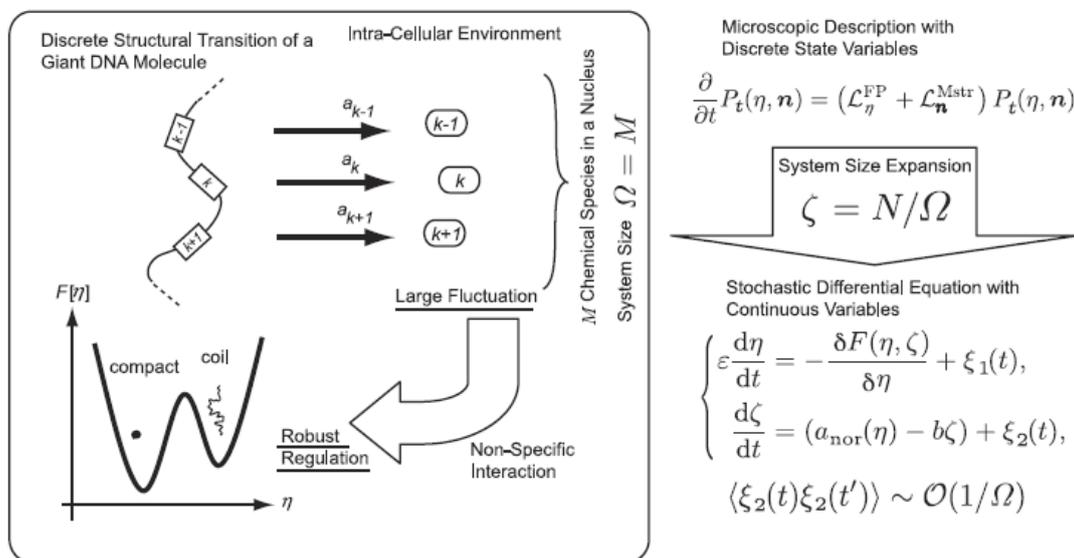


図15:理論の概要。

(B) 低電位刺激による心臓拍動の正常化:新しい方式の提唱

心臓にとって好ましくない回転ラセン波を消滅させる方法を、心筋組織の数値モデルの解析により、新たに見出すことができた(図16)。その本質は、障害物の性質と回転ラセン波の受攻期(VW)をうまく利用することにより、ピン留めされて安定化した回転波を障害物から外すことにある。更に、心筋組織を用いた実験により、ラセン波のドリフトを誘導することにより、回転ラセン波を消滅させる方法が実際に、効果のあることを実証した。このように、障害物の性質と回転ラセン波の受攻期(VW)をうまく利用すると、ピン留めされて安定化した回転波を障害物から容易に外すことができる。これらは、埋め込み型除細動が用いる抗頻脈ペーシングという方法でラセン波のドリフトを誘導し、心筋組織の端に衝突させて消滅させることが可能であることを示している。

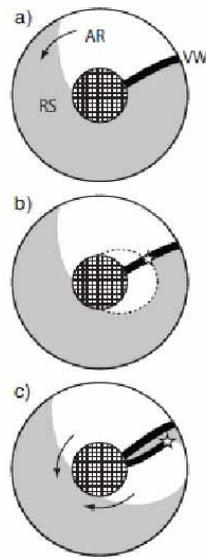


図16:心筋でピン止めされた回転らせん波の除去(模式図)

(2)研究成果の今後期待される効果

形態形成で定常的なパターンが生じるための必要条件は、阻害因子による結合であるということが、従来の数理モデルでは常識であった。それに対して、本研究では、活性因子の結合により、多様な定常パターンの生成が可能であることを明らかにした。この私達の理論の本質は、生物の組織が実数の密度での連続であるとする、従来のチューリング理論の根本的な問題点を明確にした点にある。今後、細胞が有限の体積をもつとするような、実態を踏まえた数理理論が発展するための礎石を築いたものと考えている。

また、心筋細胞系での低電位不整治療法の考案は、国際的にも大きな反響を呼んでおり、ヨーロッパでは、ヒトを対象とする臨床実験が計画されるに至っている。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際 (欧文) 誌 47 件)

1. Niwa, Y., Masamizu, Y., Liu, T., Nakayama, R., Deng, C.-X., and Kageyama, R. (2007) The initiation and propagation of Hes7 oscillation are cooperatively regulated by Fgf and Notch signaling in the somite segmentation clock. **Dev. Cell** 13, 298-304
2. Yoshiura, S., Ohtsuka, T., Takenaka, Y., Nagahara, H., Yoshikawa, K., and Kageyama, R. (2007) Ultradian oscillations in Stat, Smad and Hes1 expression in response to serum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 104, 11292-11297.
3. Kita, A., Imayoshi, I., Hojo, M., Kitagawa, M., Kokubu, H., Ohsawa, R., Ohtsuka, T., Kageyama, R., and Hashimoto, N. (2007) *Hes1* and *Hes5* control the progenitor pool and intermediate lobe specification in the pituitary development. **Mol. Endocrinol.** 21, 1458-1466.
4. Bai, G., Sheng, N., Bian, W., Xie, Z., Yokota, Y., Benezra, R., Kageyama, R., Guillemot, F., and Jing, N. (2007) Id sustains Hes1 expression to inhibit precocious neurogenesis by releasing negative autoregulation of Hes1. **Dev. Cell** 13, 283-297.
5. Karlsson, C., Jonsson, M., Asp, J., Brantsing, C., Kageyama, R., and Lindahl, A. (2007) Notch and HES5 are regulated during human cartilage differentiation. **Cell Tissue Res.** 327, 539-551.
6. González, A., and Kageyama, R. (2007) Practical lessons from theoretical models about the somitogenesis. **Gene Regulation and Systems Biology** 1, 35-42.
7. Ikeda, K., Ando, Z., Ookawara, S., Sato, S., Kageyama, R., and Kawakami, K. (2007) *Six1* is essential for generating pioneer neurons, differentiation of olfactory sensory neurons, and production of sustentacular cell progenitors in olfactory epithelium. **Dev. Biol.** 311, 53-68.
8. Takenaka, Y., Nagahara, H., Kitahata, H. and Yoshikawa, K. (2008) Large-scale on-off switching of genetic activity mediated by the folding-unfolding transition in a giant DNA molecule: An hypothesis, *Physical Review E*, **77**, 031905, 1-5.
9. Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2008) Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. **Neuron** 58, 52-64..
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Ma, Y. and Yoshikawa, K. (2008) Self-Sustained Collective Oscillation Generated in an Array of Non-Oscillatory Cells. **Physical Review E.**
15. Kokubu, H., Ohtsuka, T. and Kageyama, R. (2008) *Mash1* is required for enteroendocrine cell development in the glandular stomach. **Genes Cells** 13, 41-51.
16. 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.
17. 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-g pathways. **Immunity** 29, 691-703.
18. 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.
19. Kobayashi, T., Mizuno, H., Imayoshi, I., Furusawa, C., Shirahige, K., and Kageyama, R. (2009) The cyclic gene *Hes1* contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells.

- Genes & Dev.** 23, 1870-1875.
20. González, A., and Kageyama, R. (2009) Hopf Bifurcation in the Presomitic Mesoderm during the Mouse Segmentation. **J. Theor. Biol.** 259, 176-189.
 21. Wall, D.S., Mears, A.J., McNeill, B., Mazerolle, C., Thurig, S., Wang, Y., Kageyama, R., and Wallace, V.A. (2009) Progenitor cell proliferation in the retina is dependent on Notch-independent Sonic hedgehog/Hes1 activity. **J. Cell Biol.** 184, 101-112.
 22. Murata, J., Ohtsuka, T., Tokunaga, A., Nishiike, S., Inohara, H., Okano, H., and Kageyama, R. (2009) Notch-Hes1 pathway contributes to the cochlear prosensory formation potentially through the transcriptional down-regulation of p27(Kip1). **J. Neurosci. Res.** 87, 3521-3534.
 23. Arai, M., Masada, A., Ohtsuka, T., Kageyama, R., and Ishibashi, M. (2009) The first Hes1 dimer inhibitors from natural products. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 19, 5778-5781.
 24. Nagahara, H., Ma, Y., Takenaka, Y., Kageyama, R., and Yoshikawa, K. (2009) Spatio-temporal pattern in somitogenesis: a non-Turing scenario with wave propagation. **Physical Rev. E.** 80, 0219106(1-7).
 25. Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., and Kageyama, R. (2010) Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in the developing and adult brains. **J. Neurosci.** 30, 3489-3498.
 26. Shimizu, T., Nakazawa, M., Kani, S., Bae, Y.-K., Shimizu, T., Kageyama, R., and Hibi, M. (2010) Zinc-finger genes *Fezf1* and *Fezf2* control neuronal differentiation by repressing *Hes5* expression in forebrain. **Development** 137, 1875-1885.
 27. Inoue, T., Coles, B., Dorval, K., Bremner, R., Bessho, Y., Kageyama, R., Hino, S., Matsuoka, M., Craft, C., McInnes, R., Temblay, F., Prusky, G., Tano, Y., and van der Kooy, D. (2010) Maximizing functional photoreceptor differentiation from adult human retinal stem cells. **Stem Cells** 28, 489-500.
 28. Karlsson, C., Brantsing, C., Kageyama, R., and Lindahl, A. (2010) HES1 and HES5 are dispensable for cartilage and endochondral bone formation. **Cells Tissue Organs** 192, 17-27.
 29. Kobayashi, T. and Kageyama, R. (2010) Hes1 regulates embryonic stem cell differentiation by suppressing Notch signaling. **Genes to Cells** 15, 689-698.
 30. Ikeda, K., Kageyama, R., Suzuki, Y., and Kawakami, K. (2010) Six1 is indispensable for production of functional apical and basal progenitors during olfactory epithelial development. **Int. J. Dev. Biol.** 54, 1453-1464.
 31. Hiroki Nagahara and Kenichi Yoshikawa, "Large system in a small cell: A hypothetical pathway from a microscopic stochastic process towards robust genetic regulation," **Chemical Physics Letters**, 494(1-3), 88-94 (2010).
 32. Marcel Hörning, Akihiro Isomura, Zhiheng Jia, Emilia Entcheva, and Kenichi Yoshikawa, "Utilizing the eikonal relationship in strategies for reentrant wave termination in excitable media," **Physical Review E**, 81(5), 056202 (2010).
 33. Takashima, Y., Ohtsuka, T., González, A., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2011) Intronic delay is essential for oscillatory expression in the segmentation clock. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 108, 3300-3305.
 34. Tateya, T., Imayoshi, I., Tateya, I., Ito, J., and Kageyama, K. (2011) Cooperative functions of *Hes/Hey* genes in auditory hair cell and supporting cell development. **Dev. Biol.** 352, 329-340.
 35. Sakamoto, M., Imayoshi, I., Ohtsuka, T., Yamaguchi, M., Mori, K., and Kageyama, R. (2011) Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 108, 8479-8484.
 36. Niwa, Y., Shimojo, H., Isomura, A., González, A., Miyachi, H., and Kageyama, R. (2011) Different types of oscillations in Notch and Fgf signaling regulate the spatiotemporal periodicity of somitogenesis. **Genes & Dev.** 25, 1115-1120.
 37. Shibata, K., Yamada, H., Sato, T., Dejima, S., Nakamura, M., Ikawa, T., Hara, H., Yamasaki, S., Kageyama, R., Iwakura, Y., Kawamoto, H., Toh, H., and Yoshikai, Y. (2011) Notch-Hes1 pathway induces IL-17-producing gd T cells. **Blood** 118, 586-593.
 38. Ohtsuka, T., Shimojo, H., Matsunaga, M., Watanabe, N., Kometani, K., Minato, N., and Kageyama, R. (2011) Gene expression profiling of neural stem cells and identification of regulators of neural differentiation during cortical development. **Stem Cells** 29, 1817-1828.
 39. Matsumoto, A., Onoyama, I., Sunabori, T., Kageyama, R., Okano, H., and Nakayama, K.I.

- (2011) Fbxw7-dependent degradation of Notch is required for control of syemness and neuronal-glia differentiation in neural stem cells. **J. Biol. Chem.** 286, 13754-13764.
40. Bae, Y.-H., Park, H.-J., Kim, S.R., Kim, J.Y., Kang, Y. Kim, J.A., Wee, H.-J., Kageyama, R., Jung, J.S., Bae, M.-K., and Bae, S.-K. (2011) Notch1 mediates visfatin-induced FGF-2 upregulation and endothelial angiogenesis. **Cardiovasc. Res.** 89, 436-445.
41. M. Hörning, S. Kidoaki, T. Kawano and K. Yoshikawa(2012) Rigidity-matching between cells and the extracellular matrix leads to the stabilization of cardiac conduction **Biophys. J.** 102, 3, 379-387.
42. Ueo, T., Imayoshi, I., Kobayashi, T., Ohtsuka, T., Seno, H., Nakase, H., Chiba, T., and Kageyama, R. (2012) The role of *Hes* genes in intestinal development, homeostasis and tumor formation. **Development** 139, 1071-1082.
43. Imayoshi, I., Hirano, K., Sakamoto, M., Miyoshi, G., Imura, T., Kitano, S., Mitachi, H., and Kageyama, R. (2012) A multifunctional teal-fluorescent Rosa26 reporter mouse line for Cre- and Flp-mediated recombination. **Neurosci. Res.**
44. Imayoshi, I., Tabuchi, S., Hirano, K., Sakamoto, M., Kitano, S., Miyachi, H., Yamanaka, A., and Kageyama, R. (2012) Light-induced silencing of neural activity in Rosa26 knock-in mice conditionally expressing the microbial halorhodopsin eNpHR2.0. **Neurosci. Res.**
45. Imayoshi, I., Hirano, K., Kitano, S., Mitachi, H., and Kageyama, R. (2012) In vivo evaluation of PhiC31 recombinase activity in transgenic mice. **Neurosci. Res.**
46. Sparrow, D.B., Chapman, G., Smith, A.J., Mattar, M.Z., Major, J.A., O'Reilly, V.C., Saga, Y., Zackai, E.H., Dormans, J.P., Alman, B.A., McGregor, L., Kageyama, R., Kusumi, K., and Dunwoodie, S.L. (2012) A mechanism for gene-environment interaction in the etiology of congenital scoliosis. **Cell** in press.
47. Horn, S., Kobberup, S., Jørgensen, M.C., Kalisz, M., Klein, T., Kageyama, R., Gegg, M., Lickert, H., Lindner, J., Magnuson, M.A., Kong, Y.-Y., Serup, P., Ahnfelt-Rønne, J., Jensen, J.N. (2012) Mind bomb 1 is required for pancreatic β -cell formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** in press.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

①

1. Kageyama, R. Ohtsuka, T., and Kobayashi, T. (2007) The *Hes* gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. **Development** 134, 1243-1251.
2. Kageyama, R., Masamizu, Y., and Niwa, Y. (2007) Oscillator mechanism of Notch pathway in the segmentation clock. **Dev. Dyn.** 236, 1403-1409.
3. 丹羽康貴、影山龍一郎: *Hes* オシレーションから広がる分節時計のメカニズム. 実験医学、25: 1586-1591. 2007.
4. 正水芳人、影山龍一郎: 2時間周期の生物時計 *Hes1* の可視化と分節時計のシミュレーション. 実験医学、25: 1663-1669. 2007.
5. 大塚俊之、影山龍一郎: ニューロン新生における bHLH 因子と Notch シグナルの役割. 実験医学、25: 2964-2971. 2007.
6. 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.
7. Kageyama, R. Ohtsuka, T., and Kobayashi, T. (2008) The roles of *Hes* genes in neural development. **Dev. Growth Diff.** 50, S97-S103.
8. Ohsawa, R., and Kageyama, R. (2008) Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. **Brain Res.** 1192, 90-98.
9. Hojo, M., Kita, A., Kageyama, R., and Hashimoto, N. (2008) Notch-Hes signaling in pituitary development. **Expert Rev. Endocrinol. Metab.** 3, 91-100.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

13. 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.
14. Kageyama, R., Ohsawa, R., and Ohtsuka, T. (2009) Cell differentiation. In **Encyclopedia of Neuroscience** (Eds. M.D. Binder, N. Hirokawa, and U. Windhorst) Academic Press, Oxford, pp. 591-596.
15. Kageyama, R., Ohtsuka, T., Ohsawa, R., and Hatakeyama, J. (2009). Helix-loop-helix (bHLH) proteins: Hes family. In **Encyclopedia of Neuroscience** (Ed. L.R. Squire). Academic Press, Oxford. vol. 4, pp. 1057-1065.
16. Niwa, Y., Shimojo, H., and Kageyama, R. (2009) Ultradian oscillation networks in somite segmentation and other biological events. In **Systems Biology** (Eds, S. Nakanishi, R. Kageyama, and D. Watanabe) Springer, pp. 199-207.
17. Imayoshi, I., Sakamoto, M., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2009) Continuous neurogenesis in the adult brain. **Dev. Growth Diff.** 51, 379-386.
18. Kageyama, R., Niwa, Y., and Shimojo, H. (2009) Rhythmic gene expression in somite formation and neural development. **Mol. Cells** 27, 497-502.
19. Kobayashi, T. and Kageyama, R. (2009) Dynamic advances in NF- κ B signaling analysis. **Science Signaling** 2, pe47.
20. Kageyama, R., Ohtsuka, T., Shimojo, H., and Imayoshi, I. (2009) Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells. **Curr. Opin. Cell Biol.** 21, 733-740.
21. 影山龍一郎: 神経幹細胞とニューロン新生. *Zenit*, 創刊号: 74. 2009
22. 今吉格, 坂本雅行, 影山龍一郎: 成体脳ニューロン新生と高次脳機能. *Medical Bio*, 3: 25-28. 2009.
23. Kageyama, R., Niwa, Y., and Shimojo, H. (2010) Developmental timing and oscillating gene expression. **McGraw-Hill 2010 YearBook of Science & Technology**, pp102-104.
24. Kobayashi, T. and Kageyama, R. (2010) Hes1 oscillation: making variable choices for stem cell differentiation. **Cell Cycle**, 9, 207-208.
25. Kageyama, R., Niwa, Y., Shimojo, H., Kobayashi, T., and Ohtsuka, T. (2010) Ultradian oscillations in Notch signaling regulate dynamic biological events. **Curr. Top. Dev. Biol.** 92C, 311-331.
26. González, A., and Kageyama, R. (2010) Automatic reconstruction of the mouse segmentation network from an experimental evidence database. **Byosystems** 102, 16-21.
27. 今吉格, 坂本雅行, 影山龍一郎: 成体脳ニューロン新生の分子メカニズムと機能的意義. *実験医学*, 28:823-829. 2010.
28. 小林妙子, 影山龍一郎: 幹細胞分化の運命決定に寄与するリズム現象. *医学のあゆみ*, 235:953-954. 2010.
29. Imayoshi, I., Sakamoto, M., and Kageyama, R. (2011) Genetic Methods to Identify and Manipulate Newly born Neurons in the Adult Brain. **Front. Neurosci.** 5, 64.
30. Imayoshi I. and Kageyama, R. (2011) The role of Notch signaling in adult neurogenesis. **Mol. Neurobiol.** 44, 7-12.
31. Kobayashi, T. and Kageyama, R. (2011) Hes1 oscillations contribute to heterogeneous differentiation responses in embryonic stem cells. **Genes** 2, 219-228.
32. Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Kageyama, R. (2011) Dynamic expression of Notch signaling genes in neural stem/progenitor cells. **Front. Neurog.** 5, 78.
33. 影山龍一郎: 発生を制御する遺伝子発現リズム. *細胞工学*, 30:1256-1261. 2011.
34. 坂本雅行, 今吉格, 影山龍一郎: 成体脳ニューロン新生は先天的にプログラムされた匂い応答に必須である. *Aroma Research*, 48:37-38. 2011.
35. Kageyama, R., Imayoshi, I., and Sakamoto, M. (2012) The role of neurogenesis in olfactory-dependent behaviors. **Behav. Brain Res.** 227, 459-463.
36. Kageyama, R., Shimojo, H., Ohtsuka, T., and Imayoshi, I. (2012) Maintenance of neural stem cells in the brain: role of Notch signaling. **Stem Cells and Cancer Stem Cells: Therapeutic Applications in Disease and Injury**. Vol. 4. (Ed. M.A. Hayat) Springer.
37. Kageyama, R., Niwa, Y., Isomura, A., González, A., and Harima, Y. (2012) Oscillatory gene

expression and somitogenesis. **Wiley Interdisciplinary Reviews Developmental Biology** in press.

38. Kageyama, R., Ohtsuka, T. Shimojo, H., and Imayoshi, I. (2012) Dynamic gene networks in neural stem cell regulation. **Stem Cells** (Eds. F. Calegari and C. Waskow) Edenbridge.

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

- ① 招待講演 (国内会議 38 件、国際会議 40 件)

1. Kageyama, R.: Ultradian clocks that regulate somite segmentation and other events. Joint Spring Meeting of the Genetics Society, the British Society for Developmental Biology and the British Society of Cell Biology. Edinburgh, UK, 2007.
2. Kageyama, R.: The bHLH gene network in neural development. The Toshiya Yamada Memorial Lecture, Brisbane, Australia, 2007.
3. Kageyama, R.: The mechanism of ultradian oscillations in the somite segmentation and other events. 72nd Cold Spring Harbor Symposium, Cold Spring Harbor, USA, 2007.
4. Kageyama, R.: The mechanism of ultradian oscillations in the somite segmentation and other events. Segmentation Meeting, Cancun, Mexico, 2007.
5. Kageyama, R.: The role of Hes1 in brain development. The Notch Meeting, Athens, Greece, 2007.
6. Kageyama, R.: The role of bHLH genes in neural development. The Annual Meeting of KSMBMB, Seoul, Korea, 2007
7. Kageyama, R.: The bHLH gene network in neural development. Neurogenesis 2007. Tokyo, 2007.
8. Kageyama, R.: Ultradian oscillators in somite segmentation and other events. The 4th International Symposium on bHLH genes: Development and Diseases. Kyoto, 2007.
9. 影山龍一郎:脳形成を制御する転写因子ネットワーク。第49回日本小児神経学会総会、大阪、2007.
10. Kageyama, R., Shimojo, H. and Ohtsuka, T.: Oscillatory versus persistent Hes1 expression promotes proliferation and differentiation of neural progenitors. Neuro 2007、横浜、2007.
11. Kageyama, R.: Ultradian oscillators in somite segmentation and other biological events. BMB 2007、横浜、2007.
12. Niwa, Y., Masamizu, Y., Liu, T., Nakayama, R., Deng, C.-X., Kageyama, R.: The initiation and propagation of Hes7 oscillation are cooperatively regulated by Fgf and Notch signaling in the somite segmentation clock. The 2nd International Workshop on Natural Computing. Nagoya, 2007.
13. 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.
14. Kageyama, R.: Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitor cells. 18th International Congress of Eye Research, Beijing, China, Sept 24-29, 2008.
15. 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.
16. 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.
17. Yoshikawa, K.: Self-running droplet: mode switching on the autonomous motion, Dynamics Days Asia Pacific 5 (DDAP5), Nara, Japan, Sep 9 – 12, 2008.
18. Yoshikawa, K.: On/Off Switching of Higher-Order Structure in DNA, International Drug Discovery Science and Technology, Beijing, China, Oct 18 - 22, 2008.
19. Kageyama, R.: Ultradian oscillators in somite segmentation and other events. The Uehara Memorial Foundation Symposium, Tokyo, June 30-July 2, 2008.
20. 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.
21. 影山龍一郎:Ultradian oscillations in somite segmentation and other events. 第3回 Notch 研究会、三島、2008.

22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Kageyama, R.: Ultradian oscillators in somite segmentation and other biological events. 8th International Conference on Information Processing in Cells and Tissues, Ascona, Switzerland, April 5-9, 2009.
26. Kageyama, R.: The role of Hes1 in proliferation and differentiation of neural stem cells. EMBO Workshop/ 5th International Symposium on bHLH transcription factors. London, UK, May 7-8, 2009.
27. Kageyama, R.: Ultradian oscillators in somite segmentation and other biological events. Symposium on Developmental Biology, London, UK, June 17-19, 2009.
28. Kageyama, R.: Ultradian oscillators in somite segmentation and other biological events. The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research, Kyoto, Sept 13-14, 2009.
29. Kageyama, R.: The role of Hes1 oscillations in regulation of stem/progenitor cells. The Notch Meeting. Athens, Greece, Sept 27-Oct 1, 2009.
30. Kageyama, R.: The significance and mechanism of adult neurogenesis. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 名古屋、2009.
31. Kageyama, R.: The role of Notch signaling in proliferation and differentiation of neural stem cells. Construction and Reconstruction of the Brain. 淡路、2009.
32. Kageyama, R.: The role of Notch signaling in embryonic and adult neural stem cells. BK21 International Symposium 2010, Pusan, Korea, February 3, 2010.
33. Kageyama, R.: Ultradian oscillators in somite segmentation and other biological events. CDB Symposium 2010, Kobe, March 23-25, 2010.
34. 影山龍一郎:分節時計の数理モデルの構築と実験的検証。第114回日本解剖学会総会、岡山、2009.
35. 影山龍一郎:神経幹細胞とニューロン新生。第9回日本分子生物学会春季シンポジウム、宮崎、2009.
36. 影山龍一郎:The role of Hes genes in embryonic and adult neural stem cells. 第42回日本発生生物学会大会、新潟、2009.
37. 影山龍一郎:成体脳における神経幹細胞とニューロン新生。第1回産学情報交流会、京都、2009.
38. 影山龍一郎:2時間を刻む生物時計と生命現象。第14回睡眠科学研究講座、大阪、2009.
39. Kageyama, R.: Ultradian oscillators in somite segmentation and other biological events. Joint Congress of the 6th Congress of Asian Sleep Research Society, the 34th Annual Meeting of Japanese Society of Sleep Research, and the 16th Annual Meeting of Japanese Society for Chronobiology. 大阪、2009.
40. 影山龍一郎:成体脳の神経幹細胞とニューロン新生。第29回北野病院研究所セミナー、大阪、2009.
41. 影山龍一郎、短周期遺伝子発現リズムと形態形成、第57回日本実験動物学会総会、京都、5月12日、2010
42. 影山龍一郎、2時間リズムと生命現象、第5回リズム現象の研究会、東京、5月28日～5月29日、2010
43. 影山龍一郎、2時間リズムと生命現象、第38回 Sleep Apnea カンファレンス、東京、5月29日、2010
44. 影山龍一郎、成体脳の神経幹細胞とニューロン新生、第37回日本神経内分泌学会学術集会、京都、10月22日～10月23日、2010
45. 影山龍一郎、神経幹細胞における Notch シグナルの役割、大阪大学蛋白質研究所セミナー「神経科学と構造生物学の融合」、大阪、10月28日～10月29日、2010
46. 影山龍一郎、成体脳神経幹細胞における Notch-Hes 経路の役割、第9回成体脳のニューロン

- 新生懇談会、東京、11月27日、2010
47. 影山龍一郎、Oscillatory gene expression with ultradian rhythms in many biological events、BMB2010、神戸、12月7日～12月10日、2010
 48. 影山龍一郎、Notch シグナルによる神経幹細胞制御、発達障害研究所公開セミナー「神経発生と脳の組織構築」、春日井 愛知、12月22日、2010
 49. 小林妙子、振動遺伝子 Hes1 による ES 細胞の多様な分化応、第2回細胞システムの動態と論理、和光 埼玉、4月8日～4月9日、2010
 50. 小林妙子、転写因子 Hes1 の発現振動による ES 細胞の分化調節機構、第3回時空間ダイナミクスの定量生物学年会、東京、11月26日～11月28日、2010
 51. Ryoichiro Kageyama、The role of Notch signaling in embryonic and adult neurogenesis、18th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience、Lisbon, Portugal、6月6日～6月9日、2010
 52. Ryoichiro Kageyama、Ultradian oscillations in somite segmentation and other biological events、Meeting on Inference and Modeling of Regulatory Networks in Multicellular Systems、横浜、6月11日～6月12日、2010
 53. Ryoichiro Kageyama、Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells、Cambridge Oncology Seminar、Cambridge, UK、6月15日、2010
 54. Ryoichiro Kageyama、The role of Notch signaling in embryonic and adult neural stem cells、ENP Neural Stem Cell Meeting、Abbaye des Vaux de Cernay, France、6月17日～6月19日、2010
 55. Ryoichiro Kageyama、Ultradian oscillations in somite segmentation and other biological events、7th iCeMS International Symposium、京都、6月24日、2010
 56. Ryoichiro Kageyama、The role of Notch signaling in embryonic and adult neural stem cells、Perspectives of Stem Cells、Sao Paulo, Brazil、9月20日～9月24日、2010
 57. Ryoichiro Kageyama、The significance and mechanism of ultradian oscillations in somite segmentation and other biological events、International Workshop on Timing and Dynamics in Biological Systems、Dresden, Germany、9月26日～9月30日、2010
 58. Ryoichiro Kageyama、Essential roles of Notch signaling in embryonic and adult neural stem cells、Notch and Stem Cells、Athens, Greece、10月3日～10月6日、2010
 59. Ryoichiro Kageyama、Functional significance of neurogenesis in the olfactory bulb、Keystone Symposium --- Adult Neurogenesis、Taos, USA、1月9日～1月14日、2011
 60. Ryoichiro Kageyama、The role of Notch signaling in proliferation and differentiation of adult neural stem cells、Joint Japan-Australia-New Zealand Symposium --- Building a Functional Brain、Auckland, New Zealand、1月29日、2011
 61. Ryoichiro Kageyama、Ultradian oscillations in somite segmentation and other biological events. The 6th bHLH Symposium. Shanghai, China、5月16日～5月17日、2011
 62. Kageyama, R.: Essential roles of Notch signaling in embryonic and adult neural stem cells. 23rd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, Athens, Greece, 8月28日～9月1日、2011.
 63. Kageyama, R.: The role of Notch signaling in embryonic and adult neural stem cells. The Company of Biologists Workshops, West Sussex, UK, 9月18日～9月21日、2011.
 64. Kageyama, R.: The oscillator networks in the somite segmentation clock. The Notch Meeting V, Athens, Greece, 10月2日～10月6日、2011.
 65. Kageyama, R.: The role of Notch signaling in proliferation and differentiation of neural stem cells. Fondation Des Treilles, France, 10月24日～10月28日、2011.
 66. Kageyama, R.: Spatiotemporal regulation of somitogenesis by the oscillator networks of the segmentation clock. Annual Meeting of American Society for Cell Biology, Denver, USA, 12月3日～12月7日、2011.
 67. 小林妙子: 転写因子 Hes1 の発現振動による ES 細胞の分化調節機構、第8回「生物数学の理論とその応用」、京都、11月17日、2011.

68. 影山龍一郎:神経幹細胞の維持と分化制御、シンポジウム「器官発生の分子機構解明と疾患克服への基盤的理解」、東京、11月22日、2011.
69. 影山龍一郎:成体脳でのニューロン新生の意義と分子機構、第27回Wakoワークショップ、東京、11月22日、2011.
70. 影山龍一郎:分節時計の動作原理、第18回日本時間生物学会学術集会、名古屋、11月24日～11月25日、2011.
71. 小林妙子:転写因子Hes1の発現振動によるES細胞の分化調節機構、第18回日本時間生物学会学術集会、名古屋、11月24日～11月25日、2011.
72. Kageyama, R.: The role of Notch signaling in proliferation and differentiation of neural stem cells. 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日～12月16日、2011.
73. Marcel Hoerning "Controlling excitation patterns by minimum electric field: Experiments and simulation on heterogeneous tissue",The 50th Annual Conference of Japanese Society for Medical and Biological Engineering, "Medical and Biological Engineering Advance toward next 50 Years",東京 4-5/2011
74. Marcel Hoerning "Cell-rigidity recognition of neighboring cells toward the stabilization of cardiac conduction",The 2nd Mini-Syposium on non-equilibrium dynamics of soft matter - International Workshop on Nonlinear Dynamics in Science, 京都、9月、2011
75. Marcel Hoerning "Control of local activation patterns by electric-field stimulation in cardiac tissue",Analysis and Control of Reaction-Diffusion Systems (反応拡散系の解析と制御), One-Day-Symposium,東京、1月、2012
76. Kageyama, R: The 59th NIBB Conference—Neocortical Organization, 岡崎、3月10日～3月13日、2012.
77. 影山龍一郎:神経前駆細胞の増殖・分化制御機構、第117回日本解剖学会学術集会、山梨、3月26日～3月28日、2012.
78. 影山龍一郎:分節時計の動作原理、第89回日本生理学会大会、長野、3月29日～3月31日、2012.

② 口頭発表 (国内会議15件、国際会議5件)

1. Imayoshi, I., Itohara, S., Ikeda, T. and Kageyama, R.: Functional significance of adult neurogenesis in the mouse brain. IBRO Satellite Meeting on Neural Development, Cairns, Australia, 2007.
2. Imayoshi, I.: Functional significance of adult neurogenesis in the mouse brain. 東京大学堀場国際会議 東大130周年記念事業 Kornberg1+3, Tokyo, 2007.
3. Niwa, Y., Masamizu, Y., Liu, T., Nakayama, R., Deng, C.-X., Kageyama, R.: New molecular mechanism regulating Hes7 oscillation in the somite segmentation clock. 第40回日本発生生物学会・第59回日本細胞生物学会合同大会、福岡、2007.
4. 今吉格、糸原重美、池田敏男、影山龍一郎: マウス成体脳における神経新生の機能的意義、Neuro 2007、横浜、2007.
5. 小林妙子、水野浩彰、影山龍一郎: 胚性幹細胞におけるHes1のオシレーション。Neuro 2007、横浜、2007.
6. 下條博美、大塚俊之、影山龍一郎: Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. Neuro 2007、横浜、2007.
7. 武仲能子:研究会「ファイトテクノロジー交流会」立命館大学 平成19年10月20日.遺伝子発現制御モデル:DNAの構造と機能との相関
8. 吉川研一:2nd International Workshop on Natural Computing (IWNC) 名古屋大学 平成19年12月10日 Self-emergence of Spatio-temporal Structure and Dynamic Function
9. 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.
10. Imayoshi, I., and Kageyama, R.: Long-term labeling and ablation reveal requirement of continuous neurogenesis for the structural and functional integrity of the adult forebrain.第41回

- 日本発生生物学会、徳島、2008.
11. Takashima, Y., Ohtsuka, T., and Kageyama, R.: Visualization of the segmentation clock by real-time imaging of *Hes7* expression. BMB2008, 神戸, 2008.
 12. Kageyama, R.: Ultradian oscillations in somite segmentation and other biological events. 第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009.
 13. Imayoshi, I.: Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. The Joint Symposium of the 4th International Symposium of Institutes Network and Osaka University Global COE, Osaka, Jan 31-Feb 1, 2009.
 14. Kobayashi, T., Mizuno, H., Imayoshi, I., Furusawa, C., Shirahige, K., and Kageyama, R.: The cyclic gene *Hes1* contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. 第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009.
 15. 馬躍: A Non-Turing Scenario of Spatially Periodic Pattern Formation: Application to Somitogenesis. 第19回日本数理生物学会、東京、2009.
 16. 馬躍: Spatially Periodic Pattern Formation in a Discrete Cell Based Model. International Symposium on Nonlinear Theory and its Applications.札幌、2009.
 17. Tan S, Matsui T, Imayoshi I, Shinkai Y and R Kageyama R, Dual role of ESET in regulateing neural differentiation and repressing ERV emergence in the developing mouse brain, BMB2010, 神戸、12月7日～12月10日、2010
 18. 今吉格、坂本雅行、平野響子、影山龍一郎:成体脳神経幹細胞からの嗅球新生ニューロンの分化制御機構, 第 34 回日本神経科学大会, 横浜, 9 月 14 日～9 月 17 日, 2011.
 19. 大塚俊之、下條博美、松永充博、渡邊直希、米谷耕平、湊長博、影山龍一郎: Gene expression profiling of neural stem cells and identification of regulators of neural differentiation during cortical development. sponses. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 13 日～12 月 16 日, 2011.
 20. Hiromi Shimojo, Yukiko Harima, Toshiyuki Ohtsuka, Hitoshi Miyachi, Ryoichiro Kageyama: The significance of dynamic proneural gene expression in neural development. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12 月 13 日～12 月 16 日, 2011.
- ③ ポスター発表 (国内会議 30 件、国際会議 20 件)
1. Imayoshi, I., Itohara, S., Ikeda, T. and Kageyama, R.: Functional significance of adult neurogenesis in the mouse brain. IBRO Satellite Meeting on Neural Development, Cairns, Australia, 2007.
 2. Imayoshi, I.: Functional significance of adult neurogenesis in the mouse brain. 東京大学堀場国際会議 東大 130 周年記念事業 Kornberg1+3, Tokyo, 2007.
 3. Shimojo, H., Ohtsuka, T. and Kageyama, R.: Oscillatory *Hes1* expression in dividing and differentiating neural progenitors. 16th Biennial Meeting of the International Society of Developmental Neuroscience. Neurogenesis 2007. Tokyo, 2007.
 4. Imayoshi, I., Shimogori, T. and Kageyama, R.: The bHLH transcriptional network regulates the differentiation of Cajal-Retzius and choroid plexus epithelial cells in the mouse telencephalon. Neurogenesis 2007. Tokyo, 2007.
 5. Niwa, Y., Masamizu, Y., Liu, T., Nakayama, R., Deng, C.-X., Kageyama, R.: New molecular mechanism regulating *Hes7* oscillation in the somite segmentation clock. 第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会合同大会、福岡、2007.
 6. 今吉格、糸原重美、池田敏男、影山龍一郎: マウス成体脳における神経新生の機能的意義、Neuro 2007、横浜、2007.
 7. 小林妙子、水野浩彰、影山龍一郎: 胚性幹細胞における *Hes1* のオシレーション。Neuro 2007、横浜、2007.
 8. 下條博美、大塚俊之、影山龍一郎: Oscillations in Notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. Neuro 2007、横浜、2007.
 9. 武仲能子: 研究会「ファイトテクノロジー交流会」立命館大学 平成 19 年 10 月 20 日. 遺伝子発現制御モデル: DNA の構造と機能との相

10. 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, France, Sept 13-17, 2008.
11. 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, France, Sept 13-17, 2008.
12. Imayoshi, I., Sakamoto, M., and Kageyama, R.: Requirement of continuous neurogenesis for the structural and functional integrity of the adult brain. Keystone symposium, USA, March 15-19, 2009.
13. Takashima, Y., Masamizu, Y., Ohtsuka, T., Yamada, S., and Kageyama, R.: Visualization of the segmentation clock by real-time imaging of *Hes7* expression. 第41回日本発生生物学会、徳島、2008.
14. 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.
15. 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.
16. Sakamoto, M., Imayoshi, I., Ohtsuka, T., and Kageyama, R.: Requirement of continuous neurogenesis for the structural and functional integrity of the adult brain. 第31回日本神経科学会、東京、2008.
17. 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
18. 今吉格、坂本雅行、影山龍一郎: マウス成体脳の恒常的なニューロン新生の役割。BMB2008, 神戸, 2008.
19. Niwa, Y., Miyachi, H., and Kageyama, R.: Coupled oscillations in Notch and Fgf signaling underlie the coordination of the segmentation clock and the wavefront for periodic somite formation. International Societies for Developmental Biologists Congress, UK, Sept 6-10, 2009.
20. Tateya, T., Imayoshi, I., Tateya, I., Ito, J., and Kageyama, R.: Cooperative functions of *Hes/Hey* genes in auditory hair cell and supporting cell development. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 名古屋、2009.
21. Tan, S.L., Kageyama, R., Ohtsuka, T., and Kobayashi, T.: MicroRNA-9 regulates the timing of neural stem cell differentiation by fine-tuning *Hes1* expression in the developing cortex. 第82回日本生化学会大会、神戸、2009.
22. Imayoshi, I., and Kageyama, R.: Roles of Notch signaling in adult neural stem cells. Construction and Reconstruction of the Brain. 淡路、2009.
23. Tan, S.L., and Kageyama, R.: MicroRNA-9 regulates the timing of neural stem cell differentiation by fine-tuning *Hes1* expression in the developing cortex. Construction and Reconstruction of the Brain. 淡路、2009
24. Tan, S.L., and Kageyama, R.: MicroRNA-9 regulates the timing of neural stem cell differentiation by fine-tuning *Hes1* expression in the developing cortex. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009.
25. 下條博美、神経発生における遺伝子発現モードによる神経分化制御機構の解明、第2回細胞システムの状態と論理、和光 埼玉、4月8日～4月9日、2010.
26. Takashima Y, Ohtsuka T, Miyachi H, and Kageyama R, Intronic delay is essential for Oscillatory expression in the segmentation clock、第43回日本発生生物学会年会、京都、6月20日～6月23日、2010.
27. 小林妙子、影山龍一郎、振動遺伝子 *Hes1* は Notch シグナル制御を介して ES 細胞の多様な分化応答に寄与する、第33回日本神経科学大会、神戸、9月2日～9月4日、2010.
28. 今吉格、坂本雅行、影山龍一郎、成体脳神経幹細胞における Notch *Hes* シグナルの役割、第33回日本神経科学大会、神戸、9月2日～9月4日、2010.
29. Tan S, Matsui T, Imayoshi I, Shinkai Y and R Kageyama R, Dual role of ESET in regulateing neural differentiation and repressing ERV emergence in the developing mouse brain、BMB2010、

- 神戸、12月7日～12月10日, 2010.
30. Taeko Kobayashi, Hes1 regulates embryonic stem cell differentiation by suppressing Notch signaling, BMB2010、神戸、12月7日～12月10日, 2010.
 31. Itaru Imayoshi and Ryoichiro Kageyama, Roles of Notch-Hes signaling in adult neural stem cells, ENP Neural Stem Cell Meeting, Abbaye des Vaux de Cernay, France, 6月17日～6月19日, 2010.
 32. Tan S, Matsui T, Imayoshi I, Shinkai Y and R Kageyama R, ESET regulates neural differentiation in the developing mouse brain, ENP Neural Stem Cell Meeting, Abbaye des Vaux de Cernay, France, 6月17日～6月19日, 2010.
 33. Taeko Kobayashi, Hes1 contributes to diverse differentiation responses of ES cells by regulating Notch signaling, Notch and Stem Cells, Athens, Greece, 10月3日～10月6日, 2010.
 34. Imayoshi I, Kageyama, R.: Keystone Symposium --- Adult Neurogenesis, Taos, USA, 1月9日～1月14日, 2011.
 35. Sakamoto M, Imayoshi I, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R.: Requirement of continuous neurogenesis in the adult forebrain for gender-specific activities. Keystone Symposium --- Adult Neurogenesis, Taos, USA, 1月9日～1月14日, 2011.
 36. Sakamoto M, Imayoshi I, Ohtsuka T, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R.: Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. Society for Neuroscience, Washington DC, USA, 11月12日～11月16日, 2011.
 37. Sakamoto M, Imayoshi I, Ohtsuka T, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R.: Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. The 18th East Asia Joint Symposium, Shanghai, China, 12月7日～12月10日, 2011.
 38. Sakamoto M, Imayoshi I, Ohtsuka T, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R.: Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. The 9th International Student Seminar, Kyoto, 3月7日～3月9日, 2011.
 39. SiokLay Tan, Miyuki Nichi, Toshiyuki Ohtsuka, Toshiyuki Matsui, Keiko Takemoto, Asuka Miura-Kamio, Hiroyuki Aburatani, Yoichi Shinkai, Ryoichiro Kageyama: Roles of ESET in epigenetic regulation of developing cortex. RIKEN CDB Symposium "Epigenetic Landscape in Development and Diseases", 神戸, 3月14日～3月16日, 2011.
 40. 楯谷智子. 楯谷一郎, 伊藤壽一, 影山龍一郎: 蝸牛有毛細胞・支持細胞の発生における Hes/Hey 遺伝子群の機能. 第112回日本耳鼻咽喉科学会, 京都, 5月19日, 2011.
 41. 楯谷智子, 今吉格, 楯谷一郎, 濱口清海, 石橋誠, 伊藤壽一, 影山龍一郎: ヘッジホッグシグナルは蝸牛感覚上皮の発生と維持に必要である. 第34回日本神経科学会, 横浜, 9月14日～9月17日, 2011.
 42. 今吉格, 坂本雅行, 平野響子, 影山龍一郎: 成体脳神経幹細胞からの嗅球新生ニューロンの分化制御機構, 第34回日本神経科学大会, 横浜, 9月14日～9月17日, 2011.
 43. Siok Lay Tan, 松井 稔幸, 大塚 俊之, 眞貝 洋一, 影山 龍一郎: Essential roles of the histone methyltransferase ESET in the epigenetic control of neural progenitor cells during development. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 9月14日～9月17日, 2011.
 44. Sakamoto M, Imayoshi I, Ohtsuka T, Yamaguchi M, Mori K, Kageyama R.: Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. 第34回日本神経科学大会, 横浜, 9月14日～9月17日, 2011.
 45. M. Hörning, S. Takagi, and K. Yoshikawa, "Interactions of Virtual Electrodes - Efficiency of Far-Field Pacing in Heart", (Far-From-Equilibrium Dynamics 2011 (FFED2011), 01/ 2011, K 京都)
 46. M. Hörning, S. Takagi, and K. Yoshikawa, "Theoretical reconstruction of mammalian tissue properties by utilizing virtual electrodes", (The 1st International Symposium on Innovative Mathematical Modeling, 02/2011, 東京)
 47. M. Hörning, T. Kawano, T. Kuboki, S. Kidoaki, and K. Yoshikawa, "Rigidity of cell environment enhances mammalian cell activity", (7th International Conference on Biological

- Physics, 19.6.-24.6.2011, San Diego, California, USA)
48. M. Hörning, S. Takagi, and K. Yoshikawa, "Control of activation sites by low-electric far field pacing in excitable media", (7th International Conference on Biological Physics, 19.6.-24.6.2011, San Diego, California,
 49. M. Hörning, S. Takagi, and K. Yoshikawa, "Control of activation sites by low-electric far field pacing in excitable media", (Engineering of Chemical Complexity, 3.7.- 8.7.2011, Berlin, Germany) USA)
 50. M. Hörning and K. Yoshikawa, "Stabilization of cardiac conduction via rigidity matching between cells and extracellular matrix", (Phase Transition Dynamics in Soft Matter: Bridging Microscale and Mesoscale, 20.2.-22.2.2012, 京都)

(4)知財出願

①国内出願 (1件)

1. <<発明の名称:多能性幹細胞からの神経細胞の分化誘導方法、発明者:影山龍一郎・小林妙子、出願人:国立大学法人京都大学、出願日:2009.7.16、出願番号:2009-168045>>

②海外出願 (1件)

1. <<発明の名称:多能性幹細胞からの神経細胞の分化誘導方法、発明者:影山龍一郎・小林妙子、出願人:国立大学法人京都大学、出願日:2010.7.15、出願番号:PCT/JP2010/062014、出願国>>

(5)受賞・報道等

①受賞

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 線維芽細胞において短周期発現リズムを示す遺伝子の網羅的探索:京都新聞(2007/6/26)、日経産業新聞(6/27)、読売新聞(7/2)、朝日新聞(7/16)
2. 分節過程で短周期発現リズムを示す遺伝子の網羅的探索:産経新聞(2007/8/7)、読売新聞(8/7)、京都新聞(8/7)、日刊工業新聞(8/7)
3. Notch シグナルのオシレーションによって神経幹細胞の未分化性が維持される:日本経済新聞 (2008年4月10日)
4. 成体脳におけるニューロン新生の生理的意義の解明:
朝日新聞 (2008年9月1日夕刊9面)、京都新聞 (9月1日朝刊24面)、産経新聞 (9月1日朝刊2面)、日刊工業新聞 (9月2日朝刊22面)、日経新聞 (9月1日朝刊42面)、毎日新聞 (9月1日朝刊3面)、読売新聞 (9月1日朝刊2面) およびロイター通信
5. 振動遺伝子 Hes1 が胚性幹細胞の多様な分化応答に寄与:
朝日新聞 (2009年8月15日夕刊8面)、京都新聞 (8月15日夕刊8面)、日本経済新聞 (8月16日34面)、毎日新聞 (8月15日夕刊7面) および読売新聞 (8月15日夕刊2面)
6. 胚性幹細胞における Hes1 オシレーションの意義:NHK 教育テレビ サイエンス ZERO 2010年4月3日
7. 成体脳ニューロン新生と匂い情報処理:NHK 教育テレビ サイエンス ZERO 2010年6月26日
8. 分節時計遺伝子がリズムを刻むにはイントロンによる発現の遅れが必須:朝日新聞(2011年2月8日)、京都新聞 (2月8日朝刊)
9. 成体脳におけるニューロン新生は先天的な匂い応答に必要である。:京都新聞 (2011年5月3日21面)

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

- 本研究で開発した Nestin-CreERT2 マウスやその他の関連遺伝子改変マウスは、神経幹細胞を遺伝子操作できる非常に有用なもので、国内外 100 カ所以上で各種研究に使われている。

② 社会還元的な展開活動

- 分節時計に関する成果は、プラネタリウムや生命誌館で一般に紹介された。

§ 6 研究期間中の主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2007年5月 17～18日	第4回国際bHLHシンポジウム	京都	約100名	bHLH型転写因子に関する最新の成果を報告
2007年 12月10日	2nd International Workshop on Natural Computing --- Special Session I "Self-organization and Computation"	名古屋	約80名	Natural Computingを非平衡系での自己組織化現象と捉え、体節形成を含む時空間構造形成について議論した。
2008.9.16	第18回日本数理生物学会大会 企画シンポジウム「生物系にみられる時空間パターンの自己組織化」	京都	約80名	生物系にみられる多様なパターンがどのような仕組みで自己組織化しているのか？は本シンポジウムの趣旨である。一細胞の生物時計からはじめ、多細胞の自己振動、そして複雑な生物ネットワークまで、幅広い時間と空間上の現象を議論する。また、講演者は多国籍の構成であり、質疑も含めて英語でのシンポジウムを主催した。
2009年5月 26日	チーム内ミーティング	京都	約30名	現状および今後の方針について議論した。

§ 7 結び

当初掲げた目標は、分節時計を構成するオシレーター・ネットワークの全体像を明らかにして、それらを取り込んだ数理モデルを構築すること、さらに、分節時計以外での短周期リズムの分子機構と意義を明らかにすることであった。この5年間で、これらの当初の目標はほぼ達成できた。生物実験を中心に行う研究者と数理モデルを専門に行う研究者との間の議論はなかなか困難な面があるが、幸い両チームは同じ大学であったので頻繁にお互いの研究室を訪れ、意思の疎通を図ることができた。数理モデル化は生命現象を統合的に理解する上で非常に重要な課題であり、本プロジェクト終了後も共同研究を続けていきたい。

本プロジェクトは、大学院生やポスドクの若い研究者が中心になって強力に押し進められた。基礎研究の重要性が認識されているが、その実際の担い手である若い研究者の立場は相変わらず

不安定である。CREST は十分な経済的支援を可能にしてくれたので、彼ら・彼女らは本プロジェクトに専念して研究することができた。しかし、CREST 終了後は、このような研究のみに専念することは困難になる。本来は、日本学術振興会の DC や PD を拡充する等によって、より多くの若い研究者の経済的支援を行うことが望まれる。

影山グループ



吉川グループ

