



マウス発生過程におけるホスホリパーゼC ϵ の神経系幹細胞特異的発現

眞砂, 美佐

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Date of Publication)

2013-07-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2600

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002600>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



マウス発生過程におけるホスホリパーゼ C ϵ の 神経系前駆細胞特異的発現

眞 砂 美 佐

神戸大学大学院医学系研究科
分子細胞生物学講座分子生物学分野

連絡先：眞砂美佐

神戸大学大学院医学系研究科
分子細胞生物学講座分子生物学分野
神戸市中央区楠町 7-5-1
TEL 078-382-5385
FAX 078-382-5399

(平成14年 3 月 4 日受付)

要 約

ホスホリパーゼ C (PLC) によるホスホイノシチド加水分解は、中枢神経系の細胞内情報伝達経路において主要な役割を果たす。最近我々や他の研究グループによって、低分子量 GTPase である Ras や Rap との結合により活性が制御される新規の PLC, PLC ϵ が発見された。本研究ではマウス発生過程での PLC ϵ の発現様式について検討した。まず発現時期について調べたところ、胎生 10 日目 (E10) 頃に始まって周産期初期まで続き、それ以後は消退した。次に発現部位を解析したところ、E10~E11 では神経管の神経上皮に、E12 以降では発生途上の脳と脊髄の ventricular zone (VZ) や subventricular zone (SVZ) に特異的に強く発現され、網膜、嗅上皮、神経節など神経系の増殖・分化が起こっている部位に発現が見られた。これらは神経系前駆細胞が優位に存在する部位である。E15 以降では発生途上の筋組織に、成体マウスでは主に心臓に発現していたが脳での発現はごくわずかだった。

上記の所見と一致して、レチノイン酸 (RA) 処理したヒト奇形腫 NTERA-2 細胞の神経細胞分化初期に PLC ϵ 発現の誘導が一過性に観察され、分化完了した時点でその発現は消失した。この発現の時間的経過は、ヒト *achaete-scute* ホモログ 1 (hASH1) のそれと同様であった。これらの結果から、PLC ϵ は神経系前駆細胞の増殖・分化に関与していることが示唆された。

緒 言

ホスホイノシチド特異的ホスホリパーゼ C (PI-PLC) によるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) の加水分解は、様々な細胞膜レセプターを介する細胞内情報伝達の引き金になっている⁽¹⁾。この反応から 2 つのセカンドメッセンジャー、ジアシルグリセロールとイノシトール 1,4,5-三リン酸が産生され、前者はプロテインキナーゼ C の活性化因子、後者は細胞内カルシウム動員因子として作用する。ヒト PI-PLC アイソフォームとして約 10 種類が同定され、 β , γ , δ の 3 つのクラスに大別されている。これらはそれぞれ三量体 G 蛋白質や蛋白質チロシンリン酸化によりレセプターと共役している⁽¹⁾。最近線虫⁽²⁾や哺乳動物⁽³⁻⁵⁾ から新規の PI-PLC, PLC ϵ が発見された。それらは Ras 結合ドメインを有し、低分子量 GTPase である Ras や Rap1 と GTP 依存性に結合する⁽²⁻⁵⁾。細胞内では活性型 Ras および Rap1 を共発現することによって PLC ϵ が活性化されることが証明されている⁽⁵⁾。PLC ϵ は Ras と結合して細胞膜へ、Rap1 と結合してゴルジ装置へと移送される⁽³⁾。さらに PLC ϵ は、Rap1 グアニンヌクレオチド交換因子として作用する CDC25 類似ドメインを持つ。そのため、ゴルジ装置において CDC25 類似ドメインを介して Rap1 を活性化し、シグナルを自己増幅する機能を有する⁽⁶⁾。以上のことから、PLC ϵ は Ras あるいは Rap1 を介する情報伝達系の両方に関与し、細胞の存在する状況に応じてそれぞれ異なる細胞内部位で PIP₂ の加水分解を引き起こすと考えられる。

キーワード：ホスホリパーゼ C ϵ , Ras, 神経系前駆細胞

胎生期の神経発生において、種々の神経細胞とグリア細胞は共通の神経系前駆細胞 (neural precursor cell: NPC あるいは多機能性幹細胞: multipotent stem cell ともいう) から生じる^(7, 8)。マウスでは神経ヒダが正中軸で融合して神経管を形成する E9 頃以降に、NPC は神経管の内腔側から外限界膜に及ぶ多列上皮構造を持つ神経上皮に存在する。神経系細胞の増殖・分化が盛んになる E12 以降には、NPC は脳室や脊髄中心管に接する VZ に限局するようになる⁽⁹⁾。VZ の細胞は神経細胞とグリア細胞の双方への分化能力を持つことに加えて、活発な増殖能力と自己再生能力があり、NPC としての条件を満たしている^(7, 8)。さらに発生のより後期には NPC を含んだ第二期増殖帯が VZ のすぐ外層の SVZ に現れ⁽⁹⁾、周産期に VZ が衰退する一方、SVZ は成体期まで中枢神経系の一部に残って NPC の貯蔵庫として機能している⁽⁸⁾。その他、網膜⁽¹⁰⁾、嗅上皮⁽¹¹⁾、神経堤⁽¹²⁾などの発生途上の神経系組織に NPC が存在する。NPC はさらに細胞分裂を重ねて、神経細胞あるいはグリア細胞のいずれかに分化能力が制限された前駆細胞に分化し、VZ・SVZ からさらに外層へ移動する。近年、部位特異的発現様式の解析および遺伝子ノックアウト実験により、神経系組織の初期発生に関与する多くの調節遺伝子が明らかにされつつある^(13, 14)。それらには塩基性 helix-loop-helix ファミリー、POU ファミリーや Hox ファミリーの転写因子、Notch、繊維芽細胞増殖因子 (FGF) などを支配する遺伝子が含まれる。

PI-PLC からその下流のプロテインキナーゼ C は中枢神経系での主要な細胞内情報伝達経路であり⁽¹⁵⁾、神経系発生の制御においても重要な役割を果たしている可能性がある。本研究では新規の PLC, PLC ϵ のマウス発生過程における発現様式について解析し、中枢・末梢神経系で NPC が存在する部位に特異的に発現していることを明らかにした。

方 法

1) マウス PLC ϵ の cDNA のクローニング

BLAST サーチにより、ヒト PLC ϵ の C 末端とホロモジールをもつマウス EST クローンを発見した。さらに上流の cDNA を分離するために、E11 マウスの cDNA ライブラリー (Clontech 社) を鋳型として 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) を行った。

2) 細胞培養と神経分化誘導

NTERA-2 クローン D1 細胞⁽¹⁶⁾を、10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's

medium) 中で培養した。次に神経分化誘導のために 10 μ M RA (Sigma) 存在下で 6 週間、その後 RA を含まない DMEM/10%FBS 中で 2 日間、さらに細胞分裂阻害剤 (10 μ M uridine, 10 μ M 5-fluoro-2'-deoxyuridine, 1 μ M cytosine β -D-arabinofuranoside (全て Sigma)) を含む DMEM/5%FBS 中で 10 日間培養した。一方、マウス胎児癌 P19 細胞 (神戸大学大学院柳茂先生より供与) は既報⁽¹⁷⁾の方法に従って培養した。

3) 実験動物の準備

今回は全て ddY マウス (日本 SLC) を用い、陰性確認日を胎生 0 日目 (E0)、出生日を生後 0 日目 (P0) とした。

4) ノーザンブロット解析

マウスの胎児ブロットと成体各種組織ブロット (Clontech) に対し、³²P 標識 DNA プローブ (7.5kb 全長マウス PLC ϵ cDNA あるいは 1.1kb マウス β -actin cDNA) を用い、PerfectHyb buffer (Toyobo) で 68°C にて 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後 0.1 $\times$ SSC/0.1% SDS にて 65°C で 15 分 $\times$ 2 回洗浄し、イメージングプレートによって解析した。

5) RNA の調製と逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法による解析

TRIzol 試薬 (Invitrogen) で抽出した total RNA から Superscript II 逆転写酵素 (Invitrogen) で一本鎖 cDNA を合成し、Expand HighFidelity PCR System (Roche Diagnostics) を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PCR の増幅回数は産物の量が定量可能領域に入るように加減した。

6) *In situ* ハイブリダイゼーション

各発生過程のマウスを 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定後、20% ショ糖溶液で置換し、OCT compound (Tissue-Tek) で包埋して作製した凍結切片標本 (10 ~ 15 μ m) を、10 μ g/ml proteinase K 溶液で処理した。既報の方法^(18, 19)に従ってマウス PLC ϵ のアミノ酸 1180 ~ 1423 番目に相当する³³P 標識 RNA プローブを合成し、58°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後 2 $\times$ SSC/50% formamide にて 58°C で 30 分 $\times$ 2 回、0.4 $\times$ SSC にて 58°C で 15 分 $\times$ 2 回洗浄し、オートラジオグラフィーを行った。最後に標本を cresyl violet 染色した⁽²⁰⁾。

7) 免疫組織染色

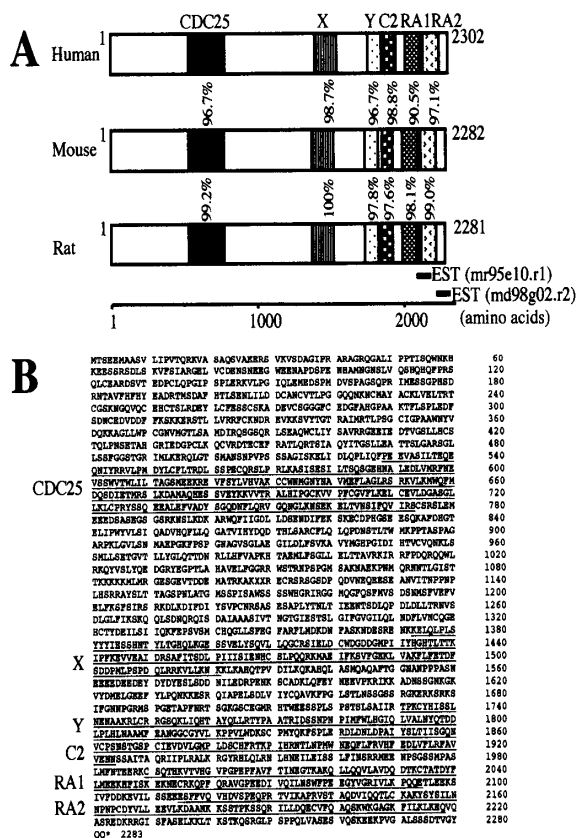
一次抗体には、マウス PLC ϵ の C 末端 19 残基に対応する合成ペプチドを抗原としてウサギポリクローナル抗体を作製した。10 μ m のマウス胎児凍結切片標本を一次抗体と反応後、フルオレセイン標識抗ウサギ免疫グロブリン G 抗体 (Amersham Pharmacia) を

二次抗体に用い、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

結 果

1) マウス PLC ϵ の一次構造

BLAST サーチからの EST クローン (図 1 A) と 5'-RACE から得た全長 cDNA は、2282 アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしており (図 1 B)、構造上は哺乳動物の PLC β , γ , δ アイソフォーム全てに共有される PLC 触媒ドメインの X, Y, C2 ドメインと、PLC ϵ に特徴的な CDC25 類似ドメインと、2 つの Ras 結合ドメインを有することがわかった。またマウス PLC ϵ の全ての機能ドメインは、アミノ酸配列レベルでヒトやラットのそれらと 90% 以上の相同性を示した^(3, 5) (図 1 A)。



(図 1) マウス PLC ϵ の一次構造

A) マウス PLC ϵ の各機能ドメインの amino 酸配列レベルでの相同性を、ヒトあるいはラットと比較してパーセント表示した。マウス EST クローン, mr95e10.rl と md98g02.r2 によってカバーされた部分は下部に示した。

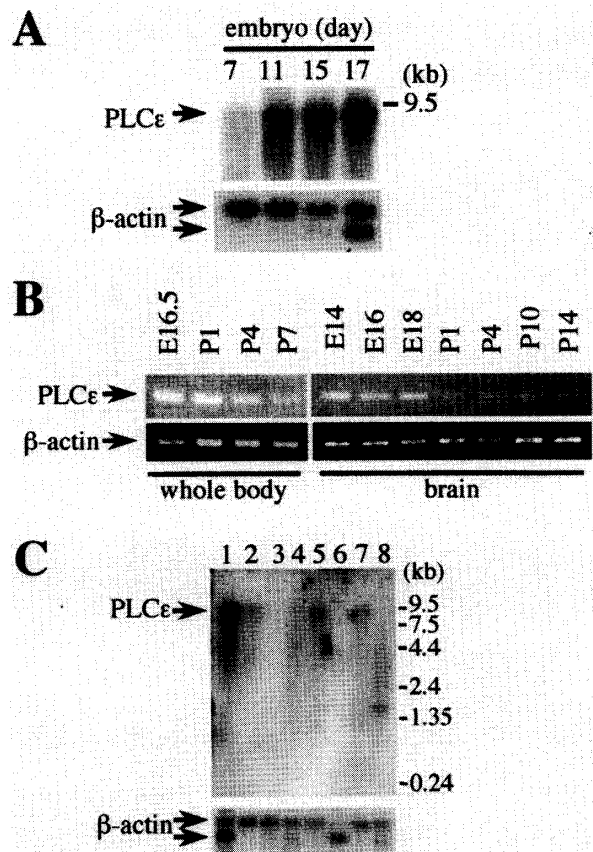
B) マウス PLC ϵ の amino 酸配列で、下線部はそれぞれ CDC25 類似, X, Y, RA (Ras 結合) 1, RA2 ドメインを示す。

2) マウス発生過程における PLC ϵ の発現

各発生過程の個体全身の mRNA を用いてノーザンブロット法と RT-PCR 法による解析を行ったところ、約 9 kb の長さの mRNA の発現が E11 頃から胎生後期まで認められ (図 2 A), P4 頃から次第に衰退した (図 2 B)。成体マウスでは心臓に中程度の発現と、脳、肝臓、腎臓に弱い発現を認めた (図 2 C)。

3) *In situ* ハイブリダイゼーションによる解析

アンチセンスプローブによって PLC ϵ の発現部位特異性を調べたところ、E10.5~E11 では、中脳水道・第 4 脳室・神経管周囲の多列上皮構造を持つ神経上皮 (図 3 A) と、耳胞や顔面聴神経節に発現が認められた。E12 (図 3 B-a~f) では、側脳室・第 3 脳室・第 4 脳室・脊髄中心管の VZ・SVZ, さらに網膜、嗅上



(図 2) マウス発生過程における PLC ϵ の mRNA の発現

A) 各発生過程の胎児マウス全身の poly(A)⁺ RNA 2 μ g を含むブロットを、マウス PLC ϵ (上段) と β -actin (下段) についてノーザンブロット法で解析した。右端に RNA サイズマーカーを示す。

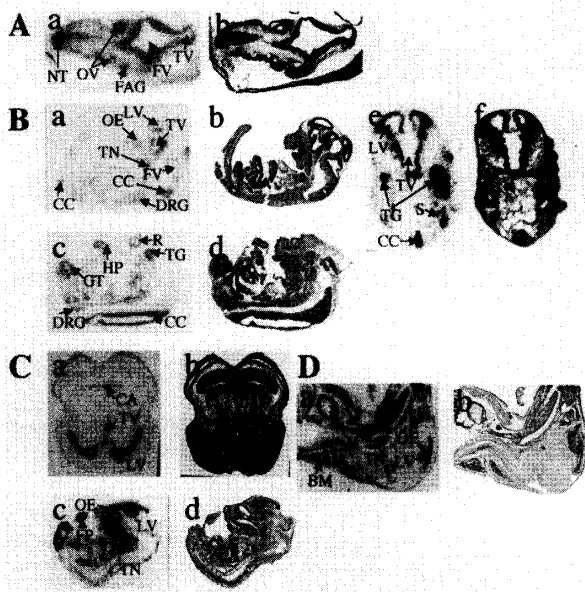
B) 各発生過程のマウス全身あるいは脳において、PLC ϵ と β -actin について RT-PCR 法を行った。

C) 成体マウス各組織の poly(A)⁺ RNA 2 μ g を含むブロット (1: 心, 2: 脳, 3: 脾, 4: 肺, 5: 肝, 6: 骨格筋, 7: 腎, 8: 精巣) を、A) と同様にノーザンブロット解析した。

皮, 三叉神経節, 脊髄後根神経節に存在し, 生殖結節, 手板, 舌筋にもわずかな発現が見られた。E15~E17では, 第3脳室・第4脳室よりも側脳室のVZ・SVZに強く発現し(図3C-a, b), 舌筋や心筋などの筋組織にも発現が認められた(図3C-c, d, 図3D)。いずれの場合もセンスプローブによる対照群ではシグナルを検出できなかった(結果示さず)。

4) 免疫組織染色による PLC ϵ の存在部位の解析

P19細胞の抽出蛋白質のプロットにおいて, 抗マウス PLC ϵ 抗体によって PLC ϵ に相当する約 250kDa の単一バンドが検出され, 抗原ペプチド共存下ではそのバンドは完全に消失した(図4A)。この抗体による解析の結果, E10 では神経管の神経上皮細胞に強い発現と(図4B), 神経管周囲細胞に中程度の発現が認められた。E14 では網膜の神経層にも発現が見られ(図4C), E15 の脳では VZ と SVZ に発現が局限していた(図4D)。これらの結果は *in situ* ハイブリダイゼーションによる結果と一致した。

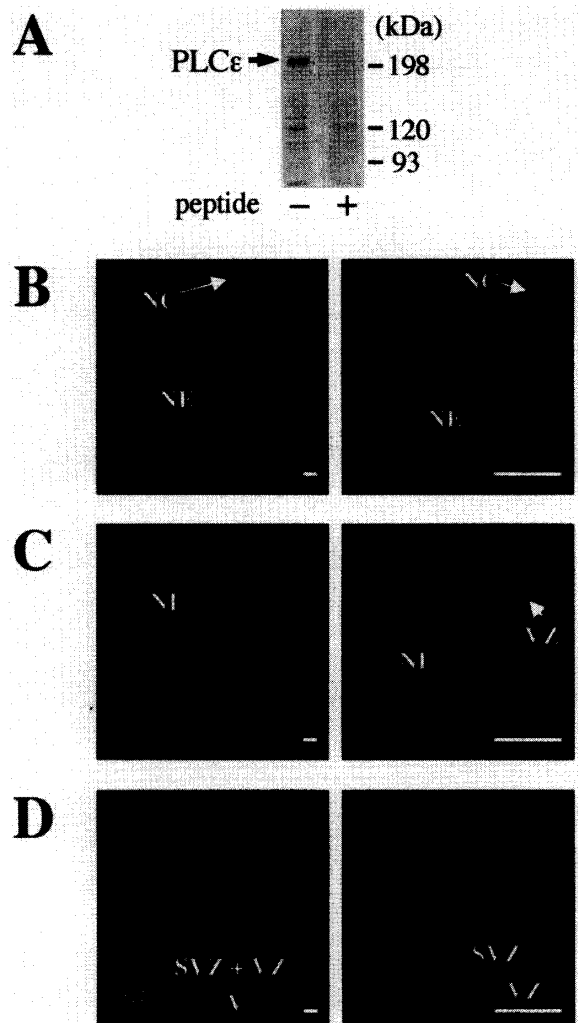


(図3) PLC ϵ の発現の *in situ* ハイブリダイゼーションによる解析

A) E10.5~E11 のマウス横断切片で, 同一切片の a : オートラジオグラム, b : cresyl violet 染色で, 左が尾側, 右が口側になる。B) E12 の全身の矢状断 (a-d), 頭部の横断 (e, f), C) E15 の横断 (a, b) と矢状断 (c, d), D) E17 の矢状断についての結果を示した。B) a, c, e, C) a, c, D) a がオートラジオグラム, B) b, d, f, C) b, d, D) b が cresyl violet 染色である。略語は, BM ; 背筋, CA ; 中脳水道, CC ; 脊髄中心管, DRG ; 後根神経節, FAG ; 顔面-聴神経節, FP ; 足板, FV ; 第4脳室, GT ; 生殖結節, H ; 心, HP ; 手板, LV ; 側脳室, NT ; 神経管, OE ; 嗅上皮, OV ; 耳胞, R ; 網膜, S ; 球形嚢, TG ; 三叉神経節, TN ; 舌, TV ; 第3脳室, を示す。

5) NTERA-2 細胞の神経分化における PLC ϵ の発現誘導

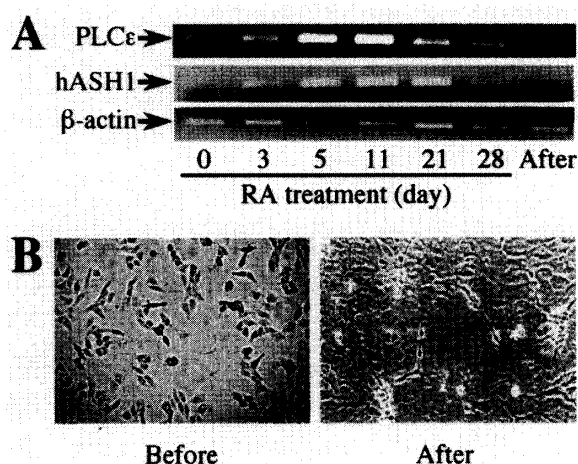
RT-PCR 法による定量では, RA 処理後 3 日までの間に PLC ϵ は誘導され(図5A 上段), 5~11 日後にピークに達した後は減衰し, 28 日後の発現はごくわずかであった。細胞分裂阻害剤処理後は約 20% が分化が完了した神経細胞であるのが観察され⁽²¹⁾(図5B 右), この時の PLC ϵ の発現は著明に低下していた(図5A 上段)。一方 NTERA-2 細胞の神経分化の対照として, 塩基性 helix-loop-helix 型の転写因子である hASH1⁽²²⁾ の発現を調べた。hASH1 は PLC ϵ と同様に RA 処理後 3 日までの間に誘導され, 5~21



(図4) PLC ϵ 発現の免疫組織染色による解析

A) 抗マウス PLC ϵ 抗体の特異性を評価するため, P19細胞の抽出蛋白質のプロットを, 抗マウス PLC ϵ 抗体のみ, あるいは抗原ペプチド共存下で反応させた結果である。B)~D) ; 抗マウス PLC ϵ 抗体で染色した胎児マウス組織の横断切片の低倍率(左図), 高倍率(右図)写真で, それぞれ E10 の神経管 (B), E14 の眼の原基 (C), E15 の脳 (D) を示した。略語は, NC ; 神経堤由来細胞, NE ; 神経上皮, NL ; 網膜神経層, SVZ ; subventricular zone, V ; 脳室, VZ ; ventricular zone, スケールバーは 60 μ m を示す。

日間でピークに達した後は減衰し、完全に神経分化した NTERA-2 細胞では認められなかった (図 5 A 中段)。



(図 5) NTERA-2 細胞における PLC ε の発現誘導
A) RA 処理後の各段階と細胞分裂阻害剤処理後 (After) において, PLC ε (上段), hASH1 (中段), β-actin (下段) について RT-PCR 法で解析した。
B) RA 処理前 (左図) と細胞分裂阻害剤処理後 (右図) の顕微鏡写真である。

考 察

PLC は中枢神経系の細胞内情報伝達において重要で⁽¹⁵⁾, PLC β や PLC γ のアイソフォームは哺乳動物の中枢神経系で部位特異的な発現様式をとることが知られている^(23, 24)。例えば, PLC β1 は大脳皮質や海馬に強く発現している一方, PLC β3, β4, γ2 は小脳のプルキンエ細胞に強く発現する。マウス発生過程において, PLC β1, β4 は胎生後期から認められるが PLC β2, β3 は出生後早期に出現する⁽²⁴⁾。また, PLC β1 のノックアウトマウスでは癲癇を起こし⁽²⁵⁾, PLC β4 のノックアウトマウスでは運動失調⁽²⁵⁾と視覚障害⁽²⁶⁾を生じる。これらのマウスでは海馬や小脳において, PIP₂加水分解活性低下と分化異常が見られる⁽²⁵⁾。以上のことから特定の PLC アイソフォームの発現部位とその機能には密接な関係があると考えられる。

今回マウス発生過程における PLC ε の発現様式を経時的に解析した結果, E10~E11 では神経管の神経上皮, E12 以降は発生途上の脳と脊髄の VZ と SVZ に特異的に発現していた。つまり PLC ε の発現部位は NPC が優位に存在する部位にほぼ一致していた^(7, 8)。さらに PLC ε は, 発生途上の網膜の神経細胞層や, 中枢神経系以外では嗅上皮や末梢神経節, また神経堤由来と推測される神経管周囲細胞にも分布し

ていたが, これらの領域には NPC が存在する⁽¹⁰⁻¹²⁾。このように中枢・末梢神経系における PLC ε の発現様式は, 神経分化に関与する種々の転写因子がそれぞれ限局した領域の NPC に存在する^(13, 14)のとは異なり, NPC が存在するほとんど全ての領域に発現していた。E15 以降は PLC ε は神経組織では減弱していく一方, 増殖分化途上の舌筋や心筋に発現しているが, その機能については今後の検討課題である。

NTERA-2 細胞において PLC ε は, RA 処理後早期に一過性に発現し, 神経細胞分化終了後は消退していた。このような時間的経過は NPC の分化に関与する hASH1⁽²²⁾と類似することや, 前述のように NPC に特異的に発現していることから, PLC ε は NPC の分化に関与すると考えられる。

PLC ε は Ras や Rap1 との結合によって活性制御を受けていることから^(3, 5, 6), FGF などの様々な神経分化の調節因子のレセプターからの細胞内情報伝達において作用していると考えられる。例えば, FGF ファミリーは中枢神経系の神経分化誘導から分化終了期までの全過程にわたって重要な役割を果たしている⁽²⁷⁾。褐色細胞腫 PC12 細胞のような細胞培養モデルを用いた解析から, FGF や神経成長因子 (NGF) の神経分化を誘導する活性は Ras-Raf-MAP キナーゼ (MAPK) 経路によって仲介されることがわかっている⁽²⁸⁻³⁰⁾。また PC12 細胞の分化に必要な NGF 依存性の MAPK の持続的活性化は, Rap1-B-Raf 経路によって仲介されている⁽³¹⁾。しかし Ras-Raf-MAPK 経路の活性化だけでは神経細胞分化誘導には不十分である⁽³²⁾。海馬の神経細胞を用いた研究では, MAPK 活性化とは別の Ras 依存性経路が FGF 由来の神経細胞分化に関わるという⁽³³⁾。従って Ras/Rap-PLC ε 経路は FGF 由来の神経分化シグナルを仲介している可能性がある。神経分化における PLC ε の役割については, 今後遺伝子ノックアウト実験によって解明していく必要がある。

謝 辞

本研究にあたり, 御指導を賜りました神戸大学大学院医学系研究科分子細胞生物学講座分子生物学分野の片岡徹教授, 脳科学講座神経発生学分野の寺島俊雄教授, ゲノム科学講座ゲノム制御学分野の南康博教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Rhee, S.G., Bae, Y.S.: Regulation of phosphoinositide-

- specific phospholipase C isozymes. J. Biol. Chem. 272: 15045-15048, 1997
- 2) Shibatohe, M., Kariya, K., Liao, Y., Hu, C.D., Watari, Y., Goshima, M., Shima, F., Kataoka, T.: Identification of PLC210, a *Caenorhabditis elegans* phospholipase C, as a putative effector of Ras. J. Biol. Chem. 273: 6218-6222, 1998
 - 3) Song, C., Hu, C.D., Masago, M., Kariya, K., Yamawaki-Kataoka, Y., Shibatohe, M., Wu, D., Satoh, T., Kataoka, T.: Regulation of a novel human phospholipase C, PLC ϵ , through membrane targeting by Ras. J. Biol. Chem. 276: 2752-2757, 2001
 - 4) Lopez, I., Mak, E.C., Ding, J., Hamm, H. E., Lomasney, J.W.: A novel bifunctional phospholipase C that is regulated by G α 12 and stimulates the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. J. Biol. Chem. 276: 2758-2765, 2001
 - 5) Kelley, G.G., Reks, S.E., Ondrako, J.M., Smrcka, A.V.: Phospholipase C ϵ : a novel Ras effector. EMBO. J. 20: 743-754, 2001
 - 6) Jin, T.G., Satoh, T., Liao, Y., Song, C., Gao, X., Kariya, K., Hu, C.D., Kataoka, T.: Role of the CDC25 homology domain of phospholipase C ϵ in amplification of Rap1-dependent signaling. J. Biol. Chem. 276: 30301-30307, 2001
 - 7) Weiss, S., Reynolds, B.A., Vescove, A.L., Morshead, C., Craig, C.G., van der Kooy, D.: Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? Trends Neurosci. 19: 387-393, 1996
 - 8) Shen, Q., Qian, X., Capela, A., Temple, S.: Stem cells in the embryonic cerebral cortex: their role in histogenesis and patterning. J. Neurobiol. 36: 162-174, 1998
 - 9) Boulder Committee: Embryonic vertebrate central nervous system. Anat. Rec. 166: 257-261, 1970
 - 10) Turner, D.L., Cepko, C.L.: A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. Nature.: 328:131-136, 1987
 - 11) Monti Graziadei, G.A., Graziadei, P.P.C.: Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. J. Neurocytol. 8: 197-213, 1979
 - 12) Stemple, D.L., Anderson, D.J.: Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. Cell. 71: 973-985, 1992
 - 13) Morrison, S.J., Shah, N. M., Anderson, D.J.: Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell 88: 287-298, 1997
 - 14) Rubenstein, J.L.R., Shimamura, K., Martinez, S., Puelles, L.: Regionalization of the prosencephalic neural plate. Ann. Rev. Neurosci. 21: 445-477, 1998
 - 15) Fisher, S.K., Heacock, A.M., Agranoff, B.W.: Inositol lipids and signal transduction in the nervous system: an update. J. Neurochem. 58: 18-38, 1992
 - 16) Lee, V. M.Y., Andrews, P.W.: Differentiation of NTERA-2 clonal human embryonal carcinoma cells into neurons involves the induction of all three neurofilament proteins. J. Neurosci. 6: 514-521, 1986
 - 17) Edwards, M.K.S., McBurney, M. W.: The concentration of retinoic acid determines the differentiated cell types formed by a teratocarcinoma cell line. Dev. Biol. 98: 187-191, 1983
 - 18) Ingham, P.W., Howard, K.R., Ish-Horowicz, D.: Transcription pattern of the *Drosophila* segmentation gene hairy. Nature 318: 439-445, 1985
 - 19) Décino, D., Georges-Labouesse, E., Dollé, P.: *In Situ* hybridization of nucleic acid probes to cellular RNA. In The Practical Approach Series: Gene Probes 2, Hames, B.D., Higgins, S.J. ed. IRL Press, Oxford, UK, P183-210, 1995
 - 20) Kaufman, M.H.: The Atlas of Mouse Embryonic Development, Revised ed. Academic Press, London, UK, 1995
 - 21) Pleasure, S.J., Page, C., Lee, V.M.Y.: Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. J. Neurosci. 12: 1802-1815, 1992
 - 22) Campuzano, S., Modolell, J.: Patterning of the *Drosophila* nervous system: the *achaete-scute* gene complex. Trends Genet. 8: 202-208,

- 1992
- 23) Tanaka, O., Kondo, H.: Localization of mRNAs for three novel members ($\beta 3$, $\beta 4$ and $\gamma 2$) of phospholipase C family in mature rat brain. *Neurosci. Lett.* 182: 17-20, 1994
- 24) Watanabe, M., Nakamura, M., Sato, K., Kano, M., Simon, M.I., Inoue, Y.: Patterns of expression for the mRNA corresponding to the four isoformas of phospholipase C β in mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 10: 2016-2025, 1998
- 25) Kim, D., Jun, K.S., Lee, S. B., Kang, N.G., Min, D.S., Kim, Y.H., Ryu, S.H., Suh, P.G., Shin, H.S.: Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature* 389: 290-293, 1997
- 26) Jiang, H., Lyubarsky, A., Dodd, R., Vardi, N., Puth, E.: Phospholipase C $\beta 4$ is involved in modulationg the visual response in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 14598-14601, 1996
- 27) Vaccarino, F.M., Schwartz, M.L., Raballo, R., Rhee, J., Lyn-Cook, R.: Fibroblast growth factor signaling regulates growth and morphogenesis at multiple steps during brain development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 46: 179-200, 1999
- 28) Qiu, M. S. L., Green, S.H.: PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21 ras activity and consequent prolonged ERK activity. *Neuron* 9: 705-717, 1992
- 29) Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., Marshall, C.J.: Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH3T3 cells. *Cell* 77: 841-852, 1994
- 30) Pang, L., Sawada, T., Decker, S., Saltiel, A.: Inhibition of MAP kinase kinase blocks the differentiation of PC-12 cells induced by nerve growth factor. *J. Biol. Chem.* 270: 13585-13588, 1995
- 31) York, R.D., Yao, H., Dillon, T., Ellig, C.L., Eckert, S. P., McCleskey, E.W., Stork, P.J.S.: Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392: 622-626, 1998
- 32) Peng, X., Greene, L.A., Kaplan, D.R., Stephens, R. M.: Deletion of a conserved juxtamembrane sequence in Trk abolishes NGF-promoted neuritogenesis. *Neuron* 15: 395-406, 1995
- 33) Kuo, W.L., Chung, K.C., Rosner, M.R.: Differentiation of central nervous system neuronal cells by fibroblast-derived growth factor requires at least two signaling pathways: roles for Ras and Src. *Mol. Cell. Biol.* 17: 4633-4643, 1997

Developmentally Regulated Expression of Phospholipase C ϵ in Mouse Neural Precursor Cells

Misa Masago

Division of Molecular Biology, Department of Molecular and
Cellular Biology, Kobe University Graduate School of Medicine

Phosphoinositide hydrolysis by phospholipase C (PLC) represents a major pathway of intracellular signal transduction in the central nervous system. Recently, a novel class of PLC, PLC ϵ , whose activity is regulated by association with the small GTPases Ras and Rap has been discovered. Here the expression pattern of PLC ϵ during mouse development was examined. When examined in the whole body and brain, the expression of PLC ϵ starts around embryonic day 10 (E10), persists until the early perinatal period and diminishes thereafter. *In situ* hybridization and immunohistochemistry experiments indicate that PLC ϵ is highly expressed specifically in the neuroepithelium of the neural tube on E10~E11 and in the ventricular zone and subventricular zone of the developing brain and spinal cord on E12 or later. PLC ϵ is also expressed in virtually all the regions undergoing neural proliferation and differentiation including the retina, olfactory epithelium, and various ganglia. These locations are similar to those where the neural precursor (stem) cells predominantly exist. The expression is also observed in developing muscle tissues on E15 or later. In adult mice, PLC ϵ is expressed predominantly in the heart, but very weakly in the brain.

Consistent with these findings, PLC ϵ expression is induced early after induction of neuronal differentiation of human teratocarcinoma NTERA-2 cells by retinoic acid treatment. This induction is transient, and the PLC ϵ expression is attenuated in fully differentiated NTERA-2 cells. The time course of the induction is similar to that of human *achaete-scute* homolog 1 (HASH1), which is involved in neural development. These results suggest that PLC ϵ expression may be a specific event associated with the development of the neural precursor cells.