

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06804

研究課題名(和文) 神経系におけるNMD依存的RNA分解機構の生理的意義

研究課題名(英文) Physiological role of RNA surveillance mechanism in the central nervous system

研究代表者

徳永 暁憲 (TOKUNAGA, Akinori)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・統合加齢神経科学研究部・室長

研究者番号：70549451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳神経系では多くの遺伝子がRNA修飾(スプライシング)による制御を受けており、その破綻は発生異常や神経疾患の発症要因となりうるがその分子基盤は不明である。本課題ではRNA分解に関わるUPF1遺伝子の欠損マウスを用いた解析を行い、UPF1が神経幹細胞の維持や正常な神経分化に必要な不可欠であることを示した。

更にUPF1のリン酸化制御を担うPI3K-AKTシグナルが脳機能と密接に関わることから本シグナルに異常を来す糖尿病モデル、アルツハイマー病モデルでの解析を行った結果、脳機能障害の進行に伴ってPI3K-AKTシグナルのリン酸化に変容が生じることを明らかとなり、その発症機序に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the cranial nervous system, many genes are regulated by RNA modification including splicing, and its breakdown can be a cause of developmental abnormality and neurological disorder. However, its molecular mechanism has not been elucidated. We analyzed the deficient mice of UPF1 gene which is a key component of the RNA surveillance and found that UPF1 is essential for maintenance of neural stem cells and normal nerve differentiation.

Furthermore, since the PI3K-AKT signal responsible for the phosphorylation control of UPF1 is closely related to brain function, we analyzed it using the diabetes model and Alzheimer's disease model which causes abnormality in this signal, we showed that the change in the phosphorylation of PI3K-AKT signal correlates with the progression of brain dysfunction.

研究分野：神経科学

キーワード：RNAスプライシング NMD 神経発生 インスリンシグナル アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

RNA 結合タンパク質が規定する選択的スプライシングは分化過程での多様性の獲得および成体の恒常性維持に働く重要なシステムであり、選択的スプライシングによる RNA 分解機構 NMD (Nonsense mediated mRNA decay) の役割が注目されている。脳神経系では多くの遺伝子が分化依存的にスプライシング制御を受けており、その破綻は発生異常や神経疾患の発症要因となるがスプライシングによって分化を制御する分子基盤は殆ど解明されていない。また近年、線虫において NMD 実行因子 UPF1 とその上流に位置する SMG1 が PI3K-AKT シグナルと連動して寿命調節に働くことが報告され、脳機能障害の発症要因としての関与も示唆されている。

2. 研究の目的

本研究課題では選択的スプライシングを介した RNA 分解機構の生理的意義を NMD の実行因子である UPF1 遺伝子欠損マウスを用いて解析を行いスプライシングが規定する RNA 修飾機構の持つ生理的意義を明らかとすることを目的とした。

加えて、UPF1 のリン酸化調節に関わる経路として PI3K-AKT シグナルに着目し、成体での解析系として本シグナル系に異常を示すアルツハイマー病モデルマウス (APPKI) および糖尿病モデルマウス (STZ) を対象疾患に選び、生化学的解析および行動試験を中心とする脳機能解析を併せて行った。

3. 研究の方法

選択的スプライシングを介した遺伝子発現抑制機構 (NMD) の構成因子 UPF1 の神経分化制御・恒常性維持における生理的機能の解明を目指し、以下の解析を行った。

1. UPF1 遺伝子改変マウスの作出

神経系での UPF1 の生理的役割を解明するため Cre/loxP システムによる UPF1-flox マウスを作成した。神経組織特異的 UPF1 cKO マウスの作出には中枢神経組織で Cre を発現するトランスジェニックマウス Nestin-Cre を用いた。UPF1-flox マウスを Nestin-Cre と交配して神経特異的 UPF1 欠損マウスを製作した。

2. 神経幹細胞の増殖能および分化能に NMD の破綻が及ぼす影響の解析

UPF1 cKO マウス胎生脳 (14.5 日胚) より得られる NSCs を in vitro で培養し、その増殖能を Neurosphere 法 (増殖能検定) にて、多分化能を単層培養法 (分化能検定) にて詳細に解析した。

3. 神経特異的 UPF1 欠損マウスの生理学的・形態学的解析

神経組織特異的 UPF1 cKO マウスの胎生期脳 (E13.5, E15.5, E17.5) での解析を行い、神経系の各種マーカー、増殖マーカーを指標とし

て組織切片上での解剖学的解析を行った。

4. 脳機能障害モデルを用いた成体での解析

近年 PI3K-AKT シグナルの破綻が生体恒常性の低下や脳機能障害の発症に関わることが示唆されている。そこで PI3K-AKT シグナル系に異常を示すアルツハイマー病モデルマウス (APPKI) および糖尿病モデルマウス (STZ) を対象疾患に選び、代謝パラメーター解析、生化学的解析 (インスリンシグナル構成因子の発現およびリン酸化変動)、行動試験 (T 字水迷路, Y 字迷路, 高架式十字迷路, Open field など) による脳機能解析を行った。

4. 研究成果

NMD の主要構成因子 UPF1 の生理的役割を解明するため UPF1-flox マウスを作成した。更に UPF1-flox マウスと中枢神経特異的 Cre マウス (Nestin-Cre) を交配して神経特異的 UPF1 cKO マウス (Nestin-Cre:UPF1-flox) を作成して NMD 機構が神経発生に及ぼす影響を解析した。その結果、全身性 UPF1 欠損マウスは胎生致死となり、神経特異的 UPF1 欠損マウスでは胎生 17.5 日目までの生存が確認されたが TuJ1 陽性のニューロン層が減少しており前脳領域 (大脳皮質) の低形成が確認された。また UPF1 欠損胎児脳由来の神経幹細胞 (NSCs) を用いて Neurosphere 法による増殖能検定を行った結果、KO マウス由来の細胞では著しい増殖障害が見られた。また出生後には致死となり RNA 分解機構が神経幹細胞の維持および正常な神経分化に必要な役割を持つことが示された。

UPF1 は PI3K related Kinase である SMG1 によるリン酸化制御を受けることが明らかとなっており、線虫において NMD 実行因子 UPF1 とその上流に位置する SMG1 が PI3K-AKT シグナルと連動して寿命調節に働くことが報告されている。そこで 2016 年に国立長寿医療研究センターに異動したのを機に UPF1 のリン酸化制御に関する PI3K-AKT シグナルについての解析を併せて行った。特に成体での解析系として PI3K-AKT シグナルに異常を示す糖尿病モデルマウス (STZ) およびアルツハイマー病モデルマウス (APPKI) を対象疾患に選び生化学的解析および行動試験による脳機能解析 (Open field, 高架式十字迷路, Y 字迷路, T 字型水迷路) を行った。

その結果、病態進行に伴う PI3K-AKT シグナルのリン酸化亢進とそれに呼応した認知機能の低下が両疾患モデルマウスで認められ、脳内 PI3K-AKT シグナルの変動が脳機能障害の進行と相関することが見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Tada H, Tokunaga A, Tanokashira D, Kurata E, Taguchi A.: Role of metabolic signaling in the regulation of cognitive functions. *Biomedical Gerontology* 40(2) 9-14, 2016. 査読有

2. Hijiya N, Tsukamoto Y, Nakada C, Tung NL, Kai T, Matsuura K, Shibata K, Inomata M, Uchida T, Tokunaga A, Amada K, Shirao K, Yamada Y, Mori H, Takeuchi I, Seto M, Aoki M, Takekawa M, Moriyama M.: Genomic loss of DUSP4 contributes to the progression of intraepithelial neoplasm of pancreas to invasive carcinoma. *Cancer Res.* 76:2612-2625, 2016. 査読有 DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-1846

3. Kai T, Tsukamoto Y, Hijiya N, Tokunaga A, Nakada C, Uchida T, Daa T, Iha H, Takahashi M, Nomura T, Sato F, Mimata H, Ikawa M, Seto M, Matsuura K, Moriyama M.: Kidney-specific knockout of Sav1 in the mouse promotes hyper-proliferation of renal tubular epithelium through suppression of the Hippo pathway. *J Pathol.* 239(1):97-108, 2016. 査読有 DOI:10.1002/path.4706

4. Tokunaga A, Anai H, Hanada K. Mechanisms of gene targeting in higher eukaryotes.: *Cell Mol Life Sci.* 73(3): 523-33, 2016. 査読有 DOI:10.1007/s00018-015-2073-1

5. Takahashi M, Tsukamoto Y, Kai T, Tokunaga A, Nakada C, Hijiya N, Uchida T, Daa T, Nomura T, Sato F, Mimata H, Matsuura K, Moriyama M.: Downregulation of WDR20 due to loss of 14q is involved in the malignant transformation of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 107(4):417-23, 2016. 査読有 DOI:10.1111/cas.12892

6. Kawakami E, Tokunaga A, Ozawa M, Sakamoto R, Yoshida N.: The histone demethylase Fbxl11 plays an essential role in embryonic development by repressing cell-cycle regulators. *Mechanisms of Development* 135, 31-42 2015. 査読有 DOI:10.1016/j.mod.2014.10.001

〔学会発表〕(計 15 件)

徳永暁憲、川上絵理、濱田文彦、田口明子、吉田進昭.: ヒストン脱メチル化酵素 Fbxl11 による神経分化制御機構の解析 第 11 回成体脳のニューロン新生懇談会, 2015 年 11 月 14 日, 名古屋

徳永暁憲、福岡屋航、川邊健士朗、倉田栄子、山本耕裕、田口明子: 糖尿病における認知機能障害と海馬インスリンシグナルの関連 第 30 回日本糖尿病合併症学会, 2015 年 11 月 28 日, 名古屋

Tada H, Tokunaga A, Fukuokaya W, Kurata E, Taguchi A.: Hippocampal Insulin like signaling induces impairment of cognitive function and adult neurogenesis in diabetic model mice. 第 8 回 NAGOYA グローバルリトリート, 2016 年 2 月 12 日, 大府

徳永暁憲、福岡屋航、川邊健士朗、倉田栄子、山本耕裕、田口明子: 海馬インスリン様シグナルを介した糖尿病随伴認知機能障害の発症機序の解明. 第 30 回日本糖尿病・肥満動物学会, 2016 年 3 月 11 日, 大宮

田之頭大輔、福岡屋航、川邊健士朗、徳永暁憲、多田敬典、柏田舞波、佐治多美子、倉田栄子、田口明子. アルツハイマー病発症における海馬インスリン様シグナルの関与. 第 31 回日本糖尿病合併症学会 2016 年 10 月 7-8 日, 仙台

田之頭大輔、福岡屋航、川邊健士朗、徳永暁憲、多田敬典、柏田舞波、佐治多美子、倉田栄子、田口明子. 糖尿病に伴う認知機能低下と海馬 IRS2 シグナルとの関連. 第 35 回日本認知症学会 2016 年 12 月 1-3 日, 東京

徳永暁憲、多田敬典、田之頭大輔、佐治多美子、柏田舞波、田口明子: 糖尿病随伴認知機能障害の発症過程における海馬インスリン様シグナルの変容. 第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会 2017 年 2 月 10-11 日, 横浜

多田敬典、徳永暁憲、田之頭大輔、佐治多美子、柏田舞波、田口明子: 糖尿病に伴う認知機能障害における前頭葉・海馬神経ネットワーク制御機構の解析. 第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会 2017 年 2 月 10-11 日, 横浜

田之頭大輔、徳永暁憲、多田敬典、柏田舞波、佐治多美子、田口明子: アルツハイマー病発症における海馬 IRS2 シグナルの関与. 第 31 回日本糖尿病・肥満動物学会 2017 年 2 月 10-11 日, 横浜

Tokunaga A, Tada H, Tanokashira D, Saji T, Kashiwada M, Taguchi A: Mechanisms linking between impaired hippocampal insulin-like signaling and diabetes-associated cognitive dysfunction. 第 94 回日本生理学会大会 2017 年 3 月 28-30 日, 浜松

Tada H, Tokunaga A, Tanokashira D, Kashiwada M, Saji T, Taguchi A.: Mechanisms of

cognitive impairment induced by altering the insulin like signaling in the prefrontal cortex of diabetic model mice. 第94回日本生理学会大会 2017年3月28-30日, 浜松

徳永暁憲, 多田敬典, 田之頭大輔, 佐治多美子, 柏田舞波, 斉藤貴志, 西道隆臣, 田口明子 糖尿病モデル動物を用いた認知機能障害発症機序の解析 第26回海馬と高次脳機能学会 2017年9月30日, 名古屋

Tokunaga A, Tada H, Tanokashira D, Saji T, Kashiwada M, Taguchi A. Mechanisms linking impaired hippocampal insulin signaling and diabetes-associated cognitive dysfunction. Neuroscience2017 (国際学会) 2017年11月11-15日, USA

Tada H, Tokunaga A, Tanokashira D, Kashiwada M, Saji T, Taguchi A.: Analysis of synaptic insulin signaling in the hippocampus and prefrontal cortex in diabetes-associated cognitive impairment. Neuroscience2017 (国際学会) 2017年11月11-15日, USA

徳永暁憲, 多田敬典, 田之頭大輔, 佐治多美子, 柏田舞波, 竹井喜美, 今井萌乃, 斉藤貴志, 西道隆臣, 田口明子: 糖尿病モデル動物を用いた認知機能障害発症機序の解析 第32回日本糖尿病・肥満動物学会、2018年2月23-24日, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳永 暁憲 (TOKUNAGA, Akinori)
国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・統合加齢神経科学研究部・室長
研究者番号: 70549451

(2) 研究分担者

濱田 文彦 (HAMADA, Fumihiko)
大分大学・医学部・教授
研究者番号: 70252707

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

多田 敬典 (TADA, Hirobumi)
佐治 多美子 (SAJI, Tamiko)
竹井 喜美 (TAKEI, Kimi)