

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18958

研究課題名(和文) FMR1・CPEB1相互翻訳制御機構に注目した脆弱X症候群治療標的分子の同定

研究課題名(英文) Analyses of mutual control mechanism between FMR1 and CPEB1.

研究代表者

大江 総一(OE, Souichi)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：70599331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脆弱X症候群の原因遺伝子であるFMR1と翻訳抑制因子であるCPEB1の相互翻訳制御機構の解明をおこなった。本研究から、ラット海馬ニューロンにおいてCPEBがFmr1 mRNAと共局在し3'UTR内のCPEを介して相互作用することが明らかとなった。また、CPEB1の発現抑制によりFMR1のRNA量・タンパク質量の上昇、およびミトコンドリア関連遺伝子の発現上昇が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is elucidation of the mutual translational control mechanism between FMR1, the causative gene of fragile X syndrome, and CPEB1 which acts as a translational repressor. We showed that CPEB co-localized with Fmr1 mRNA in the rat hippocampal neurons and interacted via CPE in the 3'UTR. Furthermore, knockdown of CPEB1 increased the expression levels of FMR1 and the mitochondria-related genes.

研究分野：神経科学

キーワード：FMR1 CPEB1 脆弱X症候群 翻訳制御

1. 研究開始当初の背景

脆弱 X 症候群は、知能の障害や行動の異常をとともなう遺伝性疾患であり、本邦では指定難病に定められているが有効な治療法は未だ存在しない。X 染色体長腕末端に存在する FMR1 (fragile X mental retardation 1) 遺伝子の発現不全に起因する疾患であり、FMR1 遺伝子のプロモーター領域において CGG 繰り返し配列が 200 回を超え過剰に伸長すると、C (シトシン) のメチル化亢進により転写が抑制され FMR1 発現量の低下を引き起こす事が知られている。

FMR1 遺伝子がコードする FMRP (fragile X mental retardation protein) は翻訳抑制因子として機能する RNA 結合タンパク質であり、そのノックアウトマウスが脆弱 X 症候群の動物モデルとして広く用いられている。そのノックアウトマウスは脆弱 X 症候群と類似した行動異常、ニューロンにおけるスパイン形態異常を示す事が報告されている。

2013 年に Richter J.D.らが、FMR1 ノックアウトマウスにおいて観察された行動異常・細胞形態異常が FMR1/CPEB1 ダブルノックアウトマウスで改善されることを報告した。CPEB1 (cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1) は FMRP 同様、翻訳抑制因子として機能する RNA 結合タンパク質であることから、細胞内翻訳バランスと標的 RNA 動態が注目を集めていたが、その詳細は不明であった。これまでにわれわれは、ニューロン樹状突起での CPEB1 による RNA 局在化機構とその後の局所翻訳機構について研究をおこなってきたが、FMRP・CPEB1 間の相互翻訳抑制機構を明らかにすることで脆弱 X 症候群の病態解明と新規治療標的の同定が可能であると考え本研究を計画・遂行した。

2. 研究の目的

本研究では、上記背景のもと FMR1・CPEB1 の相互翻訳制御機構を解明するとともに CPEB1 の標的 RNA 群を対象とした脆弱 X 症候群の新規治療標的を探索した。主に以下の 2 つの点について研究を進めた。

(1) FMR1・CPEB1 の相互翻訳制御機構の解明

FMR1、CPEB1 とともに互いの mRNA に相互作用する可能性があるためその制御機構の解明を目的とし、ラット海馬初代培養ニューロンおよび培養株化細胞を用いて、細胞内局在の観察、免疫沈降 RT-PCR、siRNA による発現抑制実験、定量 PCR とウェスタンブロットングによる発現解析等を行った。

(2) FMR1、CPEB1 発現抑制時の発現変化遺伝子群の網羅的解析と治療標的の探索

FMR1/CPEB1 ダブルノックアウトマウスにおける脆弱 X 症候群病態改善の分子メカニズム解明のため、マウス神経芽細胞腫由来

細胞株 Neuro2a 細胞を用い、siRNA による発現抑制実験、マイクロアレイ解析、Gene Ontology (GO)解析、定量 PCR とウェスタンブロットングによる発現解析等を行った。

3. 研究の方法

(1) Fmr1 mRNA と CPEB1 の細胞内局在を明らかにするために、ラット初代培養ニューロンおよび HeLa 細胞において MS2 システムによる RNA 可視化実験をおこなった。GFP-MS2-NLS、MS2rm-Fmr1 3'UTR、CPEB1-mCherry を遺伝子導入し、24 時間後に共焦点レーザー顕微鏡での画像取得を行った。ラインプロファイルによる蛍光強度の測定により細胞内局在を検討した。また、同様の実験系を用いて、Fmr1 mRNA 3'UTR 内に 4ヶ所存在する CPE に変異を施した場合での CPEB1 との共局在率の変化を解析した。

Fmr1 mRNA と CPEB1 の相互作用を検討するため、ラット脳可溶性画分に対し、抗 CPEB1 抗体、抗 FMRP 抗体、抗 GAPDH 抗体、IgG を用いて免疫沈降をおこなった。沈降産物において RNA 抽出、cDNA 合成、RT-PCR をおこなうことで Fmr1 mRNA と CPEB1、FMRP、GAPDH における相互作用を検討した。

(2) Neuro2a 細胞において siRNA を用い、CPEB1 ノックダウン群、FMR1 ノックダウン群、CPEB1/FMR1 ダブルノックダウン群の RNA を抽出し、マイクロアレイ解析により各群での遺伝子発現変化を対照群を含め比較検討した。さらに GO 解析により各群での発現量に差がある遺伝子群の推測をおこなった。さらに、定量 PCR およびウェスタンブロットングによりマイクロアレイで得られた遺伝子発現変化の検定をおこなった。

4. 研究成果

(1) HeLa 細胞において GFP-MS2-NLS、MS2rm-Fmr1 3'UTR、CPEB1-mCherry を遺伝子導入し、Fmr1 mRNA と CPEB1 の細胞内局在を観察した。その結果、Fmr1 mRNA、CPEB1 とともに細胞質での顆粒状の局在を呈することが観察された。さらに同一顆粒における両者の共局在が観察され、ラインプロファイル上でも確認された。対照として GFP-MS2-NLS、MS2rm、CPEB1-mCherry を遺伝子導入した場合には、細胞質における RNA の局在はほとんど確認できず、CPEB1 との共局在も観察されなかった。HeLa 細胞への熱ショック処理により CPEB1 顆粒が増大したが、この顆粒においても Fmr1 mRNA が共局在していた。また、GFP-MS2-NLS、MS2rm-Fmr1 3'UTR、FMRP-mCherry を遺伝子導入し、Fmr1 mRNA と FMRP の細胞内局在を観察した結果、過去に報告されている通り、細胞質で顆粒状に局在し同一顆粒上での共局在が確認された。HeLa 細胞への熱ショック処理を施した場合でも両者の共局在が観

察された。

同様の実験をラット海馬初代培養ニューロンを用いておこなった結果、樹状突起において Fmr1 mRNA、CPEB1、FMRP が顆粒状に局在し、Fmr1 mRNA/CPEB1、Fmr1 mRNA/FMRP FMRP の共局在がそれぞれ確認された。

ラットの脳可溶性画分を用いた免疫沈降 RT-PCR により、Fmr1 mRNA と CPEB1 の分子間相互作用を解析した。対照 IgG や抗 GAPDH 抗体を用いて免疫沈降した場合には、その沈降産物中に Fmr1 mRNA は検出されなかったが、CPEB1、FMRP に対する抗体を用いた場合には Fmr1 mRNA が検出された。

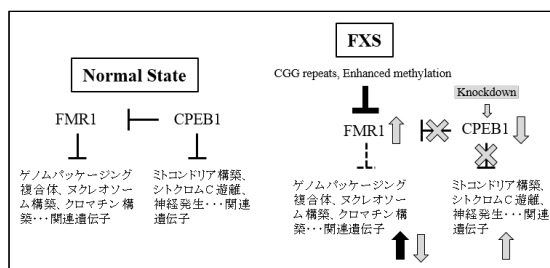
FMR1 mRNA の 3'UTR 内には 4ヶ所の CPE が存在するため、CPEB1 がこれらの CPE を認識し相互作用すると推測した。この検証のために、各 CPE に変異を施した発現ベクターおよび 4 つすべてに変異を施した発現ベクターを作製し、MS2 システムを用いて、CPEB1 顆粒上での Fmr1 mRNA の共局在率の変化を解析した。その結果、最も 3'端に存在する CPE に変異を施した場合、および、すべての CPE に変異を施した場合に、CPEB1 との共局在率が低下した。また、ラット海馬初代培養ニューロンを用いて同様の検証を行った結果、樹状突起における Fmr1 mRNA/CPEB1 共局在率が低下した。

(2) Neuro2a 細胞において siRNA を用いた CPEB1 ノックダウンをおこない、定量 PCR とウェスタンブロッティングにより遺伝子発現を解析した。その結果、対照に比較して CPEB1 の RNA 量・タンパク質量は有意に減少し、FMR1 の RNA 量・タンパク質量は有意に増加した。

Neuro2a 細胞において siRNA を用いた CPEB1、FMR1、CPEB1/FMR1、のノックダウンをおこない、対照群を含めた 4 群において、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現変化解析をおこなった。脆弱 X 症候群モデルである FMR1 ノックダウン群と、CPEB1/FMR1 ダブルノックダウン群を比較した結果、440 遺伝子が発現上昇を示し、606 遺伝子が発現低下を示した。この 2 群間で発現上昇を示した 440 遺伝子を対象に GO 解析をおこなった結果、複数のミトコンドリア関連遺伝子が CPEB1/FMR1 ダブルノックダウン群において発現上昇していることが示唆された。実際の発現量を定量 PCR を用いて検定した結果、Abat、Tmtc1、Pcx、Mgst1、Caprin2、Letm2、Galc、Pla2g6、Mtus1、Fancg、Mtf2 等のミトコンドリア関連遺伝子群の発現上昇が確認された。

上記の研究結果から、CPEB1 は Fmr1 mRNA 3'UTR に相互作用し直接的にその発現を抑制すること、CPEB1 の発現を抑制することで FMR1 の RNA 量・タンパク質量を増加させる事ができることが明らかとなった。

さらに CPEB1 発現抑制によりミトコンドリア関連遺伝子の発現上昇が誘導されることからミトコンドリア機能への影響が示唆された。その検証には酸素消費速度 (OCR) 測定、ミトコンドリア形態の可視化等の直接的な解析が必要であるが、近年、脆弱 X 症候群の Drosophila モデルにおいてミトコンドリア機能が低下することが報告されていることから、ミトコンドリア機能向上による脆弱 X 症候群病態改善が有用な治療戦略になり得ると考えられる。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

Iwata R, Maruyama M, Ito T, Nakano Y, Kanemura Y, Koike T, Oe S, Yoshimura K, Nonaka M, Nomura S, Sugimoto T, Yamada H, Asai A. Establishment of a tumor sphere cell line from a metastatic brain neuroendocrine tumor. *Medical Molecular Morphology*, 50, 211-219, 2017 (査読有) doi:10.1007/s00795-017-0160-0.

Takizawa N, Tanaka S, Oe S, Koike T, Matsuda T, Yamada H. Hypothalamo-hypophysial system in rats with autotransplantation of the adrenal cortex. *Molecular Medicine Reports*, 15, 3215-3221, 2017 (査読有) doi:10.3892/mmr.2017.6375.

Tanaka S, Takizawa N, Honda Y, Koike T, Oe S, Toyoda H, Kodama T, Yamada H. Hypocretin/orexin loss changes the hypothalamic immune response. *Brain, Behavior, and Immunity* 57, 58-67, 2016 (査読有) doi: 10.1016/j.bbi.2016.06.009.

Oe S, Miki H, Nishimura W, Noda Y. Mechanism of the Dendritic Translation and Localization of Brain-derived Neurotrophic Factor. *Cell Structure and Function* 41, 23-31, 2016 (査読有) doi: 10.1247/csf.15015.

[学会発表](計 7件)

大江 総一、田中 進、平原 幸恵、小

池 太郎、高森 康晴、山田 久夫、翻訳抑制因子 CPEB1 は 3'非翻訳領域を介して Auf1 による RNA 安定性制御と自己翻訳抑制をうける、第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2018 . 3.30、日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学（東京都武蔵野市）

Oe S、Yamada H、CPEB1 interacts with FMR1 mRNA and regulates its expression levels through 3' untranslated region. 第 40 回日本神経科学大会、2017.7.22、幕張メッセ（千葉県千葉市）

大江 総一、山田 久夫、CPEB1 は 3' UTR を介して Fmr1 の RNA・タンパク質発現を抑制する、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017 . 3.28、長崎大学坂本キャンパス（長崎県長崎市）

Oe S、Yamada Y、CPEB1 represses FMR1 mRNA and protein expression through 3' untranslated region. 第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2016.9.3、杏林大学井の頭キャンパス（東京都三鷹市）

OeS、Noda Y、Yamada H、Cytoplasmic polyadenylation elements and AU-rich elements synergistically regulate CPEB1 mRNA and protein expression during differentiation. 第 39 回日本神経科学大会、2016 . 7.21、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

大江 総一、山田 久夫、CPEB1 は 3' UTR を介して自身の mRNA 樹状突起局在化と局所翻訳を制御する、第 91 回日本解剖学会近畿支部学術集会、2015.11.28、京都工芸繊維大学（京都府京都市）

大江 総一、山田久夫、三木 玄方、西村 渉、野田 泰子、中枢ニューロンにおける CPEB1 mRNA の樹状突起局在化と翻訳制御、第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2015.10.3、関西医科大学枚方キャンパス（大阪府枚方市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www3.kmu.ac.jp/anat1/>

6 . 研究組織
(1)研究代表者
大江 総一（OE, Souichi）
関西医科大学・医学部・助教
研究者番号：70599331