

令和元年6月25日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07061

研究課題名(和文)脆弱X精神遅滞蛋白質による神経回路形成の制御 - ユビキチン化及び局所翻訳との関連

研究課題名(英文) Regulation of neural circuit by Fragile X Mental Retardation Protein - its relation to ubiquitination and local translation

研究代表者

佐々木 幸生 (Yukio, Sasaki)

横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授

研究者番号：10295511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経回路形成時の軸索ガイダンス、シナプス形成における脆弱X精神遅滞蛋白質(FMRP)の役割をユビキチン化・局所翻訳との関連で検討した。FMRPは軸索ガイダンス分子Sema3A刺激後、成長円錐内でユビキチン-プロテアソーム系により分解され、その結果、局所翻訳が惹起されて成長円錐の形態変化が生じることを明らかにした。また、FMRPのユビキチン化関連遺伝子を同定し、同遺伝子産物がFMRPを顆粒状に集積させた後、消失させることを発見した。FMRP含有顆粒はシナプス形成時にも観察された。従って、FMRPのユビキチン化はFMRPの顆粒形成や局所翻訳の調節を介して神経回路形成に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脆弱X症候群(FXS)は遺伝性の発達障害としては最も頻度の高い疾患であり、知的障害、自閉症等の症状を示す。FXSの原因遺伝子産物であるFMRPは神経細胞において軸索、樹状突起における局所翻訳を制御し神経回路形成において重要な役割を担っているが、そのメカニズムは不明であった。我々が今回明らかにしたメカニズムは神経回路の発達にFMRPのユビキチン化が関与することを示唆する結果である。FXSに対する創薬は自閉症全般に適用できると考えられ、多くの製薬会社が参入しているが、まだ有効な薬剤は開発されていない。本研究の親展によりFXSの病態の一端が明らかになり、治療法の開発や創薬に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The role of fragile X mental retardation protein (FMRP) in axon guidance and synapse formation during neural circuit formation was examined in relation to ubiquitination and local translation. Our results suggest that after stimulation with the axon guidance molecule Sema3A, FMRP was degraded in growth cones by the ubiquitin-proteasome system, followed by that local translation was triggered to induce a morphological change of growth cones. We also identified the ubiquitination related gene for FMRP, and found that the gene product induced disappearance of FMRP after granular accumulation of FMRP. FMRP-containing granules were also observed during synapse formation. Therefore, our findings suggested that ubiquitination of FMRP is involved in neural circuit formation through regulation of granule formation and local translation of FMRP.

研究分野：神経生物学

キーワード：横浜市 神経生物学 脆弱X症候群 ユビキチン セマフォリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脆弱 X 症候群 (Fragile X syndrome: FXS) は遺伝性の精神発達障害としては最も頻度の高い疾患であり (頻度: 1/1,500 - 2,500) X 染色体上の *FMR1* 遺伝子の変異によって生じ、知的障害、自閉症等の症状を示す [1]。 *FMR1* 遺伝子産物である FMRP (Fragile X mental retardation protein) は FXS 患者で発現が低下する蛋白質であり、特定の mRNA に結合して翻訳抑制を行い、神経軸索及び樹状突起において外部刺激に応じて局所的に翻訳抑制を解除して翻訳を開始する。 FXS の動物モデルである *Fmr1* ノックアウト (KO) マウスでは海馬の長期抑圧などの神経可塑性に異常が認められる [1,2]。従って、主に樹状突起スパインにおける神経可塑性に關与する蛋白質の翻訳異常が FXS の原因であると考えられてきた [2]。一方、 *Fmr1*-KO マウスにおいては軸索ガイダンスの異常等、神経回路形成に關連する表現型も報告されている [2]。しかし、発達障害である FXS において、発達時の神経回路形成と FMRP による局所翻訳の制御機構との關連は不明である。

我々は軸索ガイダンス分子の一つであるセマフォリン 3A (Sema3A) の情報伝達と神経回路形成における役割について研究を行ってきた [3]。さらに、Sema3A による神経軸索の成長円錐の形態変化 (退縮応答) が局所翻訳により制御されることを示した [4]。また、我々は近年、成長円錐における mRNA 結合蛋白質 (α -アクチン mRNA 結合蛋白質 ZBP1) を介した局所翻訳が軸索ガイダンスにおいて重要な役割を果たすことを明らかにしてきた [5, 6]。これらの我々の一連の研究から、「 mRNA 結合蛋白質の一つである FMRP も軸索ガイダンス等の神経回路形成に重要な役割を果たす」と我々は考えている。それを検証するために、まず我々は、 *Fmr1*-KO マウス海馬神経細胞を用いて Sema3A 刺激による成長円錐の退縮応答に FMRP が關与し、微小管關連タンパク質 MAP1B (microtubule-associated protein 1B) の局所翻訳が上昇することを明らかにした [7]。さらに、予備的検討として、Sema3A 刺激後に成長円錐内で FMRP が減少することを見いだした。 FMRP はユビキチン化されることが報告されているので、Sema3A 刺激によりユビキチン化され分解される可能性がある。

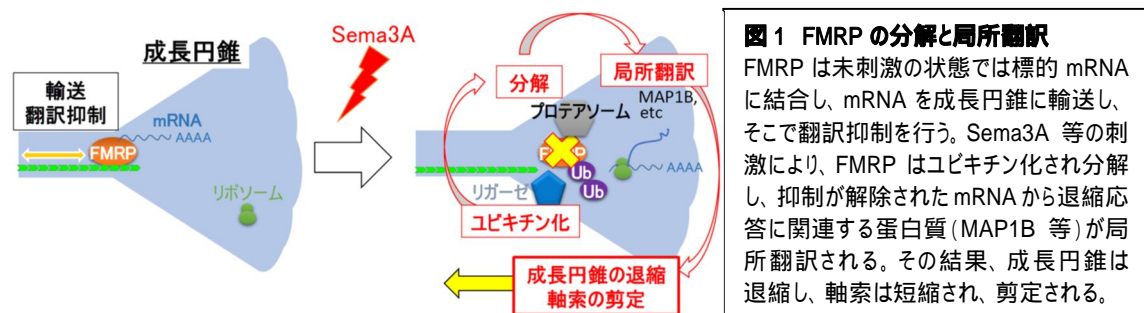
本研究ではこれらの検討で明らかにした Sema3A 刺激による FMRP の分解の可能性に着目し、「 FMRP の分解による局所翻訳調節が軸索ガイダンス等の神経回路形成に重要な役割を果たす」との仮説 (図 1) を提起し、その検証を行う。すでに、以下の予備的な結果と示唆を得ている。

(1) Sema3A は成長円錐内の FMRP の減少を誘導し、この減少はユビキチン E1 酵素阻害剤で抑制される。

(2) FMRP の分解に關与するユビキチン E3 酵素 (リガーゼ) のスクリーニング。

(3) セマフォリンと FMRP は海馬歯状回の回路形成に關与する: セマフォリン受容体遺伝子変異体 (*PlxnA3*-KO) が示す神経回路形成の表現型として海馬歯状回錐体細胞の軸索側枝である錐体下束の剪定の低下が知られているが [8]、 *Fmr1*-KO でも同様に剪定が低下する表現型が見られる。

以上から、次のようなモデルを考えている。即ち、セマフォリン刺激により成長円錐の FMRP がユビキチン化により分解され、それにより mRNA の結合が解除され、MAP1B 等の退縮応答に關与する蛋白質が局所翻訳される。その結果、成長円錐は退縮し、軸索は短縮され、剪定される (図 1)。本研究計画ではこれについてさらに検証することにより、FMRP の神経回路形成における役割を明らかにし、脆弱 X 症候群の病態の一端を解明していく。



2. 研究の目的

本研究の目的は、「 FMRP の分解による局所翻訳調節が軸索ガイダンス、軸索の剪定等の神経回路形成に重要な役割を果たす」との作業仮説を検証することである (図 1)。そのために

(1) ユビキチン化による FMRP 分解制御機構の解明

(2) FMRP の分解による翻訳調節機構の解明

(3) FMRP 分解の軸索ガイダンス、剪定における役割の解明

を行う。以上より、FMRP の分解を制御する分子機構の解明と局所翻訳及び神経回路形成における役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) マウス海馬神経細胞の培養と免疫染色

マウス海馬神経細胞を用いてニューロンボールを作成し、培養ディッシュに静置後、2 日目に

Sema3A を投与する。各時間で固定後、抗 FMRP 抗体、MAP1B 抗体等を用い、蛍光免疫染色を行い、FMRP、MAP1B の成長円錐内の局在を定量する。成長円錐におけるユビキチン化を検討するために、抗ユビキチン化蛋白質抗体 (FK2) で免疫蛍光染色を行い、ユビキチン化の程度を解析する。さらに、Sema3A による局所翻訳にユビキチン化が関与するか検討する。

(2) ユビキチン化酵素のスクリーニング

FMRP のユビキチン化酵素の同定に関しては、我々は当大学院医学研究科微生物学の梁明秀教授から御供与いただいたユビキチンリガーゼの cDNA ライブラリー (300 種以上) を用いて、リガーゼのスクリーニングを行った。HEK293 細胞に flag-FMRP とユビキチンリガーゼを遺伝子導入し、ウエスタンブロッティングにより FMRP 量を比較し、タンパク量が減少したものを候補とする。

(3) 海馬歯状回への電気穿孔法による遺伝子導入

連携研究者の伊東の協力の下、海馬歯状回への電気穿孔法を行い [9]、軸索剪定が *Fmr1*-K0 で異なるか確認する。生後 0 日 (P0) の野生型及び *Fmr1*-K0 マウスの海馬歯状回に GFP 遺伝子を当大学動物実験施設に設置の電気穿孔装置 (NEPA-21、ネッパージーン社) を用いて導入する。4 - 6 週間後に海馬切片を作成し、GFP 抗体で海馬歯状回顆粒細胞の軸索の側枝である錐体下束の短縮を観察し、軸索剪定を定量化する。

4. 研究成果

(1) Sema3A による FMRP の制御にユビキチン - プロテアソーム系が関与する

FMRP の神経ガイダンスにおける役割を解明する目的で、Sema3A に対する応答を検討した。その結果、Sema3A は成長円錐内の FMRP 量を 10 分以内に減少させた。ユビキチン E1 酵素阻害剤 PYR-41 及びプロテアソーム阻害剤は Sema3A による FMRP の減少を阻害した (図 2)。さらに、Sema3A 刺激で成長円錐内にユビキチン化が惹起することから、Sema3A により成長円錐内で FMRP がユビキチン化され分解されることが示唆された。上記のユビキチン - プロテアソーム系阻害剤は Sema3A が惹起する MAP1B の局所翻訳を阻害し、成長円錐の形態変化を抑制した。従って、図 1 のモデルのように、Sema3A 刺激により成長円錐の FMRP がユビキチン化により分解され、それにより mRNA の結合が解除され、MAP1B 等の退縮応答に関与する蛋白質が局所翻訳される。その結果、成長円錐は退縮することが示唆された。次に、我々は、FMRP が軸索剪定に関与するかを確認するために、電気穿孔法による GFP の導入を海馬歯状回顆粒細胞に行った。その結果、GFP は顆粒細胞に導入できたものの、発現効率は錐体下束の短縮を定量するには十分な発現効率ではなかった。今後、遺伝子導入法を改良し、再度検討する予定である。

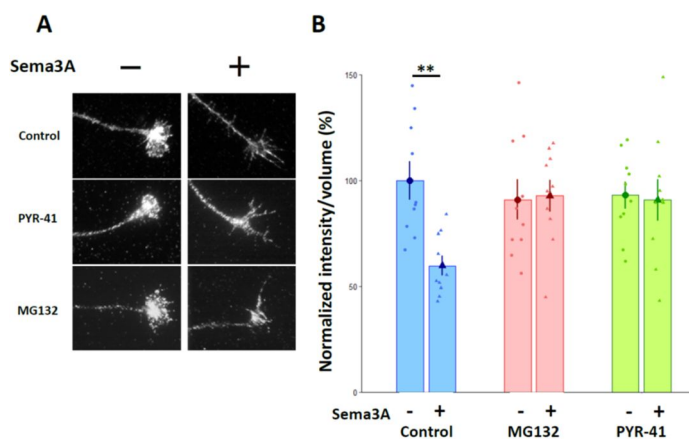


図 2 Sema3A による FMRP の減少はユビキチン - プロテアソーム系を介する

(A) 成長円錐内の FMRP は Sema3A 刺激により減少する。この減少はプロテアソーム阻害剤 MG132 及びユビキチン E1 酵素阻害剤 PYR-41 で抑制される。(B) (A) を定量したグラフ。** $p < 0.01$

(2) FMRP のユビキチン化に関与する遺伝子と FMRP を含む顆粒の形成

FMRP をユビキチン化するタンパク質を同定するために、ユビキチン化関連遺伝子の cDNA ライブラリーから FMRP の分解を誘導するクローンをスクリーニングし、1 クローンに絞り込むことに成功した。この遺伝子産物はオートファジーに関連するタンパク質でもあり、培養細胞に発現させると内在性の FMRP を顆粒状に集積させ、その後、消失させることが明らかになった。FMRP のような RNA 結合タンパク質は細胞ストレスによりストレス顆粒を形成し、その後、ユビキチン化され、オートファジーにより分解されると考えられている。そこで、細胞内ストレスにより FMRP がストレス顆粒を形成するかを検討したところ、ストレス顆粒マーカーである GAP SH3 Domain-Binding Protein (G3BP) と共同在することが明らかとなった。得られたクローンがどのようにしてユビキチン化、粒子形成を行うかに関しては今後さらに検討していく予定である。

(3) 神経細胞における FMRP 含有顆粒の形成

神経細胞において FMRP が顆粒状に集積するかを検討するために、まず、ストレス顆粒に FMRP が局在するかを解析した。その結果、大脳皮質神経細胞初代培養系において、酸化ストレス負荷の状態では FMRP はストレス顆粒マーカーである G3BP と細胞体だけでなく神経突起においても共同在することを見いだした。FMRP が中枢神経細胞で G3BP を含むストレス顆粒を形成することは報告されておらず、ストレス顆粒 ユビキチン化 オートファジーという系路を辿るか解析を行

う予定である。さらに、我々が開発した人工プレシナプス誘導系において、プレシナプス形成に伴ってFMRPがプレシナプス内で顆粒状に凝集することが明らかになった(図3、[10])。我々は既にプレシナプスにおいてFMRPが特定のタンパク質の局所翻訳に関与することを見いだしており[10]、今後、このFMRPの顆粒形成とユビキチン化、局所翻訳の関連を解明していく予定である。

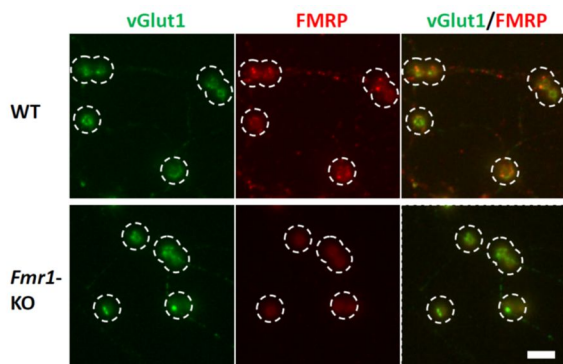


図 3 FMRP はプレシナプス形成時に顆粒を形成する

人工的にプレシナプスを形成させる系を用い、FMRPの局在を観察した。FMRPはシナプス小胞マーカーのvGlut1と共にプレシナプスに集積した。Fmr1-KOでもvGlut1の集積は確認できた。引用文献[10]より。

<引用文献>

Bhakar et al, *Annu Rev Neurosci* 35: 417 (2012). Darnell & Klann, *Nat Neurosci* 16: 1530 (2013). Sasaki et al, *Neuron* 35: 907 (2002). Li et al, *J Neurosci* 24: 6161 (2004). Yao et al, *Nat. Neurosci* 9: 1265 (2006). Sasaki et al, *J Neurosci* 30: 9349 (2010). Li et al, *Front. Neural Circuits* 3: 11 (2009). Bagri et al, *Cell* 113: 285 (2003). Ito et al, *Hippocampus* 24: 1449 (2014). Parvin et al, *Neurosci Res* in press.

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 2件)

Regulation of dendritic development by Semaphorin 3A through novel intracellular remote signaling. Goshima Y, Yamashita N, Nakamura F, Sasaki Y. *Cell Adh Migr.* 10: 627-640 (2016). DOI: 10.1080/19336918.2016.1210758 (査読有)

Fragile X mental retardation protein regulates accumulation of the active zone protein Munc18-1 in presynapses via local translation in axons during synaptogenesis. Parvin S, Takeda R, Sugiura Y, Neyazaki M, Nogi T, Sasaki Y. *Neurosci Res.* in press. doi: 10.1016/j.neures.2018.09.013. (査読有)

[学会発表](計 7件)

マイクロRNA382のエクソソームを介した分泌機構と標的遺伝子の解析 木村貴洋、田中智美、佐々木幸生 第137回日本薬理学会関東部会、日本医科大学(東京都文京区) 2017年10月28日(土)

脆弱X精神遅滞タンパク質によるシナプス前終末の形成と機能の制御 佐々木幸生、Shumaia Parvin、武田怜之雅 第39回神経組織培養研究会、サンプラザシーズンズ(愛知県名古屋市) 2017年10月7日(土)

Fragile X mental retardation protein regulates accumulation of the active zone protein Munc18 in presynapses via local translation. Shumaia Parvin, Renoma Takeda, Shino Endo, Yu Sugiura, and Yukio Sasaki 第40回神経科学学会、幕張メッセ(千葉県千葉市) 2017年7月20日(木)

人工誘導プレシナプスを用いた神経活動計測系の開発 武田怜之雅、Shumaia Parvin、佐々木幸生 第136回日本薬理学会関東部会、東京医科歯科大学(東京都文京区) 2017年7月8日(土)(第136回日本薬理学会関東部会優秀賞【口頭発表(大学院生部門)】受賞)

脆弱X精神遅滞タンパク質に対するユビキチンリガーゼの同定の試み 高畠 将、高橋 徹、梁 明秀、五嶋 良郎、佐々木 幸生 第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016年12月2日(金)

脆弱X精神遅滞タンパク質の分解と神経回路形成 佐々木 幸生、高畠 将 第38回神経組織培養研究会、横浜ランドマークタワー(神奈川県横浜市) 2016年11月26日(土)

大脳皮質神経細胞培養系において脱分極刺激により特定のマイクロRNAがエクソソーム中に増加する 田中 智美、高橋 徹、佐々木 幸生 第134回日本薬理学会関東部会、国際医療福祉大学(栃木県大田原市) 2016年7月9日(土)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：伊東 秀記

ローマ字氏名：Hidenori Ito

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。