

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20902

研究課題名(和文) 大脳皮質の進化過程で獲得した神経幹細胞内mRNA輸送機構の解明

研究課題名(英文) Development of mRNA transportation mechanisms in neural stem/progenitor cells during evolution

研究代表者

吉川 貴子(Kikkawa, Takako)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90727851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質の神経幹細胞として働く放射状グリア(radial glia; RG)細胞の形態および分化機構の複雑化が、哺乳類の大脳皮質進化につながったと考えられる。哺乳類RG細胞の長い突起構造内を長距離輸送される分子として細胞周期因子Cyclin D2を同定し、哺乳類においてのみ保存されるCyclin D2 mRNA輸送に必要な配列に着目した。このmRNA輸送配列をゲノム編集技術CRISPR/Cas9法により欠損させたマウスを作製したところ、RG細胞の基底膜突起先端部においてRNA輸送が阻害されていた。この結果から、哺乳類で獲得した本配列がRG細胞内でのmRNA輸送を担うことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：During cortical development in mammals, neural stem/progenitor cells need to adequately proliferate and differentiate. Neural progenitor cells during corticogenesis are called radial glial (RG) cells because they show highly polarized morphology with long and thin processes. We have previously shown that mRNA of Cyclin D2 encoding a cell cycle regulator is transported to the basal end-foot of RG cells by the specific mRNA transportation element. We applied a CRISPR/Cas9 genome editing system in mouse embryos and selectively removed the element. We found that the mutant mice show inhibition of Cyclin D2 mRNA transportation to the basal end-foot of RG cells. These results suggest involvement of the mammalian specific cis-regulatory sequence of Cyclin D2 mRNA in the mRNA transportation to the basal end-foot of RG cells.

研究分野：神経発生学

キーワード：大脳皮質 放射状グリア細胞 Cyclin D2 mRNA輸送 進化

1. 研究開始当初の背景

脳、特に哺乳類の大脳皮質は進化の過程でもっとも拡大・複雑化し、高次機能獲得に繋がったと考えられている。哺乳類は羊膜類に属し、爬虫類の一群から進化したとされているが、それぞれの種がどのように特異的な脳構造を獲得したかは未だ多くの謎が残されている。

大脳皮質の形成過程では、放射状グリア (radial glia; RG) 細胞と呼ばれる神経幹細胞が増殖・分化し、多様な神経細胞が産生される。哺乳類の RG 細胞は脳表面 (基底膜側) まで非常に長い放射状の突起を伸ばし、分化した神経細胞はこの基底膜側突起に沿って移動することにより、規則正しい層構造が作られる。一方、湾曲した短い基底膜側突起を有する RG 細胞を持つ爬虫類や鳥類では、神経細胞の移動方向は不規則であり、哺乳類のような層構造を持たない。さらに哺乳類では中間増殖細胞が存在し、爆発的な神経細胞の増加に貢献する。このように、RG 細胞形態および神経細胞分化様式の大幅な変化により、種間の大脳皮質構築の差異が生まれた可能性が考えられる。

哺乳類で特に発達した RG 細胞基底膜側突起の先端部には特異的なタンパク質が局在している。これまでに我々は細胞周期調節因子 *Cyclin D2* の mRNA およびタンパク質が、哺乳類 (マウスおよびヒト) RG 細胞の基底膜側突起に集積することを発見し、RG 細胞が非対称分裂する際、基底膜側突起に局在した *Cyclin D2* タンパク質を受け継いだ娘細胞は未分化性を保ち、受け継がなかった娘細胞は神経細胞へ分化することから、*Cyclin D2* タンパク質の基底膜側突起への集積が神経分化に重要な役割を担っている可能性を指摘した (Tsunekawa et al., EMBO, 2012)。

このような特異的な集積を引き起こすためには、核で転写された mRNA が突起の中を基底膜側まで長距離輸送される必要がある。我々はすでに実験発生的アプローチにより *Cyclin D2* mRNA の輸送に必要な 3'UTR 領域に存在する約 50 bp の認識配列を同定した (Tsunekawa et al., EMBO J, 2012)。さらに興味深いことに、この *Cyclin D2* mRNA 輸

送配列は哺乳類間で非常によく保存された配列であるが、爬虫類や鳥類には存在しない。

これらの結果から、進化過程における RG 細胞形態の変化とともに、RG 細胞内の mRNA 輸送機構の有無が大脳皮質構築に影響を与えた可能性がある。

2. 研究の目的

Cyclin D2 mRNA 輸送に必要な配列は哺乳類においてのみ保存されているため、この RG 細胞内のユニークな分子機構の獲得が種間の大脳皮質構築の差異を生み出す可能性が示唆される。本研究は、生物種による大脳皮質構築の違いが RG 細胞形態の進化に伴う *Cyclin D2* mRNA 輸送システムの有無によって作出されているかどうかを検証することを目的としている。

3. 研究の方法

これまでに、RG 細胞での *Cyclin D2* の過剰発現ならびにノックダウン実験により、*Cyclin D2* が RG 細胞を未分化状態に維持することを示したが (Tsunekawa et al., EMBO, 2012)、*Cyclin D2* mRNA 輸送自体が RG 細胞分化にどのような意義を持つのかは未知である。そこで、本研究では、CRISPR/Cas9 法により *Cyclin D2* mRNA の輸送配列特異的に欠損させるマウスを作製した。具体的には、

- (1) *Cyclin D2* mRNA 輸送配列の様々な部位に sgRNA を設計して、数塩基単位で輸送配列を欠損させた系統 (系統 1、系統 2) と、
- (2) *Cyclin D2* mRNA 輸送配列の両端に sgRNA を設計し、*Cyclin D2* mRNA 輸送配列全体を欠損させた系統 (系統 3) を作製した。

まずは予備的知見を得るために、これらの系統の F0 世代を用いて、*Cyclin D2* mRNA の局在を *in situ* hybridization 法により観察し、*Cyclin D2* mRNA 輸送に影響が認められる系統をスクリーニングした。

F0 世代では一般的にモザイク率が高いことから、野生型マウスと交配を行い、目的の変異のみを持つ次世代を得た。また、CRISPR/Cas9 システムによるオフターゲット効果を確かめるために、CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu/about>) を用いて予想さ

れる上位のオフターゲット配列についてシーケンス解析を行なった。

F1 世代以降の *Cyclin D2* mRNA 輸送配列欠失マウスを用いて、*Cyclin D2* mRNA およびタンパク質の局在を *in situ hybridization* 法と免疫染色法により観察した。また、*Cyclin D2* mRNA 輸送配列欠失マウスの RG 細胞の基底膜側突起に異常が無いかどうかを確認するために、RG 細胞の基底膜側突起に集積が認められる RNA 結合タンパク質である FMRP (脆弱性 X 症候群原因タンパク質) の局在を観察した。

4. 研究成果

Cyclin D2 mRNA 輸送配列欠失マウス F0 世代を用いて、*Cyclin D2* mRNA の局在を *in situ hybridization* 法により観察し、*Cyclin D2* mRNA 輸送に影響が認められる系統をスクリーニングした。その結果、数塩基単位で輸送配列の一部を欠損させた系統 (系統 1、系統 2) においては、*Cyclin D2* mRNA が基底膜側で正常な集積を示すのに対し、*Cyclin D2* mRNA 輸送配列全体を欠損させた系統 (系統 3) では基底膜側における発現が消失していた (図 1)。この結果から、*Cyclin D2* mRNA 輸送配列全長が RG 細胞内での *Cyclin D2* mRNA 輸送に重要である可能性が示唆される。

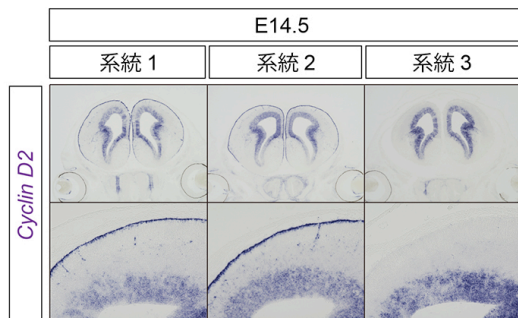


図 1. *Cyclin D2* mRNA 輸送配列欠失マウスのスクリーニング

① *Cyclin D2* mRNA 輸送配列の様々な部位に sgRNA を設計して、数塩基単位で輸送配列を欠損させた系統 (系統 1、系統 2)、② *Cyclin D2* mRNA 輸送配列の両端に sgRNA を設計し、*Cyclin D2* mRNA 輸送配列全体を欠損させた系統 (系統 3) を作製した。系統 3 でのみ、基底膜側での *Cyclin D2* mRNA の発現が消失した。

Cyclin D2 mRNA 輸送配列全体を欠損させた系統を作製する際に、系統 3 の他にもいくつか異なる欠失配列を持つ系統が得られた。これらの系統から、F1 世代以降を得て、CRISPR Design により得られた上位の推定オフターゲット配列についてシーケンス解

析を行ない、特異的な配列において変異が認められたことを確認した。

F1 世代以降のこれらの系統において、*Cyclin D2* mRNA の局在を解析したところ、RG 細胞の基底膜突起先端部で *Cyclin D2* mRNA の発現が減少していた。また、RG 細胞の細胞体が存在する脳室帯 (ventricular zone) に着目すると、これらの系統で *Cyclin D2* mRNA の発現が増加することから、mRNA 輸送が阻害されたことが示唆される。興味深いことに、欠失領域の異なる各系統で、RG 細胞の基底膜側における *Cyclin D2* mRNA の発現減少の程度に差があることから、*Cyclin D2* mRNA 輸送に必要な配列をさらに絞ることができた。この結果から、胎生期大脳皮質原基の RG 細胞の基底膜突起内における *Cyclin D2* mRNA 輸送は、きわめて特異的な 3'UTR 領域に依存すると考えられる。

一方、RG 細胞の基底膜側突起に集積が認められる FMRP は、*Cyclin D2* mRNA 輸送配列欠失マウスにおいても野生型と同様の局在を示したことから、RG 細胞の形態および基底膜突起は正常であり、基底膜側での *Cyclin D2* mRNA 発現の消失は、基底膜突起の異常ではなく、mRNA 輸送が阻害されたと考えられる (図 2)。

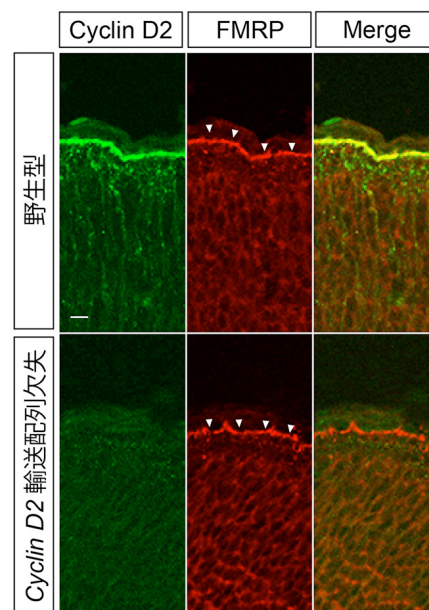


図 2. *Cyclin D2* mRNA 輸送配列欠失マウスにおける RG 細胞基底膜突起の様子

(上段) 野生型では *Cyclin D2* タンパク質および FMRP が基底膜突起に集積している。(下段) 基底膜突起には *Cyclin D2* タンパク質は認められないが、FMRP は野生型同様に発現している。

現在、F1 世代以降の大脳皮質構築について詳細な解析を行っている。また、生物種による大脳皮質構築の違いが *CyclinD2* mRNA 輸送システムの進化に伴って作出されているかを検証するために、マウス以外の動物種での *Cyclin D2* の発現比較のための *Cyclin D2* のクローニングも進捗しており、*in situ* hybridization による解析を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① **Kikkawa, T.**, Casingal, CR., Chun, SH., Shinohara, H., Hiraoka, K., Osumi, N. The role of Pax6 in brain development and its impact on pathogenesis of autism spectrum disorder. *Brain Research*. 2018. in press. 査読有
DOI: 10.1016/j.brainres.2018.02.041
- ② Sato, T., **Kikkawa, T.**, Saito, T., Itoi, K., Osumi, N. Organizing activity of Fgf8 on the anterior telencephalon. *Dev Growth Differ*, 59(9), 701-712, 2017. 査読有
DOI: 10.1111/dgd.12411
- ③ **Kikkawa, T.**, Takahashi, M., Osumi, N. Electroporation in the rodent embryonic brain using whole embryo culture system. *Curr Protoc Neurosci*, 78:3.30.1-3.30.16, 2017. 査読有
DOI: 10.1002/cpns.21
- ④ Ueharu, H., Yoshida, S., **Kikkawa, T.**, Kanno, N., Higuchi, M., Kato, T., Osumi, N., Kato, Y. Gene tracing analysis reveals the contribution of neural crest-derived cells in pituitary development. *J Anat*, 230(3), 373-380, 2016. 査読有
DOI: 10.1111/joa.12572
- ⑤ Hiraoka, K., Sumiyoshi, A., Nonaka, H., **Kikkawa, T.**, Kawashima, R., Osumi, N. Regional volume decreases in the brain of Pax6 heterozygous mutant rats: MRI deformation-based morphometry. *PLoS One*, e0158153, 2016. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0158153

[学会発表] (計 6 件)

- ① **Kikkawa, T.**, Inoue U, Y., Inoue, T., Osumi, N. : Analyses of *Cyclin D2* mRNA transportation mechanism in radial glial cells during corticogenesis using CRISPR/Cas9 genome editing system. 第40回日本分子生物学会、神戸、2017年12月
- ② **Kikkawa, T.**, Inoue U, Y., Inoue, T., Osumi, N. : Analyses of *Cyclin D2* mRNA transportation mechanism in neural stem/progenitor cells during cortical development. 第13回成体脳のニューロン新生懇談会、福岡、2017年12月
- ③ **Kikkawa, T.**, Inoue U, Y., Inoue, T., Osumi, N. : Analyses of *Cyclin D2* mRNA transportation in the cortical development using CRISPR/Cas9 genome editing system. 第60回日本神経化学会、仙台、2017年9月
- ④ **Kikkawa, T.**, Inoue U, Y., Inoue, T., Osumi, N. : Analyses of *Cyclin D2* mRNA transportation in the cortical development using CRISPR/Cas9 genome editing system. 第10回神経発生討論会、仙台、2017年3月
- ⑤ **Kikkawa, T.**, Inoue U, Y., Inoue, T., Casingal R, C., Osumi, N. : Analyses of *Cyclin D2* mRNA transportation in the cortical development using CRISPR/Cas9 genome editing system. 第39回日本分子生物学会、横浜、2016年12月
- ⑥ **Kikkawa, T.**, Inoue U, Y., Inoue, T., Osumi, N. : *Cyclin D2* mRNA transportation in the cortical development is based on the 3' UTR element: a CRISPR/Cas9 analysis. 第39回日本神経科学大会、横浜、2016年7月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 貴子 (KIKKAWA, Takako)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 90727851