

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15542

研究課題名(和文) ミエリン形成における転写-RNA代謝カップリング機構の分子基盤解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanisms underlying the coupling between transcription and RNA metabolism during myelination

研究代表者

備前 典久 (Bizen, Norihisa)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40751053

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)：オリゴデンドロサイト(OL)は中枢神経系においてミエリンを形成する細胞であるが、OL分化およびミエリン化の詳細なメカニズムには不明な点が多い。本研究では新規Olig2結合因子Obp2のOL分化およびミエリン化における役割を、RNA代謝と転写制御の観点から解析した。OL特異的Obp2欠損マウスの解析から、Obp2はOL関連因子のスプライシングを介してOL分化およびミエリン化に寄与することを明らかにした。さらにObp2のOlig2結合領域がOL関連遺伝子の転写活性に促すことがわかった。以上より、Obp2がRNAスプライシングと転写制御を介してOL分化およびミエリン化に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりObp2は転写調節のみならずRNAヘリカーゼとしてRNA代謝の様々なステップに関与することが考えられ、OL分化およびミエリン化の新たな制御機構として重要な分子であることがわかった。転写からRNA代謝へのプロセスは生命現象の根幹であり、本研究の成果は、ミエリン形成だけに限らず、生体における生理機構全般に当てはまる新たな仕組みとして提示できるため学術的に有意義である。また、ミエリン構造の破綻が起因となる神経疾患は、従来の脱髄疾患やミエリン形成不全症のみならず、統合失調症などの精神疾患にも及ぶ可能性があり、本研究の成果は治療法確立の観点において社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Oligodendrocytes (OLs) form the myelin sheaths around axons and regulate the axonal conduction in central nervous system (CNS). We have identified a novel Olig2-binding factor Obp2, which is involved in the transcription regulation and RNA metabolism. To elucidate the role of Obp2 in the myelination, we generated mature OL-specific Obp2 deficient mice (Mbp2-cre: Obp2 cKO). OL differentiation and myelination are significantly suppressed in the spinal cords of Obp2-deficient mice. RNA-seq detected the abnormal splicing of OL-related factors. In addition, we found that the expression of snRNAs, which are main components of spliceosome, was significantly suppressed in Obp2-deficient spinal cord. Furthermore, the C-terminal region of Obp2, which binds to Olig2, promoted the activation of OL-related gene promoters. Thus, these results suggest that Obp2 is a key regulator for OL differentiation and myelination through RNA splicing and transcriptional regulation.

研究分野：神経解剖学・神経発生学

キーワード：オリゴデンドロサイト ミエリン 転写 RNA代謝 Olig2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系を構成する主要な細胞種であるオリゴデンドロサイト(OL)は、神経軸索に巻きつくことで髄鞘(ミエリン)という絶縁シートを形成し、神経伝達における跳躍伝導を可能にする。ミエリン形成は、OL 前駆細胞から OL への分化、OL からのミエリン化、の2段階からなる。これらの過程は、細胞内シグナルや転写制御の他に、ミエリン形成の新たな制御機構として、miRNA 生成を含む RNA 代謝が注目を浴びている。しかし現在まで、ミエリン形成に関与するスプライシングバリエーションや miRNA の存在は数多く報告されている一方、それらを制御する上流分子はほとんど知られていない。

我々はこれまでに、OL 分化に必須の転写因子 *Olig2* に結合する RNA ヘリカーゼ、*Obp2* (*Olig2*-binding protein 2)を新たに同定し、中枢神経系特異的 *Obp2* 欠損マウスの解析から、*Obp2* が関連遺伝子の RNA スプライシングを介して OL 発生に寄与することを明らかにした (Bizen et al. 投稿準備中)。RNA ヘリカーゼは、RNA の二次構造をほどこ酵素で、RNA スプライシング、RNA 輸送、翻訳、miRNA 生成など、RNA 代謝経路の多くのステップで必須の分子として知られている。興味深いことに、*Obp2* は、成熟 OL にも発現しており、MBP や PLP などのミエリン関連遺伝子の転写活性化にも寄与していることを見出した。したがって、*Obp2* は、ミエリン形成に関する RNA 代謝を制御する RNA ヘリカーゼとしての働きと共にミエリン関連遺伝子の転写を制御するという、2つのプロセスを連動(カップリング)させる鍵分子であると考えに至った。

2. 研究の目的

本研究は成熟オリゴデンドロサイト特異的 *Obp2* 欠損マウスにおけるオリゴデンドロサイト分化およびミエリン化への影響を解析し、その分子メカニズムを RNA 代謝および転写調節の観点から解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)成熟オリゴデンドロサイト(OL)特異的 *Obp2* 欠損マウスを作製するために、*Mbp-Cre* マウスに *Obp2*-*fllox* マウスを掛け合わせて成熟 OL 特異的 *Obp2* 欠損マウス (*Mbp-Cre*;*Obp2* cKO マウス)を作製した。成熟 OL における特異的 Cre リコンビナーゼ活性を検証するために、*Mbp2-Cre* マウスに *fllox-EGFP* レポーターマウスと掛け合わせ免疫染色を行い、GFP 陽性の細胞種を確認した。

(2)*Mbp-Cre*;*Obp2* 欠損マウスの表現系を生存率・体重・筋力の観点から解析した。体重は2週齢から6週齢まで1週間ごとに測定した。筋力測定はgrip strength test およびwire hanging test を用いた。

(3)*Mbp-Cre*;*Obp2* 欠損マウスにおける OL 分化およびミエリン形成への影響について、免疫組織化学、in situ hybridization 法、定量 RT-PCR、電子顕微鏡を用いて解析した。さらに、免疫染色とウエスタンブロッティングを用いてアストロサイトやミクログリアの活性化や OL の細胞死についても検証した。また、p53 関連因子や酸化ストレス、小胞体ストレス、炎症応答性シグナル関連因子の発現も検証した。

(4)*BrdU* 取り込みを用いて、*Obp2* 欠損脊髄における OPC から OL 分化への影響を検証した。生

後 13 日目から三日連続で BrdU(50mg/kg)を腹腔内投与し、生後 42 日目に BrdU 陽性のオリゴデンドロサイトの数を比較した。さらに、OPC の増殖への影響を調べるため、生後 14 日目に BrdU を投与し、6 時間後に BrdU 陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の数を比較した。また、*Cnp-iCre;Obp2* cKO マウスを作製し、OPC から OL 分化への影響を組織学的解析を用いて解析した。

(5)*Obp2* 欠損マウス脊髄における RNA-seq から Alternative splicing の変動を解析した(同腹のコントロールおよび *Obp2* 欠損マウスを 2 匹ずつ解析)。HiSeq4000 で読んだシーケンスリードのアライメント、定量、エクソン含有率の算出は 0Lego および Quantas を用いて行った。また、*Obp2* による OL 分化促進が、関連遺伝子の直接的な転写活性化によるものか検討するため、OL 関連遺伝子であるマウス *Pip* および *Mbp* プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を連結したコンストラクトと *Obp2*, *Olig2*, *Sox10* プラスミドをそれぞれあるいは組み合わせて COS7 細胞株または初代培養神経前駆細胞に導入し、レポーターアッセイを行った。

4. 研究成果

(1) 成熟オリゴデンドロサイト(OL)特異的 *Obp2* 欠損マウスの作製

まず *Mbp-Cre* マウスが、OL 特異的に Cre リコンビナーゼ活性を発揮するかを検証した。生後 14 日目の *Mbp2-Cre;ZEG* マウス脳において、GFP 陽性細胞は成熟 OL タンパク CC-1, *Pip*, *Mbp* を発現していた。一方、ニューロン、アストロサイト、ミクログリアマーカーの発現は認められなかった。さらに、*Mbp-Cre;Obp2* cKO マウス脳において、OL における *Obp2* の顕著な発現低下を確認した。

(2)成熟 OL 特異的 *Obp2* 欠損マウスの表現型解析

Mbp2-Cre;Obp2 cKO マウスは生後 4 週以降より、コントロールマウスに対する有意な体重差が生じはじめ、全てのマウスが生後 2 か月以内に死亡した(図 1)。また、顕著な運動失調症状を呈し、grip strength test および wire hang test を行ったところ重度の筋力低下が認められた。

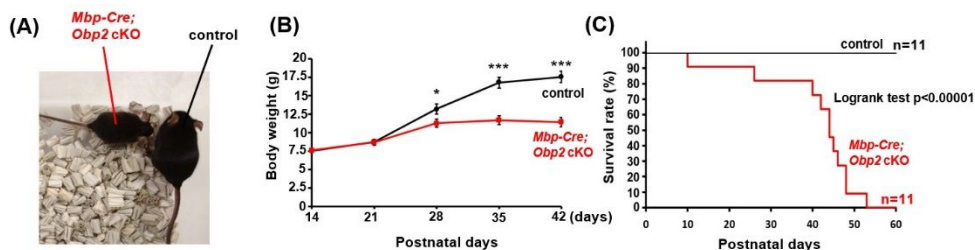


図1. 成熟オリゴデンドロサイト(OL)特異的*Obp2*欠損マウスの作製
(A)6週齢の成熟OL特異的*Obp2*欠損マウスはコントロールマウスと比較し、サイズが小さい。(B) *Obp2*欠損マウスの体重は4週齢頃から有意に低くなり、発育不良を示す。(C) *Obp2*欠損マウスは生後2か月までに全て死亡する。

6 週齢の *Mbp-Cre;Obp2* cKO マウス脊髄を用いて、OL 関連マーカーに対する in situ hybridization、免疫組織化学、定量 RT-PCR を行ったところ、CC-1, *Pip*, *Mbp*, *Mog* などの成熟 OL マーカー遺伝子およびタンパクの発現が顕著に減少していた。

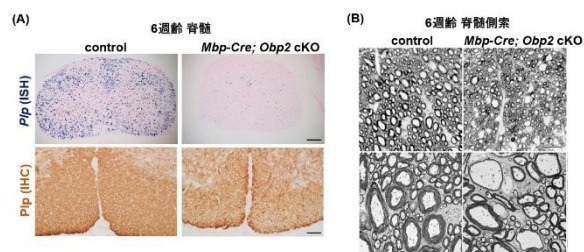


図2. 成熟OL特異的欠損マウス脊髄におけるOL分化およびミエリン形成の抑制
(A)生後6週齢マウス脊髄におけるIn situ hybridization (ISH, 上段)と免疫組織化学(IHC, 下段)による *Pip* の発現解析。*Obp2*欠損マウスにおいて*Pip*遺伝子およびタンパクの顕著な減少を示す。
(B)生後6週齢マウス脊髄断片における電子顕微鏡解析。*Obp2*欠損マウスにおいてミエリン構造の破壊が観察される。

さらに電子顕微鏡解析により、脊髄側索において太い軸索で有意なミエリン形成障害が認められた(図 2)。OL 関連因子群の有意な発現低下は 3 週齢ごろから始まるのがわかった。また、アストロサイトやミクログリアの活性化が見られた。一方、*Pdgfr* や *Gpr17* などの OPC 関連遺伝子およびタンパクの発現に有意な差は認められなかった。

Obp2 欠損による OPC から OL への分化に対する影響を検証するため、OPC 特異的 *Obp2* 欠損 (*Cnp-Cre;Obp2* cKO) マウスを作製したが、出生直後に死亡した。解析したところ、胎生後期の脳および脊髄において p53 経路活性化による OPC のアポトーシスが生じていた。よってこのマウスは OL 分化を検証する用途には使用できなかったため、次に *Mbp-Cre;Obp2* cKO マウスにおいて、BrdU 標識 OPC の OL 分化能を評価した。生後 13 日から 15 日目にかけて BrdU を 3 日連続腹腔内投与し、生後 6 週に BrdU/CC-1 共陽性細胞数を比較したところ *Obp2* cKO 脊髄において陽性細胞数が有意に減少していた。一方、OPC の増殖能を検証するため、生後 14 日に BrdU を腹腔投与し 6 時間後の BrdU/Olig2 二重陽性細胞数を比較したところ、*Obp2* cKO で有意な増加を確認した。このことから、*Obp2* 欠損により OL 分化が抑制されることが示唆された。

我々は以前に中枢神経系特異的 *Obp2* 欠損マウスを解析し、胎生期脳や脊髄において p53 経路の活性化を介して神経前駆細胞と OPC のアポトーシスが亢進することを見出している。そこで、*Mbp-Cre;Obp2* cKO マウスの OL において p53 経路活性化の有無を確認したところ、明確な活性化は認められなかった。しかし、p53 の標的遺伝子である p21 の発現は亢進していた。p21 は p53 経路以外のストレスシグナルの標的にもなっている。さらに、酸化ストレスシグナル標的遺伝子である p62 や炎症応答シグナルの *Nf-κB* シグナルの活性化が認められたことから、p53 非依存的ストレスシグナルの存在が示唆された。

(3) *Obp2* による OL 関連因子の RNA スプライシング制御と転写制御

中枢神経系特異的 *Obp2* 欠損マウスとコントロールマウスの胎生後期脊髄における RNA-seq の結果、OL 特異的な発現を示し、OL 分化とミエリン化に参与する *Tenm4* および *Bcas1* mRNA のスプライシングにおいて、それぞれ exon9 と exon7 の異常な脱落 (skipping) を検出した (図 3)。さらに、スプライシングの中心的役割を担う snRNP を構成

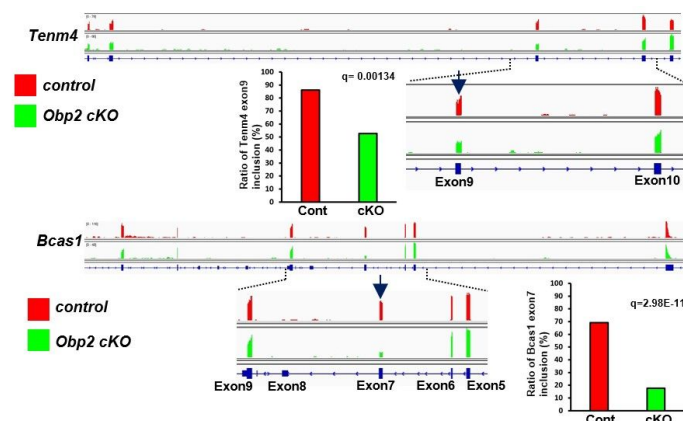


図3. 中枢神経系特異的 *Obp2* 欠損マウス脊髄における OL 分化およびミエリン形成の抑制。胎生後期マウス脊髄における RNA-seq とスプライシング解析 (図は IGV によって視覚化したマッピングデータを示す)。*Obp2* 欠損マウスにおいて、OL 分化とミエリン形成に参与する分子 (*Tenm4*, *Bcas1*) でエクソンの異常な脱落を検出した。

する snRNA 群の有意な発現低下が認められた。また、ルシフェラーゼアッセイを行い、Olig2 との結合領域である *Obp2* C 末端領域が成熟オリゴデンドロサイト関連遺伝子である *Mbp* および *Plp* 遺伝子のプロモーター活性を促進することがわかった。しかし、これらの遺伝子発現に参与する *Sox10* などの転写因子との相互作用は認められなかった。

本研究により、*Obp2* が RNA スプライシングと転写制御を介して OL 分化およびミエリン化に参与することを明らかにした。*Obp2* 欠損マウスにおいて、多くの snRNA の発現が減少していたこと

から、Obp2 が RNA スプライシングの中心的な役割を担うスプライソソームの形成に関与する可能性が考えられた。OL におけるスプライソソームの動態についてはほとんど明らかになっていないため、本研究の成果は OL におけるスプライソソーム形成制御機構解明の糸口になると期待される。今後はスプライソソーム形成における Obp2 のより詳細な分子メカニズムの解析を行うと共に、Obp2 が標的とする OL 関連遺伝子群の網羅的同定と、Obp2 が相互作用する転写因子群の同定を進めていく。また、*Obp2* 欠損 OPC とは異なり、*Obp2* 欠損 OL では p53 非依存的なストレスシグナルの存在が示唆されたことから、Obp2 によるストレスシグナルの同定とその制御機構の解明にも取り組んでいく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wang Ya-Zhou, Fan Hong, Ji Yu, Reynolds Kurt, Gu Ran, Gan Qini, Yamagami Takashi, Zhao Tianyu, Hamad Salaheddin, Bizen Norihisa, Takebayashi Hirohide, Chen YiPing, Wu Shengxi, Pleasure David, Lam Kit, Zhou Chengji J.	4. 巻 -
2. 論文標題 Olig2 regulates terminal differentiation and maturation of peripheral olfactory sensory neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-019-03385-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Terumitsu Tsujita Mika, Kitaura Hiroki, Miura Ikuo, Kiyama Yuji, Goto Fumiko, Muraki Yoshiko, Ominato Shiho, Hara Norikazu, Simankova Anna, Bizen Norihisa, Kashiwagi Kazuhiro, Ito Takuhiro, Toyoshima Yasuko, Kakita Akiyoshi, Manabe Toshiya, Wakana Shigeharu, Takebayashi Hirohide, Igarashi Hironaka	4. 巻 154
2. 論文標題 Glial pathology in a novel spontaneous mutant mouse of the Eif2b5 gene: a vanishing white matter disease model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 25 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14887	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Norihisa Bizen, Anna Simankova, Nobuhiko Ohno, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Hirohide Takebayashi
2. 発表標題 Analysis of the Effect of a Novel Olig2-Binding Factor on the Oligodendrocyte Differentiation and Myelination in Central Nervous System
3. 学会等名 The 66th NIBB Conference -ABIS International Symposium-
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 備前典久、矢野真人、周麗、阿部学、崎村建司、竹林浩秀
2. 発表標題 新規Olig2結合因子によるオリゴデンドロサイト前駆細胞維持機構の解明
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihisa Bizen, Masato Yano, Zhou Li, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Hirohide Takebayashi
2. 発表標題 Identification of a novel Olig2-binding factor indispensable for oligodendrogenesis in central nervous system
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 備前典久、矢野真人、周麗、崎村建司、竹林浩秀
2. 発表標題 新規Olig2結合因子によるオリゴデンドロサイト発生機構の解析
3. 学会等名 第23回グリアクラブ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 備前典久、矢野真人、周麗、崎村建司、竹林浩秀
2. 発表標題 新規Olig2結合因子によるオリゴデンドロサイト発生機構の解明
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norihisa Bizen, Masato Yano, Zhou Li, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Hirohide Takebayashi
2. 発表標題 Elucidation of the mechanisms underlying a novel Olig2 binding factor-mediated maintenance of oligodendrocyte precursor cells
3. 学会等名 IBRO 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihisa Bizen, Masato Yano, Anna Simankova, Li Zhou, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Hirohide Takebayashi
2. 発表標題 Identification of a novel Olig2-binding factor indispensable for the maintenance of oligodendrocyte precursor cells in the central nervous system
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 備前典久、矢野真人、周麗、阿部学、崎村建司、竹林浩秀
2. 発表標題 新規Olig2結合因子による神経前駆細胞およびオリゴデンドロサイト前駆細胞維持機構の解明
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Norihisa Bizen, Anna Simankova, Nobuhiko Ohno, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Hirohide Takebayashi
2. 発表標題 Mice lacking a novel Olig2-binding factor displays the attenuation of oligodendrocyte differentiation and myelination in the central nervous system
3. 学会等名 ABiS Symposium Forefront and Future of Electron Microscopic Imaging 電子顕微鏡イメージングの最先端と未来
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----