

令和 2 年 4 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14999

研究課題名(和文) 大脳皮質構築過程における神経幹細胞特異的なRNA輸送・局在化機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of RNA transport and localization in neural stem cells during corticogenesis

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)：大脳皮質の形成過程では、胎生期に存在する放射状グリア(radial glia; RG)細胞と呼ばれる丈の長い神経幹細胞が、予め決められたタイミングで増殖・分化し、多様な神経細胞が産生される。この過程はRG細胞内の複雑な分子機構によって制御されている。本研究では、細胞周期因子Cyclin D2に着目し、大脳皮質のRG細胞における基底膜突起先端部へのCyclin D2のmRNA輸送を阻害すると、大脳皮質の構築が異常になることを明らかにした。この結果から特異的なmRNA輸送が、胎生期における大脳皮質形成に重要である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発生や細胞分化の過程では、細胞内において様々なタンパク質が時空間的に不均等に局在することにより、細胞の運命決定や特異的な機能発現に重要な役割を果たしている。神経系でこれまでに注目されていたのは、主に分化した神経細胞内のmRNA輸送・局在制御機構であった。このような研究動向の中で、本研究では、独自に見出したCyclinD2 mRNA輸送機構を起点として、これまでに考慮されてこなかった神経幹細胞内のmRNA細胞内局在制御による機能発現についてアプローチできた点で大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：During corticogenesis, neural stem/progenitor cells need to adequately proliferate and differentiate to various types of neurons. Neural stem/progenitor cells in the developing cortex are called radial glial (RG) cells, as they possess highly polarized morphology with long apical/basal processes. We have previously shown in the mouse that mRNAs of CyclinD2, coding a cell cycle regulator, are transported to the basal end-foot of the RG cell. We found that the thickness of the cortex was decreased in the CyclinD2 mRNA transport element-deleted mutant mice that CyclinD2 mRNA no longer localized in the basal end-feet of RG cells, yet remained around the RG cell soma. These results suggest that CyclinD2 mRNA transport in RG cells is important to make the cortex during embryogenesis.

研究分野：神経発生学

キーワード：mRNA輸送 神経幹細胞 細胞周期

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進化の過程でもっとも拡大・複雑化した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予め決められたタイミングで増殖・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ており、基底膜側突起を受け継いだ娘細胞は未分化を維持した神経幹細胞となる。我々は、細胞周期の G1 期から S 期への移行を促進する CyclinD2 の mRNA およびタンパク質が、基底膜側突起の先端部に局在し、放射状突起を受け継いだ娘細胞に集積することを発見

した (図 1, Tsunekawa et al., 2012)。また、*CyclinD2* ノックダウン実験により、*CyclinD2* 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を示した (図 1)。

CyclinD2 の mRNA が基底膜側突起の先端部に集積する理由として、核で転写された *CyclinD2* mRNA が非常に長い突起の中を基底膜側まで輸送されることを予測し、実験発生的手法により、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ていた (Tsunekawa et al., 2012)。さらに予備的知見として、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 法により *CyclinD2* mRNA 輸送配列を欠失させたマウス胚を作製したところ、大脳皮質原基の RG 細胞で、*CyclinD2* mRNA 輸送が阻害されることを見出した (吉川ら未発表)。したがって、胎生期大脳皮質の RG 細胞の基底膜突起内における *CyclinD2* 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。しかし、RG 細胞内の *CyclinD2* mRNA 輸送が大脳皮質構築に影響を与えているのか、また、どのような機構によって *CyclinD2* mRNA が輸送されるのかについては未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では大脳皮質 RG 細胞内における *CyclinD2* mRNA 輸送が細胞分化運命決定に果たす機能を解析し、*CyclinD2* mRNA 局在化を担う分子機構を解明することを目的としている。*CyclinD2* mRNA 輸送機構を起点として、RG 細胞内での新規 mRNA 輸送モデルを提唱し、大脳皮質構築に及ぼす影響について追究した。

3. 研究の方法

本研究では、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 法により *CyclinD2* mRNA の輸送配列特異的に欠損させたマウスを用いて、胎生期および生後マウスの大脳皮質構築を解析した。一般的に細胞内で mRNA 輸送が行われる際、RNA 結合タンパク質 (RBP) が標的 mRNA に結合する。そこで RG 細胞の基底膜側突起への mRNA 輸送を担うことが報告されている RBP の一つである脆弱性 X 症候群の原因因子である FMRP の RNA immunoprecipitation sequencing (RIP-Seq) の結果を参照した (Casingal, Kikkawa et al., 2019)。次に *CyclinD2* mRNA の輸送配列に結合し得る RBP を探索できるデータベースを用いて候補 RBP を探索した。さらに、神経細胞では RBP が標的 mRNA を特定の場所まで運搬する際に、モータータンパク質を利用して細胞骨格上を移動ことが知られていることから、胎生期の RG 細胞が存在する脳室帯領域におけるモータータンパク質の発現についても検討を行った。

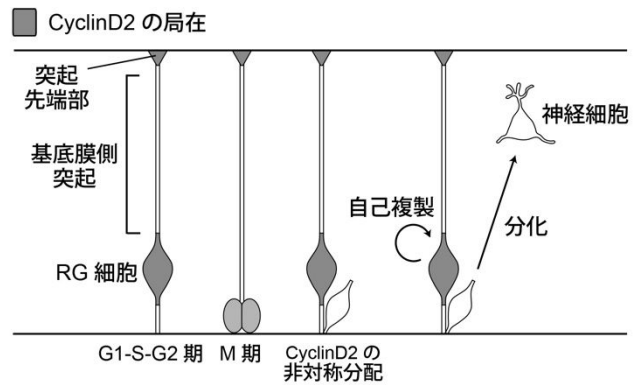


図 1. RG 細胞の分化運命決定因子 CyclinD2 の局在

哺乳類の RG 細胞は放射状の長い基底膜側突起をもつ。細胞周期因子 CyclinD2 の mRNA は基底膜側突起先端部まで輸送される。RG 細胞の非対称分裂の際に、CyclinD2 は基底膜側突起をもつ娘細胞へと非対称分配され、幹細胞としての性質を維持する。

4. 研究成果

胎生期の *CyclinD2* mRNA 輸送配列欠失マウスにおいては、基底膜側における *CyclinD2* mRNA の集積が消失することから、*CyclinD2* mRNA の輸送が阻害されると考えられる。

(図2) この *CyclinD2* mRNA 輸送配列欠失マウスを用いて、大脳皮質の構築が完成する生後 10 日で解析を行い、大脳皮質の厚みが減少するという結果を見いだした(図2)。この結果から、RG 細胞の *CyclinD2* mRNA 輸送が大脳皮質構築を担う可能性が示唆された。

次に、*CyclinD2* mRNA 輸送を担う RBP について検討した。これまでに、RBP の一つである脆弱性 X 症候群の原因因子 FMRP が基底膜側突起への mRNA 輸送を担うことが報告されている (Pilaz et al., 2016)。我々は、胎生期の終脳における FMRP の標的 mRNA を網羅的に探索するために、RNA immunoprecipitation sequencing (RIP-Seq) を用いて多数の FMRP の標的 mRNA を同定した (Casingal, Kikkawa et al., 2019)。この結果を参照したところ、*CyclinD2* mRNA は FMRP の標的 mRNA には含まれていなかった。また、FMRP をコードする *Fmr1* 遺伝子のノックアウトマウスの RG 細胞基底膜側突起における *CyclinD2* の局在には変化が認められなかった (吉川ら未発表)。この結果から、

FMRP 以外の RBP が *CyclinD2* mRNA の輸送を担っていると考えられる。そこで、特異的な mRNA 配列に結合し得る RBP を探索できるデータベースを用いて候補 RBP を探索したところ、いくつかの RBP が候補として挙がり (図3)、現在これらの RBP の解析に着手している。

神経細胞では RBP が標的 mRNA を特定の場所まで運搬する際に、モータータンパク質を利用して細胞骨格上を移動することから、胎生期の RG 細胞においても神経細胞と同様の機構があると予想した。そこで、モータータンパク質のうち微小管のプラス端へと移動するキネシン分子の発現を *in situ* hybridization により検出すると、胎生期の RG 細胞の細胞体が存在する脳室帯領域に発現していることが分かった。現在、これらのキネシン分子のタンパク質の発現を確認するとともに、子宮内電気穿孔法を用いて、RG 細胞においてキネシン分子特異的なノックダウン実験を行い、*CyclinD2* mRNA の基底膜側への局在の有無について検討している。今後、これらのサンプルを用いて大脳皮質構築の解析を行う。

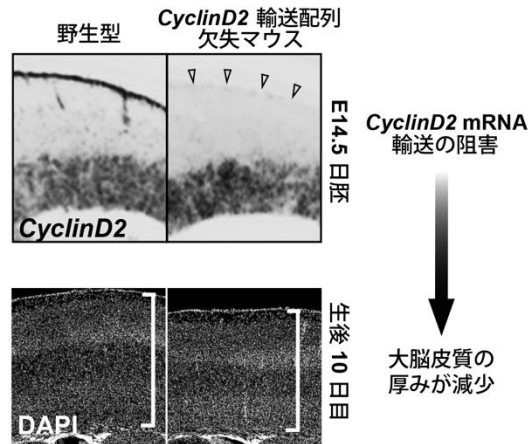


図2. RG 細胞内における *CyclinD2* mRNA 輸送は大脳皮質構築に影響を与える細胞周期調節因子 *CyclinD2* の mRNA およびタンパク質は、哺乳類 RG 細胞の基底膜側突起に集積する。この集積には脳室面側の核で転写された mRNA が突起のなかを輸送される必要がある。*CyclinD2* mRNA の輸送には 3'UTR 領域が必要で、ゲノム編集技術により作製した *CyclinD2* mRNA 輸送配列欠失マウスにおいては mRNA 輸送が阻害され、大脳皮質の厚みが減少した。

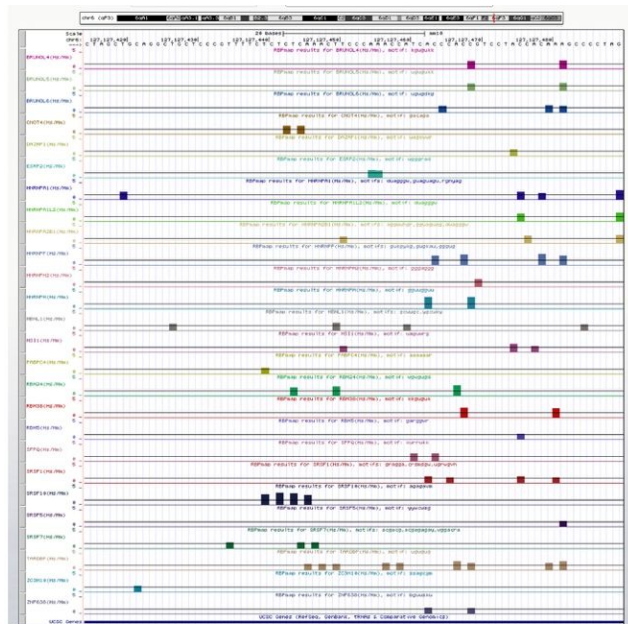


図3. *CyclinD2* mRNA 輸送を担う候補 RNA 結合タンパク質の探索

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamashita, W., Takahashi, M., Kikkawa, T., Gotoh, H., Osumi, N., Ono, K, Nomura, T.	4. 巻 145
2. 論文標題 Conserved and divergent functions of Pax6 underlie species-specific neurogenic patterns in the developing amniote brain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	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） https://doi.org/10.1242/dev.159764	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 -
1. 著者名 Kikkawa, T., Casingal, CR., Chun, SH., Shinohara, H., Hiraoka, K., Osumi, N.	4. 巻 1705
2. 論文標題 The role of Pax6 in brain development and its impact on pathogenesis of autism spectrum disorder.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 95-103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.041 .	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 -
1. 著者名 Yoshizaki, K., Koike, T., Kimura, R., Kikkawa, T., Oki, S., Koike, K., Mochizuki, K., Inada, H., Kobayashi, H., Matsui, Y., Kono, T., Osumi, N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Paternal age affects offspring's behavior possibly via an epigenetic mechanism recruiting a transcriptional repressor REST	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） https://doi.org/10.1101/550095	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Casingal, CR., Kikkawa, T., Inada, H., Osumi, N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Identification of FMRP target genes expressed in corticogenesis: implication for common phenotypes among neurodevelopmental disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） https://doi.org/10.1101/769026	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kikkawa, T., Sakayori, N., Yuuki, H., Katsuyama, Y., Matsuzaki, F., Konno, D., Abe, T., Kiyonari, H., Osumi, N.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Dmrt genes participate in the development of Cajal-Retzius cells derived from the cortical hem in the telencephalon.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1002/dvdy.156 .	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 4件)

1. 発表者名 Kikkawa, T., Inoue U, Y., Inoue, T., Osumi, N.
2. 発表標題 Analyses of Cyclin D2 mRNA transportation mechanism in radial glial cells during corticogenesis.
3. 学会等名 Special Lecture on the 5th Anniversary of the Tohoku Forum for Creativity “Genome Editing” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kikkawa, T., Inoue U, Y., Inoue, T., Osumi, N.
2. 発表標題 Analyses of Cyclin D2 mRNA transportation mechanism in radial glial cells during corticogenesis.
3. 学会等名 22th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kikkawa, T., Sakayori, N., Yuuki, H., Osumi, N.
2. 発表標題 Dmrt genes control the development of Cajal-Retzius cells derived from specific origins in the cerebral cortex.
3. 学会等名 第41回 日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kikkawa, T., Inoue U, Y., Inoue, T., Osumi, N.
2. 発表標題 Analyses of Cyclin D2 mRNA transport mechanism in radial glial cells during corticogenesis.
3. 学会等名 第12回 神経発生討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikkawa, T., Wakamatsu, Y. Inoue U, Y., Tsunekawa, Y., Matsuzaki, F., Suzuki, K., Inoue, T., Osumi, N.
2. 発表標題 mRNA transport mechanism of a cell cycle regulator Cyclin D2 in neural stem/progenitor cells during corticogenesis.
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 Kikkawa, T., Wakamatsu, Y. Inoue U, Y., Tsunekawa, Y., Matsuzaki, F., Suzuki, K., Inoue, T., Osumi, N.
2. 発表標題 mRNA transport mechanism of a cell cycle regulator Cyclin D2 in neural stem/progenitor cells during corticogenesis.
3. 学会等名 20th TMIMS International Symposium "Principles of Neocortical Development and Evolution" (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikkawa, T., Wakamatsu, Y. Inoue U, Y., Tsunekawa, Y., Matsuzaki, F., Suzuki, K., Inoue, T., Osumi, N.
2. 発表標題 mRNA transport mechanism of a cell cycle regulator Cyclin D2 in neural stem/progenitor cells during corticogenesis.
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト 冬のシンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikkawa, T.
2. 発表標題 mRNA transport of Cyclin D2 in radial glial cells during brain development.
3. 学会等名 The 5th German-Japanize Retreat on Forebrain Development (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川貴子、若松義雄、井上-上野由紀子、鈴木久仁博、井上高良、大隅典子
2. 発表標題 CyclinD2のmRNA輸送による有胎盤類大脳皮質の拡大機構の解明
3. 学会等名 125回日本解剖学会
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