

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07363

研究課題名(和文) mRNA翻訳の時空間的な制御が嗅神経細胞の形成や機能に果たす役割の解明

研究課題名(英文) Spatiotemporal control of mRNA translation in olfactory sensory neurons

研究代表者

福田 七穂 (Fukuda, Nanaho)

新潟大学・脳研究所・講師

研究者番号：00415283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞では、軸索や樹状突起に特定のmRNAが局在化しており、環境変化に応じて局所的なタンパク質合成が行われる。こうしたmRNA翻訳の時空間的な制御は、軸索伸長やシナプス可塑性を担い、神経変性疾患にも関与するため、その機構や生理機能の解明が望まれている。本研究では、RNA結合タンパク質 Hnrnpabが、神経形成期の嗅神経細胞に高発現しており、軸索投射に関わるmRNA群に結合していることを明らかにした。また、Hnrnpab欠損マウスでは、ターゲット遺伝子の発現が糸球体(軸索末端)において低下しており、成熟な嗅神経細胞数の減少と、軸索投射様式の異常が生じることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mRNA局所翻訳は神経細胞の形成や機能に必要不可欠であることが認識されつつあるが、その制御を担う因子の同定や機能解析はまだあまり進んでいない。本研究により、嗅神経細胞で軸索投射に関わるmRNA群に結合するRNA結合タンパク質が初めて同定され、嗅神経回路形成におけるmRNA制御の重要性が示された。昨年、神経発達症にHnrnpab遺伝子の変異が報告された。従って、本研究成果は他の神経細胞におけるmRNA制御機構や、神経発達症の理解にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Most mRNAs are translated at perinuclear sites in soma, and the synthesized proteins are transported to subcellular regions to function. In contrast, certain mRNAs are transported and localized in subcellular domains in a translationally-repressed form, and then locally translated into proteins on the site. Such post-transcriptional control "local mRNA translation" is important for the formation and function of highly polar cells such as neurons. In this study, we showed that an RNA-binding protein Hnrnpab is highly expressed in immature olfactory sensory neurons and binds to a group of mRNAs that are related to axon projection. In Hnrnpab KO mice, the expression of the target genes are impaired in the glomerulus, resulting in a reduction of mature olfactory neurons and an abnormal axon projection.

研究分野：分子生物学, 神経科学

キーワード：RNA結合タンパク質 転写後制御 mRNA局所翻訳

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経細胞は最も複雑な構造を持つ細胞の一つであり、神経軸索が1メートルに及ぶものもある。こうした細胞が、細胞体から遠く離れた神経末端で、外部からの刺激に応じて迅速かつ局所的に応答するためには、「mRNAの局在化」を介した時空間的な発現制御が不可欠とされる。神経細胞の樹状突起や軸索末端には、シナプス形成や軸索伸長、シグナル伝達に関わるタンパク質をコードする mRNA 群が予め局在化されており、神経成長因子や他のニューロンからの入力等の刺激を受けると、局所的に翻訳されることが知られている。

細胞内の特定のイベントに必要な mRNA 群を選択的に局在化するには、mRNA 上に存在するシス配列とその配列を認識する RNA 結合タンパク質とが必要と考えられている。しかしながら、両者が対応づけられた例はまだ少ない。また近年、脆弱 X 症候群や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの神経変性疾患の原因遺伝子として、mRNA の局在化に関わる RNA 結合タンパク質が複数同定されているが、そうした RNA 結合タンパク質のターゲット mRNA や、作用機構についての理解はあまり進んでいない。したがって、神経細胞に発現する RNA 結合タンパク質とそのターゲット mRNA を同定し、両者間の作用や、mRNA の局在・翻訳制御の機構、制御の生理的意義を解明すれば、転写後制御が高次生命機能に果たす役割を理解することに加え、疾患の診断や治療法の開発にも繋がることを期待できる。

研究代表者らは、mRNA の局在化を司る新規 RNA 結合タンパク質として、Hnrnpab (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B) を同定し、解析を行ってきた。これまでに精細胞、海馬由来神経培養細胞、オリゴデンドロサイトにおいて、Hnrnpab が RTS (RNA trafficking sequence) と呼ばれる配列を含む特定の mRNA に結合し、それら mRNA の局在化を制御することを明らかにした。これらの研究の中で、Hnrnpab は脳でも高発現しており、とりわけ嗅神経細胞で高く発現することを発見した。嗅神経細胞は成体でも高い再生能を持ち、幹細胞から成熟神経細胞までの神経形成過程を追うことができるため、神経形成研究の優れたモデルと言われている。そこで嗅神経細胞における Hnrnpab 発現の詳細を解析した結果、Hnrnpab は軸索伸長が活発な未成熟期の嗅神経細胞に発現していることが明らかとなった。また、Hnrnpab 欠損マウスにおいて、嗅上皮 (嗅神経細胞の細胞体からなる感覚上皮) の厚さの減少と、糸球体 (嗅神経細胞の軸索が投射する部位) の構造異常を発見した。

### 2. 研究の目的

上記より、Hnrnpab は嗅神経細胞の形成や維持・機能に重要な mRNA の制御を担うことが予想された。そこで本研究では、嗅神経細胞における Hnrnpab ターゲット mRNA の網羅的な同定と、各 mRNA の局在・発現様式の解析を行う。また、ターゲット mRNA の Hnrnpab 結合領域の欠損マウスを作製し、Hnrnpab 欠損マウスと併せて、組織・個体レベルの表現型解析を行う。以上から、Hnrnpab を介した mRNA 局在の機構と生理機能を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) Hnrnpab 欠損による嗅神経細胞への影響の評価

Hnrnpab 欠損マウスに見られた嗅上皮厚減少の原因を探索するため、嗅覚組織の形態解析を行なった。まず、1-, 3-, 7-週齢マウスの嗅覚組織切片で HE 染色を行い、嗅上皮層の厚さを解析した。また、嗅上皮厚の減少が認められた 3 週齢の嗅覚組織切片を、成熟嗅神経細胞マーカー (OMP) と分裂細胞マーカー (phospho-histone H3) で染色し、Hnrnpab の欠損により影響を受ける細胞を同定した。次に、嗅球切片を糸球体マーカー (VgluT2) 等で染色し、糸球体の層構造や糸球体の大きさを定量的に解析した。また、嗅球全体をカバーする連続切片を、嗅覚受容体抗体で免疫染色することによって、嗅神経軸索の嗅覚受容体特異的な投射様式について、解析を行なった。

#### 2) Hnrnpab の嗅覚組織におけるターゲット mRNA の同定

嗅上皮細胞質画分を用いて抗 Hnrnpab 抗体による RNA 免疫沈降および配列解析 (RIP-Seq) を行なった。Input と Hnrnpab 免疫沈降画分から RNA を抽出し、PolyA-cDNA ライブラリを作製して次世代シーケンサーによる配列解析を行なった。Input に対して、Hnrnpab 免疫沈降画分で 6 倍以上のエンリッチメントが見られた遺伝子群を Hnrnpab ターゲットとして同定し、それら遺伝子群について Gene Ontology 解析を行なった。

#### 3) ターゲット mRNA の嗅神経細胞における発現様式の解析

抗 Hnrnpab 抗体による RNA 免疫沈降において特に高くエンリッチされた遺伝子について、野生型及び Hnrnpab 欠損マウスの嗅覚組織における発現様式を免疫組織化学染色により解析した。

#### 4) Hnrnpab の mRNA 認識配列を欠損させたマウスの作製及び解析

上記の Gene Ontology 解析から、Pcdha や Ncam2 を含む、神経細胞接着因子をコードする mRNA 群が Hnrnpab の主要なターゲットの一つであることが示唆された。また、Hnrnpab 抗体で濃縮された遺伝子群の配列解析において、神経細胞接着因子をコードする遺伝子群に Hnrnpab の認識配列である RTS (RNA trafficking sequence) の相同配列が高頻度で見出された。Pcdha は、3'-UTR に二つの RTS 相同配列を有していた。そこで、Pcdha の 3'-UTR から RTS 相同配列を含む領域を欠失させたマウスを CRISPR/Cas9 を用いて作製し、UTR 配列の欠失が嗅覚組織における Pcdha の発現に与える影響を解析した。

#### 4. 研究成果

##### 1) Hnrnpab 欠損による嗅神経細胞への影響の評価

1-, 3-, 7-週齢マウスの嗅覚組織切片を用いた組織学的な解析から、Hnrnpab 欠損マウスの嗅上皮厚は、1 週齢では野生型との差はなく、嗅上皮の形成が完了する 3 週齢頃から薄化が生じることが明らかとなった。また、成熟神経細胞マーカー(OMP)の染色から、Hnrnpab 欠損マウスでは、成熟な神経細胞層が薄化していることが明らかとなった。一方で、未成熟な神経細胞層の厚さと、分裂細胞マーカー(phospho-histone H3) 陽性細胞数には遺伝型による差は見られなかった。Hnrnpab は未成熟神経細胞層に高発現している。これらのことから、Hnrnpab は、未成熟な嗅神経細胞が軸索を糸球体へと伸長し、神経回路を形成する過程に必要とされることが示唆された。

また、この可能性を支持するように、Hnrnpab 欠損マウスの嗅球では、糸球体の平均サイズが野生型と比較して小さくなっていった。また、嗅覚受容体特異的な嗅軸索投射様式に乱れが生じていることが明らかとなった。

##### 2) Hnrnpab の嗅覚組織におけるターゲット mRNA の同定

RIP-Seq 解析により、1131 遺伝子を嗅上皮における Hnrnpab ターゲット mRNA として同定した。Gene Ontology 解析の結果、軸索投射やシナプス形成に関わる mRNA 群が高くエンリッチされていることが分かった。特に、ターゲット mRNA のうち 11%は、Pcdha や Ncam2 (Ocam) などの、神経細胞接着因子をコードする mRNA 群であった。神経細胞接着因子の多くは、嗅神経細胞の軸索投射や回路形成に必要とされることが知られている。これらのことから、Hnrnpab は、Pcdha などのターゲット mRNA 群の嗅神経細胞における発現制御を担うことにより嗅神経回路形成に寄与していることが示唆された。

##### 3) ターゲット mRNA の嗅神経細胞における発現様式の解析

ターゲット mRNA の発現に Hnrnpab が担う役割を探索するため、Pcdha と Ncam2 の嗅覚組織における発現様式を解析した。Pcdha はシナプスに発現する因子であり、野生型マウスでは、軸索末端のシナプス形成部位である糸球体で、強い発現が観察された。これに対し、Hnrnpab 欠損マウスでは、糸球体における Pcdha タンパク質の発現レベルに減少が認められた。細胞体側における Pcdha の発現レベルや分布については遺伝型による違いが見られなかったことから、Hnrnpab は軸索末端における Pcdha の発現に寄与していることが示唆された。同様に、Ncam2 も糸球体における発現レベルが Hnrnpab 欠損マウスで低下していた。これらの結果から、Hnrnpab はターゲット mRNA の軸索末端における局所的な発現に必要とされることが示唆された。

##### 4) Hnrnpab の mRNA 認識配列を欠損させたマウスの作製及び解析

Hnrnpab は、RTS (RNA trafficking sequence) と呼ばれる 11 塩基の配列を認識する。RIP-Seq 解析で同定したターゲット mRNA の配列解析から、Hnrnpab 抗体で濃縮された神経細胞接着因子をコードする mRNA 群は、RTS 相同配列を高頻度に有することが明らかとなった。とりわけ Pcdha 遺伝子は、3'-UTR に高い相同性のある RTS 配列を二つ有していた。そこで、Pcdha の 3'-UTR から RTS 相同配列を含む領域を欠失させたマウスを CRISPR/Cas9 を用いて作製した。Pcdha の 3'-UTR 配列欠損マウスにおける Pcdha の発現を生化学的手法と組織学的な手法とで解析した結果、Pcdha は細胞体側における発現に変化は見られないにもかかわらず、糸球体における発現に低下が認められた。この発現様式は、Hnrnpab 欠損マウスにおける Pcdha の発現様式と一致する。従って、Hnrnpab は、RTS 配列を介してターゲット mRNA に結合し、軸索末端における局所的な発現の制御に寄与することが示唆された。

本研究結果により、嗅神経細胞で軸索投射に関わる mRNA 群に結合する RNA 結合タンパク質が初めて同定され、嗅神経回路形成における mRNA 制御の重要性が示された。近年、神経発達症に Hnrnpab 遺伝子の変異が報告されたことから、本研究結果は他の神経細胞における mRNA 制御機構や、神経発達症の理解にも貢献すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田七穂
2. 発表標題 mRNA局在化因子hnRNP A/Bは嗅神経細胞の形成や維持に必要とされる
3. 学会等名 味と匂学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nanaho Fukuda
2. 発表標題 Fine-tuning of mRNA translation by hnRNP A/B splice variants
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nanaho Fukuda
2. 発表標題 3'-UTR binding of hnRNP A/B is crucial for axon targeting and maturation of olfactory sensory neurons
3. 学会等名 第11回 生理研－霊長研－新潟脳研 合同シンポジウム
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	National Institute of Health			
アラブ首長国連邦	New York University, Abu Dabi			