

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20700297

研究課題名(和文)

神経系における RNA 結合蛋白質 Musashi 2 の機能解析

研究課題名(英文)

Functional analysis of RNA-binding protein Musashi2 in the nervous system

研究代表者

桑子 賢一郎 (KUWAKO KEN-ICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30468475

研究成果の概要(和文)：

RNA 結合蛋白質 Musashi (Msi) は、*Robo3* mRNA に結合し、その翻訳を促進した。また、*Msi* 欠損マウスの小脳前核ニューロンでは、*Robo3* 蛋白質の発現量が顕著に減少した。さらに、*Msi* 欠損マウスでは、*Robo3* 欠損マウスと同じく、小脳前核ニューロンの軸索の正中線交差に著しい異常が認められた。本研究結果から、小脳前核ニューロンの軸索の正中線交差では、*Msi* による *Robo3* mRNA の翻訳制御が重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：

We demonstrate that the expression of Slit receptor Robo3 is regulated by a neural RNA-binding protein Musashi (Msi). Msi binds to *Robo3* mRNA and increases its translation. In *Msi*-deficient precerebellar neurons, Robo3 protein is dramatically reduced. Moreover, axonal midline crossing of precerebellar neurons are severely impaired in *Msi*-deficient mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経発生

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：RNA 結合蛋白質、神経回路形成

## 1. 研究開始当初の背景

近年、蛋白質の発現調節機構において、転写レベルでの調節だけでなく、複数の蛋白質の発現制御を迅速かつ同調的に行うことが可能な転写後発現調節が重要な

働きをすることが明らかにされてきている。転写後発現調節では、mRNA の非翻訳領域に含まれる制御配列およびその配列に特異的に結合する蛋白質群がそれぞれの遺伝子産物の生成・分解の時空間的調

節をしていると考えられているが、その詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。神経系においても様々なRNA結合蛋白質が同定されてきたが、特に神経発生過程での転写後発現調節機構の重要性はあまり明らかにされていなかった。Musashiファミリー蛋白質群は、ショウジョウバエの神経前駆細胞の非対称成分裂で機能する重要な因子として発見され、線虫などの無脊椎生物からマウス・ヒトをはじめとする高等脊椎生物にいたるまで高度に保存されている。これまでの研究からMusashiは神経幹細胞で高発現し、自己増殖能の維持に働くことが知られていたが、最近になって神経回路形成期の神経細胞でも広く発現していることが明らかになり、神経幹細胞での機能とは全く異なる働きを持つ可能性が示唆されていた。

## 2. 研究の目的

小脳辺縁系神経回路を形成する小脳前核神経細胞群に焦点を絞り、神経回路形成におけるMusashi蛋白質の機能を明らかにし、さらにMusashiの標的mRNAを同定して、その発現制御機構を解明することを目的とした研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) Musashi欠損マウスの小脳およびその辺縁系組織を免疫組織化学的手法や神経回路標識法を用いて、神経回路形成にどのような異常が起こっているかを解析した。

(2) これまで報告されている小脳辺縁系神経回路形成に異常を示す遺伝子欠損マウスとMusashi欠損マウスを比較し、Musashiの標的mRNAの候補を絞り込んだ。

(3) 種々の生化学的・分子生物学的実験に

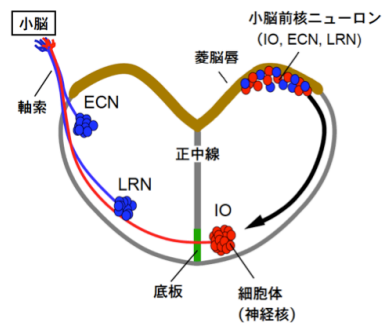
より、Musashiと標的RNAとの結合や、発現制御を解析した。

(4) 初代神経培養系において、Musashiまたはその標的分子の発現を変動させることで軸索誘導に異常が起こるかどうかを検討した。

(5) 標的mRNAとなる分子を欠損した遺伝子改変マウスとMusashi欠損マウスとの交配により、遺伝的相互作用を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 野生型マウスでは、神経発生期に、小脳前核神経細胞群 (IO, LRN, ECN) のすべての軸索は正中線を交差して小脳へと投射するが (図1)、Musashi欠損マウスではいずれの小脳前核神経細胞も軸索が正中線を交差できなくなっていた。



【図1】 胎生期後脳の断面図

小脳前核ニューロンは、後脳背側部の菱脳唇で誕生し、軸索を伸ばしながら底板に向かって移動し (黒矢印)、その軸索は正中線を交差して小脳へ投射する。

(2) Musashi欠損マウス的小脳前核神経細胞では、軸索誘導因子受容体Robo3蛋白質の発現が顕著に減少していた。しかし、Robo3 mRNAの発現量には変動はみられなかった。

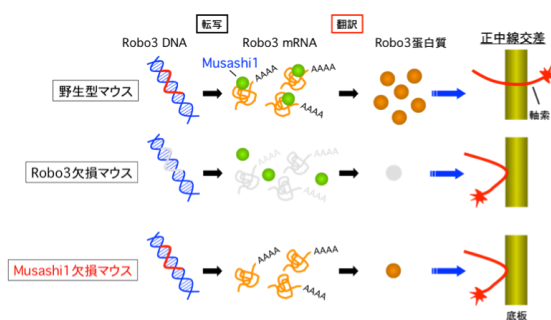
(3) *in vitro* 結合実験系により、Musashi蛋白質は、RNA認識モチーフを介してRobo3 mRNAに結合することが明らかになった。

(4)ポリソーム解析により Musashi が Robo3 の翻訳を促進する機能を持つことが明らかになった。

(5) Musashi 欠損マウスと Robo3 欠損マウスでは、小脳前核神経細胞が極めて類似した異常な構造を持った神経核を形成することが明らかになった。

(6) Musashi 欠損マウスと Robo3 欠損マウスでは遺伝的相互作用がみられ、Musashi 欠損マウスでの神経回路形成の異常が Robo3 の発現低下によるものであることが確認された。

<まとめ>



野生型マウス小脳前核ニューロンでは、Musashi が Robo3 mRNA に結合して翻訳を促進し、Robo3 の蛋白質量を増加させる。その結果、軸索は正中線を超えて小脳へ投射する。Musashi 欠損マウスでは、Robo3 mRNA の翻訳が促進されず、Robo3 の蛋白質量は減少する。そして、Robo3 欠損マウスと同様に、小脳前核ニューロンの軸索は正中線を超えることが出来なくなる。

本研究により、神経回路形成における転写後調節機構の重要性がはじめて明らかにされた。

## 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)

① Kuwako K., Kakumoto K., Imai T., Igarashi M., Hamakubo T., Sakakibara S., Tessier-Lavigne M., Okano H. J., Okano H. “Neural RNA-binding protein Musashi1 controls midline crossing of precerebellar neurons through post-transcriptional regulation of Robo3/Rig-1 expression.” *Neuron* 67, 407-421 (2010). 査読あり

② 桑子賢一郎、岡野栄之

“RNA 結合タンパク質 Musashi1 による Robo3 の転写後発現制御を介した軸索誘導機構”

文部科学省委託研究開発事業「統合データベースプロジェクト」ライフサイエンス新着論文レビュー(オンラインレビュー) 2010年 査読あり

[学会発表] (計 11 件)

① 桑子賢一郎

「Robo3 転写後調節による新規軸索誘導機構」第 3 3 回日本神経科学会・第 5 3 回日本神経化学会 (NEURO2010) (神戸コンベンションセンター) 2010年9月2日

② 桑子賢一郎、岡野栄之

「A possible mechanism for post-transcriptional regulation in axon guidance」第 4 回神経発生討論会(岡崎コンファレンスセンター) 2010年3月20日

③ 桑子賢一郎、岡野栄之

「神経軸索誘導における転写後調節の重要性」第 6 回慶應義塾大学先端科学技術シンポジウム ところを生み出す神経基盤の解明 (東京・慶應義塾大学) 2010年1月26日

④ Ken-ichiro Kuwako and Hideyuki Okano

「A role for RNA-binding protein Musashi1 in regulating the axonal midline crossing」36 th International Congress of Physiological Sciences (Kyoto) 2009年7月30日

⑤ 桑子賢一郎

「A possible mechanism for post-transcriptional regulation in the axon guidance」

第38回慶應ニューロサイエンス研究会（東京・慶應義塾大学）2009年3月14日

⑥ Ken-ichiro Kuwako and Hideyuki Okano

「A possible mechanism for post-transcriptional regulation in the axon guidance」

Keystone symposia 2009 (Keystone, Colorado, USA) 2009年2月19日

⑦ 桑子賢一郎、岡野栄之

「RNA-binding protein Musashi regulates the midline crossing of precerebellar neurons.」

JOINT FORUM (京大再生研、熊大発生研、慶應義塾大学・医、理化学研究所 CDB) (熊本大学発生研、グリーンピア南阿蘇) 2009年1月7日

⑧ 桑子賢一郎、岡野栄之

「RNA-binding protein Musashi regulates the midline crossing of precerebellar neurons.」

第31回日本分子生物学会（神戸）2008年12月9日

⑨ Ken-ichiro Kuwako 「A possible mechanism for post-transcriptional regulation in axon guidance」

The International Discussion Forum & the 242<sup>nd</sup> Tokyo Discussion Meeting of the Physiological Society of Japan (第242回日本生理学会東京談話会) (Tokyo) 2008年10月26日

⑩ Ken-ichiro Kuwako and Hideyuki Okano

「The role for RNA-binding protein Musashi in regulating the development of precerebellar neurons」 Cold Spring Harbor Laboratory meeting 2008 “Axon Guidance, Synaptogenesis & Neural Plasticity” (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA) 2008年9月12日

⑪ 桑子賢一郎、芝田晋介、岡野ジェームス 洋尚、岡野栄之

「小脳におけるRNA結合蛋白質Musashi2の機能解析」第31回日本神経科学会・第51回日本神経化学会 (NEURO2008) (東京) 2008年7月9日

〔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〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑子 賢一郎 (KUWAKO KEN-ICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30468475

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし