

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06894

研究課題名（和文）大脳皮質構築過程における選択的poly A付加反応制御の意義

研究課題名（英文）The importance of alternative polyadenylation during cortical development

研究代表者

宗宮 仁美（Soumiya, Hitomi）

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20548713

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：選択的ポリA付加反応を可視化するために、不安定化シグナルを付したVenusを付与し、ポリA付加部位（PAS）の評価ベクターを作製した。しかし、後ろの配列が長くなるほど蛍光強度が弱くなり、評価することができなかった。一方で、選択的ポリA付加反応の責任分子Xの変異体をマウス大脳皮質前駆体に遺伝子導入すると、細胞の挙動が変化することを明らかにした。また、Xの複合体形成変化を評価する系を作製し、神経分化に伴いXの複合体形成が変化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

選択的ポリA付加反応は遺伝子形状を変化させ、遺伝子発現の多様性を作り出す。分化した細胞ほど長い3' UTRを持つことが知られているが、その制御機構は明らかになっていない。本研究では、高次脳機能を司る大脳皮質構築過程に着目し、選択的ポリA付加反応の変動の挙動の一端を評価するツールを作製した。本ツールにより遺伝子発現の多様性が高次脳機能の出現を支える機構の一端を明らかにできると考えられる。

研究成果の概要（英文）： To visualize the alternative polyadenylation, we constructed vectors for polyadenylation site with destabilized Venus. However, the longer the back sequence, the weaker the fluorescence intensity became and could not be evaluated. The mutants of X, the molecule responsible for the alternative polyadenylation, altered the migration pattern of cortical progenitors. In addition, a system to evaluate the changes in complex formation of X was created, and it was revealed that the complex formation of X changes with neural differentiation.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質 選択的ポリA付加反応

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子 mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) には、miRNA や RNA 結合タンパク質の結合領域があり、mRNA の安定性/翻訳効率の調節を介して、多様な遺伝子発現を可能にする。近年、トランスクリプトーム解析から、発達障害者の (剖検) 脳では特徴的な mRNA 3' UTR 長の変調が示され (Szkop et al., *Front. Mol. Neurosci.*, 2017) また、知的障害患者の集団から 11 名から、選択的 poly A 付加反応により mRNA 3' UTR 長を制御する CFIm25 の遺伝子多型が発見され、エピジェネティクス制御因子 MeCP2 の 3' UTR 長の変動を介して、タンパク質量が増減することが報告された (Gennarino et al., *eLife*, 2015)。従って、mRNA 3' UTR 長の制御不全は、知的障害や発達障害の発症に関わると考えられるが、その詳細は不明である。神経発達障害の病態関連遺伝子の多くは、脳発達過程に深い関わりを持つ。つまり、脳組織構築/ネットワーク形成期において、神経前駆細胞の増殖、神経細胞への分化、細胞移動・定着、神経連絡の形成の各ステップを制御する遺伝子群である。一般に前駆細胞から神経細胞の分化過程において、長い 3' UTR を選択する遺伝子数が増加する。したがって、3' UTR 長制御は脳構築過程において重要な役割を果たすと考えられる。しかし、正常脳発達時の 3' UTR 長の変動が脳構築過程のいつどこでどのように制御され、何に影響を与えるのか不明である。

2. 研究の目的

本研究では、高次脳機能を司る大脳皮質の構築過程に焦点を絞り mRNA 3' UTR 長の時空間的な変化を可視化し、選択的ポリ A 付加反応の鍵分子 X の制御不全が大脳皮質構築過程に及ぼす影響を明らかにすることを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

(1) レポーター遺伝子を使用したポリ A シグナル (PAS) の選択強度の可視化

既報 (Jenal et al., *Cell*, 2012) に従い、レポーター遺伝子の下流に 2 つの poly A 付加シグナル配列 (PAS) で挟んだレプレッサー配列 [mixed leukemia lymphoma gene (MLL) 3' UTR] を挿入した発現ベクターの構築を行った。レポーター遺伝子として、短時間で発現が消失するように分解配列を付与した緑色蛍光タンパク質 Venus を用いた。

(2) 遺伝子 X 欠損 PC12 細胞株の作製

遺伝子 X 欠損 PC12 細胞を作製するため、CRISPR-Cas9 を用いて、遺伝子 X のエクソン 1 に変異を挿入し、クローニング後細胞をスクリーニングして遺伝子 X 株欠損 PC12 細胞株を樹立した。

(3) 選択的ポリ A 付加反応の変化が大脳皮質構築過程に及ぼす影響

. X 変異体の作製

X に変異を加え、大サブユニットと結合できないフォーム L 及び RNA と結合できないフォーム R を作製した。

. 子宮内エレクトロポレーション法

妊娠 14 日目の ddY マウスに 3 種混合麻酔を投与後、子宮筋を露出し、胎仔脳室内に各種ベクターと GFP 発現ベクターを大脳皮質前駆細胞へ遺伝子導入した。導入 2 日後、マウス胎仔を摘出し、GFP 陽性細胞の挙動を評価した。

(4) 神経分化に伴う遺伝子 X 複合体形成変化の評価

X は、小のサブユニット 2 つの大サブユニット a あるいは b と複合体を形成し、機能する。これらの複合体形成の変化を評価するため、NanoBit® を用いて評価系を作製した。そのベクターを神経細胞のモデル細胞である CAD 細胞へ遺伝子導入し、安定変異株を作製した。

4. 研究成果

(1) レポーター遺伝子を使用したポリ A シグナルの選択強度の可視化

既報通りに、ベクターを作製し、HEK293 細胞に遺伝子導入し、その発現を確認した。ウエスタンブロッティングにてその発現を確認できた。また、挿入する PAS 配列によりレポーター遺伝子の発現強度が異なることを見出した。しかし、選択的ポリ A 付加反応というより、PAS の発現の使用強度を評価することとなり、本来の目的とは異なる結果となった。また、このベクターをマウス胎仔大脳皮質前駆細胞に遺伝子導入したところ、レポーター遺伝子の Venus の蛍光を確認することができなかった。そこで、計画を変更し、レポーター遺伝子を緑色と赤色の蛍光タンパク質を使い分け、PAS の選択を評価しようとし、ベクターを構築した。赤色タンパク質の不安定化が難しく、緑色と赤色で同様の半減期をえることができなかったため、評価できなかった。そこで、ライブイメージは難しいが、smFP を用いた評価系を構築することとした。smFP-HA あるいは smFP-myc に不安定化シグナルを付与し、それをレポーター遺伝子として PAS 選択を評価するベクターの構築を行った。現在、このベクターを用いて、解析を進めている。

(2)(1)のベクターの評価に用いるため、Xの遺伝子欠損PC12細胞株の樹立を行った。CRISPR-Cas9を用いてPC12細胞のXのエクソン1にストップコドン複数個挿入した。スクリーニングを実施し、Xを完全欠損したPC12細胞株を樹立した(図1)。この細胞にNGFを添加したところ、神経突起伸長が認められなかった。また、この細胞では、大サブユニットbの発現が低下したものの、大サブユニットaの発現には変化が認められなかった。X発現ベクターを遺伝子Xの欠損PC12細胞株に遺伝子導入したところ、大サブユニットbの発現は一部戻ったものの、突起伸長は回復できなかった。PC12細胞はヘテロな細胞集団であるため、クローニングの際に突起伸長を起こしにくい細胞が選択されてしまった可能性も否定できず、さらなるX欠損株の樹立を行う予定である。

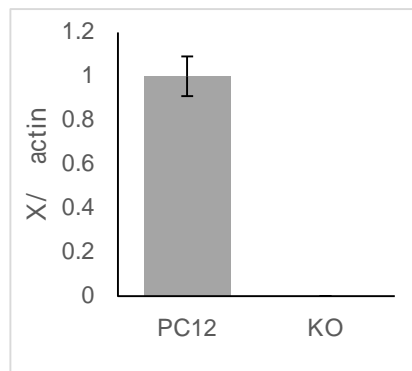


図1 遺伝子X KO細胞における遺伝子Xの発現

(3) 選択的ポリA付加反応の変化が大脳皮質構築過程に及ぼす影響

野生型、変異型L、変異型RとGFP発現ベクターをマウス大脳皮質前駆細胞へ遺伝子導入し、細胞の挙動を評価した。その結果、変異型Lは野生型に比して、細胞の移動が促進され、より上層へ細胞が位置取りしていた。

(4) 神経分化に伴う遺伝子X複合体形成変化の評価

選択的ポリA付加反応を可視化することが難しかったため、X複合体の動的変動を捉えることとした。そのため、NanoBiT®を用いて、それぞれの要素にsmBiTあるいはLgBiTを付与してタンパク質の相互作用をルシフェラーゼの活性で評価することを可能にした。それらのベクターをCAD細胞に遺伝子導入し、分化誘導の過程でのルシフェラーゼ活性の変化を評価した。その結果、CAD細胞の分化の過程で、ラージサブユニットとの結合割合が変化している可能性が示唆された。X複合体が神経分化の過程でサブユニットの形成を動的に変化させ、選択的ポリA付加反応を制御している可能性が示唆された。

引用文献

1. Szkop KJ, Cooke PIC, Humphries JA, Kalna V, Moss DS, Schuster EF, Nobeli I. Dysregulation of Alternative Poly-adenylation as a Potential Player in Autism Spectrum Disorder. *Front Mol Neurosci*. 2017 10:279.
2. Gennarino VA, Alcott CE, Chen C-A, Chaudhury A, Gillentine MA, Rosenfeld JA, Parikh S, Wheless JW, Roeder ER, Horovitz DDG, Roney EK, Smith JL, Cheung SW, Li W, Neilson JR, Schaaf CP, Zoghbi HY. NUDT21-spanning CNVs lead to neuropsychiatric disease and altered MeCP2 abundance via alternative polyadenylation. *eLife*. 2015;4:e10782.
3. The poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses alternative cleavage and polyadenylation sites. Jenal M, Elkon R, Loayza-Puch F, van Haften G, Kühn U, Menzies FM, Oude Vrielink JA, Bos AJ, Drost J, Rooijers K, Rubinsztein DC, Agami R. *Cell*. 2012 149(3):538-553.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Murasawa Hiroyasu, Kobayashi Hiroyuki, Imai Jun, Nagase Takahiko, Soumiya Hitomi, Fukumitsu Hidefumi	4. 巻 16
2. 論文標題 Substantial acetylcholine reduction in multiple brain regions of Mecp2-deficient female rats and associated behavioral abnormalities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0258830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0258830	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今井田詩織、大西諒司、宗宮仁美、福光秀文
2. 発表標題 哺乳類型mRNA前駆体開裂因子（CFIm）の代謝と選択的ポリA付加反応
3. 学会等名 第67回 日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2021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
---------	---------