

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07237

研究課題名(和文)細胞内mRNA輸送による有胎盤類の大脳皮質拡大メカニズムの解明

研究課題名(英文)A possible mechanism for enlargement of the cortex in placental mammals by the cellular mRNA transport system

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の脳は放射状グリア(RG)細胞の増殖・分化により形作られる。細胞周期因子CyclinD2のmRNAは3'UTR上の配列(CTE)依存的にRG細胞の基底膜突起末端まで輸送される。本研究ではCyclinD2 mRNAが突起先端部で局所翻訳された後、核内に移行して細胞周期を進める可能性を示した。CTE欠失マウスではCyclinD2 mRNAは輸送されず、大脳皮質が低形成となり、この現象が脳発生に重要であると考えられる。CTEは有胎盤類のみに保存され、鳥類や有袋類にはCTEが無くCyclinD2 mRNAも輸送されないことから、この現象が有胎盤類進化過程の大脳皮質発達に貢献した可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒトを含む有胎盤類の進化過程において、大脳皮質の拡大がどのようなメカニズムで起きたのかという未知の問いへアプローチすることを目的としている。本研究によって、独自に見出した神経幹細胞内CyclinD2 mRNA輸送の新たな生物学的意義を明らかにし、このユニークな機構が有胎盤類のみに存在することを発見した。本研究は、有胎盤類の脳進化メカニズムの一端を明らかにできた点で学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The vertebrate brain is formed by the proliferation and differentiation of radial glial (RG) cells. mRNAs of CyclinD2, a cell cycle regulator, are transported to the basal end-foot of the RG cell dependent on its 3'UTR "zip code" (cis-acting transport element, CTE). We found a basal-to-apical translocation of CyclinD2 proteins along the basal processes, indicating that CyclinD2 proteins in the basal end-feet will be transported to the nuclei to modulate the cell cycle progression. In CTE deleted mice, CyclinD2 mRNA no longer localized in the basal end-feet, and the cortical thickness was reduced. Interestingly, the CTE is only conserved in placental mammals among various vertebrates. Consistently, CyclinD2 mRNAs were not detected in the basal end-feet of the opossum, a marsupial mammal, nor in chick. The basal transport of CyclinD2 mRNA in the RG cells might be involved in forming a larger cortex of placental mammals.

研究分野：神経発生学

キーワード：放射状グリア細胞 細胞周期因子 mRNA 進化

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大脳皮質の発生過程では、放射状グリア細胞 (radial glia; RG) 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。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 RG 細胞として未分化性を維持することが知られている (Miyata et al., Neuron 2001)。

我々の研究室では、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、RG 細胞の基底膜側突起の末端部に局在することを発見した (Tsunekawa et al., EMBO J, 2012)。

また、核で転写された *CyclinD2* mRNA が基底膜側突起の末端部まで輸送されることや、*CyclinD2* mRNA の 3'UTR 領域に輸送に必要な約 50 bp の配列があることを明らかにしている (Tsunekawa et al., EMBO J, 2012)。研究代表者は、ゲノム編集技術によってこの mRNA 輸送配列を欠失させたマウスを作製し、RG 細胞における *CyclinD2* mRNA の輸送が阻害されるとともに、大脳皮質の厚みが減少することを明らかにした (図 1、研究代表者ら未発表)。興味深いことに、この輸送配列は哺乳類の中でもマウスやヒトなどの有胎盤類にのみ保存されており、同じ哺乳類の有袋類や、鳥類、爬虫類等では保存されていない。さらに、有袋類のオポッサムおよびニワトリの大脳原基では、内在性の *CyclinD2* mRNA は基底膜側突起に輸送されていなかった。一方、マウスの *CyclinD2* mRNA 輸送配列を付加した GFP レポーター遺伝子をオポッサムやニワトリの大脳原基で強制発現すると、基底膜突起に GFP の mRNA が輸送された。これらの結果から、鳥類と哺乳類の共通祖先にはすでに基底膜側突起に mRNA を輸送する機構があり、有胎盤類の進化過程において *CyclinD2* mRNA 輸送配列が獲得されたと考えられる。

RG 細胞における *CyclinD2* mRNA の基底膜側突起への輸送が、大脳皮質構築のどの過程に影響を与えるのか。これまでの研究から、RG 細胞に由来する Tbr2 陽性の中間増殖細胞は有胎盤類の大脳皮質原基にのみ認められ、有袋類や鳥類では Tbr2 陽性細胞は分化途中の幼若な神経細胞であることが示されている (Nomura et al., Development 2016、研究分担者の若松義雄准教授が参画)。したがって、基底膜側突起に輸送される *CyclinD2* mRNA が、有胎盤類の進化過程における大脳皮質の発達に貢献したと考えられる。

### 2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究課題では、ヒトを含む有胎盤類の進化過程において、大脳皮質の拡大がどのようなメカニズムで起きたのかを明らかにすることを目的としている。特に我々が見いだした神経幹細胞内における *CyclinD2* mRNA 輸送機構を起点として、有胎盤類の脳進化メカニズムを探る。

### 3. 研究の方法

#### (1) *CyclinD2* mRNA 輸送配列欠失変異マウスの解析

研究代表者はこれまでに、*CyclinD2* mRNA の輸送配列を欠失したマウスを作成している (図 1)。この変異体マウスと野生型マウスを用いて大脳皮質原基の転写因子 Tbr2 を発現する中間増殖細胞数を定量的に比較解析した。また、中間増殖細胞が大脳皮質の神経細胞の中でも特定のサブタイプを積極的に産生することが知られており (Kowalczyk et al., Cereb Cortex, 2009)、大脳皮質の完成する生後 10 日においてどのような神経細胞の産生が影響を受けているのかを観察した。

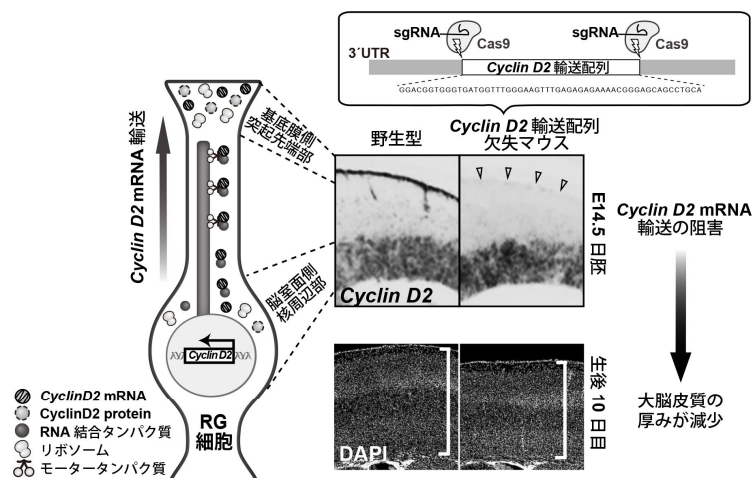


図 1. RG 細胞内における *CyclinD2* mRNA 輸送は大脳皮質構築に影響を与える

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 領域の約 50bp にわたる認識配列が必要で、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する。

## (2) RG 細胞における CyclinD2 タンパク質の動態の解析

RG 細胞の基底膜突起先端部へ輸送された *CyclinD2* mRNA は、局所的に翻訳された後、そのタンパク質が核内に移行し、細胞周期を G1 期から S 期に進める働きをもつと予想される。しかし、このことはまだ証明されておらず、RG 細胞における *CyclinD2* タンパク質の動態は明らかでない。そこで、サンゴの 1 種であるキクメイシ由来の緑色蛍光タンパク質 (Kikume Green-Red; KikGR) が紫外光照射により赤色蛍光タンパク質に変化する特徴を利用した(図 2)、3'UTR 領域を含むマウス *CyclinD2* に KikGR を繋いだ発現ベクターを子宮内電気穿孔法を用いて RG 細胞に導入した。その後、大脳皮質原基をスライス培養し、共焦点顕微鏡を用いて RG 細胞の基底膜突起先端部に局所的に紫外線を照射して、緑色から赤色に変化した KikGR-CyclinD2 融合タンパク質をライブイメージングにより追跡した。

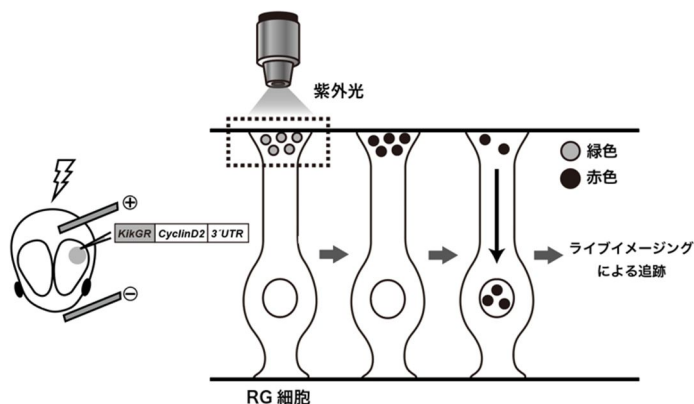


図 2. RG 細胞における *CyclinD2* タンパク質の動態の解析手法

## (3) 非有胎盤類に *CyclinD2* を基底膜突起に強制的に輸送させた場合の影響

非有胎盤類 (ニワトリおよびオポッサム) に 3'UTR 領域を含むマウス型 *CyclinD2* を導入して中間増殖細胞の増殖性を調べる前実験として、まずは有胎盤類 (マウス) にマウス型の *CyclinD2* を導入する実験を行った。具体的には 3'UTR を含む *CyclinD2* の発現ベクターを作製し、マウス胎仔脳室内に注入し、子宮内電気穿孔法を用いてマウス RG 細胞に導入し、その後 *Tbr2* 陽性の中間増殖細胞の増殖性を定量した。

## 4. 研究成果

### (1) *CyclinD2* mRNA 輸送配列欠失変異マウスの解析

*CyclinD2* mRNA 輸送配列欠失マウスの大脳皮質における中間増殖細胞を定量的に比較解析した。特に中間増殖細胞が多く見られる胎齢 18.5 日の内側領域において、*Tbr2* 陽性中間増殖細胞が減少していた。この結果から、*CyclinD2* mRNA 輸送阻害によって、中間増殖細胞の産生に影響を与えることが明らかとなった。

生後 10 日において、大脳皮質の層特異的神経細胞マーカーを用いて、各層の神経細胞層の厚みを計測した。その結果、*CyclinD2* mRNA 輸送配列欠失マウスの大脳皮質全体の厚みが減少していたが、特に *Cux1* 陽性の上層神経細胞層の厚さが有意に減少していた。

これらの結果から RG 細胞の *CyclinD2* mRNA 輸送が中間増殖細胞の産生を介して、大脳皮質の上層神経細胞の発生を制御する可能性が示唆された。

### (2) RG 細胞における *CyclinD2* タンパク質の動態の解析

まずは KikGR を基底膜突起先端部特異的に紫外光照射によって光変換できるかどうかを観察した。マウス胎齢 13.5 日にマウス *CyclinD2* に KikGR を繋いだ発現ベクターに導入し、1 日後に大脳皮質原基スライスを作成して、RG 細胞の基底膜突起先端部に局所的に紫外線を照射した。その結果、基底膜突起と突起先端部での赤色蛍光タンパク質のシグナルを観察することができた。

次に、光変換による赤色 KikGR-CyclinD2 融合タンパク質をライブイメージングによって追跡を行ったところ、基底膜側突起末端の赤色シグナルが基底膜突起内を頂端膜側へと移動する様子を観察することができた。この結果から、基底膜側突起末端で局所翻訳された *CyclinD2* タンパク質が核方向へと輸送される可能性が考えられる。以上より、RG 細胞の基底膜突起先端部へ輸送された *CyclinD2* mRNA は、局所的に翻訳された後、そのタンパク質が核内に移行し、細胞周期を G1 期から S 期に進める可能性が示唆された。

### (3) 非有胎盤類に *CyclinD2* を基底膜突起に強制的に輸送させた場合の影響

目的の前実験として、有胎盤類 (マウス) の胎齢 13.5 日においてマウス型 *CyclinD2* を導入し、その 2 日後に *Tbr2* および分裂期マーカーのリン酸化ヒストン (PH3) の二重免疫染色を行い、*Tbr2* 陽性中間増殖細胞の増殖性について定量的に計測した。その結果、*Tbr2* 陽性の細胞集団が存在する subventricular zone 周辺において PH3 および *Tbr2* 二重陽性細胞の割合が増加した。この結果から、*CyclinD2* が *Tbr2* 陽性細胞の増殖性の制御する可能性が示唆された。

現在、細胞内 mRNA 輸送による有胎盤類の大脳皮質拡大メカニズムを明らかにするために、

オポッサムおよびニワトリ胚の脳皮質において、マウス型の CyclinD2 を強制発現させ、Tbr2 陽性中間増殖細胞の増殖や脳皮質のニューロン産生に与える影響について解析を行っている。

<引用文献>

Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R.A., Bedogni, F., Hodge, R., Attardo, A., Bell, C., Huttner, W.B., and Hevner, R.F. (2009). Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb Cortex* 19, 2439-2450.

Miyata, T., Kawaguchi, A., Okano, H., and Ogawa, M. (2001). Asymmetric inheritance of radial glial fibers by cortical neurons. *Neuron* 31, 727-741.

Nomura, T., Ohtaka-Maruyama, C., Yamashita, W., Wakamatsu, Y., Murakami, Y., Calegari, F., Suzuki, K., Gotoh, H., and Ono, K. (2016). The evolution of basal progenitors in the developing non-mammalian brain. *Development* 143, 66-74.

Tsunekawa, Y., Britto, J.M., Takahashi, M., Polleux, F., Tan, S.S., and Osumi, N. (2012). Cyclin D2 in the basal process of neural progenitors is linked to non-equivalent cell fates. *The EMBO journal* 31, 1879-1892.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Nagai Masayoshi, Iemura Kenji, Kikkawa Takako, Naher Sharmin, Hattori Satoko, Hagihara Hideo, Nagata Koh-ichi, Anzawa Hayato, Kugisaki Risa, Wanibuchi Hideki, Abe Takaya, Inoue Kenichi, Kinoshita Kengo, Miyakawa Tsuyoshi, Osumi Noriko, Tanaka Kozo	4. 巻 4
2. 論文標題 Deficiency of CHAMP1, a gene related to intellectual disability, causes impaired neuronal development and a mild behavioural phenotype	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Communications	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) 10.1093/braincomms/fcac220	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 -
1. 著者名 Ochi Shohei, Manabe Shyu, Kikkawa Takako, Osumi Noriko	4. 巻 23
2. 論文標題 Thirty Years' History since the Discovery of Pax6: From Central Nervous System Development to Neurodevelopmental Disorders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6115 ~ 6115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23116115	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 -
1. 著者名 Kikkawa Takako, Osumi Noriko	4. 巻 15
2. 論文標題 Multiple Functions of the Dmrt Genes in the Development of the Central Nervous System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 789583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.789583	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 -
1. 著者名 Kanlayaprasit Songphon, Thongkorn Surangrat, Panjabud Pawinee, Jindatip Depicha, Hu Valerie W., Kikkawa Takako, Osumi Noriko, Sarachana Tewarit	4. 巻 22
2. 論文標題 Autism-Related Transcription Factors Underlying the Sex-Specific Effects of Prenatal Bisphenol A Exposure on Transcriptome-Interactome Profiles in the Offspring Prefrontal Cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13201 ~ 13201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222413201	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 該当する

1. 著者名 Kimura Ryuichi, U. Inoue Yukiko, Kikkawa Takako, Tatehana Misako, Morimoto Yuki, Inada Hitoshi, Oki Shinya, Inoue Takayoshi, Osumi Noriko	4. 巻 251
2. 論文標題 Detection of REST expression in the testis using epitope tag knock in mice generated by genome editing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 525 ~ 535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.417	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 Thongkorn Surangrat, Kanlayaprasit Songphon, Panjabud Pawinee, Saeliw Thanit, Jantheang Thanawin, Kasitipradit Kasidit, Sarobol Suthathip, Jindatip Depicha, Hu Valerie W., Tencmnao Tewin, Kikkawa Takako, Sato Tatsuya, Osumi Noriko, Sarachana Tewarit	4. 巻 11
2. 論文標題 Sex differences in the effects of prenatal bisphenol A exposure on autism-related genes and their relationships with the hippocampus functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-020-80390-2	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 該当する

1. 著者名 Yoshizaki Kaichi, Kimura Ryuichi, Kobayashi Hisato, Oki Shinya, Kikkawa Takako, Mai Lingling, Koike Kohei, Mochizuki Kentaro, Inada Hitoshi, Matsui Yasuhisa, Kono Tomohiro, Osumi Noriko	4. 巻 22
2. 論文標題 Paternal age affects offspring via an epigenetic mechanism involving REST/NRSF	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	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) 10.15252/embr.202051524	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 -

1. 著者名 Casingal Cristine R., Kikkawa Takako, Inada Hitoshi, Sasaki Yukio, Osumi Noriko	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification of FMRP target mRNAs in the developmental brain: FMRP might coordinate Ras/MAPK, Wnt/ -catenin, and mTOR signaling during corticogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	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) 10.1186/s13041-020-00706-1	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 -

1. 著者名 Yamada Yo, Yoshikawa Takeo, Naganuma Fumito, Kikkawa Takako, Osumi Noriko, Yanai Kazuhiko	4. 巻 175
2. 論文標題 Chronic brain histamine depletion in adult mice induced depression-like behaviours and impaired sleep-wake cycle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 108179 ~ 108179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2020.108179	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11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件)

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 放射状グリア細胞内のmRNA-タンパク輸送ダイナミクスとその進化的意義
3. 学会等名 第128回日本解剖学会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kikkawa, T., Wakamatsu, Y., Inoue, YU., Suzuki, K., Inoue, T., Osumi, N.
2. 発表標題 Evolution of an mRNA transport mechanism in radial glial cells by acquisition of a unique zip code sequence in placental mammals
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kikkawa, T., Wakamatsu, Y., Inoue, YU., Inoue, T., Osumi, N.
2. 発表標題 Basal transport of Ccnd2 mRNA in radial glial cells is important for the production of basal progenitors in the developing mouse cortex
3. 学会等名 24th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2022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 有胎盤類特有のzip code配列獲得による放射状グリア細胞内mRNA輸送機構の進化
3. 学会等名 第127回日本解剖学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kikkawa, T., Casingal, RC, Inoue, YU., Ebrahimiazar, S, Inada, H., Osumi, N.
2. 発表標題 Identification of FMRP target mRNAs in the developmental brain: FMRP might coordinate mTOR signaling during corticogenesis.
3. 学会等名 7th Congress of AsCNP (国際学会)
4. 発表年 2021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 放射状グリア細胞における細胞周期因子Cyclin D2のmRNA輸送機構の解析：有胎盤類の大脳皮質拡大に寄与する可能性
3. 学会等名 日本解剖学会 第67回東北・北海道連合支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kikkawa, T., Wakamatsu, Y., Inoue, YU., Inoue, T., Osumi, N.
2. 発表標題 Cyclin D2 mRNA and protein transport along the basal process of radial glial cells during brain development.
3. 学会等名 The 80th Fujiwara seminar “Molecular and cellular mechanisms of brain systems generating individuality” (国際学会)
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 Kikkawa, T., Wakamatsu, Y., Inoue, YU., Inoue, T., Osumi, N.
2. 発表標題 Transport mechanisms of Cyclin D2 mRNA and protein along the basal process of neural stem/progenitor cells of the developing brain.
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kikkawa, T., Wakamatsu, Y. Inoue U, Kunihiro Suzuki, Inoue, T., Osumi, N.
2. 発表標題 Analysis of mRNA transport mechanisms of a cell cycle regulator Cyclin D2 in radial glial cells: a possible mechanism of enlargement of the cortex in placental mammals.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kikkawa, T., Wakamatsu, Y. Inoue U, Inoue, T., Osumi, N.
2. 発表標題 Transport mechanisms of Cyclin D2 mRNA along the basal process of neural stem/progenitor cells of the developing brain.
3. 学会等名 EMBO   EMBL Symposium: The Complex Life of RNA (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川貴子、Cristine Casingal、Sharmin Naher、井上-上野由紀子、井上高良、大隅典子
2. 発表標題 胎生期の神経前駆細胞内におけるmRNA調節メカニズム
3. 学会等名 NPBPPP 2020合同年会 (招待講演)
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
研究 分担 者	若松 義雄  (Wakamatsu Yoshio)  (60311560)	東北大学・医学系研究科・准教授   (11301)	

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
---------	---------