

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15913

研究課題名（和文）小脳発達を駆動するアルギニンメチル化基質の同定・機能解析

研究課題名（英文）Mechanistic analyses how arginine methylation drives cerebellar development

研究代表者

橋本 美涼（Hashimoto, Misuzu）

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：80805424

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）：タンパク質アルギニンメチル化を担う酵素：PRMT1はターゲットのメチル化により遺伝子発現や細胞増殖等の制御を担う。PRMT1は脳の発達に重要であることもわかってきたが、運動機能を担う小脳における機能は不明だった。本研究では、小脳の神経細胞の一つである顆粒細胞におけるPRMT1欠損が小脳の発達に与える影響をマウスで調べた。組織学的解析の結果、顆粒細胞の前駆細胞がPRMT1欠損で増殖低下しその後成熟してくる顆粒細胞が減少した。また行動観察からPRMT1欠損で運動機能異常を引き起こすことがわかった。以上よりPRMT1が小脳の構造的及び機能的発達に必須であ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

小脳は運動機能、情動、認知機能など脳の主要機能の一部を司り、近年では小脳の発達障害と自閉症との関連も着目されている。本研究は、タンパク質アルギニンメチル化を担う酵素：PRMT1が小脳顆粒細胞に強く発現することからその発達における機能に着目した。小脳機能を担う顆粒細胞で特異的にPRMT1を欠損したマウスを作製し解析した結果、小脳が小さく特に顆粒細胞の成熟が著しく低下することや運動機能異常を呈することが判明した。本研究結果はPRMT1が正常な小脳発達に必須の遺伝子であることを示しており、今後はPRMT1の小脳における標的分子の探索とともに、その小脳疾患との関係性の解明が必要である。

研究成果の概要（英文）：PRMT1, a major arginine methyltransferase, plays critical roles in regulation of gene expression or cell proliferation. Although increasing number of studies demonstrate essential roles of PRMT1 in the brain development, its specific role in the cerebellum has not been studied yet.

Here, we have made a new genetically modified mice which lack Prmt1 gene specifically in the cerebellar granule cells, which is one of the major neuronal types in the cerebellum. Histological analysis of the cerebellar tissues revealed that PRMT1-knockout animals had severe defects in granule cell development at postnatal stages, peak of the cerebellar. Loss of PRMT1 affected proliferation of precursor of granule neurons, suggesting that PRMT1 positively regulates their proliferation. Furthermore, we have found that PRMT1 deficient mice has motor defects. Our results demonstrate that PRMT1 is essential for the cerebellar development by regulation of granule cell development.

研究分野：動物生化学

キーワード：アルギニンメチル化 小脳 小脳発達 顆粒細胞

1. 研究開始当初の背景

小脳は運動や平衡感覚などの機能を司っており、それを支えているのが顆粒細胞などのニューロンである。小脳顆粒細胞は、生後に顆粒細胞前駆細胞 (GCP) が小脳外顆粒層で活発に増殖して数を増やし、その後移動して小脳組織内に配置され神経機能を発揮する (図1)。GCP の増殖は Shh (ソニックヘッジ・ホッグ) シグナル下流の転写因子群が制御しており、それらはさまざまな翻訳後修飾を受けているが、それら修飾が GCP 増殖に与える影響は不明であった。

2. 研究の目的

申請者は翻訳後修飾の一つであるタンパク質アルギニンメチル化を担う主要な酵素 PRMT1 の脳特異的欠損マウス (nKO マウス) の解析から、PRMT1 欠損で GCP 増殖が抑制されることを見出していた (未発表)。さらに PRMT1 が Shh シグナル下流分子をメチル化する結果も得られた (未発表) ことから、PRMT1 によるアルギニンメチル化は Shh シグナル制御により GCP 増殖を制御することが推察された。そこで本研究では、PRMT1 が GCP 増殖制御により小脳発達を制御する可能性を明らかにすることを目的とした (図1)。

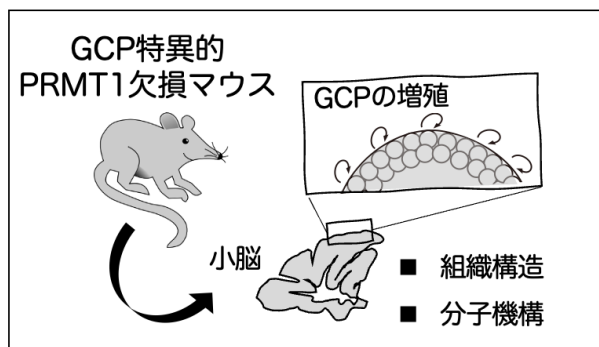


図1. PRMT1が担う小脳発達機構の制御を目指して

3. 研究の方法

(1) GCP 特異的 PRMT1 欠損マウス (CKO マウス) の作製 (図2)

以前より解析してきた nKO マウスは脳全体での PRMT1 欠損のため、GCP 増殖異常に寄与する細胞種は不明だった。そこで、Prmt1^{flx/flx} マウス (現在維持中) と Atoh1-Cre マウス (Jackson lab. より購入) の交配で GCP 特異的 PRMT1 欠損マウス (CKO マウス) を作製する。また、体重測定や行動観察などにより、GCP での PRMT1 欠損が個体の成長や運動機能に与える影響を評価する。

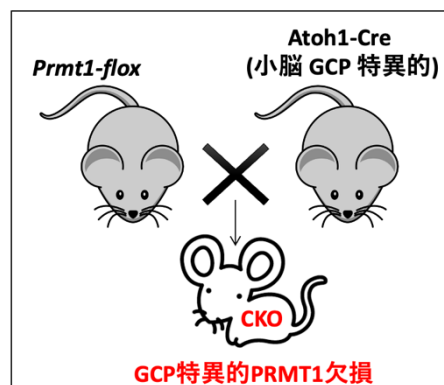


図2. GCP特異的PRMT1欠損マウス (CKOマウス) の作製

(2) CKO マウスにおける小脳組織構造と顆粒細胞増殖能の評価

上記で作製した CKO マウスの小脳を発達段階に応じて組織学的解析を行う。具体的には、GCP の増殖が活発である生後8日目や小脳発達の完了期である生後21日目において、GCP の増殖、顆粒細胞の配置、プルキンエ細胞 (ニューロン) の形態や分布などを免疫組織化学などで評価する。GCP 増殖能評価のため、生後8日目マウスに 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を投与し、24 時間後に採材した小脳組織を用いて抗 BrdU 抗体で免疫染色をおこなう。

(3) GCP 特異的 PRMT1 欠損が小脳発達に与える影響の分子レベルでの評価

CKO マウス小脳より total RNA やタンパク質を抽出し、細胞増殖や小脳発達を司る遺伝子の発現を qRT-PCR やウェスタンブロットで調べる。

4. 研究成果

(1) GCP 特異的 PRMT1 欠損マウス (CKO マウス) の作製

CKO マウスは順調に生育し、体重や体格の巨視的な変化は認められず、ホモ欠損マウスを親として用いた繁殖も可能であった (図3)。しかし、生後2週間付近より四肢の震えや歩行異常、

挙尾の様子が見られ、運動機能障害を呈することが判明した (図3)。tail suspension test では後肢を腹部に向かって縮める様子 (小脳失調を示す指標の一つ) は観察されず、コントロールマウスと同様に後肢を開いた (図3)。挙尾反応の原因は不明であるが、マウスをカップ内に移動させた直後によく観察され、全身のバランスを保つための反応と推測している。

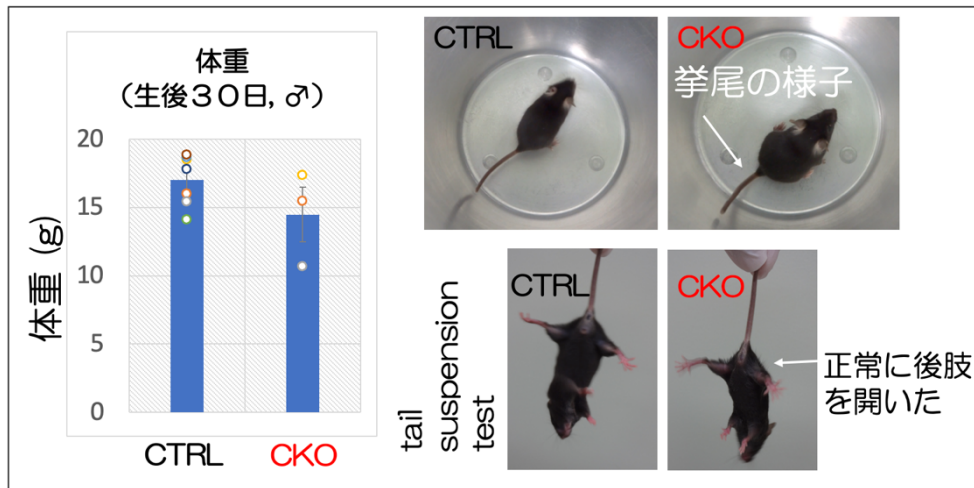


図3. CKOマウスの表現型解析

(2) CKO マウスにおける小脳組織構造と顆粒細胞増殖能の評価

本研究に使用した *Atoh1-Cre* マウスは小脳の吻側で強く *Cre* を発現することから、小脳全体のうち、*PRMT1* を欠損している吻側と、*PRMT1* を欠損していない尾側とで *PRMT1* 欠損の影響を調べた。CKO マウス小脳ではGCPの増殖が著しく低下しており、小脳の吻側が萎縮している様子が観察された (図4上)。CKO では小脳重量の低下が起きていた (図4下)。

CKO マウスにおける小脳顆粒細胞の増殖能を評価するため、*in vivo* BrdU assay による増殖細胞の検出、および *NeuN* と細胞周期のうち休止期 (G0) 以外の全ての細胞周期 (G1期、S期、G2期、M期) において発現し増殖細胞マーカーとして知られる *Ki67* の免疫染色を行なった。吻側に位置する第IV/V小葉、および尾側に位置する第VIII小葉の2つの部位において比較を行なった (図5A)。コントロールマウスでは外顆粒層において *BrdU* 陽性細胞が見られたが、CKO マウス第IV/V小葉中では *BrdU* 陽性細胞がほとんど見られず、*BrdU* 陽性細胞数、*BrdU* 陽性細胞密度は著しく減少していた (図5B, C)。一方で、CKO マウス第VIII小葉中の *BrdU* 陽性細胞数、*BrdU* 陽性細胞密度はコントロールマウスと同程度であった (図5B, C)。

また、*NeuN* 陽性細胞密度は、第IV/V小葉だけでなく、第VIII小葉においても減少が見られた (図5D)。増殖細胞マーカー *Ki67* の免疫染色の結果においても、*PRMT1^{Atoh1}* CKO マウス第IV/V小葉では *Ki67* 陽性細胞がほとんど見られなかったが、第VIII小葉は *Ki67* 陽性細胞がコントロー

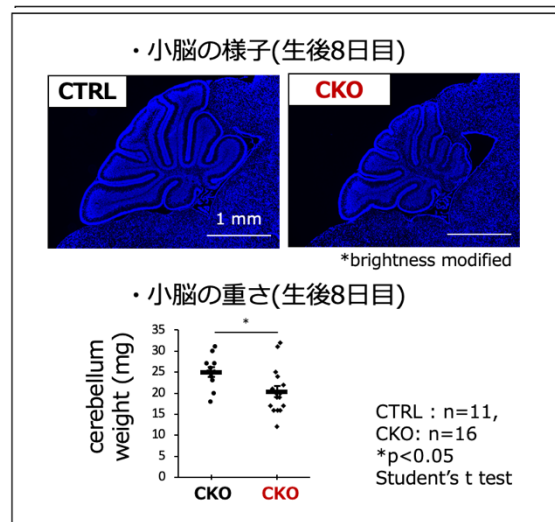


図4. CKOマウス小脳は吻側小葉の発達異常を呈する

ルマウスと同程度存在しており、*in vivo* BrdU assay の結果を支持した (図 5 D)。

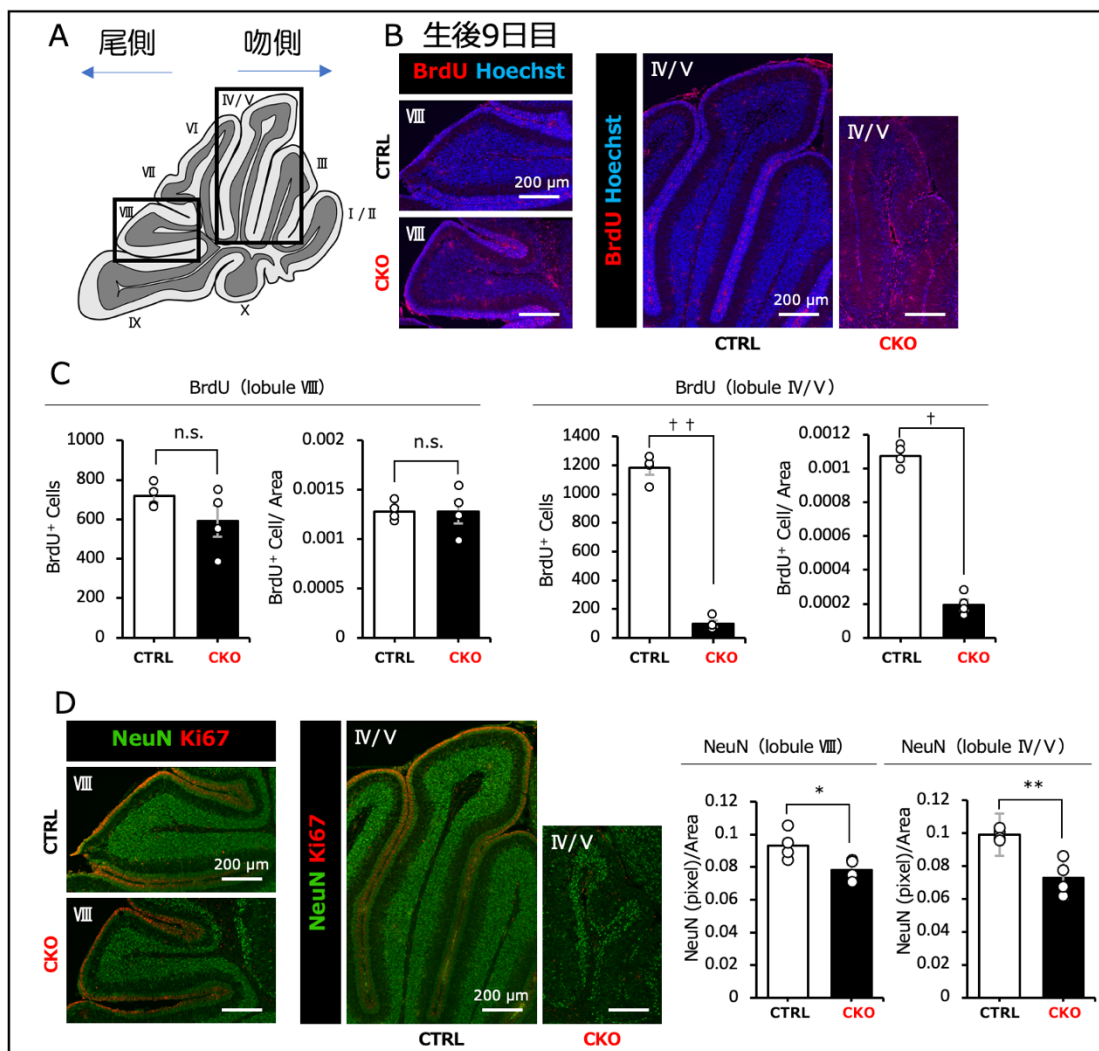


図5. CKOマウスではGCP増殖能が低下している

また、CKO では NeuN 陽性の成熟顆粒細胞の細胞数が少ないことや、異所的な NeuN の発現が認められたことから顆粒細胞の移動や成熟にも異常があることがわかった (図 5 D)。

さらに、顆粒細胞と相互作用し発達することが知られるプルキンエ細胞 (ニューロン) から成る細胞層について、抗 Calbindin 抗体を用いた免疫染色の結果、CKO 吻側で Calbindin 陽性細胞の大きな乱れが認められたが CKO 尾側では正常な層構造が観察された (図 6)。一方で小葉あたりのプルキンエ細胞数は CKO で変化がなかったことから、GCP における PRMT1 欠損はプルキンエ細胞の産生には影響がなく、顆粒細胞の密度が低下することにより副次的にプルキンエの配置異常が起きたと考えられた (図 6)。

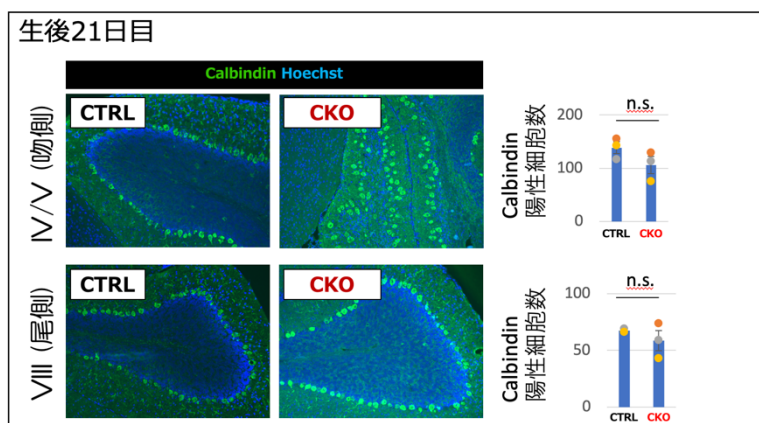
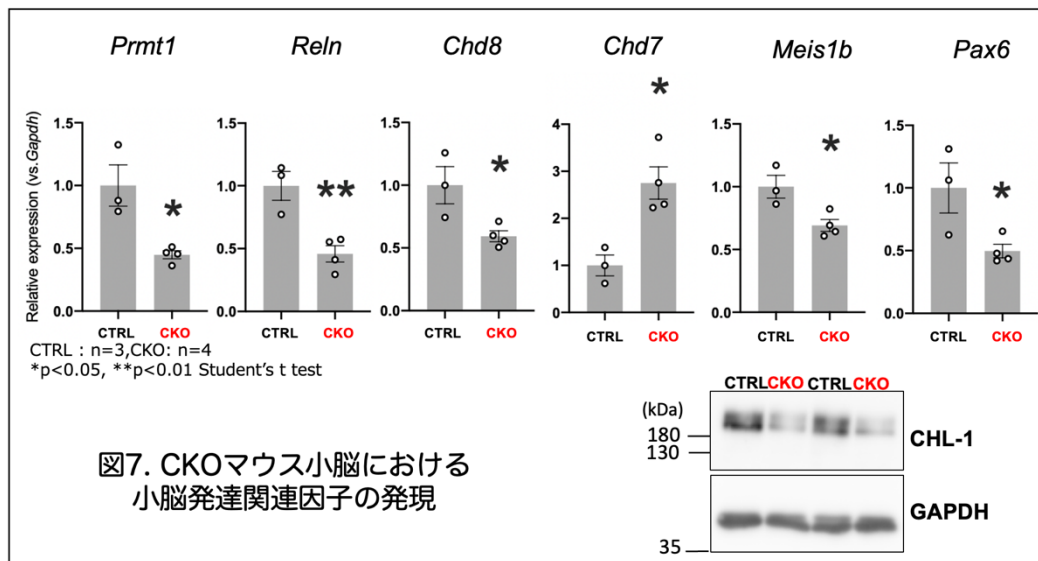


図6. CKOマウス小脳ではプルキンエ細胞層が乱れている

(3) GCP 特異的 PRMT1 欠損が小脳発達に与える影響の分子レベルでの評価

以上の結果から PRMT1 が GCP の増殖・移動・分化などを制御することで小脳の発達を制御することが考えられたため、これらを制御する小脳発達関連因子の発現を CKO 小脳で調べた。生後 8 日目小脳を用いた qRT-PCR の結果、ヒトやマウスでホモ接合変異により小脳低形成が観

察される *Reln* 遺伝子の発現が CKO 小脳で 1/2 程度に低下していた (図 7)。*Reln* 遺伝子を欠損した *Reeler* マウスでは CKO マウスと類似の歩行異常を示すことから、CKO マウスにおける歩行異常は *Reln* の低下で説明できる可能性が考えられた。一方 *Reln* の遺伝子発現を制御する



クロマチン制御因子 *Chd7*についてはCKOでむしろ上昇していたため、CKOにおいて*Reln*の発現を低下させる別の仕組みがあるか*Reln*発現細胞自体の減少によるものかと考えられた (図7)。さらに、GCPの増殖や分化を制御するクロマチン制御因子*Chd8*や*Shh*シグナル下流でGCPの増殖や分化を制御する*Meis1b*や*Pax6*もCKO小脳で有意に低下していた(図7)。ウェスタンブロットによりGCPの増殖や移動に寄与する細胞接着因子CHL-1が生後21日目CKO小脳で低下していた(図7)。以上より、小脳の発達を正に制御する複数の遺伝子について、PRMT1欠損で有意な発現低下が認められ、これらがCKOにおけるGCP発達異常を誘導したことが考えられた。またこれらは小脳組織全体での発現変動であるため、PRMT1を欠損した吻側小葉ではより顕著な遺伝子発現変化が起きている可能性がある。

本研究から、PRMT1は小脳GCPの増殖を制御し、生後小脳の発達を支持することが判明した。さらに、PRMT1はGCPの増殖だけでなく移動や成熟にも重要であり、それらはリーリングシグナルや*Shh*シグナルを介する可能性が示唆された。本研究の発展により、小脳関連疾患や小脳の低形成が起きる自閉症などの疾患メカニズムの解明につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto Misuzu, Kumabe Ayako, Kim Jun Dal, Murata Kazuya, Sekizar Sowmya, Williams Anna, Lu Weizhe, Ishida Junji, Nakagawa Tsutomu, Endo Mitsuharu, Minami Yasuhiro, Fukamizu Akiyoshi	4. 巻 156
2. 論文標題 Loss of PRMT1 in the central nervous system (CNS) induces reactive astrocytes and microglia during postnatal brain development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	6. 最初と最後の頁 834 ~ 847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15149	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 該当する

1. 著者名 Hashimoto Misuzu, Fukamizu Akiyoshi, Nakagawa Tsutomu, Kizuka Yasuhiko	4. 巻 1865
2. 論文標題 Roles of protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in brain development and disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129776 ~ 129776
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2020.129776	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 Hashimoto Misuzu, Takeichi Kaho, Murata Kazuya, Kozakai Aoi, Yagi Atsushi, Ishikawa Kohei, Suzuki-Nakagawa Chiharu, Kasuya Yoshitoshi, Fukamizu Akiyoshi, Nakagawa Tsutomu	4. 巻 16
2. 論文標題 Regulation of neural stem cell proliferation and survival by protein arginine methyltransferase 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	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) 10.3389/fnins.2022.948517	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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本美涼、金俊達、村田知弥、中川真、深水昭吉
2. 発表標題 PRMT1欠損は生後の脳においてアストロサイトやミクログリアの活性化を引き起こす
3. 学会等名 第85回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤彩夏、石川 康平、篠田 健人、橋本 美涼、木塚 康彦、中川 寅
2. 発表標題 アルギニンメチル化酵素PRMT1は小脳顆粒細胞の発達を制御する
3. 学会等名 第87回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤彩夏、石川 康平、篠田 健人、橋本 美涼、木塚 康彦、中川 寅
2. 発表標題 アルギニンメチル化酵素PRMT1は生後マウスにおいて小脳顆粒細胞の発達を制御する
3. 学会等名 第66回 日本神経化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 橋本美涼
2. 発表標題 脳発達に寄与するアルギニンメチル化コードの解明
3. 学会等名 筑波大学開学50周年記念TARAシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

橋本美涼研究紹介ウェブサイト
<https://sites.google.com/view/hashimotogroup/home?authuser=0>

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