

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16463

研究課題名（和文）樹状突起における局所翻訳が高次脳機能に果たす役割の解明

研究課題名（英文）Roles of dendritic local translation on higher-order brain functions

研究代表者

大橋 りえ（Ohashi, Rie）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・助教

研究者番号：40867529

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）：神経樹状突起へのmRNA輸送と局所タンパク質合成（翻訳）はシナプス長期増強に必須であるが、輸送されるmRNAの種類や、それらの翻訳産物の脳機能制御に関する知見は限定的である。本研究では、独自の方法で同定した局所翻訳新規候補遺伝子群Arf GEF、GAPファミリーに着目した。このうち1種類のArf GEFについて樹状突起へのmRNA輸送責任領域の同定に成功し、この領域の欠損マウスを作出した。このマウスはシナプス長期増強の指標であるAMPA受容体細胞表面提示は正常であったが、スパイン形成が顕著に低下した。よって、このArf GEFのmRNA樹状突起局在化はスパイン形成に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞における局所翻訳の研究分野では一部のmRNAのみが着目されてきたが、樹状突起局在化mRNAは他にも多数存在する。本研究では、長期記憶が低下するマウスの樹状突起においてmRNA局在が顕著に低下するものの、これまで局所翻訳との関連が不明であったArf GEF/GAPファミリーに着目した。よって、局所翻訳を介した新たな高次脳機能制御機構の解明に繋がると期待される。また、特定のmRNAの細胞体での翻訳は維持したまま樹状突起輸送のみを低下させたマウスの作出に成功した。今後、任意のタイミングでmRNA輸送を回復させる等の発展が考えられ、局所翻訳の時空間制御機構解明の足掛かりになると期待される。

研究成果の概要（英文）：mRNA transport and local translation in dendrites play a crucial role in long-term synaptic potentiation. However, our understanding of the specific mRNAs that undergo dendritic transport and how their translation products regulate higher-order brain function is limited. In this study, I investigated the Arf GEF/GAP family mRNAs as novel candidates for local translation, which were identified as dendritic mRNAs using our unique methods. Among these candidates, I successfully identified the responsible region for dendritic transport in a specific Arf GEF mRNA and generated mice with a deletion in this region. Although the cell surface expression of AMPA receptors was unaffected, the deletion mice exhibited a significant reduction in spine formation. These findings suggest that the dendritic localization of this Arf GEF mRNA is involved in spine formation.

研究分野：神経細胞生物学

キーワード：局所翻訳 mRNA輸送 樹状突起 高次脳機能 Arf GEF, GAPファミリー 3' UTR

1. 研究開始当初の背景

神経樹状突起への mRNA 輸送とそれに伴う局所翻訳は、長期記憶の基盤となるシナプス長期増強に必須の制御機構として知られている (Kang and Schuman, *Science*, 1996) (図 1)。しかし、輸送される mRNA の種類や、それらの翻訳産物がどのように高次脳機能を制御するのかという知見は限定的であった。申請者はこれまでに、高次脳機能に関与することが既知の RNA 結合タンパク質 RNG105 依存的に樹状突起へ局在化する mRNA 群を網羅的に同定した (Nakayama *et al.*, *eLife*, 2017)。その中で本研究では、RNG105 欠損により樹状突起局在の低下が顕著であった Arf GEF, GAP ファミリー mRNA 群に着目した (図 2)。これまでに、神経初代培養細胞を用いた発現抑制実験から、特定の Arf GEF, GAP はスパイン形成や AMPA 受容体の細胞表面提示に不可欠であることを見出したが、これら遺伝子群の“局所翻訳”が関与しているのか、さらに高次脳機能にどのような影響を与えるのかは未解明であった。

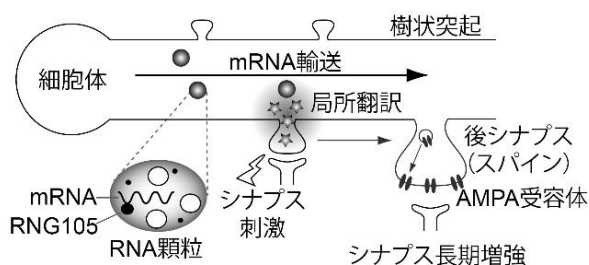


図1. 神経細胞における局所翻訳

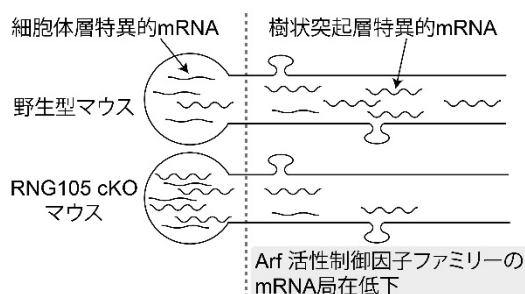


図2. RNG105 cKOマウス海馬樹状突起層における mRNA局在の低下

2. 研究の目的

神経細胞およびマウス脳内において、Arf GEF, GAP ファミリー mRNA の樹状突起輸送を操作し、シナプス長期増強については各種行動様式に与える影響を解析する。これにより、局所翻訳新規候補遺伝子群 Arf GEF, GAP ファミリーの mRNA 輸送と局所翻訳を介した新たな高次脳機能制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Arf GEF, GAP ファミリー mRNA 群の樹状突起への輸送責任領域 (dendritic transport responsible sequence, DTRS) の同定

任意の mRNA の人為的輸送制御を実現するために、各 Arf GEF, GAP mRNA 配列上の樹状突起への輸送に必要な領域 (DTRS) の同定を試みた。具体的には、各 Arf GEF, GAP mRNA の 3' UTR やその他の領域に MS2 ステムループ構造を繋げたコンストラクトと、そのステムループに結合する MS2-GFP を神経初代培養細胞に共発現させ、GFP を指標として各種変異体の動態を可視化した。

(2) DTRS 欠損マウスの作出

(1)で同定した DTRS を欠損させたマウスを CRISPR/Cas9 システムを用いて作出した。具体的には、DTRS の上流と下流に guide RNA を設計して DTRS を欠損させた。脳内における mRNA およびタンパク質の発現量および局在を解析し、細胞体におけるタンパク質発現には影響を与えずに mRNA の樹状突起輸送のみが低下するという目的のマウスを得られているかを確認した。

(3) 樹状突起における局所翻訳に DTRS が果たす役割の解析

任意の遺伝子について新規翻訳を可視化可能な Sun-Tag 法 (Wang *et al.*, *Cell*, 2016) を用い、着目している Arf GEF の DTRS が樹状突起における局所翻訳に与える影響を解析した。具体的には、Arf GEF DTRS とエピトープの繰り返し配列をつなげたコンストラクトと、そのエピトープに結合する GFP 標識一本鎖抗体をコードするコンストラクトを神経初代培養細胞に共導入した。新規翻訳が起こると、後者が前者に集積することで GFP の強い輝点が観察できるため、Arf GEF DTRS に依存した新規翻訳を輝点の可視化により解析した。

(4) DTRS 欠損がシナプス長期増強と高次脳機能に与える影響の解析

シナプス長期増強の指標であるスパイン形成や AMPA 受容体細胞表面提示を、野生型マウスと DTRS 欠損マウスとの間で比較解析した。スパイン形成は EGFP を神経初代培養細胞に導入することにより形態を可視化した。また、AMPA 受容体細胞表面提示は GluR1 の細胞外ドメイン認識抗体を用いた抗体染色により解析した。さらに今後、網羅的行動テストバッテリーにより DTRS 欠損が種々の行動様式に与える影響を解析する予定である。

4. 研究成果

(1) Arf GEF, GAP ファミリー mRNA 群の樹状突起への輸送責任領域 (DTRS) の同定

Arf GEF, GAP ファミリーのうち、神経細胞全体における発現抑制実験によりシナプス長期増強に影響を及ぼすことを確認済みであるものについて、様々な欠失変異体の動態を MS2 イメージングにより可視化した。その結果、1種類の Arf GEF について、その 3' UTR が樹状突起への輸送責任領域であることを同定した (図 3)。

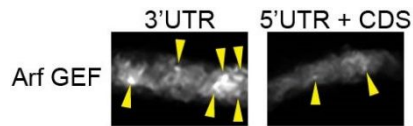


図 3. 樹状突起への輸送責任領域の同定

神経初代培養細胞における mRNA イメージング。1種類の Arf GEF について、3'UTR 欠失変異体では樹状突起上の mRNA シグナルが顕著に低下した。

(2) DTRS 欠損マウスの作出

(1) の結果に基づき、CRISPR/Cas9 システムを用いて 1種類の Arf GEF の 3' UTR 全長を欠損させたマウスを作出した。このマウスにおいて組織学的解析を行った結果、Arf GEF mRNA の海馬樹状突起への局在化は予想通り顕著に低下した。しかし、mRNA の安定性等にも影響が生じ、細胞体においても翻訳低下が見られた。この問題を解決するため、3' UTR のうち細胞体における翻訳に必須の最小領域の同定を試みた。まず Arf GEF の 3' UTR 配列の各種欠失変異体を GFP に繋げたコンストラクトを作製し、次に神経初代培養細胞にそれらを発現させて細胞体における GFP 発現を可視化・定量した。

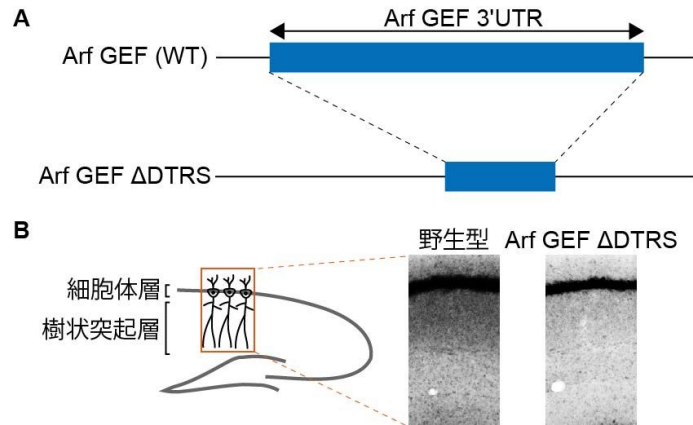


図 4. Arf GEF ΔDTRS マウスの作出

(A) Arf GEF DTRS 欠損マウスの作出。(B) 海馬切片における Arf GEF mRNA の in situ hybridization。Arf GEF ΔDTRS マウスでは樹状突起領域の mRNA 局在が顕著に低下した。

その結果、細胞体での翻訳に不可欠な 3' UTR 上の領域を同定することに成功した。

そこで、この領域以外の 3' UTR のみを欠損させたマウスを新たに作出した (図 4A)。この Arf GEF DTRS マウスでは、細胞体における翻訳量は維持したまま mRNA の樹状突起局在のみが低下し、当初の目的を達成する変異マウスを得ることに成功した (図 4B)。

(3) DTRS が樹状突起における局所翻訳に果たす役割の解析

Sun-Tag 法を用い、着目している Arf GEF の DTRS が局所翻訳に与える影響を解析した。その結果、神経初代培養細胞の樹状突起において Arf GEF の DTRS に依存した新規翻訳が起こることを明らかにした。

(4) DTRS 欠損がシナプス長期増強と高次脳機能に与える影響の解析

(2) で作出した Arf GEF DTRS マウスにおいて、シナプス長期増強への影響を解析した。具体的には、野生型および Arf GEF DTRS マウス由来の神経初代培養細胞を用い、シナプス長期増強の指標である AMPA 受容体細胞表面発現およびスパイン形成への影響を解析した。その結果、前者は野生型と同程度であったが、後者は Arf GEF DTRS マウスで顕著に低下した (図 5)。よって、着目している 1種類の Arf GEF の mRNA 樹状突起局在化は、スパイン形成・成熟化の制御に関与する可能性が示唆された。

さらに、行動解析に必要な個体数を現在作出したところであり、今後網羅的行動解析を実施予定である。

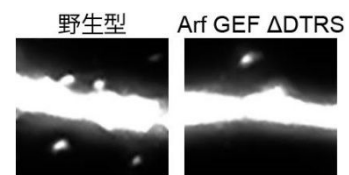


図 5. Arf GEF の DTRS 欠損がシナプス増強に与える影響

神経初代培養細胞において EGFP を導入し可視化したスパイン。Arf GEF ΔDTRS マウス由来のニューロンでスパインが顕著に低下した。

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 大橋 りえ、椎名 伸之	4. 巻 94
2. 論文標題 神経RNA顆粒が制御する局所翻訳と長期記憶形成	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 529 ~ 536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940529	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 大橋りえ、藤井一希、高雄啓三、椎名伸之
2. 発表標題 Arf GEF, GAPファミリーmRNAの神経樹状突起局在制御がシナプス形成に与える影響
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
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
---------	---------