

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24240051

研究課題名(和文) マイクロRNA生合成経路攪乱による神経発達障害発症の新規分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a novel mechanism relevant to disruption of microRNA biogenesis, explaining neurodevelopmental diseases.

研究代表者

中島 欽一 (Nakashima, Kinichi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80302892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：Rett症候群(RTT)はMeCP2遺伝子の変異が原因の神経発達障害であるが、発症機序の詳細は依然として不明である。我々は、MeCP2は、特定microRNA(miRNA)のプロセッシングを制御することを明らかにした。その標的の1つであるmiR-199aを発現させると、MeCP2欠損ニューロンの各種表現型が改善された。さら、miR-199aの標的として、mTORシグナルの負の制御因子を同定した。我々はmiR-199a欠損マウスも作製し、そのマウスがMeCP2欠損マウスで見られるものと類似した表現型を示すことを確認した。

研究成果の概要(英文)：Rett syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder caused by MECP2 mutations. Although emerging evidence suggests that MeCP2 deficiency is associated with dysregulation of mechanistic target of rapamycin (mTOR), which functions as a hub for various signaling pathways, the mechanism underlying this association and the molecular pathophysiology of RTT remain elusive. We show here that MeCP2 promotes the posttranscriptional processing of particular microRNAs (miRNAs) as a component of the microprocessor Drosha complex. Among the MeCP2-regulated miRNAs, we found that miR-199a positively controls mTOR signaling by targeting inhibitors for mTOR signaling. miR-199a and its targets have opposite effect on mTOR activity, ameliorating and inducing RTT neuronal phenotypes, respectively. Furthermore, genetic deletion of miR-199a-2 led to a reduction of mTOR activity in the brain and recapitulated numerous RTT phenotypes in mice.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 レット症候群 MeCP2 エピジェネティクス マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

X染色体上の MeCP2 遺伝子変異は、Rett 症候群 (RTT) をはじめ、自閉症、双極性障害、認知障害などを含めた種々の発達障害・精神疾患への関与が示唆されている。しかし RTT は、MeCP2 遺伝子変異が原因で発症することは分かっているものの、発症機序の詳細は不明である。申請者は、プロテオミクス技術を用いた網羅的な MeCP2 相互作用因子の解析を通じて、MeCP2 が miRNA マイクロプロセッサである Drosha 複合体と会合し、特定の miRNA のプロセッシングを制御するという全く新しい MeCP2 の作用を発見した。

2. 研究の目的

前述のような背景を受け、本研究では、新規かつ予想外の MeCP2 による miRNA 生合成制御作用の下流の分子機構、およびその破綻が RTT 病態発症の一因であることを明らかにすることを目的とし、精神神経疾患・発達障害発症に対する新しい分子基盤の提示を目指した。

3. 研究の方法

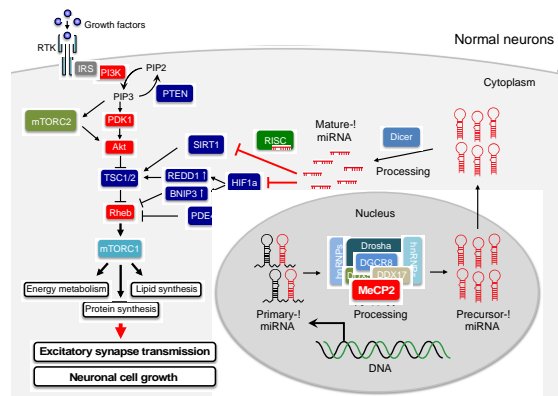
近年、RTT モデルマウスや MeCP2 欠損ヒト ES 細胞由来ニューロンにおいて cell growth/size の主要制御因子として知られる mechanistic target of rapamycin (mTOR) シグナルパスウェイの活性減衰が報告されたことなどから、RTT 病態における mTOR シグナルの重要性が指摘されている。実際に、MeCP2 欠損ニューロンは cell size の減少を示すことや、MeCP2 欠損マウス個体およびニューロンの各種表現型が mTOR シグナルの増強によって改善することなどから、RTT 病態において mTOR シグナルが MeCP2 の下流で必須な役割を果たしていることが強く示唆される。しかしながら MeCP2 がどのように mTOR シグナルを制御するのかは明らかになっていない。そこで我々は MeCP2 と mTOR シグナルを結びような MeCP2 の新規機能同定を目的とし、神経系の主要細胞種における MeCP2 相互作用因子の網羅的探索に着手した。そして MeCP2 相互作用因子から想定される機能を細胞・分子生物学的解析により立証し、さらに下流標的因子の同定を行った。また、MeCP2 の下流で mTOR シグナルを制御する因子を同定するために網羅的および機能的スクリーニングを実施した。

4. 研究成果

MeCP2 相互作用因子の網羅的探索の結果、MeCP2 は microRNA(miRNA) マイクロプロセッサ Drosha 複合体と会合することが明らかになった。次に MeCP2-Drosha 複合体の標的 miRNA を同定するために、野生型および MeCP2 欠損細胞から抽出した small non-coding RNA 画分を用いた RNA sequencing により成熟 miRNA の発現変化を網羅的に解析した。この解析により MeCP2 欠損ニューロン、神経幹細胞

胞においていくつかの miRNA が共通して発現量の減少を示すことが明らかになった。同定された標的候補 miRNA を海馬ニューロンに発現させ、MeCP2 と同程度に soma size を増大させる miRNA を探した。この機能的スクリーニングにより、MeCP2 と同レベルに soma size を増大させる miRNA の同定に成功した。この標的 miRNA を MeCP2 欠損ニューロンに発現させたところ、異常な興奮性シナプス伝達および興奮性シナプス密度、cell size 減少などの MeCP2 欠損ニューロンの代表的な各種表現型が改善された。また、我々はこの標的 miRNA の機能阻害が MeCP2 欠損ニューロンの表現型を再現すること、MeCP2 過剰発現の作用を解除することを明らかにした。次に我々は標的 miRNA の下流で mTOR シグナルを負に制御する下流因子の探索・同定を試みた。その結果、標的 miRNA の下流標的因子として 3 つの遺伝子を同定した。これらの因子は MeCP2 欠損脳においてタンパク質量の増大がみられ、MeCP2 と共発現させると MeCP2 の機能が消失することなどが確認された。また、我々はいくつかの機能解析実験により mTOR シグナルが実際に MeCP2 の下流で機能し、興奮性シナプス伝達、cell growth を制御していることを確認した。

これらの結果は MeCP2 が特定の miRNA プロセッシングを介して、mTOR シグナルを負に制御する因子群の発現を抑制することで mTOR シグナルを正に制御すること、これらの分子メカニズムの破綻により Rett 症候群の病態が引き起こされることを示唆している (図)。



図、MeCP2 による mTOR シグナル制御の分子基盤

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)

Guo W.#, Tsujimura K.#, Otuska M., Irie K., Igarashi K.\*, Nakashima K.\*, Zhao X\* (# Equally first authorship, \* Shared correspondence) VPA Alleviates Neurological Deficits and Restores Gene Expression in a Mouse

Model of Rett syndrome, *PLoS one*, 9, e100215 (2014).  
doi: 10.1371/journal.pone.0100215.  
Tsujimura K., Irie K., Nakashima H., Egashira Y., Fukao Y., Fujiwara M., Itoh M., Uesaka M., Imamura T., Nakahata Y., Yamashita Y., Abe T., Takamori S. & Nakashima K. miR-199a Links MeCP2 with mTOR Signaling and Its Dysregulation Leads to Rett Syndrome Phenotypes. *Cell Reports* 12, 1-15 (2015).  
doi: 10.1016/j.stemcr.2015.10.012.

〔学会発表〕(計 20 件)

中島欽一 : miR-199a は MeCP2 と mTOR シグナルをリンクしレット症候群発症に關与する、大阪大学蛋白質研究所セミナー、大阪府、大阪大学蛋白質研究所、2015 年 12 月 11 日-12 日(11 日)  
中島欽一 : The microRNA, linking MeCP2 with mTOR signaling and its dysregulation cause Rett syndrome phenotypes、第 40 回内藤コンファレンス、北海道、シャトレゼガトキグダムツポロ、2015 年 9 月 15 日-18 日(17 日)(招待)  
中嶋秀行、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一 : Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor, mediated by microRNA in neural stem cells fate specification、第 38 回日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンションセンター、2015 年 7 月 28 日-31 日(28 日)(口頭)  
入江浩一郎、辻村啓太、中嶋秀行、中島欽一 : Analysis of the molecular mechanism of dendritic formation by MeCP2 through miR-199a processing、第 38 回日本神経科学大会、兵庫県、神戸コンベンションセンター、2015 年 7 月 28 日-31 日(28 日)(ポスター)  
辻村啓太、中島欽一 : Rett syndrome responsible factor MeCP2 regulates specific miRNA processing、第 8 回神経発生討論会、福岡県、九州大学コラボステーション、2015 年 3 月 19 日-20 日(口頭)  
中嶋秀行、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一 : Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor, in neural stem cell、第 8 回神経発生討論会、福岡県、九州大学コラボステーション、2015 年 3 月 19 日-20 日(ポスター)  
入江浩一郎、辻村啓太、中嶋秀行、中島欽一 : MeCP2 は miR-199a のプロセッシングを介して樹状突起形成を制御する、第 8 回神経発生討論会、福岡県、九州大学コラボステーション、2015 年 3 月 19

日-20 日(ポスター)  
辻村啓太、入江浩一郎、中嶋秀行、江頭良明、深尾陽一朗、藤原正幸、伊藤雅之、高森茂雄、中島欽一 : レット症候群原因因子 MeCP2 による興奮性シナプス伝達制御の分子基盤、第 37 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2014 年 9 月 11 日-13 日(13 日)(シンポジウム)  
中嶋秀行、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一 : Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor, in neural stem cells、第 12 回幹細胞シンポジウム、九州大学医学部百年講堂、2014 年 5 月 30 日~31 日(31 日)(ポスター)  
辻村啓太、江頭良明、深尾陽一朗、藤原正幸、入江浩一郎、中嶋秀行、伊藤雅之、高森茂雄、中島欽一 : The Rett syndrome-associated protein MeCP2 regulates microRNA processing、2013 年度 包括脳ネットワーク夏のワークショップ、名古屋国際会議場、2013 年 8 月 29 日-9 月 1 日(8 月 31 日)(ポスター)  
辻村啓太、江頭良明、深尾陽一朗、藤原正幸、入江浩一郎、中嶋秀行、伊藤雅之、高森茂雄、中島欽一 : Rett 症候群原因因子 MeCP2 による microRNA プロセッシングを介した神経機能制御、第 5 回日本 RNAi 研究会、グランドプリンスホテル広島、2013 年 8 月 29 日-31 日(30 日)(口頭)  
入江浩一郎、辻村啓太、中嶋秀行、中島欽一 : MeCP2 は miR-199a のプロセッシングを介して軸索伸展を制御する、MeCP2 regulates axon outgrowth through processing of miR-199a、第 5 回日本 RNAi 研究会、広島県、グランドプリンスホテル広島、2013 年 8 月 29-31 日(30 日)(ポスター)  
中嶋秀行、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一 : Rett 症候群原因遺伝子 MeCP2 による神経幹細胞分化制御機構の解明、Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor, in neural stem cells、第 5 回日本 RNAi 研究会、広島県、グランドプリンスホテル広島、2013 年 8 月 29-31 日(ポスター)  
入江浩一郎、中嶋秀行、辻村啓太、中島欽一 : MeCP2 標的 miRNA による神経幹細胞の分化制御機構の解明、第 7 回エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂、2013 年 5 月 30、31 日(ポスター、31 日)  
辻村啓太、江頭良明、深尾陽一朗、藤原正幸、入江浩一郎、中嶋秀行、高森茂雄、中島欽一 : レット症候群原因遺伝子産物 MeCP2 による microRNA プロセッシング制御、第 7 回エピジェネティクス研

研究会年會、奈良県新公会堂、2013年5月30,31日(ポスター、31日)  
中嶋秀行、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一:レット症候群原因因子 MeCP2 による神経幹細胞の分化制御機構の解明、第7回エピジェネティクス研究会年會、奈良県新公会堂、2013年5月30,31日(ポスター、30日)  
中島欽一:レット症候群原因因子 MeCP2 の新規作用とその神経系細胞における役割、第60回日本実験動物学会総会、2013年5月15日-17日(16日)(招待、口頭) つくば国際会議場  
中島欽一: Novel function of the Rett syndrome-associated protein MeCP2 in the central nervous system、日英ワークショップ「Neural Epigenetics:From Mechanism to Disease」、英国大使館新館、2013年2月25-28日(27日)(招待、口頭)  
中嶋秀行、辻村啓太、入江浩一郎、中島欽一:神経幹細胞における Rett 症候群原因遺伝子産物 MeCP2 の機能解析、第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月18-21日  
辻村啓太、深尾陽一郎、江頭良明、藤原正幸、入江浩一郎、中嶋秀行、高森茂雄、中島欽一:発達障害原因因子 MeCP2 による microRNA 生合成を介した神経機能制御、第35回日本神経科学大会、名古屋国際会議場、2012年9月18-21日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/app/module/information/detail.php?i=801&c=10&s=>

[O&k=](#)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中島 欽一 (NAKASHIMA Kinichi)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号: 80302892

### (2) 連携研究者

辻村 啓太 (TSUJIMURA Keita)  
九州大学・大学院医学研究院\_\_特任助教  
研究者番号: 60588474

### (3) 連携研究者

深尾 陽一郎 (FUKAO Yoichiro)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科  
研究者番号: 80432590