

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500447

研究課題名(和文)未分化維持因子Musashi1による神経細胞の分化・回路形成制御の解析

研究課題名(英文)Analysis for a neural differentiation regulatory factor, Musashi1

研究代表者

堀澤 健一(Horisawa, Kenichi)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：70424207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Msi1は神経前駆細胞で高発現するRNA結合蛋白質であり、神経分化を司る。主な分子的機能は、標的mRNAの翻訳制御である。

その標的探索の為に、マウス胎仔由来のmRNAからin vitro SELEX法による探索を行ったところ、dcc遺伝子の3'UTR領域が検出された。Dccは神経の成長円錐に存在する膜受容体であり、Netrin1シグナルを受容し軸索や細胞を誘引する。本計画で行われた解析により、dccがMsi1の特異的標的であり、既知の機構により翻訳抑制されることを明らかにできた。現在はこの分子機構と神経発生の関係性について、Msi1 KOマウスを用いた解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：Musashi1 (Msi1) is a RNA-binding, which is highly expressed in neural stem/progenitor cells and is responsible for stem cell maintenance and differentiation. The main function of Msi1 is to regulate the expression of its target mRNAs through translational up/down-regulation. In search for novel Msi1 targets, in vitro SELEX selection was performed from a mouse embryonic brain mRNA library, and a 3' UTR fragment of dcc was obtained. Dcc is a transmembrane receptor expressed on the growth cones of neurons, and it guides axons and cells in response to Netrin1. In this project, in vitro and in cultured cell experiments clearly identified that the dcc mRNA is a direct target of Msi1, and is suppressed their translation through a canonical molecular machinery. Now, we are analyzing the connection between the molecular mechanism and neural development by using Msi1-KO mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：Musashi1 RNA結合タンパク質 神経発生 神経回路 未分化維持 翻訳制御 転写後制御 神経分化

1. 研究開始当初の背景

Musashi1 (Msi1) は標的となる mRNA に特異的に結合し、その翻訳を制御する RNA 結合タンパク質であり、神経幹細胞において高発現し、その性質を特徴づける因子として注目されてきた。具体的には、Msi1 は未分化状態を担う Notch シグナルの阻害因子 *m-Numb* (Imai T. *et al. Mol. Cell. Biol.* 2001) や、細胞周期の制御因子 *p21^{WAF1}* (Battelli C. *et al. Mol. Cell. Neurosci.* 2006) の翻訳を抑制することで、体性幹細胞が分化するのを抑えていることが明らかにされている。しかし近年、Msi1 の新たな役割を示す以下のような発見が成されてきた。ある程度分化が進んだ神経前駆細胞や未熟ニューロンにおいても Msi1 の発現が確認できる部位がある (Kawase S. *et al. Mol. Brain* 2011)。未分化状態維持に直接的に関連があるとは思えない Msi1 標的候補因子が発見されている (de Sousa Abreu *et al. J. Biol. Chem.* 2009)。標的 mRNA によっては Msi1 が翻訳を抑制ではなく亢進する場合がある (Kuwako K. I. *et al. Neuron* 2010)。Msi1 と機能を共有するパラログタンパク質 Msi2 が白血病の急性転化に関連するなど、幹細胞だけではなく癌をはじめとした疾患との関連性が示唆されている (Ito T. *et al. Nature* 2010)。

我々の研究グループでもこれまでの研究において、Msi1 の未分化維持機構以外の新たな機能を解明するために、*in vitro* スクリーニング技術を用いて、新規標的 mRNA の探索を行ってきた。それにより、神経細胞の遊走に参与する *doublecortin* (*Dcx*) 遺伝子が標的候補として選択され、その機能解析の結果を報告した (Horisawa K. *et al. FEBS Lett.* 2009)。この結果は、Msi1 が神経幹細胞だけでなく、神経方向にコミットした神経前駆細胞でも同様に機能し、神経回路の形成という中枢神経系の発生にとって非常に重要な役割を果たしている可能性が高いことを示唆している。

また最近、マウスの小脳における神経軸索の正中線交差が、軸索誘導因子である Slit のレセプター Robo3 の翻訳を Msi1 が亢進することで制御されることも発表しており (Kuwako K. I. *et al. Neuron* 2010)、中枢神経の組織形成において、Msi1 が広範な役割を果たしている可能性が高いと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの *in vitro* スクリーニングにより選択されてきた *Dcx*、および新規スクリーニングにより得られた候補遺伝子が、神経回路形成に対して、どのような影響を与えるのかを培養細胞レベルおよび、*in vivo*、*ex vivo* の実験を通して明らかにすることを目的とした。具体的には、下記のような目標を設定して研究を行った。

A: *Dcx* 遺伝子の解析

Dcx は微小管重合を制御することで神経細胞の遊走を左右し、その結果、大脳皮質形成に参与する。大脳皮質形成異常を示す遺伝病の原因遺伝子であることから、Msi1 が *Dcx* の翻訳制御を介して、大脳皮質の発生に参与する可能性が考えられた。我々はこれまでに、*Dcx* mRNA が *in vitro* および培養細胞内で Msi1 と特異的に結合し、またレポーター遺伝子実験からその相互作用により *Dcx* の翻訳が制御される可能性を示していた (Horisawa K. *et al. FEBS Lett.* 2009)。そこで本研究では Msi1 による *Dcx* 遺伝子の翻訳制御を、培養細胞および Msi1 KO マウスを用いた系によって直接的に検証し、またこの相互作用が、細胞遊走・皮質形成にどのように関与するのかを明らかにすることを目標とした。

B: 新規候補的 *Dcc* 遺伝子の解析

本研究プロジェクト申請の過程において推進していた、新規 *in vitro* スクリーニングから、新たな Msi1 標的候補として *Dcc* mRNA が得られていた。*Dcc* は、神経軸索ガイダンス因子 Netrin1 の細胞膜結合型受容体である。過去の Netrin1 および *Dcc* の KO マウスを用いた解析では、いずれの場合も交連ニューロンの軸索ガイダンス障害によるものと思われる神経回路の形成不全が観察されている。また、これまでの Msi1 KO マウスの解析から、脳梁形成不全などの、*Dcc* および Netrin1 KO マウスと酷似した表現型が得られており (未発表データ)、神経回路形成の過程に Msi1 が関与していることが強く示唆される。そのため本計画では、*Dcc* を重要な Msi1 標的遺伝子と位置づけ、培養細胞を用いて、Msi1 と *Dcc* の翻訳制御を介した関連性を詳細に解析すると同時に、Msi1 KO マウスにおける神経回路形成の過程を、*Dcc* タンパク質の発現を軸に経時的に観察することで、脳梁をはじめとした種々の交連神経組織発生への Msi1 の役割を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

A: 培養細胞を用いた Msi1 と標的候補 mRNA 間の相互作用の検証

(i) 「RNA 免疫沈降実験による RNP 複合体形成の確認」: 培養細胞内で形成される内在分子間の RNA-タンパク質複合体を RNA 免疫沈降実験を行うことで確認し、Msi1 と候補 mRNAs の直接的な相互作用を検証した。

(ii) 「標的因子の翻訳変動の確認」: 培養細胞に対して、Msi1 の強制発現による Gain-of-function 実験、または siRNA を用いた Loss-of-function 実験を行い、Msi1 の発現量変動が、標的候補因子の発現量に与える影響を調べた。いくつかの内在性 Msi1 を発現する神経芽腫細胞株では、*Dcx*、*Dcc* が mRNA でのみ発現する。これは Msi1 の翻訳制御機構による現象

である可能性が高いため、それらの細胞を使用した。

(iii)「レポーター遺伝子実験」: *in vitro* スクリーニング、およびRNAの2次構造予測・モチーフ検索により特定された、Msi1と物理的に相互作用する配列部位を用い、レポーター遺伝子実験を行った。具体的には、ルシフェラーゼの下流に*Dcx*、*Dcc*のMsi1結合配列をUTRとして組み込んだコンストラクトを複製し、翻訳制御が行われることを検証した。この実験では、上記のGain or Loss-of-function 実験と組み合わせ、Msi1の翻訳制御への影響に関して詳細かつ定量的な解析を行った。

(iv)「ポリソーム解析」: 培養細胞ライセートをショ糖密度勾配遠心法によって分画し、標的候補 mRNA が、翻訳不活化画分(モノソーム)と翻訳活性化画分(ポリソーム)のどちらに分配されるかをRT-PCR によって確認した。上述のMsi1のGain or Loss-of-function 実験と組み合わせることで、この分配がMsi1の有無によりどのように変化するかを観察し、Msi1の翻訳への影響をより詳しく解析した。また、いくつかの神経芽腫細胞株はレチノイン酸の添加などによりニューロン方向への分化誘導が可能であることが知られるが、我々はヒト神経芽腫 SK-N-SH が神経分化の過程でMsi1の発現を徐々に消失することを明らかにしていたことから(未発表データ)、この系を神経分化のモデル系としてMsi1とその標的の関係性の解析に用いた。

(v)「軸索ターニングアッセイ」: Msi1を導入した神経系培養細胞株とNetrin1分泌培養細胞を用いることで、伸長する軸索の動態を観察した。

B: Msi1遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo* におけるMsi1と*Dcc*、*Dcx* mRNA相互作用の解析
Msi1 KOマウスは連携研究者の岡野らが作製し、既に主要な表現型を報告している

(Sakakibara S. *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 2002)。また同様に、*Dcx*、*Dcc*の両遺伝子についてもKOマウスが報告されていることから、それらの表現型の類似性などを足がかりとして*in vivo*解析を進めた。

(i)「*Dcc*の*in vivo*解析」: *Dcc* KOマウスでは、リガンドであるNetrin1のKOマウスと同様に、脳梁など交連組織の形成に顕著な異常を生じる。Msi1 KO マウスにおいても類似の表現型が確認されることから、*Dcc*タンパク質が機能する軸索の正中交差に関して、Msi1が関与することが考えられた。そこで免疫組織染色、*in situ*ハイブリダイゼーションによる観察を行うことで、交連ニューロン成熟におけるMsi1と*Dcc*相互作用の役割を解析した。

(ii)「*Dcx*の*in vivo*解析」*Dcx*は大脳皮質形成異常の原因因子であるにもかかわらず、*Dcx* KO マウスでは、海馬形成に一部問題が生じる

だけである。しかし胎仔脳でのsiRNAによる*Dcx*ノックダウンでは、皮質形成異常が見られるため、KOでは他の遺伝子に機能が相補されると考えられる。そこでMsi1 KOマウスの解析では、*Dcx* KO マウスで影響が確認できた海馬周辺での解析を集中的に行った。

4. 研究成果

当初の研究計画において、解析の中心的なターゲットとして挙げた *Dcx*、*Dcc* の2因子のうち、プロジェクト開始前よりMsi1の標的としての機能が*in vitro*で明らかにされていた*Dcx*を先行して*in vivo*解析を行った。Msi1 KOマウスを用いて、*Dcx* KOマウスにおいて表現系の現れる海馬を中心に免疫組織染色などの方法を用いて解析を行ったが、野生型マウスと比較して、Msi1と*Dcx*の関連性を疑わせるような表現系を観察することはできなかった。Msi1にはMsi2というほぼ同一のRNA配列認識特異性を有するパラログタンパク質が存在しており、その発現分布は互いにほぼ重複している。したがって、その相補的な働きがMsi1 KOによる表現系を打ち消したのではないかと考察している。今後はMsi1/Msi2 dKOマウスの使用などを試みるべきであると考えます。

もう一方の標的候補である、*Dcc*は、マウス胎仔由来のmRNAからの*in vitro* SELEX スクリーニングにより同定された。検出された*Dcc* mRNAの3' UTR領域は、既知のMsi1標的RNAと同様に、ステムループ構造を形成し、またMsi1の認識モチーフ配列を有していたため、確度の高い候補であるとして優先的に解析を行った。*Dcc*は神経の成長円錐に存在する膜受容体であり、Netrin1シグナルを受容し軸索や細胞を誘引する。本計画では、培養細胞を用いた生化学的・細胞生物学的な種々の実験により、*Dcc*がMsi1の特異的標的として翻訳レベルでの発現抑制を受けることが明らかになった。特に遺伝子導入により培養細胞の軸索伸長に明確な形態的・機能的変化を観察することができるため、Msi1-*Dcc*相互作用は細胞レベルで機能し得るモジュールであることが明らかになった。Msi1 KOマウスを用いた解析では、*Dcc*およびそのリガンドであるNetrin1のKOマウスで表現系が現れた部位を中心に解析を現在進行で行っており、そこで得られた新規の知見とこれまでの成果を合わせ、研究の集大成として国際紙に投稿していく予定である。

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 19 件)

- 1) Takahashi T, Suzuki H, Imai T, Shibata S, Tabuchi Y, Tsuchimoto K, Okano H, Hibi T (2013) *PLoS One* 8, e53540
- 2) Muto J, Imai T, Ogawa D, Nishimoto Y,

- Okada Y, Mabuchi Y, Kawase T, Iwanami A, Mischel PS, Saya H, Yoshida K, Matsuzaki Y, Okano H (2012) PLoS One 7, e33431
- 3) 今井貴雄、岡野栄之 (2012) 細胞工学, 31, 668-674
 - 4) Tokunaga M, Shiheido H, Tabata N, Sakuma-Yonemura Y, Takashima H, Horisawa K, Doi N, Yanagawa H. (2013) PLoS One. 8, e76774
 - 5) Tokunaga M, Shiheido H, Hayakawa I, Utsumi A, Takashima H, Doi N, Horisawa K, Sakuma-Yonemura Y, Tabata N, Yanagawa H. (2013) Chem. Biol. 20, 935-942
 - 6) Nishimoto Y, Nakagawa S, Hirose T, Okano HJ, Takao M, Shibata S, Suyama S, Kuwako K, Imai T, Murayama S, Suzuki N, Okano H (2013) Mol. Brain 6, 31
 - 7) Kuroiwa-Numasawa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H (2014) Stem Cell Rep. 2, 648-661
 - 8) Zhang L, Kaneko S, Kikuchi K, Sano A, Maeda M, Kishino A, Shibata S, Mukaino M, Toyama Y, Liu M, Kimura T, Okano H, Nakamura M. (2014) Mol. Brain 7, 14
 - 9) Takano M, Kawabata S, Komaki Y, Shibata S, Hikishima K, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. (2014) J. Neuroinflamm. 11, 40
 - 10) Sato H, Shibata M, Shimizu T, Shibata S, Toriumi H, Ebine T, Kuroi T, Iwashita T, Funakubo M, Kayama Y, Akazawa C, Wajima K, Nakagawa T, Okano H, Suzuki N. (2013) Neurosci. 248C, 345-358
 - 11) Fukuda T, Takeda S, Xu R, Ochi H, Sunamura S, Sato T, Shibata S, Yoshida Y, Gu Z, Kimura A, Ma C, Xu C, Bando W, Fujita K, Shinomiya K, Hirai T, Asou Y, Enomoto M, Okano H, Okawa A, Itoh H. (2013) Nature 497, 490-493
 - 12) Ohtomo R, Mori T, Shibata S, Tsuta K, Maeshima M, Akazawa C, Honda K, Yamada T, Yoshimoto S, Asai M, Okano H, Kanai Y, Tsuda H. (2013) Modern Pathol. 26, 1041-1050
 - 13) Horisawa K. (2014) Front Physiol. 5, 457
 - 14) Kawase S, Kuwako K, Imai T, Renault-Mihara F, Yaguchi K, Itohara S, Okano H. (2014) Stem Cells Dev. 23, 2250-2261
 - 15) Shibata S, Komaki Y, Seki F, Inouye MO, Nagai T, Okano H. (2015) Microscopy 64, 57-67
 - 16) Nishikawa R, Hotta R, Shimojima N, Shibata S, Nagoshi N, Nakamura M, Matsuzaki Y, Okano HJ, Kuroda T, Okano H, Morikawa Y. (2014) Sep 18, online
 - 17) Murota Y, Ishizu H, Nakagawa S, Iwasaki YW, Shibata S, Kamatani MK, Saito K, Okano H, Siomi H, Siomi MC. (2014) Cell Rep. 8, 103-113
 - 18) Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. (2014) Stem Cell Reports 2, 648-661
 - 19) Nishimura S, Sasaki T, Shimizu A, Yoshida K, Iwai H, Koya I, Kobayashi Y, Iakura G, Shibata S, Ebise H, Horiuchi K, Kudoh J, Toyama Y, Anderson AJ, Okano H, Nakamura M. (2014) Exp Neurol. 261, 171-179
- 〔学会発表〕(計 4 件)
- 1) Hara H, Horisawa K, Yanagawa H, Doi N (2012) Translational Control, N.Y.
 - 2) 原裕恵、堀澤健一、松尾薫、柳川弘志、土居信英 (2012) 第 35 回日本分子生物学学会年会, 福岡
 - 3) Horisawa K, Miyazawa T, Ohkawa K, Oka K and Doi N (2013) The 12th Human Proteome Organisation World Congress, Yokohama
 - 4) 堀澤健一 (2013) 筑波大学大学院生命環境科学研究科セミナー 動物細胞バイオテクノロジー(招待講演), つくば
- 〔図書〕(計 2 件)
- 1) Horisawa K and Yanagawa H (2012) Neural Stem Cells and Therapy, InTech
 - 2) 堀澤健一、鈴木淳史 (2015) 細胞工学別冊 ダイレクトリプログラミング, 学研メディカル秀潤社
- 〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀澤 健一（九州大学・生体防御医学研究所器官
発生再生学分野・助教）
研究者番号：70424207

(2) 研究分担者

今井 貴雄（慶應義塾大学・医学部生理学教
室・助教）
研究者番号：10383712
芝田 晋介（慶應義塾大学・医学部生理学教
室・講師）
研究者番号：70407089

(3) 連携研究者

岡野 栄之（慶應義塾大学・医学部生理学
教室・教授）
研究者番号：6016069
土居 信英（慶應義塾大学・理工学部生命
情報学科・准教授）
研究者番号：50327673