

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860239

研究課題名(和文) 精神疾患に関わる脳特異的ノンコーディングRNAの機能解析

研究課題名(英文) Study on the brain-specific ncRNA related to mental disorder

研究代表者

古米 亮平 (Furumai, Ryohei)

広島大学・医歯薬保健学研究院・特任助教

研究者番号：30450414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス脳から神経細胞を取り出し、発達障害・精神疾患であるプラダーウィリー症候群の原因とされるノンコーディングRNAを特異的にノックダウンした。コントロールの神経細胞と、ノックダウンした神経細胞(プラダーウィリー症候群と近似した状態)からそれぞれRNAを回収し、次世代シーケンシングによる網羅的解析を行った。その結果、いくつかの遺伝子とマイクロRNAの発現に有意に差があることを見出すことができた。

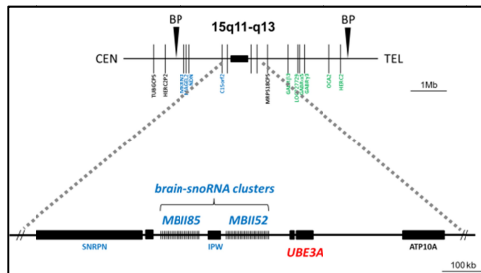
研究成果の概要(英文)：Brain-specific non-coding RNA (ncRNA) responsible for the pathogenesis of Prader-Willie syndrome, a rare developmental/mental disorder, was knock-downed in the primary cultured neurons obtained from wild type mouse brain. Then we compared the global transcriptome between control and knock-downed neurons by next-generation sequencer. As a result, we found that the expressions of several genes and miRNAs were significantly changed in knock-downed neurons. Our finding suggested that transcriptional changes in these genes/miRNAs in knock-downed neurons could be related to the etiology of Prader-Willie syndrome.

研究分野：分子生物学

キーワード：ノンコーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

プラダーウィリー症候群は、2万人に一人が発症する、発達障害・精神疾患である。この症候群は、主にヒト染色体 15q11-13 領域に存在する脳で特異的に発現する二つのノンコーディング RNA (ncRNA) (下図) の欠損によって起こることが分かっている。



MBII-85 と MBII-52 と呼ばれる二種類の小さな ncRNA が、それぞれ数十個クラスターを形成して隣り合って存在している。そもそもこれらの小さな ncRNA は、snoRNA (small nucleolar RNA) と呼ばれるファミリーに属し、本来は核小体に存在して rRNA のプロセッシングに関わる ncRNA である。しかしながら、これら二つの ncRNA は、第一に脳で高発現していること、第二に rRNA とは配列に相同性がないことから標的は別にあると予想されること、の二点において非常に特異的な存在であると言える。MBII-52 はセロトニンレセプター mRNA のスプライシング (あるいは RNA エディティング) に影響することが昔に示唆されたが、その後詳細な解析をした続報がない。もう一方の MBII-85 は、こちらの方がプラダーウィリー症候群の発症にはより強く関わっているとされるものの、明確な機能についての報告はない (ごく数報において、やはりある mRNA 群のスプライシングに関わる可能性を示唆するという報告はあるが、一般的に受け入れられているとは言い難い)。

結論として、プラダーウィリー症候群の発症と強く関連している、脳で高発現するこの二つの ncRNA の機能は未だに明確になっておらず、分子メカニズムの解明が待たれてい

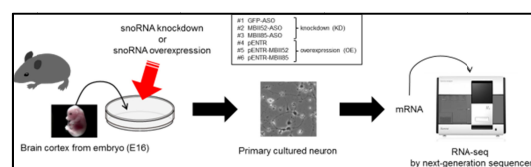
る。申請者が所属する研究室は、自閉症モデルマウスとして、これらの ncRNA が存在する染色体 15q11-13 領域の重複マウスを作製し、実際にマウスが自閉症様行動を示す事を明らかにしてきた。そこで、この領域に存在し、自閉症のみならずプラダーウィリー症候群に強く関連すると考えられる二つの ncRNA に注目し、解析を行うこととなった。

2. 研究の目的

ほぼ機能が明確となっていないと言える、プラダーウィリー症候群発症と密接に関連する二つの ncRNA、MBII-85 と MBII-52 の生物学的機能を探ることを第一目的とした。また、その応用として、その分子メカニズムの解明を通じて、プラダーウィリー症候群の治療法につながる知見となることを期待した。

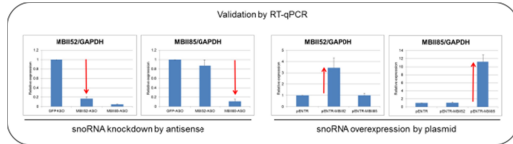
3. 研究の方法

MBII-85 と MBII-52 の機能を探るため、まずこれらの ncRNA を特異的にノックダウンするアンチセンス RNA を設計・合成した。重要なことは、これらは通常の蛋白質に翻訳される mRNA とは違って、核内に留まる ncRNA であるので、siRNA による一般的なノックダウンが期待できないことである。そこで、核内 ncRNA にも有効であることが示されている RNA/DNA ハイブリッド型の人工アンチセンスを利用したノックダウンを試みた。野生型マウス脳から取り出した中枢神経細胞を培養し、これらのアンチセンスによって ncRNA をノックダウンすることで、神経細胞のトランスクリプトーム全体にどのような影響があるのかを次世代シーケンサーを使って網羅的に解析した。



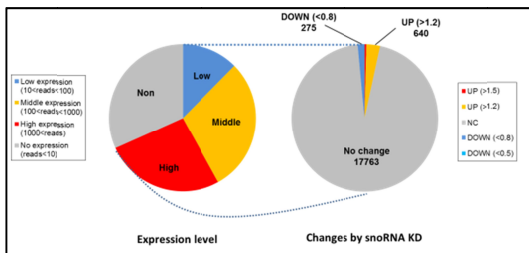
4. 研究成果

まず、ncRNA のノックダウンが効率よくできていることを RT-PCR により確認した。それぞれ、MBI185 のアンチセンスは MBI185 を、MBI152 アンチセンスは MBI152 を約 80%以上の効率でノックダウンできていた（下図）。



興味深いことに、MBI185 アンチセンスは MBI185 のみならず MBI152 のノックダウンにも有効であることが分かった。これは、二つの ncRNA が近接していること、さらに MBI185 の下流に MBI152 があることが原因と考えられた。

二つの ncRNA がノックダウンされた培養神経細胞から、total RNA を抽出し、次世代シーケンサーでトランスクリプトームを解析した。その結果、まず全遺伝子中の約 300 が抑制され、約 600 が上昇していることが分かった。変化の割合は劇的ではないものの、機能不明の ncRNA のノックダウンによって遺伝子の約 5%が変化を受けることは驚きである（下図）。



次に、遺伝子オントロジー (GO) 解析によってどのような種類の遺伝子の変化を受けているのかを調べた（下表）。

Top 10 enriched GO term (biological pathway) within DEG by snoRNA			
Term	Count	%	PValue
GO:0006955*immune response	26	5.10	0.00003
GO:0042129*regulation of T cell proliferation	7	1.37	0.00162
GO:0007665*sensory perception of sound	8	1.57	0.00217
GO:0042359*vitamin D metabolic process	3	0.59	0.00268
GO:0050954*sensory perception of mechanical stimulus	8	1.57	0.00364
GO:0042122*positive regulation of T cell proliferation	5	0.98	0.00547
GO:0032944*regulation of mononuclear cell proliferation	7	1.37	0.00744
GO:0050670*regulation of lymphocyte proliferation	7	1.37	0.00744
GO:0070663*regulation of leukocyte proliferation	7	1.37	0.00837
GO:0050863*regulation of T cell activation	8	1.57	0.00868

表中の赤字で示したように、免疫関連のパスウェイ上の遺伝子が有意に影響を受けていることが分かった。MBI185, MBI152 の標的と脳内免疫系パスウェイとの関連は不明であるが、発達障害・精神障害である自閉症やブラダーウィリー症候群が、脳内の免疫不全と関わりがある可能性は非常に興味深い。あらゆる疾患と免疫が密接に関わることが明らかになってきている中で、精神疾患と免疫の関わりは昔から暗示されてはいるものの、未だにはっきりした結論は得られていないからである。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：

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

古米 亮平 (FURUMAI, Ryohei)

広島大学・医歯薬保健学研究院、特任助教

研究者番号：30450414