

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430032

研究課題名(和文) 神経栄養因子BDNFのノンコーディングRNAの分子機能に関する研究

研究課題名(英文) Molecular function of the BDNF noncoding RNA

研究代表者

小島 正己 (Kojima, Masami)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究特別チーム長

研究者番号：40344171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：proBDNF BDNFのプロセッシング異常マウスではBDNFよりproBDNFが過剰になり、うつ様行動をはじめとする表現型が観察される。本研究では、この異常マウスの分子病態を見出すためにBDNFの遺伝子発現を解析した。第一に、新規のBDNFアンチセンスRNAがこのマウスの海馬領域では発現していることを見出した。BDNFアンチセンスRNAの機能を見出すため、アンチセンスRNAを培養神経細胞に発現させたところ、AS2cと名付けたBDNFアンチセンスRNAにはBDNFたんぱく質を増加させる役割があることを見出した。本結果を特許出願すると同時に、現在はその成果の論文を作成中である。

研究成果の概要(英文)：BDNF-processing deficit mice expressed proBDNF protein with a little amount of BDNF, and a pronounced behavioral phenotype includes depression-like behavior. In this study, the gene expression of BDNF was analyzed to find the molecular pathology of this abnormal mouse. First, we found that novel BDNF antisense RNA is expressed in the hippocampal region of this mouse. In order to find out the function, the antisense RNA was expressed in cultured neurons and we found that BDNF antisense RNA named AS2c had the role of increasing BDNF protein. At the same time as applying for a patent for this result, we are currently preparing a manuscript for submission of the article.

研究分野：神経科学、分子生物学

キーワード：神経細胞 RNA 翻訳後メカニズム タンパク質 マウス 情動障害

1. 研究開始当初の背景

ゲノム上から数万種類のノンコーディング RNA (>200nt) が転写されていることが 2005 年に報告された (Katayama et al., Science, 2005)。ノンコーディングゆえに機能解析の報告はまだ少ないが、脳疾患との関係を報告した論文が報告されている (Alzheimer's 病: Faghihi et al., Nature Medicine, 2008; Parkinson's 病: Scheele et al., BMC Genomics, 2007; Fragile X syndrome: Ladd et al., Hum.Mol.Genet., 2007)。Faghihi らの論文では、A の合成酵素 BACE1 のアンチセンス RNA がセンス RNA と協調的 A の合成促進を行うことが報告されている。

我々は、BDNF の細胞機能の研究や精神神経疾患における BDNF の分子病態の解明、疾患モデルマウス作製に取り組んできた。そして、BDNF プロセッシング障害マウス (プロセッシング障害により前駆体 proBDNF が高発現になっているマウス) は、うつ様行動、抗うつ薬抵抗性、血中コルチコステロン濃度の高値などの表現型に加え、BDNF mRNA の発現低下、BDNF アンチセンス RNA の発現増加を示した。BDNF mRNA の発現量が変動する処理を行ったラット培養海馬神経細胞 RNA から BDNF アンチセンス RNA のクローニングを試み、計 8 種類のスプライシングバリエントをクローニングし、その配列にはアンチセンス RNA の特徴が見出された (図 1)。

- 1) BDNF タンパク質のコーディング領域に対して相補的な配列の存在
- 2) エクソンが BDNF 遺伝子のエクソンと重なる、イントロンまたは隣接する遺伝子との間に存在するといった構造の多様性

2. 研究の目的

BDNF アンチセンス RNA が BDNF タンパク質発現等の細胞機能への影響の検証を目指す。

3. 研究の方法

・BDNF アンチセンス RNA の細胞機能の解明  
 神経細胞やグリア細胞にアンチセンス RNA 発現ベクターを導入し細胞レベルの機能評価 (生化学・細胞生物学) を行う。  
 2) 各アンチセンス RNA の時空間的発現の解析。  
 ・脳疾患モデル動物における BDNF アンチセンス RNA  
 うつ様症状を有するモデルマウスを用いて、BDNF アンチセンス RNA の発現動態を解析する。

4. 研究成果

・スプライシングバリエントの 1 つ AS2c を初代培養大脳皮質神経細胞に導入し、48 時間後に細胞ライゼートを回収した。その BDNF タンパク質発現量を ELISA 法により定量した結果、無処理の細胞と比較して 1.5 倍増加した。つまり、**AS2c BDNF アンチセンス RNA の発現によって BDNF タンパク質の発現量を増加させる作用を持つことが示唆された。**

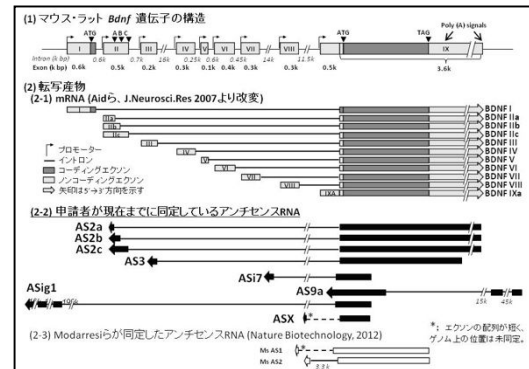


図 1. マウス BDNF 遺伝子座の構造と転写産物の配列

- (1) BDNF 遺伝子座の構造
- (2) 転写産物
  - (2-1) mRNA のスプライシングバリエント  
3' UTR 配列の短い mRNA は省略している。
  - (2-2) 本研究の代表者が同定したアンチセンス RNA のスプライシングバリエント
  - (2-3) Modarresi らが同定したマウスアンチセンス RNA

研究 1 BDNF アンチセンス RNA の細胞機能の解明

同定したスプライシングバリエント全てが BDNF タンパク質のコーディング領域との相補配列を有している。つまり、強制発現させた際、AS2c を含むアンチセンス RNA が、BDNF mRNA ・タンパク質の発現量に影響するかどうかを検証した。そのため、培養海馬神経細胞へ遺伝子導入後、0.5, 1, 2, 4 日後にライゼートおよび全 RNA を回収し、ELISA ・ウエスタンブロット法、定量 RT-PCR 法により内在性の BDNF mRNA ・アンチセンス RNA、BDNF タンパク質の定量解析を行った。その結果、AS2c BDNF アンチセンス RNA には、BDNF の内在的転写レベルには影響しないが、BDNF のタンパク質を増加させることが見出された。遺伝子導入した図 1 の BDNF アンチセンス RNA について細胞内局在も解析した。その結果、導入したアンチセンス RNA は神経細胞全体に局在できることが示唆された。BDNF の転写量は神経活動の上昇に伴い増加し活動の低下に伴い減少することが報告されている。しかし BDNF の転写産物であるため遺伝子導入した培養神経細胞の突起数や生存も調べたが、これらについては効果がなかった。さらに本研究では、2 週間培養した海馬神経細胞の NMDA

あるいは TTX を添加して、BDNF のセンス RNA およびアンチセンス RNA の全発現量を定量した。図 1 に示した BDNF のセンスおよびアンチセンス RNA の全種類を測定しうるプライマーセットを用いた実験から、BDNF アンチセンス RNA の発現は神経活動が抑制されたときに増加することが見出された。

以上の結果は、BDNF アンチセンス RNA の発現と神経活動の関係、研究 1 から見出された AS2c には BDNF のタンパク質発現を上昇させる機能の可能性を示唆する。

## 研究 2 疾患モデル動物における BDNF アンチセンス RNA

proBDNF BDNF のプロセッシング異常マウスでは BDNF より proBDNF が過剰になり成体のマウスではうつ様行動が観察される。本マウスにおける proBDNF 過剰が細胞内シグナルに影響し、その結果として BDNF の転写発現に影響するかどうかを検証した。研究では、proBDNF 過剰マウスおよび同腹のコントロールマウス（生後 8 週齢）の海馬を摘出し RNA を調整し BDNF の遺伝子発現に対する影響を解析した。その結果、proBDNF 過剰マウスでは、BDNF アンチセンス RNA の発現が上昇していることを見出した。

体内の成長因子の多くはその前駆体のプロセッシングにより活性型に変換されるが、その翻訳後メカニズムの詳細については十分に説明が進んでいなかった。申請者の研究グループは、神経栄養因子 BDNF の前駆体 proBDNF がプロテアーゼ切断を受けたとき、活性型 BDNF と同時に産生されるプロセッシング副産物 (BDNF pro-peptide) が内在的に存在する (Dieni, Kojima et al., JCB, 2012)。本研究では、BDNF のアンチセンス RNA AS2c が BDNF のタンパク質を発現上昇させることを見出したが、その過程において BDNF pro-peptide が活性分子として機能することを新たに見出した。

電気生理学の手法を用いて BDNF pro-peptide の活性を調べたところ、過去に報告に一致して BDNF はシナプス伝達の長期増強 (LTP; Long-term potentiation) を亢進するが BDNF pro-peptide はシナプス伝達の長期抑圧 (LTD; Long-term depression) を亢進することが見出された。つまり、BDNF と BDNF pro-peptide の生理作用は異なりかつ相反することが示唆される。

これまでの成長因子研究では、成熟型に注目したものがほとんどであった。しかし、前駆体のプロセッシングにより BDNF と BDNF pro-peptide という異なる活性を有する分子が同時に産生されることから、これまで数多く見出されてきた神経ペプチドと同様に、成長因子もその前駆体のプロセッシングにより活性型に限らず多様なサブタイプが産生されるのかもしれない。

BDNF 遺伝子の一塩基多型 Val66Met がヒトのエピソード記憶を低下させることが以前

に報告されていた (Egan, Kojima et al., *Cell*, 2003)。しかしこの多型が記憶に影響する細胞メカニズムはその後説明が進んでいなかった。BDNF pro-peptide は LTD を促進することを見出したが、Val66Met 変異を有する pro-peptide は BDNF と同様に LTD を抑制することが示された (Mizui et al., *PNAS*, 2015)。したがって、Val66Met 変異の分子機能は、BDNF の分泌量を低下させることに加えて、LTD を抑制するメカニズムの中で BDNF と協調的役割を担うのかもしれない。

## 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 3 件)

K. Uegaki, H. Kumanogoh, T. Mizui, T. Hirokawa, Y. Ishikawa, and M. Kojima, BDNF binds its pro-peptide with high affinity and the common Val66Met polymorphism attenuates the interaction. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol.18, No.5, pp 1042-1053, 2017

E. Castrén E. and M. Kojima, Neurotrophic factors and mood disorders, *Neurobiology of Disease*, Vol. 97, pp 119-126 (2016)

T. Mizui, Y. Ishikawa, H. Kumanogoh, M. Lume, T. Matsumoto, T. Hara, S. Yamawaki, M. Takahashi, S. Shiosaka, C. Itami, K. Uegaki, M. Saarma and M. Kojima, BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. *PNAS*, Vol.112, No.23, pp E3067-3074, 2015

[学会発表](計 1 件)

M. Kojima, New insights into the biology of growth factor and the etiology of dementia: BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met, IAN 2015, October, Chandigarh, India

[図書](計 1 件)

T. Mizui, M. Kojima, BDNF Propeptide: A Novel Modulator of Synaptic Plasticity *Vitamins and Hormones*, 2016, Vol.104

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島正己 (Masami Kojima)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究  
部門・研究チーム長  
研究者番号：40344171

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者