

令和元年5月23日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05320

研究課題名(和文) RNA結合タンパク質の機能障害を介した選択的神経変性機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism underlying selective neuronal death mediated by dysregulation of RNA-binding proteins

研究代表者

河原 行郎 (Kawahara, Yukio)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80542563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、複数の神経変性疾患において、RNA結合タンパク質(RBP)の代謝障害が発症病態に関与していることが示唆されている。しかし、多くのRBPは脳脊髄組織を含めた全身に幅広く分布しており、なぜ特定の神経細胞だけがこれらの環境変化に脆弱であるのか未解明である。このため本研究では、マウスの特定の神経細胞に発現するRNAだけを標識する技術を導入し、各神経細胞に発現するRNAの特徴を明らかにする手法の確立を目指した。その結果、比較的数の多い神経細胞についてはその細胞の特徴を捉えることに成功した。今後、より少数の神経細胞にも適用可能に改良し、選択的神経細胞死のメカニズムを解明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、現時点ではまだ開発途上にあるが、最終的にはRBPを介した選択的神経細胞死のメカニズムの解明に高く貢献する。その結果、筋萎縮性側索硬化症(ALS)や脊髄小脳変性症など数多くのRBPの代謝障害が発症病態の背景にある神経難病の原因を解明し、治療法開発へと役立つ。また、神経難病以外でもRBPが関与する疾患の研究に応用も可能である。

研究成果の概要(英文)：It has been recently revealed that dysregulation of RNA-binding proteins (RBPs) is tightly associated with the pathogenesis of multiple neurodegenerative diseases. However, given that most of these RBPs are ubiquitously expressed in the entire body, it remains unknown why certain selective neurons are vulnerable to the alteration of RBP-mediated metabolism. Therefore, in this research, we aimed to develop a method to label RNAs expressed in selective neuronal subtypes and elucidate the neuronal subtype-specific pattern of gene expression. Consequently, we successfully established the method, which is applicable to the neurons whose number is relatively large. Although we still have to improve the method until it can be utilized for the small number of neurons, it is expected that we can elucidate the mechanism underlying selective neuronal death by introducing this method once established.

研究分野：神経病態学

キーワード：神経変性疾患 RNA結合タンパク質 細胞死 脳神経組織 核酸 遺伝子 神経科学 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は、高齢化社会の到来により今後益々患者数が増加すると考えられ、病態解明と治療法確立が社会的に強く望まれている。近年の技術革新により運動神経細胞が変性する筋萎縮性側索硬化症 (ALS)や小脳・脊髄の細胞が変性する脊髄小脳変性症 (SCD)などの神経変性疾患では、TDP-43、FUS、Ataxin-2などの複数のRNA結合タンパク質 (RBP)に遺伝子変異が同定され、RBPの機能喪失・障害によるRNA代謝障害が発症に関与していることが分かってきた (Ling et al, Neuron, 2013; Castello et al, Trends Genet, 2013)。我々もTDP-43やAtaxin-2の機能喪失がRNA代謝障害を介して神経変性を誘導することを示してきた (Kawahara et al, PNAS, 2012; Yokoshi et al, Mol Cell, 2014; Li et al, Nat Commun, 2015)。しかし、これらのRBPは脳脊髄組織を含めた全身に幅広く分布しており、なぜ特定の神経細胞だけが選択的に変性するのか長年に渡って未解明である。これには、個々の神経細胞の特徴を、RNA発現プロファイルの観点から明らかにすることが不可欠である。

これまで脳脊髄組織から特定の神経細胞を分離するに当たっては、レーザーマイクロディセクション (LMD)法や蛍光標識した細胞のソーティング (FACS)法などが用いられてきた。LMD法では回収できる細胞数に限りがあり、自身の経験上も細胞を回収するまでに時間を要するためRNAの分解が不可避である (Kawahara et al, Nature, 2004)。FACS法も結合組織の多い神経細胞を単一細胞にするには限界があり、分画するまでの間にRNAの発現プロファイルが変化するリスクを伴う。また、両者とも細胞体は回収できても軸索・シナプスなどに分布するRNAは失ってしまうが、こういった細胞体外に局在するRNAが重要だという報告もある (Alami et al, Neuron, 2014)。また、近年、シングルセルからRNAライブラリーを調整する手法が実用化されたが、神経細胞はシングルセルにすることがそもそも困難であり、やはり細胞体以外のRNAは失ってしまう。そこで、これらの問題点を克服するため、あらかじめ生体内で特定の神経細胞に発現するRNAを標識し、解剖学的に細胞を分離する必要性をなくせばよいのではと着想した。これによって、RNA回収までの煩雑なステップがなくなり、質の劣化が軽減できる上に、細胞体だけでなく、軸索やシナプスに分布するRNAも回収可能となることが期待された。このRNA標識法はTU-tagging法と呼ばれ (Gay et al, Genes Dev, 2013)、これまでに血管内皮細胞で有効であることが示されている。しかし、脳を標的とした有用性については不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、将来的に経時的な RNA 発現の変動を解析することで神経変性に連動する特徴的な RNA を同定し、選択的神経細胞死のメカニズムを解明することを目指して、脳を標的としたTU-tagging法を確立し、各神経細胞に発現するRNAの特徴を明らかにするアプローチ法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

TU-tagging法では、4-SUをウリジンの代わりにRNAに取り込ませ、4-SUを取り込んだRNAをビオチン化修飾することで標識したRNAだけを回収する (図1)。特定の神経細胞に発現するRNAだけを標識するには、その細胞にだけ4-SUが存在する必要があるが、これには4-TUを4-SUに変換する哺乳類には存在しないuracil phosphoribosyltransferase (UPRT)酵素を、Cre-loxPシステムを使ってマウスの特定の神経細胞に発現させる (図1)。具体的には、原生物 *Toxoplasma gondii*由来のUPRT遺伝子の上流部分をloxP配列で挟み込んだUPRT Tgマウス (Gay et al, Genes Dev, 2013; Nat Protocols, 2014)と、各神経細胞特異的にCreを発現するTgマウスを交配し、特定の神経細胞でのみUPRTを発現させる (図2)。このマウスの腹腔に4-TU溶液を注射す

ると、UPRTを発現する神経細胞でのみ4-SUに変換される(図1)。4-SUには特に毒性はなく、また転写にも影響しないことが知られている(Duffy et al, Mol Cell, 2015)。4-SUのチオール基がビオチン化修飾できることを利用し、4-SUを取り込んだRNAだけを回収する(図1)。

本研究では、まずUPRT Tgマウスを導入し、全神経細胞でCreリコンビナーゼを発現するNestin-Creマウスと交配し、ラベル化RNAを回収した。ビオチン化修飾後、ドットブロット法によって、ビオチン化RNAの回収効率を評価した。次に、小脳プルキンエ細胞とアストロサイトで、それぞれCreリコンビナーゼを選択的に発現するPcp2-CreマウスおよびGfap-Creマウスと交配し、TU-tagging法を実施した。

各マウスの小脳からRNAを回収した後、RNA-seqを実施し、発現プロファイルを解析した。コントロールとして、非ラベル化マウス(野生型)の小脳を用いた。

なお、本研究は、大阪大学の動物実験審査委員会の承認を得て実施した。

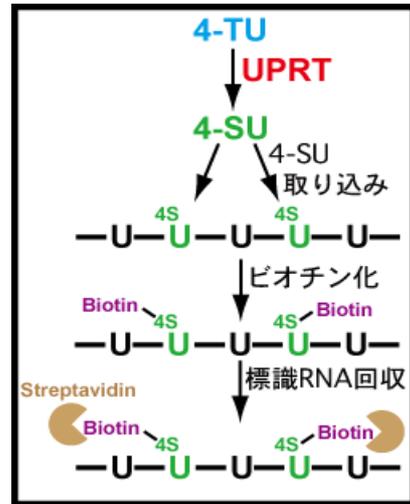


図1. 細胞特異的 RNA 標識と回収

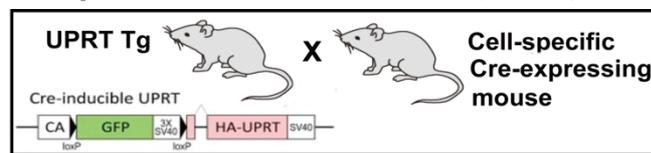


図2. 各神経細胞特異的UPRT発現マウスの作成法。

4. 研究成果

(1) 4-SU や 4-TU は脳血管関門を通過し、神経細胞に取りこまれる

はじめに、4-SUを腹腔に投与し、6時間後に安楽死させ全脳を抽出して解析したところ、神経細胞内のRNAが強くラベルされていることが確認できた。このため、次にUPRT Tgマウスを、全神経細胞でCreリコンビナーゼを発現するNestin-Creマウスと交配し、神経細胞全体にUPRTを発現させた。本Nestin-UPRTマウスに、DMSOとコーン油に溶解した4-TU (50 mg/ml)を腹腔に投与し (450mg/Kg体重)、6時間後に安楽死させ全脳を抽出した。複数回投与も検討したが、動物への負荷が高いため、最終的には、投与量、時間などは先行プロトコルに従った (Gay et al, Nat Protocols, 2014)。全脳からtotal RNAをTrizol Reagent (Thermo Fischer)を用いて抽出し、Biotin-MTSEA (Biotium)を用いてビオチン化修飾した。これをニトロセルロースメンブレンにドット状に滴下し、抗ビオチン化抗体を用いたドットブロット法によって、ビオチン化RNAの回収効率を評価した。その結果、Nestin-UPRTマウスに4-TUを投与した場合に、強いビオチン化シグナルが確認できた(図3)。脳特異的にUPRTが発現しているため、同マウスの肝臓からはシグナルを確認できなかった。また、UPRT Tgマウスや野生型マウスに4-TUを投与した場合も、ビオチン化シグナルは確認できなかった(図3)。以上の結果から、腹腔に投与した4-TUは脳血管関門を通過し、脳内のUPRTを発現した細胞内で4-SUへと置換され、RNAに取り込まれていることが確認できた。次に、Nestin-UPRTマウスから回収したビオチン化RNAを用いて、リボソームRNA (rRNA)を除去した後RNA-seq解析を行った。その結果、神経細胞に特徴的な遺伝子が濃縮されていることが確認できたことから、数の多い神経細胞を標的とした場合には、TU-tagging法により効率的に狙った細胞のRNAを回収できることが分かった。

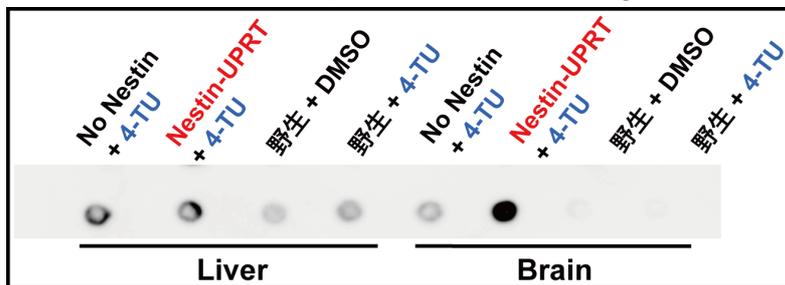


図3. 神経細胞特異的 RNA 標識のドットブロット解析。

(2) TU-tagging 法を用いた小脳プルキンエ細胞由来の RNA 標識

次に、小脳プルキンエ細胞をモデルとして選択し、ラベルしていない小脳の発現プロファイルと比較し、TU-tagging法を用いることで小脳プルキンエ細胞由来のRNAを濃縮できるかどうかを検証することとした。比較対照として、アストロサイトを選択し、グリア細胞の

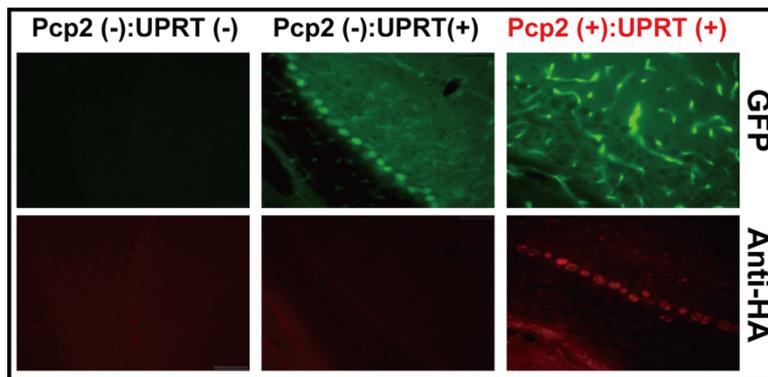


図4. Pcp2-UPRT マウスの小脳プルキンエ細胞における UPRT 発現.

特徴を抽出できるかどうかを検証することとした。具体的には、UPRT Tgマウスを、Pcp2-Creマウスと交配し、小脳プルキンエ細胞にUPRTを発現するマウスを作成した (図4)。UPRT Tgマウスでは、すべての細胞でGFPの発現が確認できる。一方、Pcp2-UPRTマウスでは、プルキンエ細胞でのみGFPのシグナルが検出されず、HAタグの発現が確認できることから、プルキンエ細胞特異的にUPRTが発現していることが確認できた (図2, 4)。同様に、UPRT Tgマウスを、Gfap-Creマウスと交配し、全脳アストロサイトにUPRTを発現するマウスも作成した。これらのマウスにおいて、確立したTU-tagging法に従って、4-TUを腹腔に投与し、6時間後に安楽死させ小脳を抽出した。その後、各小脳からtotal RNAを抽出しビオチン化修飾した。更に、ビオチン化RNAを回収し、リボソームRNA (rRNA)を除去した後RNA-seq解析を行った。同時に、ラベルしていない野生型マウスの小脳からもtotal RNAを回収し、rRNAを除去した後RNA-seq解析を行った。

RNA-seq後のデータを解析した結果を図5に示す。プルキンエ細胞に高発現するトップ100遺伝子 (左)と、アストロサイトに高発現するトップ100遺伝子 (右)のヒートマップを掲載した。今回は各群2サンプルで実施したが、同じ

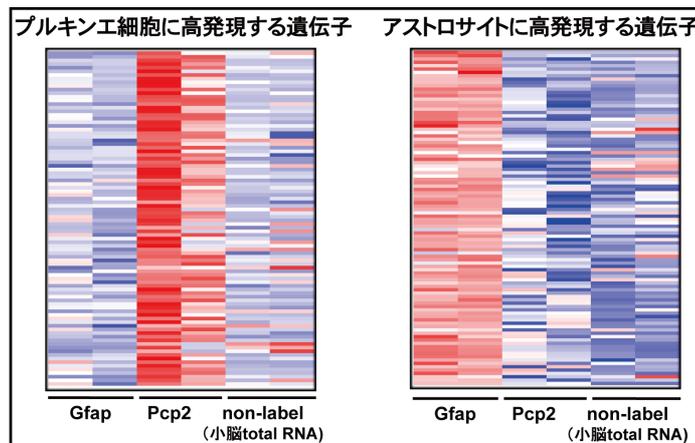


図5. 小脳プルキンエ細胞とアストロサイトに高発現する遺伝子

サンプル間での発現傾向は相関性が高く、再現性は高いことが確認できた。また、プルキンエ細胞に高発現している遺伝子はアストロサイトでの発現は低く、またアストロサイトで高発現している遺伝子は、プルキンエ細胞では低発現の傾向が見て取れる。また、ラベルしていないRNAの場合には、その混合型となっており、様々な細胞の集合体としての発現プロファイルを反映しているものと考えられる。プルキンエ細胞高発現遺伝子の中には、プルキンエ細胞マーカーとされる遺伝子も含まれており、ある程度手法の妥当性は検証できたものと考えられた。

(3) 今後の展望

本研究を通して、数の多い神経細胞は効率的にTU-tagging法でラベルできることが確かめられたが、少数の細胞については、オリジナルのプロトコールのままではいくつかの問題があることも分かってきた。まずは、ラベルされるRNAも少なくなるので、回収効率が低下し、更に非特異的に混入するRNAとの識別が困難になる。また、もう一つの問題は、神経細胞にはリボソ-

ムが大量に存在しているため、ラベルがrRNAに偏りやすい点である。このため、RNA-seq前にrRNAを除去しているが、実際に得られたデータを解析してみるとrRNAが相当量残存していることも明らかとなった。このため、プロトコルの大幅な改変が必要だと思われる。そこで、より効率的にラベルするため、4-TUの脳室内への直接注入を行ったところ、個体の生命維持に影響することなくラベル効率を上げることに成功した。また、polyA RNAを精製し、rRNAを除去してからビオチン化修飾されたRNAを回収するようにステップの変更を検討している。これらの改良プロトコルが確立されてから、改めて各神経細胞由来のRNAの発現プロファイルを解析する予定である。更に、in situ hybridization (ISH)法によって、結果の検証も進める予定である。その後、まずは脊髄小脳変性症モデルマウスを使って、変性に伴う経時的なプルキンエ細胞内でのRNA発現の変動を解析することで神経変性に連動する特徴的なRNAを同定し、選択的神経細胞死のメカニズムを解明することを予定している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Oshima T, Ishiguro K, Suzuki T, ***Kawahara Y.** Quantification of methylation efficiency at a specific *N*⁶-methyladenosine position in rRNA by using BNA probes. **Chemical Communications**, 54(69); 9627–9630, 2018. doi: 10.1039/c8cc03713b. 査読有
- ② Nakahama T, Kato Y, Kim JI, Vongpipatana T, **Suzuki Y**, Walkley CR, ***Kawahara Y.** ADAR1-mediated RNA editing is required for thymic self-tolerance and inhibition of autoimmunity. **EMBO Reports**, 19; e46303, 2018. doi: 10.15252/embr.201846303. 査読有
- ③ Gallego A, Hartasánchez DA, Brasó-Vives M, Garcia-Ramallo E, Lopez-Valenzuela M, Baena N, Guitart M, Fernández-Bellón H, Kondova I, Bontrop R, **Kawahara Y**, Espinosa-Parrilla Y. RNA editing independently occurs at three mir-376a-1 sites and may compromise the stability of the microRNA hairpin. **Gene**, 628; 109–116, 2017. doi: 10.1016/j.gene.2017.07.032. 査読有
- ④ Uemura Y, Oshima T, Yamamoto M, Reyes CJ, Costa Cruz PH, Shibuya T, ***Kawahara Y.** Matrin3 binds directly to intronic pyrimidine-rich sequences and controls alternative splicing. **Genes to Cells**, 22(9); 785–798, 2017. doi: 10.1111/gtc.12512. 査読有
- ⑤ Kanemitsu Y, Fujitani M, Fujita Y, Zhang S, Su YQ, **Kawahara Y**, Yamashita T. The RNA-binding protein MARF1 promotes cortical neurogenesis through its RNase activity domain. **Scientific Reports**, 7(1); 1155, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-01317-y. 査読有
- ⑥ Miyake K, Ohta T, Nakayama H, Doe N, Terao Y, Oiki E, Nagatomo I, Yamashita Y, Abe T, Nishikura K, Kumanogoh A, Hashimoto K, ***Kawahara Y.** CAPS1 RNA Editing Promotes Dense Core Vesicle Exocytosis. **Cell Reports**, 17; 2004–2014, 2016. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.073. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① **河原 行郎.** TDP-43 ノックインマウスにおける神経変性病態. 第 37 回日本認知症学会学術集会 ロイトン札幌 札幌 2018 年 10 月 14 日 (招待講演)
- ② **河原 行郎.** TDP-43 ノックインマウスを用いた ALS 発症病態の解析. 第 59 回日本神経学会学術大会 ロイトン札幌 札幌 2018 年 5 月 23 日 (招待講演)
- ③ **河原 行郎.** ALS 発症機構の解明に向けた TDP-43 ノックインマウスの作製と解析. 第 1 回三融会・武田神経科学シンポジウム 武田研修所 大阪 2018 年 3 月 11 日 (招待講演)
- ④ Uemura Y, Oshima T, Yamamoto M, Reyes CJ, Costa Cruz PH, Shibuya T, **Kawahara Y.** Matrin3 binds directly to intronic pyrimidine-rich sequences and controls alternative splicing. RNA2017 富山国際会議場 富山 2017 年 7 月 19–21 日 (ポスター)
- ⑤ Miyake K, Ohta T, Nakayama H, Doe N, Terao Y, Oiki E, Nagatomo I, Yamashita Y, Abe T, Nishikura K, Kumanogoh A, Hashimoto K, **Kawahara Y.** CAPS1 RNA Editing Promotes Dense Core Vesicle Exocytosis. Gordon Research Conference on RNA editing ベンチュラ 米国 2017 年 3 月 11–17 日 (ポスター)
- ⑥ **河原 行郎.** CAPS1 RNA Editing Promotes Dense Core Vesicle Exocytosis. 第 39 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 横浜 2016 年 11 月 30 日 (招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：鈴木 穰

ローマ字氏名：(SUZUKI, Yutaka)

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院新領域創成科学研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：40323646

(2) 研究協力者 該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。