

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06877

研究課題名(和文) RNA顆粒による局所翻訳制御とプレシナプス形成：相分離とシナプス顆粒との関連

研究課題名(英文) RNA granule-mediated regulation for local translation and presynapse formation: relation between phase separation and synapse granules

研究代表者

佐々木 幸生 (Yukio, Sasaki)

横浜市立大学・生命医科学研究科・准教授

研究者番号：10295511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：RNA結合タンパク質(RBP)の1種である脆弱X精神遅滞タンパク質(FMRP)が他のRBPと共に、神経軸索のプレシナプスにおいてRNA顆粒を形成し局所翻訳を制御することを示唆する知見を得た。さらに、FMRP欠損による局所翻訳上昇とシナプス小胞分泌増加が翻訳抑制活性を持つメトホルミンで抑制可能であることを示した。また、光遺伝学によりFMRP含有RNA顆粒の液-液相分離を時間空間的に制御する新手法を開発した。これを用いて、RNA顆粒形成のRNA顆粒形成によるシナプスの形態、機能の調節機構を明らかにする計画である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性神経発達障害で最も頻度が高い脆弱X症候群(FXS)は、知的障害や自閉症の症状を示す。今回、FXSの原因遺伝子産物であるFMRPが、G3BP2などの他のRNA結合タンパク質と共にシナプスでRNA顆粒を形成し、局所翻訳を制御することでシナプス機能を調節すると示唆する結果を得た。最近G3BP2等の数個のRNA結合タンパク質において神経発達障害で変異が見られ、RNA顆粒形成に異常があることが報告された。従って、我々の研究成果は他の神経発達障害でも共通する可能性のある病態を示している。今後の研究進展により、RNA顆粒形成がどのように神経発達障害の病態に影響を及ぼすかが明らかになると期待される

研究成果の概要(英文)：Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) is a component of RNA granules, including stress granules. Our study suggests that FMRP, in conjunction with other RNA-binding proteins, forms RNA granules and regulates local translation in the presynapses of neuronal axons. FMRP-deficient neurons demonstrated elevated local translation and increased synaptic vesicle secretion. However, in metformin-treated FMRP-deficient neurons, translation was suppressed, and synaptic vesicle secretion was reduced to levels observed in wild types. We developed an optogenetic system to control RNA granule formation, where blue light irradiation prompts liquid-liquid phase separation, enabling spatial and temporal regulation of FMRP-containing RNA granules. Using this system, we plan to clarify the mechanisms through which RNA granule formation influences synaptic morphology and functions.

研究分野：神経生物学

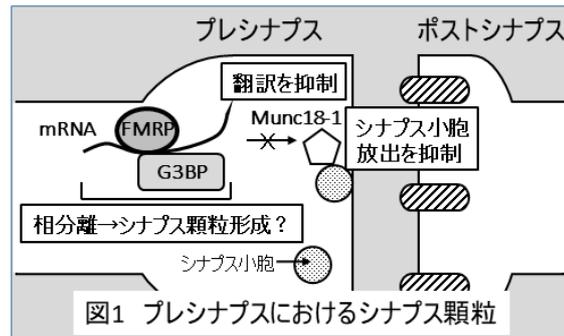
キーワード：横浜市 神経生物学 脆弱X症候群 自閉スペクトラム症 液-液相分離 光遺伝学 RNA顆粒 RNA結合タンパク質

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

神経細胞は軸索や樹状突起という長い突起を持つため、細胞体から遠く離れた場所におけるシナプス形成には局所翻訳によるシナプスタンパク質の即座の供給が重要である。局所翻訳には mRNA、リボソーム、RNA 結合タンパク質 (RNA binding protein, RBP) の局在が必要である。シナプスにおける mRNA の局在に関してはポストシナプスに比べてプレシナプスのトランスクリプトーム解析が先行しており、約 450 種の mRNA がプレシナプスに局在することが明らかになった (Hafner et al, Science (2019))。リボソームの局在も同時に明らかになったが、プレシナプスに局在する RBP はほとんど解析されていない。我々は軸索にプレシナプスを誘導する新手法を開発し (Parvin et al, J Vis Exp (2019))、RBP である脆弱 X 精神遅滞タンパク質 (Fragile X mental retardation protein, FMRP) がプレシナプス形成時に顆粒状に集積することを見いだした (Parvin et al, Neurosci Res (2019))。我々はこの顆粒を「シナプス顆粒」と名付け解析を行っている。しかし、FMRP のような RBP がどのように顆粒を形成、局所翻訳を制御し、プレシナプス形成を調節するかは全く不明である。

RBP は結合する RNA と共に、神経顆粒、ストレス顆粒、P ボディ等の「RNA 顆粒」と呼ばれる膜を持たない一種のオルガネラ様の構造体を形成し、RNA の輸送、貯蔵、分解、翻訳を調節する (Kiebler & Bassell, Neuron (2006))。RBP の多くは液-液相分離により細胞内の RNA 顆粒を形成することが知られている (Alberti & Dormann, Annu Rev Genet (2019))。しかし、RNA 顆粒の形成機構は不明であり、さらに、顆粒形成によりどのようにシナプスで翻訳が制御され、結果としてシナプスの機能が調節されるかは明らかではない。



2. 研究の目的

本研究の目的は、「シナプス顆粒形成の相分離による制御が局所翻訳を介してプレシナプス形成を調節するか」を解明することである (図1)。そのために、

- (1) プレシナプスにおける RNA 顆粒形成
- (2) プレシナプスにおける局所翻訳とシナプス小胞分泌について明らかにする。さらに、
- (3) 時間空間的な RNA 顆粒形成制御系の開発に着手し、光遺伝学的手法を用いて相分離を制御することで RNA 顆粒形成をコントロールし、シナプスの形態、機能を調節することを目指す。

3. 研究の方法

(1) LRRTM2 ピーズを用いたプレシナプス形成

シナプスオーガナイザータンパク質である LRRTM2 (Leucine-rich repeat transmembrane neuronal 2 protein) の細胞外領域に BAS (biotin acceptor sequence) を付加した融合タンパク質を Expi293F cells に発現させ、その培養上清からビオチン化 LRRTM2 を精製した。このタンパク質を直径約 4.5 μm の磁気ビーズに結合させ、培養 9-18 日目のマウス大脳皮質から作成したニューロンボールの軸索に添加し、プレシナプスを形成させるためにさらに 1 日培養した (Parvin et al, Neurosci Res (2019))。プレシナプス内のタンパク質を観察するために、抗 FMRP, G3BP1, G3BP2 等の抗体で蛍光抗体染色を行った。

(2) シナプス小胞分泌の測定

まず、LRRTM2 ピーズでプレシナプスを形成させたニューロンボールに細胞膜を染色できる蛍光色素 AM1-43 を取り込ませた。洗浄により、細胞膜の AM1-43 を除去し、シナプス小胞をラベルした。ニューロンボールを蛍光顕微鏡のステージにセットした後、60 mM の KCl で刺激し、その後 5 分間ライブイメージングを行った。蛍光画像を ImageJ で解析し、シナプス小胞の蛍光色素の減衰の程度からシナプス小胞分泌の程度を数値化した。

(3) OptoFMRP による青色光照射依存性顆粒形成

赤色蛍光タンパク質である mCherry、青色光によりオリゴマー形成を誘導する Cry2 をマウス FMRP の RNA 結合領域に融合させたタンパク質 (OptoFMRP) を発現するベクターを HEK293T 細胞にトランスフェクションした。2 日後、共焦点レーザー顕微鏡下において 488 nm の青色光を局所的に照射し、OptoFMRP の顆粒形成を観察した。固定後、蛍光免疫染色法で他の RBP との共同在を、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法 (FISH 法) で polyA⁺ RNA の局在を解析した。

4. 研究成果

(1) プレシナプスにおける RNA 顆粒形成の解析

我々は以前、シナプスオーガナイザータンパク質 LRRTM2 を結合させたビーズを用いて形成させたプレシナプスに FMRP が集積することを明らかにした (Parvin et al, Neurosci Res (2019))。

また、シナプス小胞分泌に関与する Munc18-1 がプレシナプスで局所的に翻訳されることを示唆する結果を得ていた。今回、FMRP と相互作用することが知られている G3BP1, 2 が FMRP と共にプレシナプスに集積するか解析した。LRRTM2 を結合しなかったコントロールのビーズでは FMRP や G3BP2 の集積は見られなかったが、LRRTM2 ビーズで形成したプレシナプスには FMRP と G3BP2 が集積しており、さらに両者は共局在していた (図 2)。これらの集積は LRRTM2 添加後 30 分から始まり、2-4 時間で最大値に達し、その後平衡状態となった。同様の集積は G3BP1 と FMRP のファミリータンパク質である Fxr2p でも観察された。また、リボゾーム RNA も同時に集積していた。ピューロマイシンラベル法を用いて、プレシナプスにおける翻訳を解析したところ、ピューロマイシンの染色がプレシナプス形成と共に上昇し、翻訳阻害剤アニソマイシンで染色が抑制された。従って、プレシナプス形成と共に、FMRP を含む少なくとも数種類の RBP が集積し、局所翻訳が起きていることが示唆された。

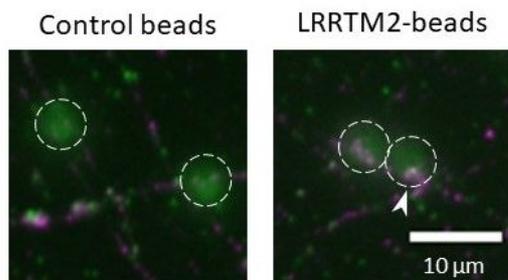


図 2: FMRP と G3BP2 のプレシナプスにおける集積

培養後 18 日目のニューロンボールにコントロールビーズ、あるいは LRRTM2 を添加し、1 日後に固定し FMRP (緑) と G3BP2 (マゼンダ) の局在を蛍光免疫染色法で観察した。白い破線はビーズの位置を示す。FMRP と G3BP2 が共局在したシグナルが矢頭の位置に白で示されている。

(2) プレシナプスにおけるシナプス小胞分泌と局所翻訳

次に、プレシナプスにおける局所翻訳がシナプス小胞分泌を調節するかを検討した。LRRTM2 ビーズにより形成されたプレシナプスからのシナプス小胞分泌を AM1-43 を用いて野生型と FMRP 欠損神経細胞 (FMRP をコードする遺伝子である *Fmr1*-knockout (KO) 神経細胞) で比較した。*Fmr1*-KO 神経細胞では野生型に比べてシナプス小胞分泌が有意に上昇していた。また、*Fmr1*-KO 神経細胞のプレシナプスでは Munc18-1 が有意に増加していた。糖尿病治療薬であるメトホルミンは脆弱 X 症候群モデルマウスにおいて、翻訳レベルを野生型レベルまで低下させることが報告されている (Gantois et al, Nat Med (2017))。メトホルミンを *Fmr1*-KO 神経細胞に投与したところ、Munc18-1 の集積は野生型と同程度に低下し、シナプス小胞分泌も野生型と同程度に抑制された。これらのことから、*Fmr1*-KO 神経細胞では FMRP がいないため、RNA 顆粒形成に障害が生じ、Munc18-1 の局所翻訳が増加し、シナプス小胞分泌が上昇する可能性が考えられる。本稿の結果は Neuroscience Letter 誌に公表した (Takeda et al, Neuosci Lett in press)。

(3) 時間空間的な RNA 顆粒形成制御系の開発

上記の結果から、FMRP を含む RBP の顆粒形成が局所翻訳を介してプレシナプスの機能を調節する可能性がある。このことを明らかにするために、我々は FMRP を含む顆粒を光遺伝学的手法を用いて制御する方法を開発した。

FMRP の顆粒形成を時間空間的に制御するために、光依存的顆粒形成システムを導入した。シロイヌナズナの光受容タンパク質である Cry2 を利用した OptoDroplet システムを検討した。FMRP の RNA 結合領域を Cry2 に融合させた遺伝子を発現するプラスミドを 293T 細胞に導入したところ、短時間の青色光照射で顆粒形成が確認された (図 1)。この顆粒形成は可逆的であり、照射を止めると元通りに細胞質全体にわたって分散していた。青色光照射と同時に FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) を行ったところ、30 秒以内に蛍光が回復したことから、この顆粒は流動性が十分にあり、液-液相分離で形成されていることが示唆された。この顆粒はストレス顆粒のマーカである Fxr1p や polyA⁺ RNA と共局在していたので、RNA 顆粒と同様の性質を有していると考えられる。本稿の結果は昨年度の日本分子生物学会で発表した。

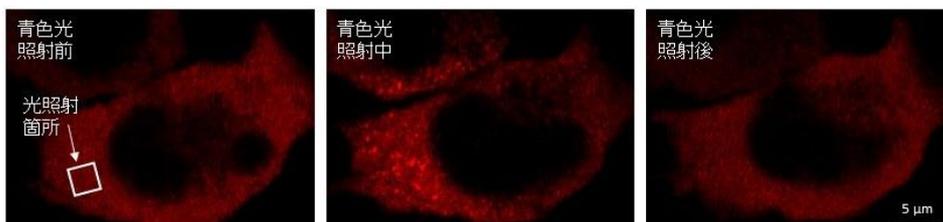


図 3: 青色光照射による OptoFMRP の可逆的顆粒形成

OptoFMRP を HEK293T 細胞に導入し、青色光を照射して顆粒形成を観察した。OptoFMRP は赤色蛍光タンパク質である mCherry、青色光によりオリゴマー形成を誘導する Cry2 を FMRP の RNA 結合領域に融合させたタンパク質である。青色光照射することにより、すぐに照射箇所周辺で OptoFMRP の顆粒形成が生じ、青色光照射を OFF することで元のように細胞質全体に均一に分布した。

今後、OptoFMRP を神経細胞に発現させて、局所的な液-液相分離を制御することで顆粒形成を行い、その結果、翻訳を局所的に制御されるかどうか、さらに、シナプスの形態・機能が制御可能か検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takabatake Masaru, Goshima Yoshio, Sasaki Yukio	4. 巻 14
2. 論文標題 Semaphorin-3A Promotes Degradation of Fragile X Mental Retardation Protein in Growth Cones via the Ubiquitin-Proteasome Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncir.2020.00005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sasaki Yukio	4. 巻 10
2. 論文標題 Local Translation in Growth Cones and Presynapses, Two Axonal Compartments for Local Neuronal Functions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 668 ~ 668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10050668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Casingal Cristine R., Kikkawa Takako, Inada Hitoshi, Sasaki Yukio, Osumi Noriko	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification of FMRP target mRNAs in the developmental brain: FMRP might coordinate Ras/MAPK, Wnt/ -catenin, and mTOR signaling during corticogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00706-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Renoma, Ishii Rie, Parvin Shumaia, Shiozawa Aki, Nogi Terukazu, Sasaki Yukio	4. 巻 in press
2. 論文標題 Novel Presynaptic Assay System Revealed That Metformin Ameliorates Exaggerated Synaptic Release and Munc18-1 Accumulation in Presynapses of Neurons from Fragile X Mouse Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 137317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2023.137317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 藤原 睦也 佐々木 幸生	4. 巻 54
2. 論文標題 RNA顆粒と神経細胞のRNA輸送・局所翻訳	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 478-482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐々木 幸生、武田 怜之雅、石井 理愛、塩澤 亜希、禾 晃和、Shumaia Parvin
2. 発表標題 糖尿病治療薬メトホルミンは脆弱X症候群モデルマウスの神経細胞のプレシナプスにおいて生じる過剰なシナプス分泌とMunc18-1の蓄積を改善する
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原 睦也、佐々木 幸生
2. 発表標題 脆弱X精神遅滞タンパク質のRNA結合ドメイン欠損変異体の過剰発現はRNA顆粒形成を阻害する
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤原 睦也、佐々木 幸生
2. 発表標題 光遺伝学的な液-液相分離制御による脆弱X精神遅滞タンパク質含有顆粒形成の神経細胞内における操作
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------