

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22500286

研究課題名(和文) RNA 結合蛋白 PTB によるスプライシングを介した神経分化制御機構の解明

研究課題名(英文) The regulatory role for the RNA binding polypyrimidine tract-binding (PTB)

protein during neural development.

研究代表者

吉田 進昭 (YOSHIDA NOBUAKI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：10250341

研究成果の概要(和文)：RNA 修飾因子 PTB は中枢神経系において未分化細胞集団に発現しており、RNA recognition motif を介して標的 pre-mRNA の polyprimidine 領域に結合し、mRNA のスプライシングや翻訳制御を行う。近年、転写調節のみならず RNA 修飾による細胞分化制御が重要な役割を担う事が知られており、これまで不明の点が多かったスプライシング等の RNA 修飾による神経分化制御の機構解明を目的に PTB 欠損 ES 細胞およびコンディショナルノックアウトマウス(cKO マウス)を作製した。Nestin-Cre マウス及び Emx1-Cre マウス(神経組織特異的に Cre を発現)との交配により、PTB が脳室周囲に存在する未分化細胞(Radial glia)の細胞間接着や細胞極性の維持に重要な因子である事を見出した。PTB 欠損マウスの大脳皮質領域において胎生 14.5 日前後から Radial glia の形成する Adherence junction が消失し、それに伴って神経分化亢進および神経幹細胞の枯渇が起こる事が示された。また生後には重篤な水頭症を発症する事を見出した。

研究成果の概要(英文)：PTB (Polypyrimidine tract binding) protein is a well-known multifunctional RNA binding protein, which can regulate mRNA stability, internal ribosome entry site (IRES) dependent translation, mRNA localization and alternative splicing (AS) by interacting with polypyrimidine rich sequences of target pre-RNAs and mRNAs. We have generated PTB knockout mice and null ESCs and found that PTB is essential for early mouse development and important for proliferation and differentiation of mouse ESCs. Its expression is observed various tissues and cells including neural stem cells (NSCs) and the expression was gradually down regulated during neural differentiation. Some in vitro studies demonstrated that knockdown of PTB leads to change of wide spread AS events similar to the change observed during neural differentiation. To explore the role of PTB in the developmental mouse brain, we generated conditional *Ptb* knockout mice (*Nestin-Cre;Ptb flox/neo*) and studied its phenotypes using histological analysis. Our findings show that the depletion of PTB in the developing mouse brain is eventually developed hydrocephalus and clearly reveal that PTB is important for the maintenance of adherens junctions in the dorsal telencephalon and might function in the regulation of stem cell niche integrity upon the maintenace of NSCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：キーワード：1 発生工学、2 神経発生、3 RNA splicing

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系を構成する様々な細胞(ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト)は、増殖能及び多分化能を有する神経幹細胞より生み出される。そのため神経幹細胞からの分化メカニズムの解明は生物学的研究意義に加え神経疾患に対する再生医療という観点からも重要な課題である。近年、転写因子群による神経分化制御機構以外にRNA修飾による制御が重要な働きを担っている事が示唆されている。しかしRNA修飾機構に関する研究は未だ立ち後れているのが現状であり、その機構解明は喫緊の課題と考えられた。

2. 研究の目的

我々はES細胞の未分化維持因子の一つとしてRNA結合蛋白質PTBを同定し研究を行ってきた(Shibayama et al. 2009, Ohno et al. 2011)。PTBはRNA recognition motifを持ち、標的pre-mRNAのpolyprimidine領域に結合してmRNAのSplicingを制御している。PTBはSplicing 制御の重要な担い手であり、神経系においては神経幹細胞/前駆細胞に限局して発現している。そこでPTBによるRNA splicing制御を介した神経分化制御機構の解明を目指し研究を行った。

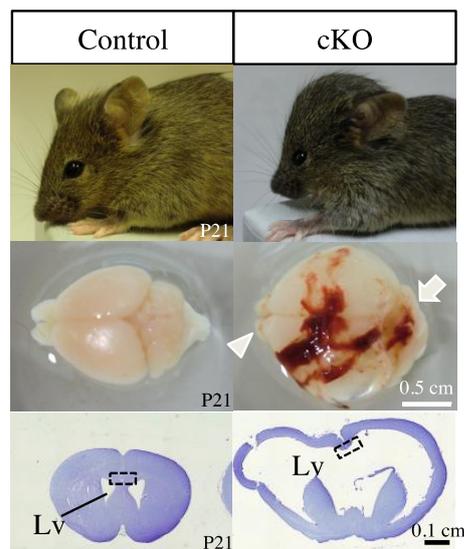
3. 研究の方法

RNA 修飾因子 PTB は中枢神経系において未分化細胞集団に発現しており、mRNA のスプライシングを制御している。近年、転写調節のみならずRNA修飾による細胞分化制御が重要な役割を担う事が知られており、これまで不明の点の多かったスプライシング等のRNA修飾による神経分化制御の機構解明を目的にPTBコンディショナルノックアウトマウス(cKOマウス)を作製した。

4. 研究成果

(1) Nestin-Creマウス及びEmx1-Creマウス(神経組織特異的にCreを発現)との交配により、PTBが脳室周囲に存在する未分化細胞(Radial glia)の細胞間接着や細胞極性の維持に重要な因子である事を見出した。PTB欠損マウスの大脳皮質領域において胎生14.5日前後からRadial gliaの形成するAdherence

junctionが消失し、それに伴って神経分化亢進および神経幹細胞の枯渇が起こる事が示された。また生後には重篤な水頭症を発症する事を見出した(図1)。



PTB cKOマウス由来の神経幹細胞集団のRNAを回収しエクソンアレイによる標的因子の検索を行った。同定した候補因子が幹細胞の極性維持に関わる分子メカニズムに関して解析を進めている。

(2) 神経系ではPTBのパラログ遺伝子であるnPTBが発現しておりPTBと相補的に働く可能性が示唆される。そこでnPTB cKOマウスを作製した。Emx1-Creマウス(大脳皮質領域のみでCreを発現)との交配により得られたnPTB cKOマウスはPTB cKOマウスと同じく水頭症様の症状を呈した。現在、PTB/nPTB double cKOマウスを作製しより詳細な機能解析を進めている。

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 11 件)

1. Ichise T, Yoshida N, Ichise H. Ras/MAPK signaling modulates VEGFR-3 expression through Ets-mediated p300 recruitment and histone acetylation on the Vegfr3 gene in

lymphatic endothelial cells. PLoS One. 7(12):e51639. (2012)

2. Shibasaki T, Tokunaga A, Sakamoto R, Sagara H, Noguchi S, Sasaoka T, Yoshida N. PTB Deficiency Causes the Loss of Adherens Junctions in the Dorsal Telencephalon and Leads to Lethal Hydrocephalus. Cereb Cortex. [Epub ahead of print] (2012)

3. Oyama T, Harigaya K, Sasaki N, Okamura Y, Kokubo H, Saga Y, Hozumi K, Suganami A, Tamura Y, Nagase T, Koga H, Nishimura M, Sakamoto R, Sato M, Yoshida N, Kitagawa M. Mastermind-like 1 (MamL1) and mastermind-like 3 (MamL3) are essential for Notch signaling in vivo. Development. 138(23):5235-5246. (2011)

4. Ohno S, Shibayama M, Sato M, Tokunaga A, Yoshida N. Polypyrimidine tract-binding protein regulates the cell cycle through IRES-dependent translation of CDK11(p58) in mouse embryonic stem cells. Cell Cycle. 1;10(21):3706-3713. (2011)

5. Morita M, Oike Y, Nagashima T, Kadomatsu T, Tabata M, Suzuki T, Nakamura T, Yoshida N, Okada M, Yamamoto T. Obesity resistance and increased hepatic expression of catabolism-related mRNAs in Cnot3^{+/-} mice. EMBO J. 30(22):4678-4691. (2011)

6. Fukui R, Saitoh S, Kanno A, Onji M, Shibata T, Ito A, Onji M, Matsumoto M, Akira S, Yoshida N, Miyake K. Unc93B1 restricts systemic lethal inflammation by orchestrating Toll-like receptor 7 and 9 trafficking. Immunity. 35(1):69-81. (2011)

7. Fukuda T, Tokunaga A, Sakamoto R, Yoshida N. Fbxl10/Kdm2b deficiency accelerates neural progenitor cell death and leads to exencephaly. Mol Cell Neurosci. 46(3):614-624. (2011)

8. Funato Y, Terabayashi T, Sakamoto R, Okuzaki D, Ichise H, Nojima H, Yoshida N, Miki H. Nucleoredoxin sustains Wnt/ β -catenin signaling by retaining a pool of inactive dishevelled protein. Curr Biol. 20(21):1945-1952. (2010)

9. Hayashi T, Funato Y, Terabayashi T, Morinaka A, Sakamoto R, Ichise H, Fukuda H, Yoshida N, Miki H. Nucleoredoxin negatively regulates Toll-like receptor 4 signaling via recruitment of flightless-I to myeloid differentiation primary response gene (88). J Biol Chem. 285(24):18586-18593. (2010)

10. Ichise T, Yoshida N, Ichise H. H-, N- and Kras cooperatively regulate lymphatic vessel growth by modulating VEGFR3 expression in lymphatic endothelial cells in mice. Development. 137(6):1003-1013. (2010)

11. Murohashi M, Nakamura T, Tanaka S, Ichise T, Yoshida N, Yamamoto T, Shibuya M, Schlessinger J, Gotoh N. An FGF4-FRS2 α -Cdx2 axis in trophoblast stem cells induces Bmp4 to regulate proper growth of early mouse embryos. Stem Cells. 28(1):113-121. (2010)

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 川上絵理、徳永暁憲、坂本怜子、吉田進昭 初期発生におけるポリコーム群遺伝子rybpの機能解析 第34回 日本分子生物学会 2011年2月14日 横浜
- (2) 福田 剛、徳永 暁憲、吉田 進昭 Targeted disruption of Fbxl10 causes neural tube defects resulting in exencephaly 第33回日本分子生物学会, 第83回日本生化学会大会 2010年12月8日 神戸
- (3) 柴寄 孝幸、徳永 暁憲、吉田 進昭 PTB deficiency in the brain disrupts dorsal neuroepithelium of the lateral ventricles and leads lethal hydrocephalus 第33回日本分子生物学会, 第83回日本生化学会大会 2010年12月8日神戸
- (4) 正木 信也、徳永 暁憲、吉田 進昭 Functional analysis of nPTB, nervous system specific RNA binding protein 第33回日本分子生物学会, 第83回日本生化学会大会 2010年12月7日 神戸

〔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：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/cem_ger/HPidenshikinou/main.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 進昭 (YOSHIDA NOBUAKI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：10250341

(2) 研究分担者

徳永 暁憲 (TOKUNAGA AKINORI)

大分大学・全学研究推進機構・助教

研究者番号：70549451

(3) 連携研究者

なし