

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14352

研究課題名(和文) 神経選択的サイレンサーNRSF/RESTバリエントによる老化脳制御

研究課題名(英文) Regulatory roles of NRSF/REST variants in the aging brain

研究代表者

森 望 (MORI, Nozomu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：00130394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：従来、神経発生の初期段階において神経分化の抑制因子と考えられていたRESTが、ヒトの老化脳においては神経分化抑制ではなく、神経保護に機能し、RESTの発現が認知能力とも相関すると報じられている。申請者らはこの結果の真偽を検証する目的で、マウスのRESTの発現を培養神経老化モデルで検討した。また、RESTに細胞保護機能があるかどうかについて、酸化ストレスやDNA障害をモデルに検討した。全長のRESTおよび短絡型のREST4の発現が若齢と老齢の神経細胞で異なることが判明した。ただし、REST4の機能性や、RESTの老化神経での発現変動の意義については未だはっきりせず今後の研究に委ねられる。

研究成果の概要(英文)：NRSF/REST was originally reported as a transcriptional master regulator of neuronal differentiation during early neural development. However, recent report claimed that REST is key regulator of brain aging, and in human REST expression levels highly correlated with cognitive function in mild cognitive impairment (MCI) and Alzheimer's disease (AD) patients. We explored whether REST gene expression and their potential roles in neuronal protection in the aged neurons, with special interest on REST splicing variant, named REST4. REST and REST4 expression was altered during aging of neurons, but the functional significance of the REST4 short isoform remain uncertain.

研究分野：分子神経老年学

キーワード：老化脳 神経老化 転写制御 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

2014年の3月末、科学雑誌 Nature の論文としてハーバード大学の Bruce Yankner のグループからヒトの老化脳制御に関して大変興味深い結果が提示された。REST は老化脳での発現が本来高いが、アルツハイマー病(AD)脳ではその発現が一律に低い。REST があると酸化ストレス防御が進み、それがないと神経細胞死が進む。REST は蛋白質凝集代謝にも関わり AD 脳、他の神経変性疾患脳でもアミロイドβなどの凝集体と挙動を同じくする。REST の発現レベルが高いと一般に認知能力は高く、MCI、AD 脳ではそれが様に低い。したがって REST は人間の老化脳保護のマスター遺伝子と考えられる、と報じた(Lu et al., Nature 507, 448-454 (2014))。この結果は、従来、この転写因子が神経特異的遺伝子の発現を抑えることで神経機能を阻止する、という事実と真っ向から対立する概念であって、とてもにわかには信じがたい研究結果だった。しかし、一方で老化脳制御の根幹でこのような重要な転写制御因子が本当に関わるのであれば、今後老化脳保護へむけた具体的戦略の構築に向けてとても有効な新たな方法が考えられると期待された。

2. 研究の目的

REST 遺伝子の発現産物としては、全長 120kD の転写抑制因子として機能する蛋白質とそれの N 末側のほぼ 1/3 領域からなる機能未知の REST4 バリエーション蛋白質がある。これまでの研究では、その多くが全長蛋白質についての解析だった。神経の初期分化における REST の機能性を考えると全長蛋白質が優位だが、老化脳での機能性に関しては短い REST4 バリエーションが神経細胞の中で優位になる可能性が考えられた。そこで、本研究では老化神経細胞における REST4 バリエーションの発現形態と機能性を探索することを第一目的とした。

そのために、REST4 を特異的に認識する抗体の作成、神経様培養細胞への REST 遺伝子導入、インビトロでの培養神経における老化細胞の解析、そして REST4 バリエーションの機能解明を進めることとした。

3. 研究の方法

(1). 抗体作成

マウスとラットの NRSF/REST アミノ酸配列を比較して、N 末近傍と C 末近傍、そして神経特異的な REST4 バリエーションの C 末近傍の部分で共通性があり、なおかつ抗原性が高いと思われる領域を選別した。その結果、N 末より 6 番目アミノ酸から 20 番目まで、また C 末から 35 番目から 22 番目までのペプチド領域で KLH ペプチドを合成し、ウサギ 2 羽を免疫し、抗血清を回収する。

(2). 強制発現細胞株

いわゆる Tet-on システムで REST cDNA を

含むプラスミドを構築し、Neuro2a 細胞へトランスフェクションし、安定発現株 (stable lines) を複数ひろう。

(3). 長期初代培養神経細胞

マウス胎仔 (E18.5) の脳海馬からの初代培養神経細胞を通常の条件で 2 週間 (突起伸展期) から 4 週間 (シナプス形成期) 培養後もそのまま維持し、5 ヶ月以降まで形態観察を続ける。培養開始初期の細胞密度、培地組成、培地の交換ないし添加頻度などを比較検討し、海馬神経の長期培養に適した条件を確立する。培養 1 ヶ月程度でのシナプス形成のあと、神経回路形成、神経細胞の代謝変動、細胞内小器官の存在形態 (ミトコンドリア、小胞体、老化マーカーとしてのリポフスチン沈着など)、シナプス関連分子の発現変動、神経細胞骨格 (微小管とアクチン) の化学的变化を分子生物学的手法および細胞生物学的手法で解析した。

4. 研究成果

(1) NRSF/REST バリエーション認識抗体

全長 REST の N 末、C 末近傍配列 (CMGQSS-GGGSLFNN、CKDYSKHLNRHLVN) と、短絡型バリエーション REST4 の C 末配列 (RHMRTHSECDLAG) を元にしてペプチド抗体 (ウサギ、ポリクロー) を作成し、その反応特性を調べた。その結果、N 末抗体とバリエーション抗体ではウェスタンブロット上で短絡型の REST4 を検出できることが確認となった。マウス神経芽細胞である Neuro2a (N2a) 細胞で REST を強制発現して組織染色をしてみると、夾雑性の反応をするためか、結果が思わしくなかった。細胞の固定法や染色条件を工夫してみたが、結局組織染色には特異性をもった形での使用ができない、と結論した。その結果、細胞染色、組織染色には市販のアブカムの抗体 (ab21635) を使用することとした。ただし、この場合、全長 REST と短絡型 REST4 を区別することはできないこととなった。

(2) NRSF/REST 発現誘導細胞の樹立

マウスの N2a 細胞に REST 遺伝子を導入し、染色体上に安定的に組み込まれた細胞株を単離した。そのプロモーター領域にはドキシサイクリン (DOX) で誘導ができるよう細工した。その結果、細胞培養条件下で、1 µg/ml の DOX の添加によって NRSF を発現誘導できる細胞株を樹立できた。DOX 添加後の REST の発現レベルをウェスタンブロットで確認したところ、添加後 24 時間で明瞭な REST 発現を認め、添加後 48 時間ではさらにつよい REST 発現を認めたが、48 時間の時点では細胞数の減少も識別したので、REST 過剰発現による細胞死の誘導が懸念された。したがって、この誘導系ではおよそ 24 時間程度の

時間経過までで実験を計画すべきであると判断した。

(3) 長期培養における神経老化モデル

ヒトやマウスでの老化研究は寿命が長いためにとっても時間を要し、またヒトの場合は倫理規程もあって研究上の障害も多い。そこで、神経老化研究においてより簡便な細胞老化モデル系があるととても有用であると考えられる。そこで、われわれはマウス胎仔の脳から初代培養神経細胞を長期間培養し、シャーレの中で数週間から数ヶ月培養することによって、生体内での老化を反映するような神経老化のモデル系を樹立することを試みている。これまでのところ、E18.5のステージの胎仔から海馬の神経細胞を培養することで、培養後1ヶ月でほぼ十分に突起伸展をし、4~5ヶ月後には突起の退縮や若干の細胞死など、老化の兆候を示す培養系をほぼ確立することができた。従来、細胞老化のマーカーとして知られる細胞内の脂質性蓄積物であるリポフスチンが経時的に溜まっていく様子も確認することができた。また、シナプス関連分子の発現を比較検討すると、若齢(1ヶ月)に比べ老齢(4ヶ月)では明らかに種々の受容体やシナプス直下の関連分子、シグナル伝達関連分子の遺伝子発現レベルが低下していることも確認できた。このことから、神経老化におけるRESTの役割の探索においても、このインビトロでの神経老化の系が有効と考えられる。

(4) 老化神経細胞におけるNRSF/REST発現

上記のインビトロの神経細胞の老化系で、全長のRESTおよび短絡型のREST4の遺伝子発現を比較検討した。まず1ヶ月齢の培養神経細胞(若齢)と4ヶ月齢の培養神経細胞(老齢)で細胞抽出液を回収し、ウェスタンブロットによる蛋白質の発現比較を検討した。しかし、なかなか十分量の細胞を回収することができず結果が不安定だった。そこで、方針を転換し細胞染色によってRESTの発現量を比較することを試みた。しかし、従来の抗体では全長のRESTと短絡型のREST4の発現を区別することができなかった。REST4識別を喧伝する市販抗体においても十分確定的な実験結果をえることはできなかった。

そこで、先に自前で作成していたREST4バリエーションのペプチド抗体、ふたつのロットについてウサギの抗血清から抗体の精製を試みた。その結果、どちらのロットの抗体とも反応夾雑物を減弱することができたが、とくにロット2のほうが、より鮮明にREST4以外に反応していたバンドを除去することができた。しかも、その精製抗体を培養神経細胞で蛍光抗体染色をしてみると、全長RESTに対するアブカムの市販抗体とは異なる染色像を得ることができた。いくつかのコントロール実験の結果、この抗体を用いた細胞染色が短絡型のREST4を認識しているとの確証が

えられたので、それ以降このREST4-2精製抗体を組織染色に利用することにした。

(5) 老化神経細胞におけるNRSF/RESTバリエーションの挙動

市販の全長RESTの抗体とこの短絡型REST4認識抗体とで、培養神経細胞の老化系で、REST発現の変動について調べた。その結果、RESTの発現は老化した神経細胞で高まるが、逆にREST4の発現は老化細胞で低下することがわかった。ただし、REST4レベル全体が下がったというよりむしろ、細胞核内のREST4レベルが減弱する。場合によっては細胞質性のREST4は不変かむしろ増加するとみてとれる傾向にあった。いずれにせよ、細胞核内のREST4は老化神経細胞で少なくなることがわかった。

(6) NRSF/RESTバリエーションの機能解析

神経細胞老化に対するRESTの影響を調べるため、先に樹立したREST遺伝子を導入したN2a細胞株を用いて酸化ストレスや放射線障害ストレス、および蛋白質凝集体ストレスの影響について比較検討した。

まず、酸化ストレス(H₂O₂)負荷後の細胞の生存率をDOXによるREST誘導株と非誘導細胞とで比較した。その結果、REST誘導群ではストレス耐性が高まる結果となった。

次に、この細胞に放射線照射によりDNA損傷を誘発し、 γ -H2AX fociの数として損傷を定量的に比較した。DOXでの誘導細胞と非誘導細胞とで比較すると、DOX誘導24時間によるREST発現誘導細胞では、ストレス負荷30分後でDNA損傷の低下がみられた。つまり、RESTによるDNA障害ストレスからの防御作用、あるいは細胞保護効果が示唆された。一方、線照射(5 Gy)によるDNA損傷誘発時にはREST発現の有無によるDNA損傷の程度に著しい違いは見られなかった。これらのことからストレスの違いによりDNA損傷に対するRESTの応答も異なることが示唆された。

N2a細胞でのREST誘導株の樹立に際して、全長RESTの発現系と短絡型REST4の発現系とを同時に作成し、両者を並行して比較検討するつもりだったが、不確定な事情により後者の細胞の性状が不明確となり、現状ではまだはっきりとした両者の比較ができていない。したがって、REST4の機能性については、今後さらに検討が必要となっている。

(7) 老化神経細胞におけるトランスクリプトーム解析

さらにより詳しい神経細胞の老化メカニズムの理解のため、上述の培養神経細胞の老化の系で網羅的な遺伝子発現の比較検討を試みた。まず、培養1か月の若齢神経細胞と培養4か月の老齢神経細胞のトランスクリプ

トーム解析をいわゆる CAGE 法(Cap analysis of gene expression) によりおこなっている。予備的な解析では、まだ明確な REST ターゲット遺伝子群の統一的な変動は確認できていない。引き続き詳細な解析を進めていく必要がある。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Baba S, Onga K, Kakizawa S, Ohyama K, Yasuda K, Otsubo H, Scott BW, Burnham WM, Matsuo T, Nagata I, Mori N. Involvement of the neuronal phosphotyrosine signal adaptor N-Shc in kainic acid-induced epileptiform activity. *Sci. Rep.* Jun 8;6:27511. doi: 10.1038/srep27511. (2016) 査読有
2. Makino N, Oyama J, Maeda T, Koyanagi M, Higuchi Y, Shimokawa I, Mori N, Furuyama T., FoxO1 signaling plays a pivotal role in the cardiac telomere biology responses to calorie restriction. *Mol Cell Biochem.* 2412 (1-2):119-130 (2016) 査読有
3. Yasuda K, Takahashi M, Mori N. Mdm20 modulates action remodeling through the mTORC2 pathway via its effect on Rictor expression *PLoS One*, e0142943. (2015) 査読有
4. 三井洋司、森望、磯部健一：老化の細胞モデル：その挑戦と限界を探る、基礎老化研究 39(1), 41-46 (2015) 査読無

[学会発表] (計 5 件)

1. Mori N, REST or CTCF?: In searching for a master regulator of animal longevity and brain aging, The 7th Nagasaki-Pusan Joint Seminar on Aging Research, Feb 23 (2018)
2. Murai K, Mori N, Transcriptome analysis by use of CAGE-seq in young and old cultured neurons, The 7th Nagasaki-Pusan Joint Seminar on Aging Research, Feb 23 (2018)
3. 淵野萌子、松本弦、村井清人、森望、マウス初代培養神経細胞の長期培養による老化神経細胞モデルの構築 (3P-15) 第 1 2 2 回日本解剖学会、3月 2 8-3 0 日 (2017)
4. 鳴瀬喜久、青木努、廣瀬英司、田中雅樹、森望、神経機能に関わる転写因子 NRSF/REST に結合する Ifi203 の機能解析 (1P-33) 第 1 2 2 回日本解剖学会、3

月 2 8-3 0 日 (2017)

5. Mori N, Matsumoto G, Murai K, NRSF/REST in neuroprotection and brain aging, 韓国老年学会、デグ (韓国) June 15-17 (2016)

[図書] (計 2 件)

1. Mori N, In vitro aging revisited: The longevity of cultured neurons, in " Aging Mechanisms: Longevity, Metabolism, and Brain Aging " , pp79-88, Springer (2015)
2. Mori N, Mook-Jung I (eds.) " Aging Mechanisms: Longevity, Metabolism, and Brain Aging " , 総ページ数 439 (本書全体の編集を担当) , Springer (2015)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

- (1) 研究代表者
森 望 (MORI, Nozomu) 長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系) ・教授
研究者番号 : 00130394
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
村井 清人 (MURAI, Kiyohito) 長崎大学・医歯薬学総合研究科 (医学系) ・助教
研究者番号 : 90362540
- (4) 研究協力者
なし