

令和元年5月29日現在

機関番号：82675

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07361

研究課題名(和文) 神経樹状突起mRNA輸送・局所的翻訳と記憶形成を繋ぐ分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism linking dendritic mRNA transport and local translation in neurons and memory formation

研究代表者

椎名 伸之 (Shiina, Nobuyuki)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構(新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・准教授)

研究者番号：30332175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経樹状突起へのmRNA輸送および局所的翻訳を担うRNA顆粒の構成因子RNG105は、長期記憶に必須のRNA結合タンパク質である。本研究では、RNG105のターゲット候補として同定したmRNA(低分子量Gタンパク質ArfのGEFおよびGAPをコードするmRNA 8種類)に注目し、解析を行った。その結果、それらのmRNAはRNG105依存的に樹状突起へ局在化することを明らかにした。さらに、それらmRNAの翻訳産物は、樹状突起上の後シナプス(スパイン)のうち、未成熟型を減らして成熟型を増加させ、細胞表面のグルタミン酸受容体発現量を増加させることによってシナプス強化に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経樹状突起へのmRNA輸送および局所的翻訳は、シナプス強化や記憶に関与するが、数万種類存在するmRNAのうちどれがその責任を担うかは体系的に調べられていなかった。本研究は、長期記憶が顕著に低下するRNG105ノックアウトマウスの海馬において、樹状突起層への局在が低下したmRNAを網羅的に同定し、その中から遺伝子オントロロジー解析によって「Arf制御因子mRNA群」を絞り込んだ。これらmRNA群が実際にRNG105依存的に樹状突起へ局在化し、シナプス強化に関与することを示した本研究は、長期記憶形成のメカニズムを理解する上で重要な因子及び制御機構を新たに提示した点で学術的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：RNG105, a component of RNA granules responsible for mRNA transport and local translation in neuronal dendrites, is an RNA-binding protein essential for long-term memory formation. In this study, we focused on mRNAs identified as RNG105 target candidates (eight different mRNAs encoding GEFs and GAPs of small G protein Arf). mRNA imaging with an MS2-GFP tagging system in primary cultured neurons from mouse cerebral cortexes revealed that the Arf GEF and GAP mRNAs were localized to dendrites in an RNG105-dependent manner. Furthermore, knockdown of the Arf GEFs and GAPs in cultured neurons suggested that they are involved in synaptic strengthening by reducing immature types and increasing mature types of postsynapses (spines) on dendrites and by increasing the expression level of AMPA-type glutamate receptors on the cell surface of dendrites.

研究分野：細胞生物学

キーワード：mRNA輸送 神経樹状突起 RNA顆粒 RNG105 Arf スパイン AMPA受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

長期記憶の形成には脳内での新規タンパク質合成が必要であることが 1960 年代から知られていた (Flexner *et al.*, 1963)。このタンパク質合成は、神経細胞の細胞体で起こるのではなく、細胞体から遠く離れた樹状突起内で起こることが示唆されていた (Kang and Schuman, 1996)。樹状突起内でタンパク質を合成するためには、翻訳の鋳型となる mRNA などの必要な分子を樹状突起へ配置する必要がある。それを担う構造体として「RNA 顆粒」が発見された。RNA 顆粒は mRNA、リボソーム、翻訳因子、RNA 結合タンパク質など、翻訳に関わる多くの因子を含み、これらが巨大複合体となって能動的に樹状突起へ輸送されることが示された (Knowles *et al.*, 1996)。さらに、興奮刺激を受けた後シナプス近傍の RNA 顆粒では、局所的に翻訳が活性化することも示された (Krichevsky and Kosik, 2001)。しかし、RNA 顆粒が担う mRNA 輸送・局所的翻訳と長期記憶形成とを繋ぐ分子メカニズムは不明な点が多かった。

我々は、RNA 顆粒の主要な RNA 結合タンパク質 RNA granule protein 105 (RNG105, 別名 Caprin1) を同定し、RNG105 が樹状突起への mRNA 輸送に関与することを見出した (Shiina *et al.*, 2010)。さらに、生後の大脳・海馬で *Rng105* 遺伝子を欠損する RNG105 コンディショナルノックアウト (cKO) マウスは、後シナプスの反応性 (excitatory postsynaptic potential, EPSP) が約半減し、空間記憶および恐怖条件付けテストにおける長期記憶が著しく低下することを明らかにした。このマウスの海馬を用いて、樹状突起への局在化が低下した mRNA を網羅的に同定し、さらにそれら mRNA を遺伝子オントロジー解析によってカテゴリー分けすることによって、低分子量 G タンパク質 ADP ribosylation factor (Arf) の活性制御因子 guanine nucleotide exchange factor (GEF) および GTPase-activating protein (GAP) をコードする mRNA 群が最も有意に局在低下することを突き止めた。以上のそれまでの成果および予備的データから、長期記憶形成の基盤となる分子メカニズムとして、Arf GEF, GAP mRNA 群の樹状突起への輸送を介した制御が鍵を握る可能性が考えられた。

2. 研究の目的

長期記憶形成の基盤となる分子メカニズムとして、Arf GEF, GAP mRNA の樹状突起への局在化およびそれら翻訳産物によるシナプス強化に着目し、長期記憶を制御するメカニズムを解明することが本研究の目的である。具体的には、まず、(1) Arf GEF, GAP mRNA の樹状突起への局在化が RNG105 によることを明らかにする。そのために、初代培養神経細胞内においてそれらの mRNA を蛍光イメージングし、樹状突起への局在化を野生型マウスおよび RNG105 ノックアウト (KO) マウス由来の神経細胞の間で比較定量解析を行った。さらに、(2) Arf GEF, GAP が後シナプス (スパイン) 形成をいかに制御するかを明らかにする。学習・記憶に伴うスパイン強化の際には、スパインが肥大化 (成熟) し、細胞表面に提示される AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) が増加することが知られている (Makino and Malinow, 2009; Herring and Nicoll, 2016)。そこで、初代培養神経細胞において Arf GEF, GAP をノックダウン (KD) し、スパイン形態および細胞表面 AMPAR 発現への影響の定量イメージング解析を行った。

3. 研究の方法

(1) Arf GEF, GAP mRNA 群の樹状突起への局在化

マウス大脳から抽出した mRNA から cDNA を作成し、Arf GEF, GAP 8 種類の全長 mRNA に対応する cDNA を得た。これらを、In-fusion HD cloning kit (Takara) を用いて pKaede-MC1 (Kaede 166-566)-MS2-24x ベクター (Shiina *et al.*, 2010) の EcoRI サイトに挿入した。このベクターから転写される mRNA は、Arf GEF, GAP mRNA の 5' 末端側に MS2 結合配列の 24 回リピートを融合した mRNA となる。このベクターおよび MS2-GFP ベクターの両者を、マウス大脳皮質由来の初代培養神経細胞 (7 days *in vitro*, 7DIV) にリン酸カルシウム法によって導入した。MS2 タンパク質が MS2 結合配列へ結合することにより、mRNA が GFP タグ化され、mRNA の蛍光イメージングが可能となる。初代培養神経細胞は野生型および RNG105 KO マウス由来のものを用いた。

導入 2 日後 (9DIV)、一部の神経細胞には 25 mM KCl を添加し、脱分極刺激を与えた。その後神経細胞を 3.7%ホルマリン固定し、IX83 倒立型顕微鏡 (Olympus) 60 倍対物レンズ、ORCA-R2 デジタル CCD カメラ (Hamamatsu Photonics) を用いて Z シリーズ画像を取得した。Z スタック画像を作成後、ImageJ を用いて mRNA の定量を行なった。mRNA は顆粒状に観察されたが、これは RNA 顆粒に取り込まれたことに起因すると考えられる。顆粒の個数および平均輝度の定量解析を行った。

(2) Arf GEF, GAP の KD がスパイン形態および樹状突起表面 AMPAR 発現に与える影響

Arf GEF, GAP 8 種類の各々に対する KD ターゲット配列 21 base を pH1'-SR-DsRed-I-P ベクター (Takahashi *et al.*, 2007) に挿入し、マウス大脳皮質由来初代培養神経細胞 (7DIV) に導入した。KD 効率の測定は、各 Arf GEF, GAP の GFP タグ化タンパク質を神経細胞に発現し、10DIV において GFP 蛍光強度を KD なしのコントロール神経細胞と比較定量することにより行った。

スパインの形態およびサイズの定量解析は、KD ベクターと共に GFP ベクターを 7DIV にて導入することにより行った。12DIV にて神経細胞をホルマリン固定し、前シナプスマーカーであるシナプシン I 抗体で免疫染色した。GFP の蛍光により神経細胞の形態を可視化し、シナプシ

ン I が接触した樹状突起上の棘構造をスパインとして抽出した。顕微鏡による画像取得は(1)と同様に行い、ImageJを用いてスパインの個数および形態を定量解析した。スパインの形態分類は、過去の報告を参考にし(Choi *et al.*, 2006; Ron *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2017)、フィロポディア、Thin型、Stubby型、Mushroom型、Branch型に分類した。

AMPAの樹状突起表面への発現の定量解析は、KDベクターと共にpC1-SEP-GluR1ベクター(Addgene)を7DIVにて導入することによって行った。GluR1はAMPAのサブユニットの一つであり、SEP(super ecliptic pfluorin)は細胞表面に提示されることによって蛍光を発するpH感受性GFPである。12DIVにて神経細胞をホルマリン固定し、GFP抗体染色によって細胞に発現した全SEP-GluR1をCy3で染色した。これにより、細胞表面に発現したSEP-GluR1を緑色で、また、全SEP-GluR1を赤色で検出可能となる。AMPAは細胞内ではエンドソームに、細胞表面では後シナプスに主に局在し、点状のシグナルとして検出される。画像取得を上記と同様に行った後、ImageJを用いて点状のシグナルの個数および蛍光強度を定量し、全GluR1に対する表面GluR1の比を求めることにより、樹状突起表面に発現したAMPAを定量解析した。

4. 研究成果

(1) Arf GEF, GAP mRNAのRNG105依存的な樹状突起への局在化

まず、野生型マウス由来の初代培養神経細胞におけるmRNAの局在を解析した。細胞体に留まるmRNAとして同定された*Gabra1*, *Gria2* mRNAは、MS2結合配列のみのコントロールRNAと同程度の樹状突起局在を示した。これに対し、樹状突起局在が知られている*Camk2a* mRNAは、有意に多く樹状突起に局在化した。Arf GEF, GAP mRNA群はコントロールRNAよりも有意に多く、かつ、*Camk2a* mRNAと同程度に樹状突起局在を示した。

さらに、RNG105 KOマウス由来の初代培養神経細胞で同様の解析を行った。その結果、すべてのmRNAがコントロールRNAと同程度にしか樹状突起へ局在しなかった。また、各々のmRNAの樹状突起への局在を野生型神経細胞とRNG105 KO神経細胞との間で比較した結果、*Camk2a* mRNAおよびArf GEF, GAP mRNA群はRNG105 KO神経細胞における樹状突起への局在が有意に低下した。以上の結果から、Arf GEF, GAP mRNA群は樹状突起へ局在化すること、またそれはRNG105依存的事であることが明らかになった。

(2) Arf GEFおよびArf GAP mRNAの脱分極刺激非依存のおよび依存的な樹状突起への局在化

mRNAの神経樹状突起への局在は、KClを添加した脱分極条件において促進されるケースが報告されている(Lyford *et al.*, 1995; Link *et al.*, 1995; Steward *et al.*, 1998)。そこで、野生型の初代培養神経細胞におけるArf GEF, GAP mRNA群の樹状突起への局在化がKClに依存するかどうかを調べた。その結果、8種類のmRNAのうち、2種類のArf GEF mRNAはKClの有無にかかわらず樹状突起へ局在化した。一方、6種類のArf GAP mRNAは、KClなしの場合はコントロールRNAと有意差がなく、KClありの場合には有意に多く樹状突起へ局在化した。以上の結果から、GEF mRNAは脱分極にかかわらず樹状突起へ局在化し、GAP mRNAは脱分極に依存して樹状突起へ局在化することが示唆された。

(3) Arf GEF, GAPのスパイン形成・成熟への関与

野生型マウス大脳皮質由来の初代培養神経細胞にKDベクターを導入し、Arf GEF, GAPのKDを行なった。共導入したGFP融合型Arf GEF, GAPの蛍光強度を指標にKD効率を定量した結果、コントロールKDベクターの場合と比較して8種類のArf GEF, GAPのいずれも90%以上がKDされていることを確認した。

次に、初代培養神経細胞にKDベクターとGFPベクターを共導入し、Arf GEF, GAPのKDがスパインの個数と形態に及ぼす影響を解析した。その結果、6種類のArf GEF, GAPのKDによって、Mushroom型の成熟型スパインの個数が有意に減少することがわかった。一方、2種類のArf GAPのKDでは、Thin型の未成熟型スパインの個数が有意に増加した。以上の結果から、解析を行った8種類のArf GEF, GAPは、成熟型スパインの形成を促進する6種類と未成熟型スパインを減らす2種類とに大別できることが示された。よって、これらArf GEF, GAPの働きにより、樹状突起上の成熟型スパインの割合が増加することが示唆された。

(4) Arf GEF, GAPのAMPA樹状突起表面発現への関与

初代培養神経細胞にKDベクターとSEP-GluR1ベクターとを共導入し、Arf GEF, GAPのKDがAMPAの樹状突起における表面発現に及ぼす影響を解析した。その結果、(3)の結果でKDによって成熟型スパインの個数が減少した6種類のArf GEF, GAPに関しては、KDによって樹状突起表面に発現するAMPAが減少することがわかった。一方、別の2種類のArf GAPのKDでは、表面に発現するAMPAの量に影響は見られなかった。以上の結果から、6種類のArf GEF, GAPは成熟型スパインの形成を促進すると共にAMPAの表面発現も促進することが示唆された。

以上の結果は、Arf GEF, GAPをコードする複数のmRNAがRNG105依存的に、また、GAPに関しては神経活動にも依存して樹状突起へ局在化することを示した。さらに、これらの翻訳産物はスパインの成熟化に加えてAMPAの樹状突起表面発現も制御してシナプス強化に関与することを示した。これまで、樹状突起に局在するmRNAとして*Camk2a*, *Arc* mRNAなどの解析が進め

られてきたが、いずれの翻訳産物もスパインの成熟に関わるものであった。しかしシナプス強化には、スパインの成熟に加えて AMPAR の表面発現の増加も重要な役割を担う。その後者に関わる樹状突起 mRNA の同定と解析は遅れているが、本研究は、その mRNA として Arf GEF, GAP mRNA 群を提示した点に意義がある。またこれまで、数万種類存在する mRNA のうち、どれが樹状突起へ輸送されてシナプス強化の責任を担うかは体系的に調べられていなかった。本研究は、長期記憶が顕著に低下する RNG105 cKO マウスの海馬において、樹状突起層への局在が低下した mRNA を網羅的に同定し、その中から遺伝子オントロロジー解析によって最も高い割合の mRNA が樹状突起局在低下を示した「Arf 制御因子 mRNA 群」を責任因子の候補として絞り込み、解析を行った点にも意義がある。Arf GEF, GAP mRNA 群は、樹状突起へ局在化して長期記憶形成の責任を担う有力な候補であり、今後、樹状突起へ局在できない Arf GEF, GAP mRNA を持つマウスを作成し、個体レベルでの研究を展開することによって、長期記憶形成の責任を担う mRNA 輸送・局所的翻訳メカニズムの解明につながることを期待される。

<引用文献>

- Choi, S. et al. *J. Neurosci.* 26, 4811-4819 (2006).
Flexner, J.B. et al. *Science* 141, 57-59 (1963).
Herring, B.E. and Nicoll, R.A. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 351-365 (2016).
Kang, H. and Schuman, E.M. *Science* 273, 1402-1406 (1996).
Knowles, R.B. et al. *J. Neurosci.* 16, 7812-7820 (1996).
Krichevsky, A.M. and Kosik, K.S. *Neuron* 32, 683-696 (2001).
Lin, L. et al. *J. Biol. Chem.* 292, 9451-9464 (2017).
Link et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5734-5738 (1995).
Lyford et al. *Neuron* 14, 433-445 (1995).
Makino, H. and Malinow, R. *Neuron* 64, 381-390 (2009).
Ron, S. et al. *Cereb. Cortex* 22, 2519-2528 (2012).
Shiina, N. et al. *J. Neurosci.* 30, 12816-12830 (2010).
Steward, O. et al. *Neuron* 21, 741-751 (1998).
Takahashi, K. et al. *Mol. Biol. Cell* 18, 1701-1709 (2007).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

- Shiina N. Liquid- and solid-like RNA granules form through specific scaffold proteins and combine into biphasic granules. *J. Biol. Chem.* 294, 3532-3548 (2019). 査読有, doi: 10.1074/jbc.RA118.005423.
Nakayama K, Ohashi R, Shinoda Y, Yamazaki M, Abe M, Fujikawa A, Shigenobu S, Futatsugi A, Noda M, Mikoshiba K, Furuichi T, Sakimura K and Shiina N. RNG105/caprin1, an RNA granule protein for dendritic mRNA localization, is essential for long-term memory formation. *eLife* 6, e29677 (2017). 査読有, doi: 10.7554/eLife.29677.

[学会発表](計13件)

- 椎名伸之. mRNA transport regulatory factor RNG105/caprin1 is essential for long-term memory. 日本分子生物学会年会 2018年.
大橋いえ、木森義隆、椎名伸之. Dendritic localization of mRNAs for Arf GEFs and GAPs involved in spine formation in dendrites. 日本分子生物学会年会 2018年.
山下映、藤井一希、腰高由美恵、安達真由美、笹川恵理、中川真一、高雄啓三、椎名伸之. ストレス応答性翻訳制御因子 NFAR2 の天然変性領域欠損マウスの網羅的行動解析. 日本分子生物学会年会 2018年.
Ohashi R, Shinoda Y, Shigenobu S, Kimori Y, Furuichi T and Shiina N. Reduced dendritic mRNA localization and AMPAR surface expression by RNG105/caprin1 deficiency. Society for Neuroscience Annual Meeting 2018年.
Nakayama K, Abe M, Yamazaki M, Fujikawa A, Noda M, Futatsugi A, Mikoshiba K, Sakimura K and Shiina N. RNG105/caprin1, an RNA granule protein, regulates structural spine plasticity and is required for long-term memory formation. Society for Neuroscience Annual Meeting 2018年.
大橋いえ、木森義隆、椎名伸之. Dendritic localization of mRNAs for Arf GEFs and GAPs involved in spine formation in dendrites. 日本神経科学大会 2018年.
中山啓、阿部学、藤川顕寛、野田昌晴、二木啓、御子柴克彦、崎村建司、椎名伸之. RNG105, an RNA granule-associated RNA-binding protein, regulates the structural plasticity of spine and is required for memory formation. 日本神経科学大会 2018年.
椎名伸之. RNA 顆粒の液相・固相様サブ構造は異なる RNA 顆粒因子によって形成される. 生命科学系学会合同年次大会 2017年.
大橋いえ、木森義隆、重信秀治、椎名伸之. RNG105/Caprin1 欠損マウス神経樹状突起にお

ける Arf 制御因子 mRNA の局在低下 . 生命科学系学会合同年次大会 2017 年 .
中山啓、阿部学、山崎真弥、藤川顕寛、野田昌晴、二木啓、御子柴克彦、崎村建司、椎名伸之 . RNA 顆粒構成因子 RNG105 は、シナプス後部形態の可塑的变化を制御し、記憶形成に必要である . 生命科学系学会合同年次大会 2017 年 .
片山香織、椎名伸之 . RNA 顆粒タンパク質 RNG140 複合体主要要素 eIF3 の同定 . 生命科学系学会合同年次大会 2017 年 .
椎名伸之 . RNA granule assembly and disassembly modulated by methylation. 日本神経科学大会 2016 年 .
大橋りえ、高雄啓三、宮川剛、椎名伸之 . Comprehensive behavioral analysis of RNG105 heterozygous mice: reduced social interaction and attenuated response to novelty. 日本神経科学大会 2016 年 .

〔その他〕

ホームページ等

「細胞内構造の膜によらない区画化を担うタンパク質群の特性を解明」

<http://www.nibb.ac.jp/press/2019/01/17.html>

「長期記憶形成に必須な分子メカニズムを特定」

<http://www.nibb.ac.jp/press/2017/11/21.html>

「長期記憶に不可欠な分子 RNG105」 <https://academist-cf.com/journal/?p=6660>

報道関連情報

「基礎生物学研究所、長期記憶形成や ALS・認知症の新たな知見」infoseek ニュース、nifty ニュース、ニコニコニュース、認知症ねっと (2019.2.2)

「記憶長続きする仕組み解明」朝日新聞 (2017.12.22)

「長期記憶形成に必須」日刊工業新聞 (2017.11.30)

「長期記憶「RNG105」」毎日新聞 (2017.11.28)

「長期記憶形成タンパク質」中日新聞 (2017.11.22)

6 . 研究組織

〔研究協力者〕

研究協力者氏名：大橋 りえ

ローマ字氏名：(OHASHI, Rie)

研究協力者氏名：木森 義隆

ローマ字氏名：(KIMORI, Yoshitaka)

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。