

令和元年6月17日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06730

研究課題名(和文) アルギニンメチル化酵素PRMT1を起点としたグリア分化機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of glial differentiation by PRMT1

研究代表者

橋本 美涼 (Hashimoto, Misuzu)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：80805424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質アルギニンメチル化を担う酵素：PRMT1は細胞増殖の制御等が知られているが、中枢神経系の発達における機能は十分に知られていなかった。特に神経活動や発達を制御する細胞：アストロサイトにおける役割は不明である。我々は、中枢神経系の大元である神経幹細胞に着目し、神経幹細胞特異的PRMT1欠損マウスではアストロサイトが過剰に産生され、発達中の脳が炎症様の応答を示すことを見出した。本研究から、PRMT1が正常な脳の発達を支えるための必須の因子であ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

妊婦の感染等により胎児の脳が炎症様の状態(脳白質障害等)を起こすとその後の脳発達に致命的な影響が出る事が知られているが、現在有効な治療法や対策が無い。本研究は、タンパク質アルギニンメチル化を担う酵素：PRMT1に着目して脳の発達を調べた。脳特異的PRMT1欠損マウスは、発達早期に炎症様応答を示すと共に、その後の脳発達が遅延した。本研究結果はPRMT1が正常な脳発達の際には過剰な炎症を抑制する作用があることを示唆しており、健康な脳の発達を支える分子基盤の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：PRMT1, a major arginine methyltransferase, plays critical roles in transcription, DNA damage response, and cell proliferation. Although PRMT1 is highly expressed in the central nervous system (CNS), its role has not been studied well. Especially, its role in astrocyte, a major CNS cell type which supports neuronal activity, was uncovered. To identify astrocytic development by loss of PRMT1 in the CNS, we analyzed neural stem cell-specific PRMT1 conditional knockout (PRMT1-CKO) mice. A comprehensive analysis of gene expression in the developing cortices of PRMT1-CKO mice showed upregulation of inflammatory signaling which is generally mediated by astrocytes and microglia which is another CNS cell type. Histological analyses also revealed that populations of astrocytes and microglia were increased in the brain of PRMT1-CKO mice. Our results indicate that PRMT1 is essential for the development of astrocytes and also affects microglial development.

研究分野：動物生化学

キーワード：アルギニンメチル化 グリア アストロサイト ミクログリア RNA-seq 炎症性サイトカイン ケモカイン PRMT1

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

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の胎生期から生後の期間は、中枢神経系組織(脳・脊髄)が構造的・機能的に大きく発展する時期である。中枢神経系を構成する細胞の大元となる神経幹細胞は、まずニューロン分化に進み、次にグリア分化が起きるとされており(図1)、分化の順序やバランスの決定が正常な神経系発達そのものと言える。これまで、ニューロン・グリア分化スイッチングを担う多数の転写因子が同定されてきた。さらには、グリアの中でもアストロサイトとオリゴデンドロサイトという全く機能の異なるグリアがあり、これらは共通のグリア前駆細胞から、拮抗作用を持つ転写因子などの制御を介して生まれてくると考えられている。しかし、グリア分化の際に、この拮抗を伴う「細胞運命決定」の具体的なメカニズム(=どのようにグリアの個性が決まるか)は不明な点が多かった。

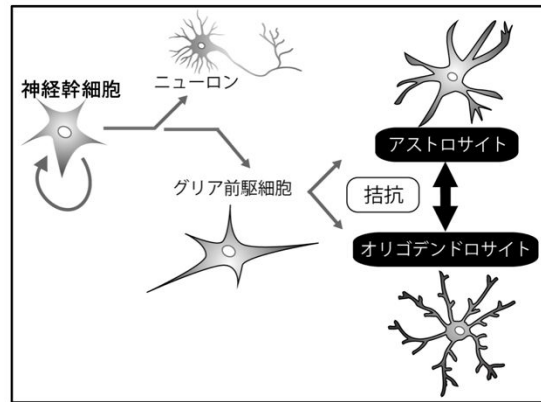


図1. 中枢神経系の発達における細胞の分化

申請者は、*in vivo* において正常なグリア分化を担う分子として、エピゲノム修飾因子である PRMT1 が必須であることの証明に成功していた (*J. Biol. Chem.* 2016)。これまではオリゴデンドロサイトに着眼していたが、最近の実験結果から、PRMT1 はアストロサイト形成にも関わる可能性が浮上しており、PRMT1 がより広くグリア分化に寄与している可能性を見出していた。

### 2. 研究の目的

PRMT1 によるグリア分化メカニズムの理解を目指し、特に神経幹細胞からアストロサイトが産生される際の PRMT1 の役割を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は、「PRMT1 によるグリア分化制御メカニズム」の解明を目指し、以下の2つに焦点を絞り、研究を推進した。

#### (1) 神経幹細胞特異的 PRMT1 欠損マウス (CKO マウス) におけるグリア発達への影響

生後マウス脳におけるアストロサイトの数や分布の評価  
CKO マウス脳の脳凍結切片を作製し、アストロサイトマーカーの GFAP に対する抗体を用いて免疫染色をした。画像解析ソフト ImageJ により細胞数の定量を行った。

生後マウス脳におけるグリオシスの検出  
CKO マウス脳組織を用いてアストロサイトマーカーの GFAP や Vimentin に対する抗体を用いてウェスタンブロットを行なった。

生後マウス脳におけるミクログリアの数や分布の評価  
CKO マウス脳の脳凍結切片を作製し、ミクログリアマーカーの IBA-1 に対する抗体を用いて免疫染色をした。画像解析ソフト ImageJ により細胞数の定量を行った。

#### (2) PRMT1 によるグリア分化の分子メカニズム解明

CKO マウス脳組織を用いたトランスクリプトーム解析  
CKO マウス大脳皮質を用いて RNA-seq を行った後、パスウェイ解析を行い、変化の大きい分子経路を同定した。主要な遺伝子についてはリアルタイム PCR により検証した。

培養細胞を用いた PRMT1 のノックダウン  
PRMT1 が直接 GFAP の発現を制御している可能性を検討するため、PRMT1 のノックダウンにより GFAP の発現を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 神経幹細胞特異的 PRMT1 欠損マウス (CKO マウス) におけるグリア発達への影響

脳内アストロサイトの数や分布の評価

神経幹細胞特異的 PRMT1 欠損マウス (CKO マウス) においてアストロサイトの発達に変化があるかを調べるため、免疫染色を行った。成熟アストロサイトを示す GFAP 陽性細胞は CKO マウスの大脳皮質や海馬等で増加しており、「グリオシス」の状態にあることが判明した (図 2)。また CKO マウスにおいてグリオシスが起きる時期を調べた結果、検討した生後 4、8 日目の両方で起きていた。

生後マウス脳におけるグリオシスの検出  
グリオシスをより定量的に評価するために、CKO マウスの大脳皮質を単離し、グリオシスにおける 2 つの独立したマーカーである GFAP と Vimentin の発現をウェスタンブロットで調べた。生後 8 日目の CKO マウスにおいて Vimentin の顕著な増加が認められた (図 3)。また、生後 0 日目の CKO マウスにおいても GFAP が有意に増加していた。

生後マウス脳におけるミクログリアの数や分布の評価  
認知症や脳損傷といった脳組織異常が生じると、脳内免疫担当細胞であるミクログリアが活性化することで脳内炎症を引き起こす。CKO マウスにおいて大脳皮質を中心に IBA-1 陽性のミクログリアが増加していた (図 4)。さらに CKO マウスのミクログリアは、突起が短縮し細胞体が肥大した、活性化ミクログリアの形態を取っていた。活性化ミクログリアは生後 4 日目、8 日目に認められたが、胎生後期から脳の一部で認められた。

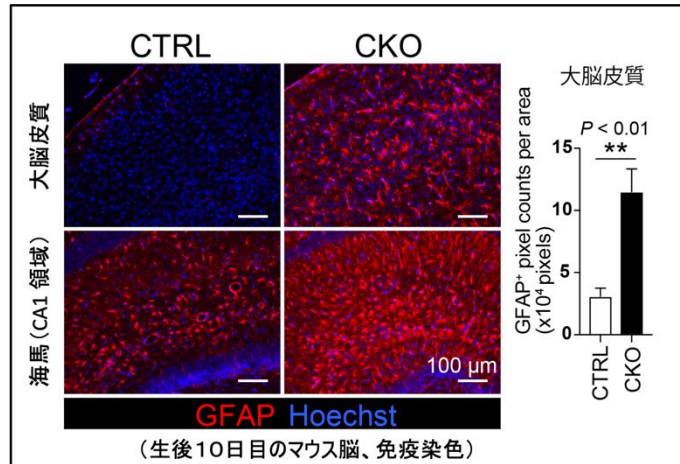


図2. PRMT1 欠損脳における成熟アストロサイト (GFAP 陽性) の増加

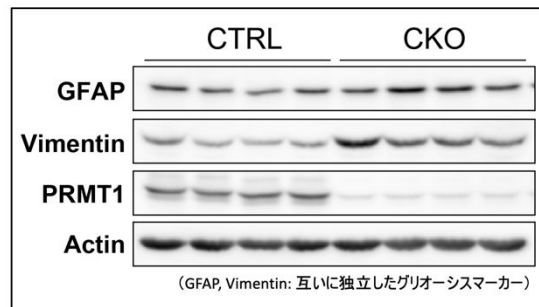


図3. PRMT1 欠損脳によるグリオシスの誘導

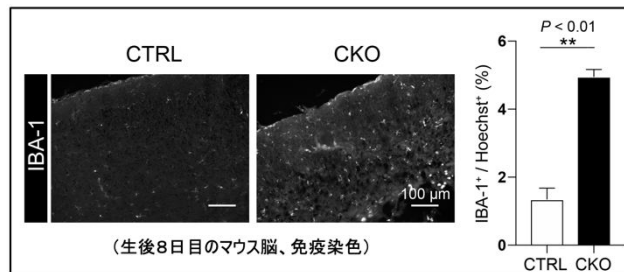


図4. PRMT1 欠損脳における IBA-1 陽性ミクログリアの活性化

## (2) PRMT1 によるグリア分化の分子メカニズム解明

CKO マウス脳組織を用いたトランスクリプトーム解析

生後 0 日目の CKO マウス大脳皮質サンプルを用いて RNA-seq に供し、CKO マウスで最も変化している分子経路を同定した。その結果、CKO マウスにおいて有意に増加した遺伝子群のパスウェイ解析から、炎症性サイトカイン *Il-6* やケモカイン受容体 *Cx3cr1* を含む多数の炎症関連遺伝子が上昇していた。さらにリアルタイム PCR により、これらの炎症関連遺伝子の発現の推移を調べたところ、生後

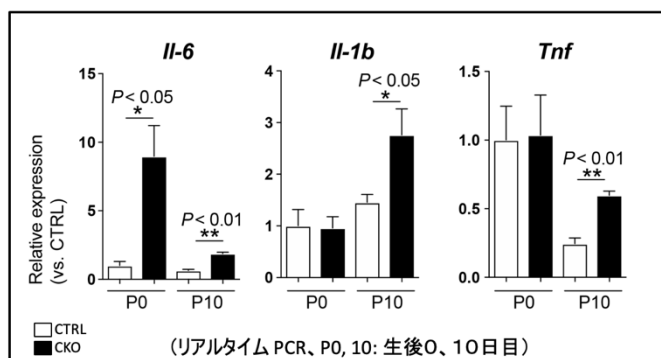


図5. 生後 PRMT1 欠損脳における炎症性サイトカインの遺伝子発現

0 日目では CKO マウスで既に上昇傾向にあったが生後 10 日目にはさらに差が開いたことから、CKO マウスでは生後の脳発達に伴い炎症様状態が進行していることが分かった (図 5)。ミクログリアの活性化やグリオシスは炎症を誘導する作用があることから、(1)の結果を支持する結果が得られた。

培養細胞を用いた PRMT1 のノックダウン  
グリオシスの上流経路として、JAK-STAT シグナル  
による GFAP の転写制御が知られている。そこで、  
PRMT1 による GFAP の転写制御を調べるため、初代培  
養グリア細胞やラット由来 C6 グリオーマ細胞にお  
いて siRNA を用いて PRMT1 をノックダウンし、GFAP  
の発現をウェスタンブロットで調べた。その結果コ  
ントロール細胞と比べて、siPrmt1 処理細胞におい  
て GFAP の発現上昇は見られなかった (図 6)。この  
ことから、PRMT1 欠損脳における GFAP の上昇は、  
PRMT1 による直接的な転写制御以外の可能性が考えられた。

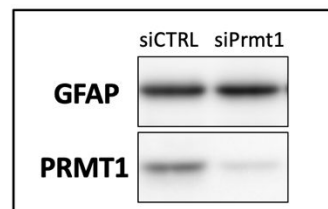


図6. PRMT1 発現抑制の GFAP 発現に対する効果  
(初代グリア細胞を用いた結果)

本研究では、PRMT1 によるグリア分化メカニズムの理解を目指し、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析、PRMT1 欠損マウスの組織学的解析、そして初代培養技術を組み合わせた解析を行った。中枢神経系において PRMT1 はオリゴデンドロサイトのみならずアストロサイトを含むグリア細胞の正常な発達に必須であることが初めて明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計6件)

1. 竹市 華帆、橋本 美涼、中川 寅、PRMT1 欠損マウス由来神経幹細胞の増殖能評価、第 83 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2019年
2. 隈部 彩子、橋本 美涼、中川 寅、中枢神経系特異的 PRMT1 欠損マウスにおけるミクログリアの活性化、第 83 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2019年
3. 橋本 美涼、神経幹細胞特異的 PRMT1 欠損マウスにおけるグルタミン酸-グルタミンサイクル、第 91 回日本生化学会大会、2018年
4. 橋本 美涼、中枢グリア発達におけるタンパク質アルギニンメチル化酵素 PRMT1 の役割、第 41 回神経科学大会、2018年
5. 橋本 美涼、アルギニンメチル化酵素 PRMT1 によるアストロサイト発達制御機構の解明、2018年度日本生化学会関東支部例会、2018年
6. 橋本 美涼、PRMT1 による中枢神経系の発達と代謝調節の解明、第 22 回日本心血管内分泌代謝学会学術集会 若手奨励賞候補講演口頭発表、2018年

[その他]

ホームページ等

岐阜大学応用生物科学部 生物化学研究室 (<http://www.abios.gifu-u.ac.jp/nakagawa/>)

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

無し

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：中川 寅

ローマ字氏名：(NAKAGAWA, Tsutomu)

研究協力者氏名：深水 昭吉

ローマ字氏名：(FUKAMIZU, Akiyoshi)

研究協力者氏名：石田 純治

ローマ字氏名：(ISHIDA, Junji)

研究協力者氏名：金 俊達

ローマ字氏名：(KIM, Jun-Dal)

研究協力者氏名：村田 知弥

ローマ字氏名：(MURATA, Kazuya)

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。