

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06464

研究課題名（和文）神経回路形成において成長円錐での局所翻訳とRNAメチル化修飾機構が果たす役割

研究課題名（英文）Effects of RNA modification and local translation in the growth cone on neural circuit formation

研究代表者

梅嶋 宏樹 (UMESHIMA, Hiroki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：40525375

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）：神経突起伸長には突起先端におけるRNAの局所翻訳が重要であると考えられているがその制御機構についてはいまだ不明な点が多い。本研究ではこの局所翻訳にRNA化学修飾の一つであるアデノシンN6メチル化修飾が関与する可能性に着目し、関連遺伝子の発現を分散培養下ニューロンおよび胎児期マウス大脳皮質においてRNAiノックダウン法を用いて攪乱し神経突起伸長や神経回路形成への影響を検討した。また並行してRNA顆粒形成や翻訳制御にも関与するHSP90遺伝子について着目し発現パターンおよび遺伝子ノックダウンの影響を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経系が適切な機能を実現するには発生過程において個々の神経細胞が適切な接続先へと神経突起を伸長させることが不可欠である。RNA修飾や局所翻訳の対象となる遺伝子には脳形成不全の一種である滑脳症の原因遺伝子として知られているものや自閉症や統合失調症などの神経疾患の関連遺伝子も多く含まれる。本研究から得られた知見から神経回路形成メカニズムへの理解がさらに発展すれば上記の神経疾患などの病態解明と治療法開発にも繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：Local translation of messenger RNA at the tips of neuronal processes is thought to be important for neurite outgrowth, but its regulatory mechanism remains unclear. In this study, we focused on the possibility that adenosine N6 methylation (m6A), one of the RNA chemical modifications, is involved in local translation and investigated its roles on neurite outgrowth and neuronal circuit formation by disrupting m6A-related genes using RNAi knock-down method in neurons in dissociated cultures and in the cerebral cortex. In parallel, we focused on the HSP90 gene, which is also involved in RNA granule formation, local translation and so on, and examined its roles on neuronal circuit formation.

研究分野：神経生物学

キーワード：神経発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の軸索や樹状突起が伸長する過程では突起先端に成長円錐と呼ばれる運動性の高い手のひら状の構造が形成される。成長円錐はガイダンス分子受容体や細胞接着分子を発現させ、周囲の環境を感知しながら適切な接続先へと突起伸長を誘導する。成長円錐の周縁部では、接着分子と結合したアクチン骨格が重合とミオシンモーターによる逆行性流動で突起伸長を促す牽引力を生み出す。微小管は中心部で重合と脱重合を繰り返すが、一時的に周縁部に侵入しアクチン動態の調節や膜分子の供給を行なうことで突起伸長の速度や方向を制御する。微小管の周縁部への侵入には微小管伸長端(プラス端)結合タンパク質(+TIP タンパク)が関与する。+TIP タンパクの一つである APC は多様な微小管関連分子のメッセンジャーRNA (mRNA) と結合することが報告されており、近年、成長円錐における微小管ダイナミクスと mRNA 局所翻訳の関係が注目されている。

成長円錐には多数の mRNA が局在しており、細胞体とは独立した翻訳機構によって成長円錐に特異的な遺伝子発現を実現している。成長円錐の局所翻訳阻害が神経突起の伸長およびガイダンスに影響を及ぼす事例は報告されているが、局所翻訳がどのように成長円錐の細胞骨格ダイナミクスを制御するのかについてはいまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では神経突起伸長における成長円錐での mRNA 局所翻訳の制御メカニズムを明らかにすることを旨とし、特に mRNA の化学修飾に注目した。近年、mRNA は様々な化学修飾を受けることでプロセシングや翻訳、分解が制御されることが明らかになりつつある。中でもアデノシン N6 メチル化修飾は一部 mRNA の特定のアデノシンに可逆的にメチル基を付加する。メチル基を付加する"Writer"、メチル基を消去する"Eraser"、N6-メチルアデノシン (m^6A) に結合し翻訳効率や mRNA 分解を制御する"Reader"と呼ばれる分子群が見つかっている。また、APC と結合する mRNA の多くが m^6A 修飾を受けること、 m^6A Reader 分子である YTHDF1 が APC と共同在することもわかっており、 m^6A 修飾が成長円錐における局所翻訳の制御に関与することが示唆された。 m^6A 修飾は Reader 分子を介して mRNA の翻訳と分解を同時に促進することで"パルス"状の翻訳を実現すると考えられており、成長円錐においても外界の環境に動的に応答することに寄与する可能性が考えられた。

また、本研究の過程で並行して分子シャペロンである HSP90 が神経突起伸長に及ぼす影響についても注目した。HSP90 はクライアント分子と呼ばれる特定のタンパク質群の分子構造を変化させることでその活性を制御しており、RNA 顆粒の形成を含む RNA 輸送、局所翻訳過程にも関与することも報告されている。

3. 研究の方法

(1) m^6A 修飾関連分子が神経細胞の軸索および樹状突起伸長に影響を及ぼすかを検証するため、分散培養下マウス海馬ニューロンにおいて RNAi ノックダウン法を用いて m^6A 修飾関連分子を発現抑制し、軸索および樹状突起伸長に対する影響を検討した。また、生体内における神経回路形成に対する m^6A 修飾経路の関与を検証するため、子宮内電気穿孔法を用いて胎生期マウス大脳皮質ニューロンの m^6A 修飾関連分子を抑制し、神経細胞移動や軸索投射・樹状突起形成への影響を調べた。神経細胞は幹細胞から誕生後、先導突起と呼ばれる成長円錐を持った神経突起に牽引されて機能部位へと移動することから成長円錐での局所翻訳が神経細胞移動にも影響する可能性が考えられた。また、大脳皮質ニューロンは軸索を皮質外領域もしくは反対側の大脳皮質へと長距離の投射を行なうことから m^6A 修飾がこれらの投射に影響を及ぼす可能性が考えられた。

(2) HSP90 が神経突起の伸長および神経回路形成に関与する可能性を検証した。哺乳類では HSP90 は 2 のアイソフォームを持つ。まず、神経細胞および脳組織においてこれらのアイソフォームがどのような発現パターンを示すのかをアイソフォーム特異的抗体を用いた免疫染色法および in situ hybridization 法を用いて調べた。さらに RNAi ノックダウン法を用いて分散培養下海馬ニューロンおよび胎生期マウス大脳皮質ニューロンにおいて各々のアイソフォームを発現抑制し神経突起伸長や神経回路網形成への影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 分散培養下マウス海馬ニューロンにおける m^6A 修飾関連分子ノックダウンの影響の解析 m^6A 修飾関連分子が神経細胞の突起伸長に影響を及ぼすかを検討するため、分散培養下マウス海馬ニューロンにおいて RNAi ノックダウンプラスミドをトランスフェクション法により遺伝子導入し形態に対する影響を調べた。対象とする分子としては Writer である METTL14、Eraser である FTO、Reader である YTHDF1~3 に注目した。各プラスミドのノックダウン効率については免疫染色法により確認を行なった。結果として、METTL14、YTHDF1、YTHDF3 のノックダウンにより軸索および樹状突起の伸長が減少する傾向が見られた(図1)。また、

METTL14 のノックダウンでは神経突起の伸長抑制に加えて細胞体の占める面積が拡大する傾向が確認された。これは細胞体内と突起先端での RNA 翻訳のバランスが崩れたことによる可能性が考えられた。また、YTHDF1 と相互作用すると考えられる RNA 結合タンパク質である APC についても RNAi ノックダウンを行なった。APC のノックダウンにより神経突起の伸長が減少するのに加えて細胞の周囲に糸状仮足様の細かい突起が多数形成されるのが確認された。同様の表現型は YTHDF1 においても確認できており、APC と YTHDF1 が同じパスウェイ上で働いていることが示唆された。

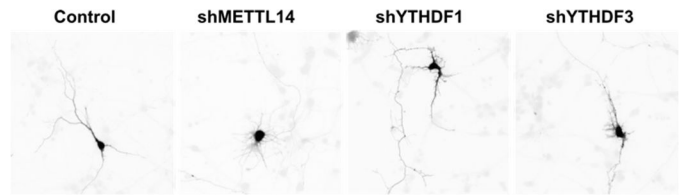


図 1. m⁶A 修飾関連分子のノックダウンによる神経細胞の形態変化。培養 2 日目にトランスフェクションを行ない、6 日目に固定。形態は EGFP により標識（明暗反転）。

(2) 胎生期マウス大脳皮質ニューロンにおける m⁶A 修飾関連分子ノックダウンの影響の解析
m⁶A 修飾関連分子が生体内における脳および神経回路形成に影響を及ぼすかを検討するため、マウス胎児大脳皮質に子宮内電気穿孔法によりノックダウンプラスミドを遺伝子導入し、神経細胞移動の不全による細胞配置の異常や軸索樹状突起の形態について検討を行なった。対象分子としては特に METTL14 および YTHDF1 に注目した。METTL14 のノックダウンでは神経細胞移動が遅延する傾向が見られ、特に他極性細胞から双極性細胞への形態変化が起こる部位で遅延が起きている可能性が示唆された。一方で、YTHDF1 のノックダウンでは神経細胞の配置、樹状突起の形態、軸索の伸長において顕著な影響は認められなかった。ただし、生体内における神経細胞の形態は分散培養下に比べて複雑であるため差を検出するためにより詳細な比較が必要となる可能性が考えられた。

(3) HSP90 isoform の発現パターンの解析

哺乳類における HSP90 の と アイソフォームはアミノ酸レベルで 90%程度相同であり多くの抗体では両方のアイソフォームを同時に認識してしまう。本研究では N 末端の相同性の低い領域を抗原としたアイソフォーム特異的抗体を用いてそれぞれの発現パターンを検討した。マウス大脳皮質および分散培養下海馬ニューロンの免疫染色から isoform 毎に細胞内局在が異なり、が細胞体近傍に集積しているのに対してはより神経突起の先端に分布していることがわかった（図 2）。このことから成長円錐における神経突起伸長の制御に関してはがより強く関与する可能性が示唆された。また、大脳皮質における免疫染色像から HSP90 / が一部の細胞において強く発現していることがわかった。神経細胞においては特に一部の抑制性ニューロンにおいて強く発現し、グリア細胞においては Olig2+陽性オリゴデンドロサイトの 20%程度においてのみ発現が見られた。これは分子シャペロンとしてハウスキーピングな役割を担う以外に HSP90 に細胞特異的な役割が存在することを示唆すると考えられた。上記の内容については第 128 回日本解剖学会総会・全国学術集会（2023 年 3 月）において発表した。

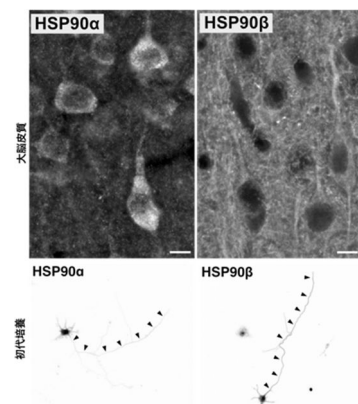


図 2. HSP90 (左)および (右)の免疫染色像。上:マウス大脳皮質 (scale bar:20 μm)。下:初代培養神経細胞(明暗反転; scale bar:50 μm)。矢印は軸索の位置を示す。

(4) 分散培養下ニューロンおよびマウス大脳皮質における HSP90 遺伝子ノックダウンの影響の解析

神経細胞の突起伸長における HSP90 の影響を検討するために RNAi ノックダウン法を用いて HSP90 のアイソフォーム特異的ノックダウンを行なった。まず、分散培養下マウス海馬ニューロンにノックダウンプラスミドを遺伝子導入し、HSP90 / の発現抑制をアイソフォーム特異的抗体による免疫染色法を用いて確認した。アイソフォーム特異的なノックダウンプラスミドでは各々のアイソフォームを特異的に発現抑制していることが確認できた。さらに興味深いことに HSP90 をノックダウンした神経細胞では HSP90 の発現量が増加していることが確認できた。HSP90 / ノックダウンの神経突起の伸長への影響を検討したところ、2つのアイソフォームを同時にノックダウンすることで神経突起伸長が抑制される傾向が見られた。また、生体における神経回路形成の過程における HSP90 / の機能を検討するため、子宮内電気穿孔法によりノックダウンプラスミドを遺伝子導入し大脳皮質の形成への影響を調べたところ、 / アイソフォームを同時にノックダウンした際に神経細胞の移動が障害されることを示唆する結果が見られており、これについては今後さらに検討を行なう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 王 丹, Rohini Roy, Hiroki Umeshima, Ikumi Oomoto, Ruolin Fan, Momoe Sukegawa, Yoshie Fujiwara, Kwok-On Lai, Xiangru Li
2. 発表標題 m6A readers are required for neuronal development and connections in vitro
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会シンポジウム「エピトランスクリプトミクス：脳の形成や機能における新たな調節機構」（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梅嶋宏樹、平山晃斉、富田江一
2. 発表標題 マウス大脳皮質におけるHeat Shock Protein 90のアイソフォーム特異的発現パターンの解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2023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
研究協力者	王 丹 (WANG Dan Ohtan) (50615482)		

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
---------	---------