

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07345

研究課題名（和文）希突起膠細胞分化におけるRNA代謝 - 脂質代謝フィードバックループ制御機構

研究課題名（英文）Feedback regulation between RNA biogenesis and lipid metabolism in oligodendrocyte differentiation

研究代表者

矢野 佳芳（早川佳芳）（Hayakawa-Yano, Yoshika）

新潟大学・医歯学系・特任助教

研究者番号：60397320

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、希突起膠細胞(OLs)の分化段階および神経系での様々な細胞種ごとのトランスクリプトーム情報を元にpSI解析を行い、OLs特異的かつ分化段階で一過性に発現する新規RNA結合蛋白質としてRochsを同定した。本研究では、Rochsの機能解析を行い、RochsがOLsにおいて脂質代謝を制御し、髄鞘の形成を制御する分子であることを同定した。さらに、Rochsは脂質代謝やOLs分化において重要な制御因子のmRNAに直接結合することが明らかになり、Rochsはその制御分子の発現調節を介して脂質代謝やOLsの成熟を正に制御する分子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脱髄性疾患の一つである多発性硬化症は希突起膠細胞(OLs)が形成する髄鞘が障害され、脱髄と寛解を繰り返して進行する難治性疾患であり、未だ病態の解明には至っていない。我々は、OLsの分化段階および神経系での様々な細胞種ごとのトランスクリプトーム情報からpSI解析を行い、OLsの分化に伴って発現が変動する新規RNA結合蛋白質としてRochsを同定した。さらに本研究により、Rochsは重要な制御因子のmRNAへの結合を介してOLsの成熟を正に制御する分子であることが明らかになり、髄鞘形成不全症や脱髄性疾患の分子基盤の解明に繋がる基礎的な知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：To identify novel RNA binding proteins (RBPs) with oligodendrocytes (OLs)-specific and OLs differentiation stage-dependent expression, we performed pSI screening based on transcriptome information of OLs and other-type of neural cells. We successfully identified a new RBP, named Rochs, which is specifically expressed in OLs with the differentiation dependency.

In this study, we performed loss-of-function studies in cultured mouse OPC and mouse genetics and found that Rochs regulates lipid metabolism and OLs differentiation. Furthermore, our study identified that Rochs promotes OLs differentiation through the interaction with mRNA of a major regulator, which encodes a transcription factor related to lipid metabolism and OLs maturation. We believe that our present findings provide a novel molecular mechanism to understand OLs maturation, as well as diseases including myelination deficiency and demyelinating disorders.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：希突起膠細胞 髄鞘形成 RNA制御 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

希突起膠細胞(OLs)の主要な機能は、神経細胞の軸索に絶縁体として巻く髄鞘(ミエリン)を形成することであり、それにより神経細胞は跳躍伝導を可能にしている。中枢神経脱髄性疾患である多発性硬化症(MS; multiple sclerosis)では脳、脊髄、視神経において時間的、空間的に病巣が多発し、通常、脱髄と寛解を繰り返しながら進行するという経過を辿る。しかしながら、現時点では詳細な病態メカニズムの解明には至らず、根本的な治療法がないのが現状であり、「なぜ多発性硬化症は脱髄と寛解を繰り返しながら進行するのか?」という疑問が存在する。この脱髄と寛解の分子機構には、何らかの一過性のフィードバックループの存在が示唆され、病態メカニズムと深い関わりがあると考えられる。

我々は、疾患関連 RNA 結合蛋白質を同定するために、ヒトにおいて 1542 種類存在すると言われる RNA 結合蛋白質群より、pSI (細胞特異性アルゴリズムにより求めた Cell Specificity Index) を指標としたバイオインフォマティクス解析を行い、OLs の分化・成熟に伴って発現が変化する新規 RNA 結合蛋白質 Rochs を同定した。

2. 研究の目的

本研究では、OLs 特異的に発現する新規 RNA 結合蛋白質 Rochs の OLs の髄鞘化、再髄鞘化および随伴するコレステロール代謝制御の分子機構を解明することにより、中枢性脱髄疾患である多発性硬化症の病態解明に繋がる分子基盤を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)培養マウスオリゴデンドロサイト前駆細胞(mOPC)を用いた機能解析:

Rochs に対する siRNA に導入してノックダウンを行い、OLs の分化状態を各種マーカーの細胞染色及び RT-qPCR 法により解析し、OLs 分化における影響を検討した。さらに RNA シークエンスによるトランスクリプトーム解析を行い、変動するパスウェイ、遺伝子の抽出を行った。

(2)CLIP 法を用いた Rochs の結合コンセンサス RNA 配列、標的遺伝子群の解析:

蛋白質 RNA 相互作用解析方法である CLIP 法を用いて、mOPC における Rochs-RNA 相互作用マップを作製し、Rochs が結合する部位を解析し、結合コンセンサス RNA 配列を検証を行った。さらに、標的遺伝子群を探索し、OLs の髄鞘化に影響を示しうる生物学的に重要なパスウェイおよび標的遺伝子を同定した。

(3)生体内の OLs 髄鞘化における Rochs の機能解析:

生後 7、14 日目 Rochs ノックアウト(KO)マウスの脊髄を用いて、各種分化マーカーを用いた免疫組織学的解析により、髄鞘形成について検証を行った。

4. 研究成果

本研究では、OLs の分化・成熟に伴って発現が変動する新規 RNA 結合蛋白質 Rochs を同定し、OLs 細胞系譜における詳細な発現、機能解析を行った。

(1) Rochs 蛋白質は OLs に特異的に発現する RNA 結合蛋白質である。

Rochs に対する特異的な抗体を作製し、生後マウス脊髄における発現について精査した。その結果、Rochs 蛋白質は OLs 細胞系譜に特異的に発現し、OLs の成熟に伴って一過性の発現をすることが明らかとなった。

(2) Rochs は OLs の分化を正に制御する RNA 結合蛋白質である。

培養 mOPC 系において、Rochs に対する 3 種類の siRNA を導入して発現抑制を行い、OLs の分化状態を各種マーカーの細胞染色及び RT-qPCR 法により検討したところ、MBP、CNPase など OLs 分化マーカーの発現が減少し、分化異常が見られた。

(3) Rochs は OLs 分化とコレステロール代謝を制御する分子である。

次に、同細胞系にて RNA シークエンスによるトランスクリプトーム解析を行い、Rochs のノックダウンにより発現変化する遺伝子群のパスウェイ解析を行なったところ、コレステロール代謝パスウェイが統計学的に有意に抽出され、Rochs は OL 分化に加えて髄鞘形成に重要なコレステロール代謝も調節していることを見出した。

(4) Rochs は生体内においても OLs の成熟を制御する分子である。

生後 Rochs KO マウスの脊髄を用いて、経時的に各種分化マーカーを用いた免疫組織学的解析を行った結果、RochsKO マウスでは髄鞘の形成不全が認められた。

(5) Rochs は脂質代謝や OLs 分化の重要な制御因子の mRNA に結合する。

さらに、これらの Rochs による OLs の成熟、脂質代謝の制御機構を明らかにするために、CLIP-qPCR 法を用いて標的 RNA の検証を行った。その結果、Rochs が脂質代謝や OLs の成熟において重要な制御因子の mRNA に直接結合することが明らかになった。

以上の結果より、Rochs は脂質代謝や OLs 分化に重要な制御因子の発現調節を介して、OLs の成熟を正に制御する分子であることが、本研究により新たな知見として得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nogami Masahiro, Miyamoto Kazumasa, Hayakawa-Yano Yoshika, Nakanishi Atsushi, Yano Masato, Okano Hideyuki	4. 巻 296
2. 論文標題 DGCR8-dependent efficient pri-miRNA processing of human pri-miR-9-2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100409(14pages)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hayakawa-Yano Yoshika, Yano Masato	4. 巻 20
2. 論文標題 An RNA Switch of a Large Exon of Ninein Is Regulated by the Neural Stem Cell Specific-RNA Binding Protein, Qki5	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1010 ~ 1010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20051010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshika Hayakawa-Yano, Takako Furukawa, Akihito Koyama, Chihiro Nakamoto, Kenji Sakimura, Osamu Onodera, Hirohide Takebayashi, Hideyuki Okano, Masato Yano
2. 発表標題 運動ニューロンにおけるRNA結合タンパク質Quakingの役割
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢野真人, 矢野佳芳
2. 発表標題 An RNA-binding protein Quaking safeguards motor neuron function through pre-mRNA processing
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 目黒 雄大、備前 典久、矢野 真人、矢野 佳芳、阿部 学、崎村 健司、竹林 浩秀
2. 発表標題 運動ニューロンにおける新規Olig2結合因子Obp2欠損マウスの表現型解析
3. 学会等名 第63回日本神経化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 目黒 雄大、備前 典久、矢野 真人、矢野 佳芳、阿部 学、崎村 建司、竹林 浩秀
2. 発表標題 運動ニューロンにおける新規Olig2結合因子欠損マウスの表現型解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yano M and Hayakawa-Yano Y
2. 発表標題 Qki5 HITS-CLIP provides new mechanisms of RNA regulatory loop.
3. 学会等名 The 20th Takeda Science Foundation Symposium on Biosciences “RNA Neobiology” (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayakawa-Yano Y, Koyama A, Takebayashi H, Sakimura K, Okano H, Yano M.
2. 発表標題 Qki5 HITS-CLIP provides new mechanisms of RNA regulatory loop in gene regulation and the possibility of RNA-switching oligonucleotide treatment in brain
3. 学会等名 第21回日本RNA学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayakawa-Yano Y, Koyama A, Takebayashi H, Sakimura K, Okano H, Yano M.
2. 発表標題 Qki5 HITS-CLIP provides new mechanisms of RNA regulatory loop in gene regulation and the possibility of RNA-switching oligonucleotide treatment in brain
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会
4. 発表年 2019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
研究分担者	矢野 真人 (Yano Masato) (20445414)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

	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	古川 貴子 (Furukawa Takako)		

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