

機関番号：82648  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20570191  
 研究課題名(和文) 細胞増殖・ストレス応答・神経回路形成における mRNA 粒子による翻訳調節機構の解析  
 研究課題名(英文) Translational regulation by mRNA granules in cell proliferation, stress response and neuronal network 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(岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・准教授  
 研究者番号：30332175

## 研究成果の概要(和文)：

神経樹状突起への mRNA 輸送と局所的翻訳は、シナプス長期増強並びに学習記憶に必須であり、それらは主に mRNA 粒子によって担われている。本研究では、mRNA 粒子構成因子 RNG105 のターゲット mRNA を同定し、それら mRNA の神経樹状突起への輸送が RNG105 によって担われていることを明らかにした。翻訳調節に関しては、RNG105 以外の因子の関与が示唆された。また RNG105 は、増殖細胞においてはストレス誘導性のストレス粒子に局在すること、及びその粒子は mRNA の翻訳を抑制していることを示した。

## 研究成果の概要(英文)：

mRNA transport and subsequent local translation in neuronal dendrites play key roles in synaptic long-term plasticity and also in learning and memory. They are mediated by mRNA granules, macromolecular complexes containing their cargo mRNAs. Here we identified target mRNAs for RNG105, a component of mRNA granules in neurons. We found that the target mRNAs were transported to dendrites in an RNG105-dependent manner. But translational regulation of mRNAs did not appear to be mediated by RNG105 but other unidentified factors. We also showed that in proliferating cells, RNG105 was localized to stress-induced stress granules in which translation of mRNAs were repressed.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：mRNA 粒子、mRNA 輸送、翻訳、RNG105、RNG140、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase、シナプス、ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

細胞質に出現する新しい構造体「mRNA 粒子」が近年注目されるようになった。この粒子にはリボソーム、翻訳因子などタンパク質合成に必要な要素の他に、特定の mRNA がパ

ッキングされる。mRNA 粒子はそれらをまとめて細胞内の特定の場所に局在化させると同時に、mRNA からの翻訳を OFF にする働きがある。例えば神経細胞では mRNA 粒子は樹状突起へ輸送され、シナプス刺激に応じて mRNA

を放出してそこで初めて翻訳を活性化する。この刺激依存的翻訳は、シナプスの長期増強ひいては学習記憶に必須であることが明らかにされてきた。また例えば増殖細胞では、通常では mRNA 粒子は存在しないが、酸化ストレスなどのストレスに反応して mRNA 粒子が細胞質に形成されることが知られていた。これはストレス粒子と呼ばれ、ハウスキーピング遺伝子等の mRNA を取り込み、ストレス時の翻訳低下を担うと考えられている。

我々は、神経細胞の mRNA 粒子の構成要素として、新規 RNA 結合タンパク質 RNA Granule protein 105 (RNG105) を見出した。さらに、ノックアウトマウスの解析から、RNG105 がシナプス形成や神経ネットワーク形成に重要な因子であることも見出した。また、RNG105 は、ストレス粒子の構成因子 RasGAP SH3-binding protein (G3BP, これも RNA 結合タンパク質である) と *in vitro* で直接結合することを見出した。このことは、RNG105 が神経細胞の mRNA 粒子のみならず、増殖細胞のストレス粒子においても機能することを示唆した。

## 2. 研究の目的

本研究では、RNG105 のターゲット mRNA を同定することを目的とした。さらにそれら mRNA が実際に mRNA 粒子に取り込まれるかどうか、またどのような翻訳調節を受けているかについて、神経細胞と増殖細胞の両方を用いて解析することを目的とした。掲げた項目は以下の3項目である。

- (1) RNG105 ターゲット mRNA の同定
- (2) RNG105 ターゲット mRNA の細胞内局在
- (3) RNG105 ターゲット mRNA の翻訳調節機構

また、当初の目的に加えて、増殖細胞における RNG105 のストレス応答性と翻訳制御について、RNG105 のパラログである RNG140 との比較検討を交えた解析をおこなった。

## 3. 研究の方法

(1) RNG105 ターゲット mRNA の同定：当初とは方針を変更し、マイクロアレイを用いた方法を用いた。実際には、以下の通りである。マウス脳抽出液から RNG105 抗体(ウサギ IgG) を用いて免疫沈降をおこない、その免疫沈降物から RNA を抽出した。コントロールとして、コントロール IgG を用いて同様に免疫沈降、RNA 抽出の操作をおこなった。両 RNA を逆転写後、DNA マイクロアレイを用いてディフュージョンディスプレイをおこない、RNG105 に特異的に結合する mRNA を同定した。

(2) RNG105 ターゲット mRNA の細胞内局在：上記で得られた mRNA をマウス大脳由来の神経培養細胞に導入し、それが RNG105 と共局

在するかどうか、また、樹状突起へ輸送されるかどうかを以下のように解析した。対象となる mRNA に MS2 RNA 配列をつなげたコンストラクトおよび MS2 タンパク質に GFP 蛍光タンパク質をつなげたコンストラクトの両者を神経細胞に導入した。細胞内で MS2 タンパク質が MS2 RNA に強く結合することによって、mRNA-MS2 RNA-MS2 タンパク質-GFP の融合体ができる。これにより、神経細胞内での mRNA の動態を蛍光で可視化、継時的観察をおこなった。また、RNG105-RFP を神経細胞に同時に発現させることによって、mRNA と RNG105 の共局在についても解析をおこなった。

(3) RNG105 ターゲット mRNA の翻訳調節機構： mRNA 粒子に取り込まれるために必要な mRNA 上の cis 配列を同定し、それを Kaede 蛍光タンパク質をコードする mRNA につなげて神経培養細胞に導入した。Kaede の発現量を蛍光強度定量することにより、cis 配列が Kaede の翻訳に及ぼす影響を調べた。この定量を野生型の神経細胞と RNG105 ノックアウト神経細胞で比較することにより、RNG105 による翻訳調節を解析した。

(4) RNG105 と RNG140 のストレス応答機構と翻訳制御：増殖細胞である A6 細胞に RNG105-GFP (または RNG105-RFP) および RNG140-GFP を発現し、亜硫酸処理による酸化ストレス時におけるその応答性・動態変化を継時的に観察した。特に酸化ストレスによって誘導されるストレス粒子の形成に注目した。また、mRNA を取り込んだ粒子における翻訳の状態を、シクロヘキシミド処理によって調べることができる。すなわち、シクロヘキシミドによって粒子が分散化すれば翻訳抑制状態で、逆に巨大化すれば翻訳活性化状態の粒子であることが知られている。そこで上記の A6 細胞をシクロヘキシミド処理し、mRNA 粒子の動態を観察することによって、RNG105 粒子および RNG140 粒子による翻訳制御の解析をおこなった。

## 4. 研究成果

### (1) RNG105 ターゲット mRNA の同定

マウス脳から RNG105 免疫沈降で共沈した mRNA をマイクロアレイによるディフュージョンディスプレイで解析した結果、複数の RNG105 結合 mRNA を同定した。これら mRNA のオンロジー解析をおこなった結果、イオンホメオスタシス、抗活性酸素、細胞生存、ミトコンドリア機能、アミロイド関連機能に関与する遺伝子の mRNA が有意に多いことが分かった。その中でも特に、イオンホメオスタシスに関連する Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase サブユニットを構成するアイソフォームが複数含まれていることに注目し、それらを中心に解析を進

めることにした。Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase は3つのサブユニット、 $\alpha$  (1-4)、 $\beta$  (1-4)、 $\gamma$  (別名 FXYD タンパク質、1-7) で構成されるが、そのうち脳に発現の高い  $\alpha 3$ , FXYD1, FXYD6, FXYD7 の4種類の mRNA が RNG105 に結合した。

## (2) RNG105 ターゲット mRNA の細胞内局在

### ① RNG105 と mRNA の mRNA 粒子における共局在

$\alpha 3$ , FXYD1, FXYD6, FXYD7 の4種類の mRNA に MS2 を介して GFP をつなげ、これらをマウス大脳由来の神経培養細胞に発現させた。この神経細胞には、同時に RNG105-RFP を発現させた。その結果、4種類の mRNA とも細胞体および樹状突起で粒子状に局在し、その局在パターンは RNG105 と非常に良く一致することがわかった (図1)。さらに継時的観察をおこなった結果、mRNA と RNG105 は共局在しながら樹状突起中を輸送されることが分かった。以上の結果から、RNG105 結合 mRNA が神経樹状突起の RNG105 局在性 mRNA 粒子に取り込まれることが分かった。またこれら mRNA が mRNA 粒子に局在するためには、それらの3' 非翻訳領域 (3' UTR) が責任領域であることもわかった。

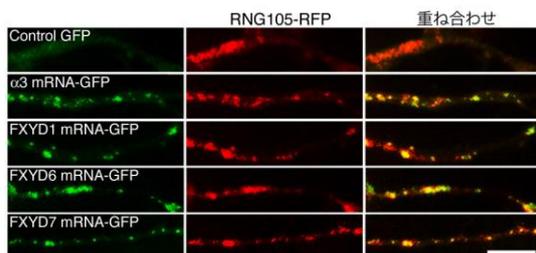


図1. 神経樹状突起における mRNA と RNG105 の共局在: マウス大脳由来神経培養細胞に遺伝子導入をおこない、蛍光顕微鏡で観察した。樹状突起の一部を拡大。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

### ② RNG105 による mRNA の樹状突起への輸送

次に、RNG105 が mRNA の局在化に果たす役割について解析をおこなった。実際には、RNG105 ノックアウトマウス大脳由来の神経細胞内での mRNA の動態を、野生型の神経細胞と比較した。その結果、RNG105 ノックアウト神経細胞において、mRNA の樹状突起への輸送が野生型に比べて低下していることがわかった (図2)。さらに、野生型の神経細胞に RNG105 を過剰発現した細胞で同様に mRNA の輸送を観察したところ、その場合は逆に mRNA の樹状突起への輸送が有意に増加していることがわかった (図2)。以上の結果から、RNG105 はそのターゲット mRNA に結合し、mRNA の樹状突起への輸送を担っていることが明らかになった。

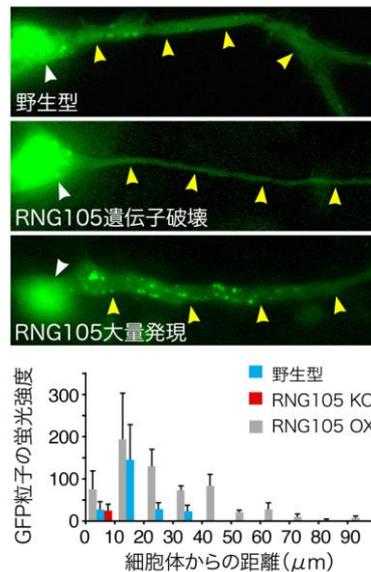


図2. RNG105 による神経樹状突起への mRNA 輸送: マウス大脳由来神経培養細胞に FXYD1 mRNA-MS2-GFP を発現し、それが局在する mRNA 粒子の蛍光強度を測定した。白矢頭は細胞体を、黄矢頭は一本の樹状突起を示す。RNG105 ノックアウト (遺伝子破壊、KO) 神経細胞では mRNA の樹状突起局在が低下し、逆に RNG105 過剰発現 (大量発現、OX) では樹状突起局在が増加した。グラフは FXYD1-MS2-GFP の樹状突起の各場所における蛍光強度分布を示す。 $\alpha 3$ , FXYD6, FXYD7 mRNA でも同様の結果を得た。

### (3) RNG105 ターゲット mRNA の翻訳調節機構

$\alpha 3$ , FXYD1, FXYD6, FXYD7 の4種類の mRNA はその3' UTR で RNG105 に結合し、mRNA 粒子に取り込まれた。そこで次に、これらの3' UTR が翻訳調節に果たす役割について解析をおこなった。実際にはそれら3' UTR に Kaede mRNA を cis につなぎ、それを神経培養細胞に導入した後、Kaede の翻訳を定量した。その結果、3' UTR をつなげることによって Kaede の翻訳量が低下することがわかった (図3)。ただし、FXYP6 の3' UTR は例外で、そのような効果は見られなかった。次に、3' UTR による翻訳抑制に RNG105 が関与する可能性を調べるために、同一のコンストラクトを RNG105 ノックアウト神経細胞に導入して Kaede の翻訳を定量した。しかしその結果は、RNG105 ノックアウトと野生型で差は見られないというものだった (図3)。以上の結果から、 $\alpha 3$ , FXYD1, FXYD7 mRNA の3' UTR は cis につながった mRNA の翻訳を抑制するが、その抑制に関与すると考えられる結合タンパク質は、RNG105 の他に存在する可能性が示唆された。

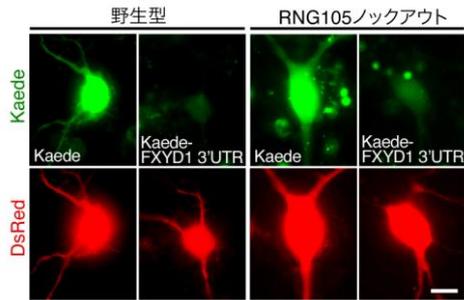


図3. FXYD1 3' UTRによる翻訳抑制：野生型あるいは RNG105 ノックアウトマウス的大脑由来神経培養細胞に Kaede-FXYD1 3' UTR および DsRed の遺伝子導入をおこない、蛍光顕微鏡で観察した。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

#### (4) RNG105 と RNG140 のストレス応答機構と翻訳制御

本研究では、ストレス応答における RNG105 局在性 mRNA 粒子の解析に着手した。また、RNG105 と同時に、そのパラログである RNG140 についても同様に解析をおこなった。

#### ① RNG105 および RNG140 局在性 mRNA 粒子のストレス応答

RNG105-GFP あるいは RNG140-GFP を増殖細胞である A6 細胞に過剰発現すると、両者とも mRNA を取り込んだ mRNA 粒子を形成した。しかし、RNG105 局在性 mRNA 粒子にはリボソームが濃縮しているのに対して RNG140 局在性 mRNA 粒子にはリボソームが存在しない等、両者の構成要素は異なっていた。さらに RNG105 と RNG140 の局在する粒子は全く共局在することはなく、両者は異なる mRNA 粒子を形成することがわかった。

次に RNG105 と RNG140 のストレス応答性を調べる目的で、RNG105-RFP と RNG140-GFP を低濃度で同時に A6 細胞に発現した。低濃度では、両者とも mRNA 粒子を形成しなかった。その細胞を、酸化ストレスを誘導する亜硝酸で処理した。すると mRNA を取り込んだストレス粒子が細胞質に形成され、そのストレス粒子には RNG105-RFP が濃縮することがわかった (図4)。これとは対照的に、RNG140-GFP はストレス粒子に濃縮することは全くなかった (図4)。以上の結果から、RNG105 は増殖細胞ではストレス粒子で機能し、RNG140 はそれとは異なる種類の mRNA 粒子で機能すると考えられた。

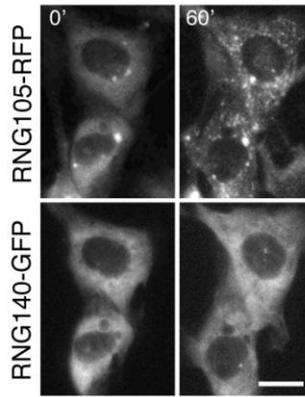


図4. RNG105 はストレス粒子に局在する：A6 細胞に RNG105-RFP および RNG140-GFP を共発現し、亜硝酸刺激をおこなった。刺激前 (0') には見られなかったストレス粒子が 60 分後 (60') には形成された。RNG105 はストレス粒子に局在し、RNG140 はしなかった。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

#### ② RNG105 局在性および RNG140 局在性 mRNA 粒子による翻訳制御

A6 細胞に RNG105-GFP あるいは RNG140-GFP を発現し、シクロヘキシミド処理後の mRNA 粒子の動態を観察した。シクロヘキシミド処理をしない場合には mRNA 粒子のサイズに変化は見られなかったが、シクロヘキシミド処理した場合には、RNG105-GFP、RNG140-GFP ともに粒子が分散する様子が観察された (図5)。この結果から、両粒子は種類が異なるものの、どちらも mRNA の翻訳抑制の場であることが示唆された。

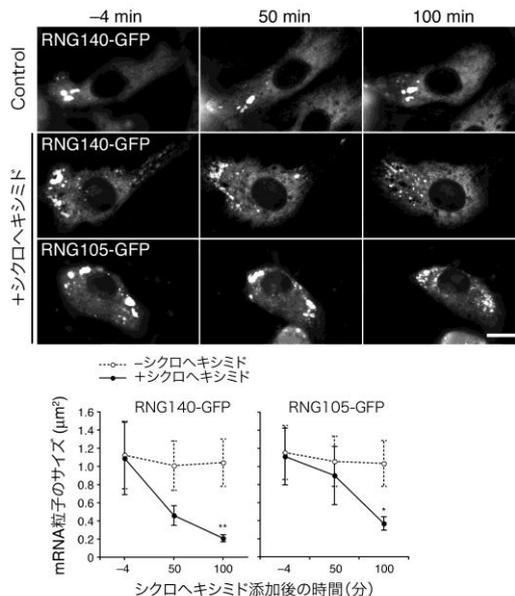


図5. RNG105 局在性および RNG140 局在性 mRNA 粒子は翻訳抑制状態にある：A6 細胞に RNG105-GFP あるいは RNG140-GFP を発現し、シクロヘキシミド処理をおこなった。処理前 (-4 分) に比べて処理後 (100 分) にはどちらの mRNA 粒子も分散した。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

以上の結果をまとめると、本研究によって RNG105 のターゲット mRNA ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase サブユニットアイソフォーム  $\alpha 3$ , FXYD1, FXYD6, FXYD7) を同定し、それら mRNA は RNG105 によって神経樹状突起へ輸送されることを明らかにした。また、RNG105 は神経細胞の mRNA 粒子のみならず、増殖細胞のストレス粒子においても機能することが示唆された。RNG105 のパラログである RNG140 は RNG105 と異なる種類の mRNA 粒子に局在し、増殖細胞のストレス応答には関係しないと考えられた。

今後は増殖細胞における RNG105 のターゲット mRNA が神経細胞の場合と共通かどうか、また、RNG105 と RNG140 のターゲット mRNA が共通かどうか、さらに、神経 mRNA 粒子と増殖細胞ストレス粒子の共通あるいは相違する制御機構について明らかにしていく。また、RNG105 結合 mRNA として同定した他の mRNA についても、その局在・翻訳制御・翻訳産物の機能について解析をおこなう。

mRNA 粒子による mRNA 輸送と翻訳制御の研究は、世界的に見ても新しい分野であり、これからの発展が期待される。その中でも RNG105 は、遺伝子破壊をおこなうと神経ネットワークが脆弱になり致死になるという、極めて重要な因子であることがわかってきている。そのターゲット mRNA を世界に先駆けて同定し、RNG105 の機能を含めて解析した本研究は、今後世界に先駆けてこの研究分野を牽引するための端緒を開いた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 椎名伸之、山口和彦、徳永万喜洋、RNG105 deficiency impairs the dendritic localization of mRNAs for  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase subunit isoforms and leads to the degeneration of neuronal networks. *J. Neurosci.* Vol. 30, 2010, pp. 12816-12830, 査読有
- ② 椎名伸之、徳永万喜洋、RNA granule protein 140 (RNG140), a paralog of RNG105 localized to distinct RNA granules in neuronal dendrites in the adult vertebrate brain. *J. Biol. Chem.* Vol. 285, 2010, pp. 24260-24269, 査読有
- ③ 椎名伸之、神経樹状突起における RNA 粒子と翻訳制御. *蛋白質核酸酵素*, Vol. 54, 2009, pp. 2171-2176, 査読無
- ④ 椎名伸之、生体高分子のショ糖密度勾配による超遠心分画. *実験医学*, Vol. 27, 2009, pp. 2125-2130, 査読無
- ⑤ 椎名伸之、徳永万喜洋、神経シナプス可

塑性の分子イメージング. *Clinical Neuroscience*, Vol. 26, 2008, pp. 1062-1063, 査読無

[学会発表] (計 6 件)

- ① 椎名伸之、RNG105 deficiency impairs the dendritic transport of mRNA and leads to the degeneration of neuronal networks, The 16th International Conference of the International Society of Differentiation, 2010 年 11 月 15 日、奈良
- ② 椎名伸之、神経細胞における mRNA 輸送と局所的翻訳の分子機構、日本植物学会 第 74 回大会 シンポジウム、2010 年 9 月 10 日、春日井
- ③ 椎名伸之、神経 mRNA 輸送粒子タンパク質 RNG105 と RNG140 による樹状突起の形成と維持、第 62 回 日本細胞生物学会大会 ワークショップ、2010 年 5 月 19 日、大阪
- ④ 椎名伸之、RNA 粒子タンパク質 RNG140 は RNG105 のパラログであるが、種間保存性、脳発現パターン、局在 RNA 粒子が異なる、第 61 回 日本細胞生物学会大会 ワークショップ、2009 年 6 月 4 日、名古屋
- ⑤ 椎名伸之、RNG105 deficiency impairs the dendritic transport of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase subunit isoform mRNAs and the formation of synapses and neuronal networks, 第 31 回 日本分子生物学会年会 第 81 回 日本生化学会大会 合同大会 シンポジウム、2008 年 12 月 11 日、神戸
- ⑥ 椎名伸之、神経 RNA 粒子タンパク質 RNG105 ノックアウトによる  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase サブユニットアイソフォームの樹状突起における減少と神経ネットワーク・シナプス形成の異常、第 60 回 日本細胞生物学会大会、2008 年 6 月 29 日、横浜

[その他]

科学新聞 2010 年 10 月 1 日 (金) 第 1 面  
「神経細胞のネットワーク形成-樹状突起での局所的なタンパク質合成不可欠」

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/neurocel/>

<http://www.nibb.ac.jp/press/100922/100922.html>

## 6. 研究組織

(1) 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  
(岡崎共通研究施設)・統合バイオサイエンスセンター・准教授

研究者番号：30332175