

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 9 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590198

研究課題名（和文）神経系で特異な発現を示す RNA ヘリカーゼの遺伝子改変動物を用いた分子形態学的解析

研究課題名（英文）Molecular and morphological analysis of RNA helicase that shows a unique expression in the nervous system by utilizing genetically modified animals

研究代表者

鶴尾 吉宏 (TSURUO YOSHIHIRO)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90207449

研究成果の概要（和文）：特異的にオリゴデンドロサイトを認識するモノクローナル抗体（4F2）を用い、認識する分子が RNA ヘリカーゼの Ddx54 であると同定した。この遺伝子を強制発現したトランスジェニック動物では髄鞘形成が亢進した。ラット中枢神経系では胎仔早期から成熟期まで 4F2 陽性細胞が認められ、神経系の初代培養でもオリゴデンドロサイトに特異的に発現した。Ddx54 は MBP の 4 つのアイソフォームと結合し、特に 21.5kDa の MBP は細胞核に移行してオリゴデンドロサイトの髄鞘形成過程でのシグナル伝達への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The monoclonal antibody (4F2) that specifically identifies oligodendrocytes was generated, and the molecule recognized by this antibody proved to be Ddx54, a member of RNA helicase. In the transgenic animals with forced expression of Ddx54, myelination appeared to be accelerated. The 4F2-positive cells were observed in the rat central nervous system from early embryonal to adult stages, and they were specifically expressed in oligodendrocytes using primary cultures of neural tissues. Ddx54 bound to 4 types of MBP isoforms, and especially the 21.5 kDa isoform of MBP was transported into the nucleus, suggesting its involvement in the signal transduction during the process of myelination in oligodendrocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	3,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：RNA ヘリカーゼ、神経系、オリゴデンドロサイト、遺伝子改変動物、分子形態学

1. 研究開始当初の背景

細胞機能を発揮するためには、細胞核内で遺伝情報を含んだ二本鎖の DNA から一本鎖の RNA が転写され、この RNA が細胞質に輸送されてリボゾーム上で目的の情報を含んだ生理活性物質に翻訳されることが必要となる。よって、RNA は DNA からの遺伝情報を最終産物である生理活性物質との間で橋渡しをする制御分子として細胞の機能調節にとって極めて重要な働きをしている。その際、RNA は一本鎖の分子状態として機能するのではなく、他の分子と複雑に絡み合いながらその機能を発揮している。

我々は、最近、神経系を構成する細胞であるニューロンとグリアのうち、特に髄鞘を形成するグリア細胞であるオリゴデンドロサイトについて研究を進めた。最初に、分化途中の未熟なオリゴデンドロサイトを抗原として作製した複数のモノクローナル抗体を使用し、オリゴデンドロサイトを認識する抗体を検討した。そして特異的にオリゴデンドロサイトを認識できるモノクローナル抗体が存在することを確認した。次に、このモノクローナル抗体がオリゴデンドロサイトを特異的に認識しているのがどういう分子であるのかを生化学的に検討したところ、この分子が RNA の機能調節に関与する RNA ヘリカーゼ (RNA helicase) であることを見出した。

RNA ヘリカーゼは、RNA 結合タンパクの一種であり、その名前が示すように、一本鎖 RNA が翻訳に繋がらないような立体配置になった場合にその配置を元に戻したり、他の分子との不適当な結合がある場合にはその結合を取り除くなどの働きを持つ分子である。RNA ヘリカーゼには ATPase 活性があり、ATP を加水分解して得たエネルギーによって一本鎖 RNA の巻き戻しを行っている。

RNA ヘリカーゼに属する分子は、構成するアミノ酸配列によって 3 つの大きなスーパーファミリーと 2 つの小さなファミリーに分類されている。今回、我々が特定した RNA ヘリカーゼは、一番大きな群であるスーパーファミリー2 (SF2) に属している DEAD-box タンパクであることを確認している。DEAD-box タンパクは、全ての真核生物と大部分の原核生物に認められ、構成するアミノ酸配列の中心部分に、アスパラギン酸-グルタミン酸-

アラニン-アスパラギン酸 の特徴的な配列を示すことから名付けられた RNA ヘリカーゼである。この DEAD-box タンパクは、9 つの共通のモチーフを持っており、RNA の機能調節には ATPase 活性とヘリカーゼ活性が関与している。9 つのモチーフ (Q、I、Ia、Ib、II、III、IV、V、VI) は、それぞれ異なる機能を持ち、Q、I、II、VI には、ATPase 活性があり、Ia、Ib、IV、V、VI には、RNA 結合活性があつて、III にはヘリカーゼ活性があることが分かっている。名前の由来である DEAD-box はモチーフ II に認められる。9 つのモチーフは、立体配置から Q、I、Ia、Ib、II、III と IV、V、VI の 2 つのドメインに分かれる。DEAD-box タンパクの生物学的働きは、細胞内で RNA が関与するほとんど全ての過程の調節に密接に関与している。すなわち、DNA から RNA への転写調節、前駆体 mRNA からのスプライシングとこれに関わる巨大な RNA-タンパク質複合体であるスプライソソームの会合、核小体から核をへて細胞質にいたるリボソームの生合成、核から核膜孔を通して細胞質への mRNA 輸送、mRNA からタンパクへの翻訳の開始、RNA の分解などに関与することが分かっている。また、ある種の DEAD-box タンパクは、一つの働きだけを持っているのではなく、2 つ以上の機能を持っていることが分かってきたことから、細胞環境が異なる状況においては相互作用する分子を変えることによって違った作用を発揮していることが考えられている。

このように、DEAD-box タンパクは生物界に普遍的に存在して生物学的に重要な働きをしていることが報告されているが、未だ多くの機能が明らかにされていないのが現状である。今回、我々が特定した DEAD-box タンパクである RNA ヘリカーゼについても、その生物学的な働きはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、我々がモノクローナル抗体によって特定した分子が、中枢神経系においてオリゴデンドロサイトに特異的に

発現し、この分子が DEAD-box タンパクである RNA ヘリカーゼであることをふまえて、我々が特定した RNA ヘリカーゼの生物学的機能について遺伝子改変動物を用いて形態学的に解析し、その生体における役割を明らかにすることを目的とする。

1. これまでにこの RNA ヘリカーゼを認識するモノクローナル抗体を用いた実験において、この抗体が発生早期からオリゴデンドロサイトを認識することを確認している。このことから、この分子がオリゴデンドロサイトの発生過程において遺伝子発現の調節に重要な働きをしていることが推測される。そこで、我々が特定した DEAD-box タンパクである RNA ヘリカーゼが、中枢神経系でどのような機能を発揮しているのかを知る目的で、この遺伝子を組み込んだトランスジェニックラットを作製する。このようにしてマルチコピーの RNA ヘリカーゼを強制的に組み込んで、大量の RNA ヘリカーゼを動物に発現させた場合に、オリゴデンドロサイトの発生・分化および髄鞘形成に如何なる影響が及ぶのかを明らかにする。

2. 遺伝子改変動物および正常動物を用いて、神経発生のきわめて早い時期におけるこの RNA ヘリカーゼの発現を調べることによって、オリゴデンドロサイトの発生とそれ以外のニューロン、アストロサイトの発生との関係を見る。

3. 研究の方法

1. DEAD-box タンパクである RNA ヘリカーゼが、中枢神経系で如何なる機能を発揮しているのかを知るために、この遺伝子 (Ddx54) を組み込んだトランスジェニックラットを作製する。このようにして強制的にマルチコピーの RNA ヘリカーゼ遺伝子を組み込んで、大量の RNA ヘリカーゼを発現させた遺伝子改変動物において、オリゴデンドロサイトの発生・分化およびこれに続く髄鞘形成にどのような変化が見られるのかを、オリゴデンドロサイトの分化過程で発現することが分かっているマーカー分子を標識として、これらの分子のタンパクおよび mRNA レベルの局在を、特異抗体による免疫組織化学と *in situ* hybridization 法

によって明らかにする。

2. 神経発生のきわめて早い時期からこの RNA ヘリカーゼがオリゴデンドロサイトに発現することを確認している。このことをふまえて、遺伝子改変動物および正常動物を用いて、神経発生のきわめて早い時期におけるこの RNA ヘリカーゼの発現を調べることによって、オリゴデンドロサイトの発生が中枢神経系の細胞構築にどのような影響を及ぼしているのかを解析する。また、オリゴデンドロサイトの増殖と分化の様子を調べ、発生初期でオリゴデンドロサイトの増殖と分化に変化が現れた時期において、他のニューロンやアストロサイトの発生・分化と細胞移動にどのような形態学的関連性があるのかを検討する。

4. 研究成果

我々は、未熟なオリゴデンドロサイトを抗原として作成したモノクローナル抗体の中に特異的にオリゴデンドロサイトを認識するモノクローナル抗体 (4F2) が存在することを確認した。次に、このモノクローナル抗体が認識する分子を生化学的に検討し、この分子が RNA の機能調節に関与する RNA ヘリカーゼであり、DEAD-box タンパクに分類される Ddx54 であることを確認した。そして、特定した DEAD-box タンパクの Ddx54 が、オリゴデンドロサイトの発生・分化においてどのような発現と作用をするかについて検討した。Ddx54 の作用を調べるために、強制的にマルチコピーの Ddx54 遺伝子を組み込んだトランスジェニックラットを作製し、オリゴデンドロサイトの発生・分化およびこれに続く髄鞘形成においてどのような変化が見られるかを検討した。トランスジェニック動物では野生型と比較して髄鞘形成が亢進していることを LFB 染色によって確認した。4F2 抗体を用いて、ラット中枢神経系において胎仔早期 (E9) から成熟期までの発達過程における陽性細胞の発現と局在を免疫組織化学的に確認した。また、オリゴデンドロサイトの primary culture を用いて、陽性

細胞がオリゴデンドロサイトであり、アストロサイトおよびニューロンではないことを確かめた。さらに、Ddx54 のオリゴデンドロサイトにおける働きを myelin basic protein (MBP) との関係に注目し、Ddx54 と MBP の遺伝子を HEK293 細胞に cotransfection してこの二つの分子の関連性を解析して、Ddx54 が MBP の 4 つの isoform と結合し、特に 21.5kDa の MBP isoform が細胞核に移行してオリゴデンドロサイトの分化過程でのシグナル伝達に関与することを確認した。

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 1 件)

1. Ueki T, Tsuruo Y, Yamamoto Y, Yoshimura K, Takanaga H, Seiwa C, Motojima K, Asou H, Yamamoto M. A new monoclonal antibody, 4F2, specific for the oligodendroglial cell lineage, recognizes ATP-dependent RNA helicase Ddx54: possible association with myelin basic protein. J Neurosci Res 90, 48-59, 2011
DOI: 10.1002/jnr.22736

[学会発表] (計 1 件)

1. 山本悠太、鶴尾吉宏、志波歩美、伊藤隆雄、上山敬司、植木俊之、山本雅浩、阿相皓晃。オリゴデンドロサイトに特異的モノクローナル抗体 (4F2) による新規分子マーカーの同定および機能解析。日本解剖学会総会・全国学術集会、2012年3月26日、山梨大学甲府キャンパス

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鶴尾 吉宏 (TSURUO YOSHIHIRO)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：90207449

(2) 研究分担者

上山 敬司 (UEYAMA TAKASHI)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50264875

伊藤 隆雄 (ITO TAKAO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：

(3) 連携研究者