

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 23 年 6 月 1 日現在

機関番号: 17501

研究種目: 若手研究(B)

研究期間: 2011 ~ 2012

課題番号: 23790218

研究課題名(和文) RNAスプライシングを介した神経分化制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of alternative splicing during neural development

研究代表者

 徳永 暁憲(TOKUNAGA AKINORI)
 大分大学・全学研究推進機構・助教

研究者番号: 70549451

研究成果の概要(和文):

神経発生過程では複数の因子がalternative splicingを受けており、RNA修飾が神経分化に深く関わる事が示唆されるがその分子メカニズムは不明である。そこで(1)神経幹細胞に発現するSplicing調節因子PTBのコンディショナルKOマウスを作製して解析を行った。Nestin-Creマウスとの交配により作製したPTB欠損脳では、未分化細胞(Radial glia)が脳室帯表層において形成する接着構造が消失しており、PTBが神経幹細胞の細胞間接着および細胞極性を制御して未分化維持に働くことが明らかとなった。また生後では重篤な水頭症を引き起こすことを見出した。次に(2) alternative splicingにより制御されるナンセンス変異依存RNA分解機構(NMD:Nonsense mediated mRNA decay)が神経分化にどのような影響を及ぼしているのかを明らかにするため、NMD構成因子UPF1のコンディショナルKOマウスを作製した。神経特異的UPF1欠損により、脳の低形成や神経幹細胞に由来するNeurosphere形成能の低下が観察され、UPF1が胎生期の神経分化に必須である事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文):

The functional coupling roles of alternative splicing and nonsense mediated mRNA decay in the developing brain had remained unclear. Therefore we generated conditional KO mouse of splicing regulatory factor PTB. We found that a loss of PTB caused serious hydrocephalus. PTB was expressed in neural stem cells and required for the maintenance of the adhesion structure of Radial glia formed in the ventricular zone, and the undifferentiated state. Furthermore, we generated UPF1 conditional KO mouse and found that UPF1 is essential for cell proliferation and neuronal differentiation.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成 24 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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: 神経発生、RNA splicing、発生工学

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系を構成する様々な細胞(ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイ

ト)は、増殖能及び多分化能を有する神経幹細胞より生み出される。そのため神経幹細胞からの分化メカニズムの解明は生物学的研究意義に加え神経疾患に対する再生医療という観点からも重要な課題である。近年、転写因子群による神経分化制御機構以外にRNA修飾による制御が重要な働きを担っている事が示唆されている。しかしRNA修飾機構に関する研究は未だ立ち後れているのが現状であり、その機構解明は喫緊の課題と考えられた。

2. 研究の目的

RNAの選択的スプライシング制御は様々な組織の分化過程や恒常性維持に重要な働きを持つ事が示唆されており、近年では選択的スプライシングが(1)機能の異なる isoformの産生のみならず(2)特定の mRNAの分解誘導にも働く事が明らかとなっている。これまで申請者らは、中枢神経系に発現する RNA 結合蛋白質 PTB の研究を行ってきた(Shibayama et al. 2009, Ohno et al. 2011)。PTB は Splicing 制御の重要な担い手であり、神経系においては神経幹細胞/前駆細胞に局限して発現している。そこで PTB による RNA splicing 制御を介した神経分化制御機構の解明を目指し研究を行った。Nestin-Cre マウス及び Emx1-Cre マウス(神経組織特異的に Cre を発現)との交配により神経系特異的 PTB 欠損マウスを作製した。PTB 欠損脳では胎生 14.5 日前後から Radial glia の形成する Adherence junction が消失しており、それに伴って神経分化亢進および神経幹細胞の枯渇が起こる事から、PTB は脳室周囲に存在する未分化細胞(Radial glia)の細胞間接着や細胞極性の維持に重要な因子である事が示された。また生後には重篤な水頭症を発症する事を見出し、その成果を報告した(発表論文 1)。そこで RNA の選択的スプライシング制御により誘導される NMD 依存的 RNA 分解機構の意義を明らかとする目的から、NMD 実行因子である UPF1 欠損マウスを作製し NMD 依存的 RNA 分解機構がどのように神経分化を制御しているのか、その解明を目指した。

3. 研究の方法

本遺伝子改変マウスの作成には、国内外において利用が進められている C57BL/6 由来 ES 細胞を使ったジーンターゲット法を用いた。BL/6 由来 ES 細胞より作出される遺伝子改変マウスは初代から純粋な BL/6 background として解析可能であり数世代に渡る backcross(戻し交雑)の必要が無いため、特に遺伝的背景による影響が観察される神経系、免疫系での解析において大変有用である。またターゲットベクターは BAC を用いた組換え手法により構築した。

これまでに全身性の UPF1 欠損マウスは着床前後(E5.5)で致死となり、個体発生に必須の因子である事が報告されている(Medghalchi et al. 2001)。しかし初期胚で致死となるため組織での生理的な役割は不明のままである。個体レベルでの神経系での NMD の役割に関する報告は未だなされていない事から UPF1 コンディショナル KO(cKO)を作製した。

(1)作製された UPF1 cKO マウスにおいて Neural stem cell (NSC)の細胞増殖能及び多分化能に相違が見られるかを Neurosphere 法(増殖能検定)および単層培養(分化能検定)を用いて検討した。分化能はマーカー遺伝子の発現量を指標に realtime PCR 法、免疫染色法を用いて検討した。

(2)また神経発生過程での RNA 選択的スプライシング制御に関わる知見が乏しい現状から NMD による発現抑制を受ける遺伝子 nPTB の発現変動を指標として検討を行った。

4. 研究成果

(1)神経特異的 UPF1 欠損マウスを作製するため Nestin-Cre マウスを交配に用いた。胎生期 14 日以降より UPF1 欠損脳では神経細胞層の低形成が認められた(図 1)。また胎生期 17 日以降では特に上層の神経細胞が減少していた。そこで胎生期脳を用いて神経幹細胞の増殖能を Neurosphere 法により検討したところ、未分化な増殖細胞も同様に減少しており神経幹細胞の減少に伴った表現系であることが示された。

(2)発生過程において PTB の発現低下に伴う

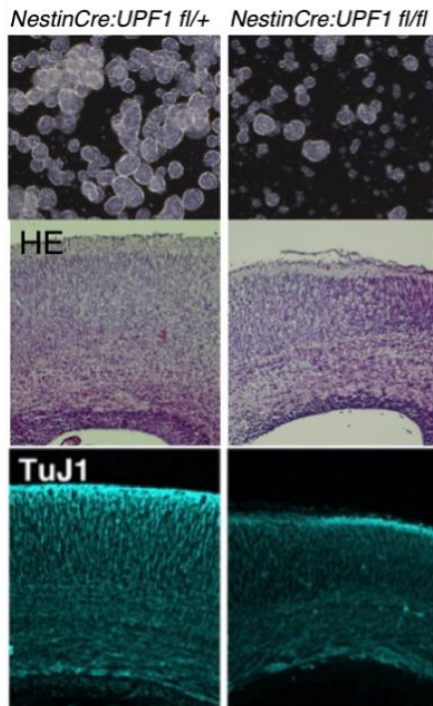
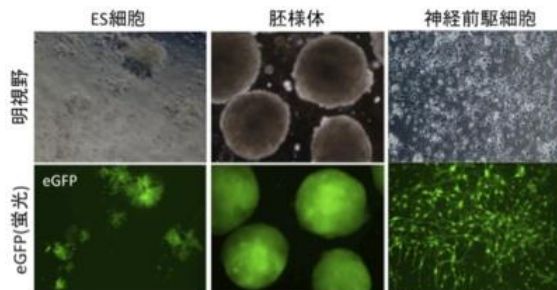


図1：(胎生期17.5日脳) UPF1の欠損により TuJ1陽性の神経細胞が減少していた。

nPTBの発現上昇が観察される。これはPTBのホモログであるnPTBがPTBの標的RNAとしてスプライシング制御を受けており、PTB存在下ではnPTBのExon10(34bp)がスキップされframeshiftにより中途終止コドン(PTC)が生じNMDが誘導されることによる。PTBおよびnPTBはしんそこで実際にUPF1欠損脳でnPTBの発現にはnPTBの発現が優位に上昇しており、nPTBの発現変動がNMD依存的RNA分解によるものであり神経系におけるNMDの良い指標となる事が予想された。

また初代培養細胞への遺伝子導入法としてトランスポゾンベクター(PiggyBac)の有用性を検討した。構築したベクターは薬剤耐性遺伝子およびEGFPを同時に発現するため選択的培養/同定が可能であり、従来のウイ



トランスポゾンベクターを用いた遺伝子導入

ルスベクターに比べて導入が簡便で、発現のサイレンシングも認められず実用性に優れていた(図2)。

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 3 件)

1. Shibasaki T, Tokunaga A, Sakamoto R, Sagara H, Noguchi S, Sasaoka T, Yoshida N. PTB Deficiency Causes the Loss of Adherens Junctions in the Dorsal Telencephalon and Leads to Lethal Hydrocephalus. *Cereb Cortex*. [Epub ahead of print] (2012) (査読有り)

2. Ohno S, Shibayama M, Sato M, Tokunaga A, Yoshida N. Polypyrimidine tract-binding protein regulates the cell cycle through IRES-dependent translation of CDK11(p58) in mouse embryonic stem cells. *Cell Cycle*. 1;10(21):3706-3713. (2011) (査読有り)

3. Fukuda T, Tokunaga A, Sakamoto R, Yoshida N. Fbx110/Kdm2b deficiency accelerates neural progenitor cell death and leads to exencephaly. *Mol Cell Neurosci*. 46(3):614-624. (2011) (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

1. 徳永暁憲：ES細胞、神経幹細胞への遺伝子導入法。(口頭発表) 第85回日本生化学会大会 2012年12月16日 福岡

2. 川上絵理、徳永暁憲、坂本怜子、吉田進昭 神経発生におけるヒストン修飾酵素によるエピジェネティック制御機構の解明 第35回日本分子生物学会 2012年12月13日 福岡

3. 川上絵理、徳永暁憲、坂本怜子、吉田進昭 The role of Polycomb group protein Rybp in neural development 第7回研究所ネットワーク国際シンポジウム 2012年6月14日 仙台

4. Akinori TOKUNAGA Analysis of PTB dependent alternative splicing switch during neural development. 3rd IMSUT-GCOE Retreat. 2011 March, 9 (Gunma, Japan)

5. 川上絵理、徳永暁憲、坂本怜子、吉田進昭 初期発生におけるポリコム群遺伝子rybpの機能解析 第34回日本分子生物学会 2011年2月14日 横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/tenuretrack/researcher/tokunaga.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳永 暁憲 (TOKUNAGA AKINORI)

大分大学・全学研究推進機構・助教

研究者番号：70549451

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし