

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659093

研究課題名(和文) マイクロRNAによる樹状突起スパインの形態制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of dendritic spine morphology by microRNA

研究代表者

山形 要人 (YAMAGATA, Kanato)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：20263262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の脳からは多数のmiRNAが単離されているが、スパイン形態を制御するmiRNAに関する報告は少ない。そこで、スパインに局在する蛋白質arcの3'非翻訳領域に結合するmiRNAを同定し、スパイン形態に及ぼす影響を調べた。miRNAを神経細胞に過剰発現させるとスパインは細長く変化したが、これはarc蛋白質の減少によるものと考えられた。次に、arcによるスパイン形態制御を調べるため、arc結合蛋白質のコヒキチンリガーゼを減少させたところ、やはりスパインが細長く変化した。この時、arcの修飾が変化していたことから、arcの減少あるいは修飾の違いによってスパイン形態変化が生じると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Various microRNAs (miRNAs) have been identified in the mammalian brain. However, there is few literature concerning how miRNA regulates dendritic spine morphology. Therefore, I tried to identify and investigate miRNA that binds to arc mRNA, which is induced by neuronal activity and localizes to dendritic spines. Overexpression of this miRNA caused thin spines in primary neurons probably by reducing arc protein levels. We next identified a ubiquitin ligase as one of arc-binding proteins. Reduction of this ubiquitin ligase also caused thin spines in neurons. Knockout of this ligase resulted in distinct post-translational modification of arc protein. These results suggest that decrement or different modification of arc protein may change dendritic spine morphology.

研究分野：神経科学

キーワード：マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (miRNA) は、タンパク質をコードしない小さな RNA 分子であり、様々な生命現象に関わっている。miRNA は、その標的 mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) にある相補的配列と結合し、翻訳を抑制する。哺乳類の脳からは多数の miRNA が単離されているが、スパイン形態を制御する miRNA、その標的となる mRNA に関する報告は極めて少ない。スパイン形態制御に関わる miRNA は、スパインに局在する蛋白質の翻訳を制御すると考えられる。さらに、樹状突起スパインは神経活動によってその大きさや形を変化させることから、神経活動によって発現が変化し (1) スパインに局在する (2) 細胞骨格関連蛋白質 (3) の翻訳制御に関わる miRNA を同定することが重要と考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに神経活動依存的に発現量が変化し、mRNA が樹状突起へ運ばれる細胞骨格関連分子 arc (activity-regulated cytoskeleton-associated protein) を見出している (Neuron 14:433-4, 1995)。Arc 蛋白質もスパインに局在するため、本研究では arc mRNA を翻訳制御する miRNA を同定し、そのスパイン形態制御における役割を解析する。さらに、miRNA は arc を介してスパイン形態を調節すると考えられることから、arc と結合蛋白質の解析を行う。

3. 研究の方法

平成 24 年度は、arc 3' UTR に結合する miRNA による樹状突起スパインの形態調節、そして miRNA による翻訳抑制が神経活動依存的に解除されるかどうかを検討した。平成 25 年度以降は、miRNA 前駆体のノックアウトマウスを用いて、*in vivo* スパイン形態制御における miRNA の役割を解析し、

超解像顕微鏡を用いてシナプスを観察した。さらに、miRNA は arc 翻訳を介してスパイン形態を変化させると考え、arc と結合するユビキチンリガーゼの解析を行った。

4. 研究成果

(1) arc 3' -UTR に結合する miRNA と miRNA によるスパイン形態制御

arc mRNA の 3' UTR に結合する miRNA (二種類) を EGFP とともに遺伝子導入し、樹状突起スパイン形態を観察した。その結果、miRNA 導入ニューロンのスパインは細く長くなり、miRNA によって形態変化が起きることが明らかになった。また、miRNA を過剰発現するニューロンの arc 蛋白質は、scrambled oligo 導入ニューロンと同じく樹状突起中に点状分布したが、その大きさは明らかに小さくなっていった。

また、培養海馬ニューロンの神経終末を vGlut1 抗体、スパインを GFP-fil1 により描出し、構造化照明顕微鏡 (SIM) を用いて観察することも試みた。通常の共焦点顕微鏡の画像より、スパインの輪郭が明瞭になり、シナプス間隙も観察することが確認できた。

myr-GFP-arc 3' UTR (wt) あるいは 3' UTR の miRNA 結合配列を変異させたプラスミド (mt) をニューロンへ導入し、KCl 刺激によって EGFP 蛍光が増強するかどうかを調べた。その結果、KCl による wt の蛍光強度の増加より mt の強度変化の方が大きいことがわかった。すなわち、miRNA も脱分極によって誘導され、arc mRNA の翻訳を抑制すると考えられた。

(2) 脳特異的に miRNA を欠損するマウスの作製と arc 蛋白質の発現

arc mRNA の 3'-UTR に結合する miRNA は、幾つかの miRNA をコードする前駆体からプロセシングにより生成される。そこで、この前駆体を脳特異的にノックアウト (KO) されたマウスを作製した。野生型マウスとこの KO マウスから脳を摘出し、arc 発現量を比較したところ、KO マウス脳において arc 蛋白量が増加していることを確認した。

脳特異的 miRNA ノックアウトマウスの行動学的解析: miRNA KO マウスと野生型マウスを用いて、文脈依存的恐怖記憶試験を行った。しかし、KO マウスと野生型の間で有意な記憶の差は認められなかった。以上の結果から、arc が正常より増加してもスパイン形態や記憶に有意な影響を及ぼさないと考えられた。

(3) arc と結合するユビキチンリガーゼの解析

Arc と結合するユビキチンリガーゼを同定しているため、その解析を進めた。siRNA を用いてユビキチンリガーゼをノックダウンしたところ、典型的なキノコ型スパインはほぼ形成されなくなり、細長い (thin) フィロポディア様の突起へと変化した。さらに、興奮性のシナプス形成も抑制された。これらの結果から、arc と結合するユビキチンリガーゼはスパインおよび興奮性シナプス形成に必要な分子であると考えられた。

Arc 結合ユビキチンリガーゼが arc 蛋白質自体を基質とするかどうかを解析した。ユビキチンリガーゼノックアウトマウスにおける arc のユビキチン化を野生型マウスと比較したところ、予想外の結果が得られた。すなわち、arc は通常 55kDa の蛋白質として arc 抗体によって認識されるが、ノックアウトではこの 55kDa 蛋白質が減少し、やや小さい 53kDa 蛋白質が新たに出現した。しかも、ユビキチン抗体との反応性を調べたところ、

53kDa 蛋白質の方がユビキチン化されており、55kDa 蛋白質はユビキチン化されていなかった。以上の結果から、このユビキチンリガーゼは arc を基質とせず、むしろ他の酵素によるユビキチン化を抑制していると考えられた。さらに、通常見られる 55kDa の arc 蛋白質はユビキチン化とは別の蛋白修飾を受けていると考えられた。ユビキチンリガーゼノックアウトマウスは、様々な行動異常を示すが、arc の修飾の異常に起因する可能性が考えられた。

以上の結果から、miRNA が arc 蛋白質の翻訳を抑制していること、arc 蛋白質はユビキチンリガーゼと結合し、スパインの形態変化を制御していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

Sugiura H, Yasuda S, Katsurabayashi S, Kawano H, Endo K, Takasaki K, Iwasaki K, Ichikawa M, Kobayashi T, Hino O, Yamagata K (2015) Rheb activation disrupts spine synapse formation through accumulation of syntenin in tuberous sclerosis complex. *Nature Commun.* 6:6842. (査読有) doi: 10.1038/ncomms7842

Masui K, Tanaka K, Ikegami S, Villa GR, Yang H, Yong WH, Cloughesy TF, Yamagata K, Arai N, Cavenee WK, *Mischel PS (2015) Glucose-dependent Acetylation of Rictor Promotes Targeted Cancer Therapy Resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112:9406-11. (査読有) doi: 10.1073/pnas.1511759112

山形要人 (2016) 薬理学研究のすすめ、*日本薬理学雑誌* 147:3-4. (査読無)

<http://www.pharmacol.or.jp/fpj/issue/TOC16-147%281%29/16-147-1.htm>

Yasuda S, Sugiura H, Katsurabayashi S, Shimada T, Tanaka H, Takasaki K, Iwasaki K, Kobayashi T, Hino O, Yamagata K (2014) Activation of Rheb, but not of mTORC1, impairs spine synapse morphogenesis in tuberous sclerosis complex. **Sci Rep** 4 : 5155. (査読有) doi: 10.1038/srep05155

Shimada T, Takemiya T, Sugiura H, * Yamagata K (2014) Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. **Mediators Inflamm** 2014 : 901902 (査読有) doi: 10.1155/2014/901902

Oda, A., Yamagata, K., Nakagomi, S., Uejima, H., Wiriyasermkul, P., Ohgaki, R., Nagamori, S., Kanai, Y., and Tanaka, H.: "Nicotine induces dendritic spine remodeling in cultured hippocampal neurons." **J Neurochem.** 128. 246-55 (2014), 査読有 doi: 10.1111/jnc.12470

Shimada, T., Fournier, A.E., and Yamagata, K.: "Neuroprotective function of 14-3-3 proteins in neurodegeneration." **BioMed. Res. Int.** 2013. 564534 (2013), 査読有 doi: 10.1155/2013/564534

Shimada, T., Sugiura, H., and Yamagata K.: "Neuritin: A therapeutic candidate for promoting axonal regeneration." **World J. Neurol.** 3. 138-143 (2013), 査読有 doi: 10.5316/wjn.v3.i4.138

Takeuchi, C., Yamagata, K., and Takemiya, T.: "Variation in EAE scores in a mouse model of multiple sclerosis." **World J. Neurol.** 3. 56-61 (2013), 査読有 doi: 10.5316/wjn.v3.i3.56

山形要人、杉浦弘子、安田 新: "神経活動によるスパイン形態制御と脳疾患" **日本薬理学雑誌** 142. 106-111 (2013), 査読無 <http://plaza.umin.ac.jp/JPS1927/fpj/issue/TOC13-142%283%29/13-142-3.htm>

Takeuchi C, Matsumoto Y, Kohyama K, Uematsu S, Akira S, Yamagata K and Takemiya T: "Microsomal prostaglandin E synthase-1 aggravates the inflammation and demyelination in a mouse model of multiple sclerosis." **Neurochem. Int.** 62. 271-80 (2013), 査読有 doi: 10.1016/j.neuint.2012.12.007

Takemiya T, Yamagata K: "Intercellular Signaling Pathway among Endothelia, Astrocytes and Neurons in Excitatory Neuronal Damage." **Int J Mol Sci.** 14. in press (2013), 査読有 doi: 10.3390/ijms14048345

安田 新、杉浦弘子、山形要人: "過剰興奮後に生じるスパインが減少するメカニズム" **日本薬理学雑誌** 140. 141 (2012), 査読無 <http://plaza.umin.ac.jp/JPS1927/fpj/issue/TOC12-140%283%29/12-140-3.htm>

[学会発表](計 15件)

山形要人、てんかん・精神遅滞の新しいメカニズムと治療薬の探索、第17回応用薬理シンポジウム、2015-9-4、新潟大学(新潟県新潟市)

山形要人、TSCモデル動物を用いた基礎研究: てんかん・精神遅滞の新しいメカニズム、Tsc Meet The Experts、2015-11-15、東京ミッドタウン(東京都港区)

Shimada T, Yoshida T, Yamagata K. Neuritin mediates activity-dependent

branch formation through FGF signaling. 第 49 回日本てんかん学会、2015-10-30、長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

Yasuda S, Sugiura H, Katsurabayashi S, Kawano H, Endo K, Takasaki K, Iwasaki K, Ichikawa M, Kobayashi T, Hino O, Yamagata K. Rheb activation disrupts spine synapse formation through accumulation of syntenin in tuberous sclerosis complex. 第 58 回日本神経化学会大会、2015.9.12、大宮ソニックシティ (埼玉県さいたま市)

Shimada T, Yoshida T and Yamagata K. "Neuritin mediates activity-dependent axonal branching in hippocampal granule cells." Development, Functions and Disorders of the Nervous System 2014. Joint Meeting of the 20th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience and the 5th Annual NeuroDevNet Brain Development Conference, 2014.7.19-24, (Montreal, Canada)

Yamagata K, Sugiura H, Yasuda S, Shimada T, Katsurabayashi S, Takemiya T, Iwasaki K, Kobayashi T, Hino O, Novel mechanism for the pathogenesis of tuberous sclerosis complex. 第 48 回日本てんかん学会学術集会、2014.10.2-3, 京王プラザホテル (東京都新宿区)

Shimada T, Yoshida T, and Yamagata K. "Neuritin induces activity-dependent axonal branch formation through FGF signaling." 第 37 回日本神経科学大会、2014.9.11-13, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Yasuda S, Sugiura H, Katsurabayashi S, Shimada T, Tanaka H, Takasaki K, Iwasaki K, Kobayashi T, Hino O, Yamagata K. Activation of Rheb, but not of mTORC1, impairs spine synapse morphogenesis in tuberous sclerosis complex. 第 36 回日本生物学的精神医学会・第 57 回日本神経化学会大会合同年会、2014.9.29-10.1, 奈良県文化会館 (奈良県奈良市)

Tadayuki Shimada, Tomoyuki Yoshida, and Kanato Yamagata: "Activity-dependent axonal branching mediated by neuritin." New Frontier of Molecular Neuropathology 2014-3-16. 東京医科歯科大学 (東京都文京区)

山形要人: "プロトカドヘリン情報伝達系と脳の病態" 第 86 回日本生化学会大会シンポジウム. 2013-9-13、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Shin Yasuda, Hiroko Sugiura, Shutaro Katsurabayashi, Katsunori Iwasaki, Toshiyuki Kobayashi, Okio Hino, Kanato Yamagata: "An mTOR-independent mechanism for impaired spinogenesis and behavioral deficits in a rodent model of tuberous sclerosis." 2013-6-22、京都国際会館 (京都府京都市)

山形要人 結節性硬化症におけるスパイン形成障害の分子メカニズム、金沢大学シンポジウム「発達神経薬理学をスタートとする源流と現状」2013-4-18、金沢大学 (石川県金沢市)

山形要人: "活動依存的発現分子によるシナプス形成制御と病態" 第 86 回日本薬理学

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

会年会シンポジウム. 2013-3-22, 福岡国際
会議場 (福岡県福岡市)

Yamagata K: "Roles of
activity-regulated proteins in dendritic
spine abnormalities" International
synapse research workshop 2012

"Understanding of synapse pathology,
from genome mutation to functional
defects". 2012-11-9, Okazaki conference
center (Okazaki, Aichi)

Yasuda S, Sugiura H, Katsurabayashi S,
Iwasaki K, Hino O and Yamagata K: "Novel
mechanism for dendritic spine abnormality
in tuberous sclerosis" The 11th Biennial
Meeting of the Asian Pacific Society for
Neurochemistry. 2012-9-30、神戸国際会議
場 (兵庫県神戸市)

[図書](計 1件)

Yasuda S, Sugiura H and Yamagata K: "Mek3
in Encyclopedia of Signaling Molecules"
Springer. 1058-1065 (2012)

[産業財産権]

出願状況(計 2件)

名称: 精神・神経疾患モデル動物
発明者: 山形要人 杉浦弘子 安田新 島田
忠之
権利者: 公益財団法人東京都医学総合研究所
種類: 特許
番号: 2013-179443
出願年月日: 2013-09-11
国内外の別: 国内

名称: スパイン形成異常を抑制するための医
薬組成物
発明者: 山形要人 杉浦弘子 安田新 島田
忠之
権利者: 公益財団法人東京都医学総合研究所
種類: 特許
番号: 2012-1630780
出願年月日: 2012-09-07
国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ: <http://www.igakuken.or.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山形要人 (YAMAGATA, Kanato)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発
達・神経再生研究分野・プロジェクトリー
ダー

研究者番号: 20263262

(2)研究分担者

田中秀和 (TANAKA, Hidekazu)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号: 70273638

(2)連携研究者

杉浦弘子 (SUGIURA, Hiroko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発
達・神経再生研究分野・主席基盤技術研究
職員

研究者番号: 40162870

安田 新 (YASUDA, Shin)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発
達・神経再生研究分野・研究員

研究者番号: 20392368