

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291046

研究課題名(和文)胎生期神経前駆細胞内mRNA長距離輸送に関わるRNA結合タンパクの探索と機能解析

研究課題名(英文)The role of RNA-binding protein for long-distance transportation of mRNA within embryonic neural progenitor cells

研究代表者

大隅 典子(OSUMI, Noriko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00220343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の進化の過程で拡大した大脳皮質の脳室帯を構成する神経前駆細胞は、放射状グリア(RG)細胞と呼ばれ、その名の通り放射状に脳室面から脳表面まで突起を伸ばし、きわめて極性の高い形態を呈することが知られている。このようなRG細胞における長距離物質輸送メカニズムを明らかにするために、RNA結合タンパク質であるFMRP(脆弱性X症候群タンパク質)に着目した。RIP-ChIP法を用いて、FMRPが結合するmRNAを網羅的に探索したところ、標的mRNA候補を同定でき、Fmr1ノックアウトマウスの大脳皮質において、免疫染色法によりそのタンパク質の発現を調べたところ、数個のタンパク質の発現が低下していた。

研究成果の概要(英文)：The mammalian cortex has expanded during evolution and its primordium consists with radial glial (RG) cells as neural progenitors. RG cells have long processes stretching between apical and basal surface of the cortical primordium. We would like to understand molecular mechanisms for long-distance transportation within the RG cell, and focused on an RNA-binding protein, i.e., fragile X mental retardation protein (FMRP), coded by Fmr1 gene. We performed RIP-ChIP analyses and found candidate mRNAs as targets of FMRP, and examined expression profiles of the candidate genes. Immunohistochemical analyses showed decreased expression of some of the candidate genes at the protein level, suggesting a possibility that these transcripts can be transported by FMRP.

研究分野：神経発生

キーワード：神経発生 RNA結合タンパク質 FMRP 放射状グリア mRNA輸送

1. 研究開始当初の背景

我々の高度な神経機能を支える中枢神経系の中でも、大脳皮質は哺乳類の進化の過程で拡大した領域である。胎生期における哺乳類大脳皮質の構築過程において、神経前駆細胞として働く放射状グリア（RG）細胞は、脳室面から脳表面（basal 側）まで達する長い突起を有する。このような極性の強い神経前駆細胞内において、どのようにして核から遠く離れた basal 側まで mRNA 分子が輸送されるのか、そのメカニズムについては明らかになっていない。神経細胞内の mRNA 輸送では、微小管がレールとなり、その上を移動するキネシン等の各種モータータンパク質が、自閉症関連因子である FMRP（脆弱性 X 症候群タンパク質）等の RNA 結合タンパク複合体を介して、細胞の樹状突起側もしくは軸索末にシナプス分子 mRNA を長距離に輸送することが知られている。mRNA は、輸送される間に分解されることがないように、「RNA 顆粒」と呼ばれる複合体に取り囲まれた状態で細胞内の目的の部位に輸送され、局所に存在するリボソーム上で翻訳されることが多い。

2. 研究の目的

本研究は、哺乳類型の非常に極性の高い RG 細胞内において、核から遠く離れた basal 側までの mRNA 分子長距離輸送メカニズムを明らかにすることを目指す。大脳皮質原基における mRNA の RG 細胞 basal 側への長距離輸送現象を理解することにより、哺乳類型脳構築過程の基本原理の一端について解明を目指すものである。

3. 研究の方法

マウス大脳皮質原基を構成する RG の細胞内 basal 側 mRNA 輸送に関して、分子生物学的解析や申請者らが得意とする実験発生学的手法を駆使することにより、下記について明らかにする。

- 1) 発生段階に沿った大脳皮質原基の RG 細胞における FMRP の局在について、免疫組織学的に明らかにする。
- 2) RIP-ChIP 法によって大脳皮質原基において FMRP が結合する mRNA を網羅的に探索し、FMRP の標的 mRNA について同定する。これらの標的 mRNA について Gene Ontology (GO) 解析を行う。
- 3) 2)で同定した標的 mRNA について、*Fmr1* ノックアウトマウスにおいて局在が変化するかどうかを確認する。

4. 研究成果

FMRP に対する抗体を用いた免疫染色により、野生型マウスの大脳皮質原基において、RNA 結合タンパク質である FMRP が RG 細胞の apical 側および basal 側において局在することを確認した。また、FMRP の basal 側の局在は、RG 細胞の basal 側突起が発達した神経細胞産生期の発生段階で認められた。

RG 細胞においても細胞内物質輸送が mRNA レベルで行われていると予想し、RNA 結合タンパク質である FMRP に結合する RNA を探索するために、RIP-ChIP 法を用いて、FMRP が結合する mRNA を網羅的に探索した。その結果、865 個の標的 mRNA を同定することができた（図 1）。これらの標的 mRNA に関して Gene Ontology 解析を行い、物質輸送や細胞周期、細胞増殖に関する GO term を得ることができた。

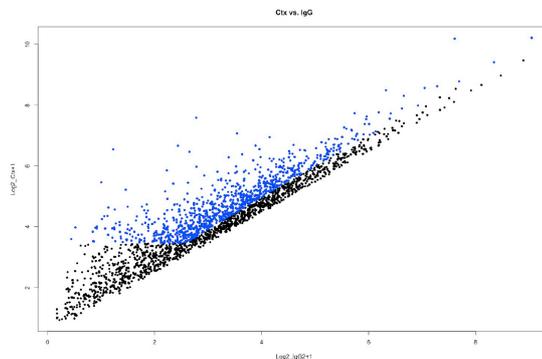


図 1. RIP-seq 法による FMRP の標的 mRNA の同定

さらに、横浜市立大学の佐々木幸夫博士より入手した *Fmr1* 遺伝子ノックアウトマウス胚の大脳皮質において、免疫染色法によりこれらのタンパク質の発現を調べたところ、いくつかのタンパク質の発現が低下していた。

以上のように、大脳皮質における RNA 結合タンパク質 FMRP の標的 mRNA を網羅的に探索できた。これらの網羅的解析データを過去の文献との比較することにより、胎生期の RG 細胞に特異的な FMRP 標的 mRNA を絞り込むことができた。標的 mRNA の GO 解析により、FMRP による mRNA の制御が RG 細胞の増殖・分化に関わる可能性が示唆された（図 2）。さらに、*Fmr1* 遺伝子ノックアウトマウスを用いた発現解析により、FMRP によって制御される分子について検討することができ、大脳皮質の RG 細胞発生における FMRP の機能解析が進捗した。

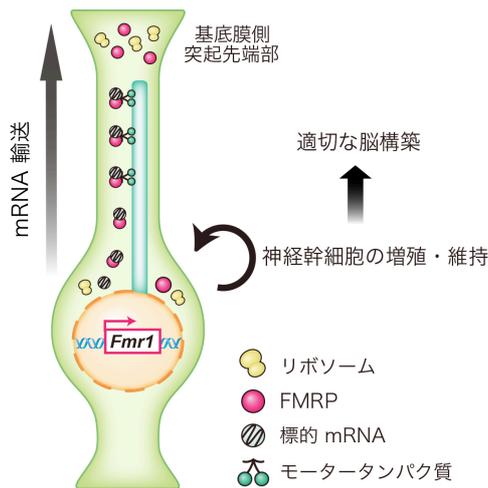


図 2. RG 細胞内の FMRP による mRNA 輸送モデル

今後、同定した候補 mRNA の大脳皮質における発現について、*in situ* ハイブリダイゼーション法により確認する予定である。また、RG 細胞内で FMRP が標的 mRNA の輸送を制御するかどうかを調べるために、子宮内電気穿孔法を用いた *Fmr1* ノックダウン実験によって標的 mRNA の局在が変化するかどうかにについて確認することを計画している。

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 8 件)

1) Kikkawa, T., Takahashi, M., Osumi, N.: Electroporation in the Rodent Embryonic Brain Using Whole Embryo Culture System. *Curr Protoc Neurosci*, 78:3. 30.1-3. 30.16, 2017. 査読有.
DOI: 10.1002/cpns.21

2) Matsumata, M., Inada, H., Osumi, N.: Fatty acid binding proteins and the nervous system: Their impact on mental conditions. *Neurosci Res* 102, 47-55, 2016. 査読有.
DOI: 10.1016/j.neures.2014.08.012

3) 大隅典子: カタチと機能: 神経幹細胞の形態から考察する哺乳類大脳新皮質の進化. *組織細胞化学* 2016(7), 145-153, 2016. 査読無.
<https://www.gakusai.co.jp/books/s-18.htm#link2016>

4) Suzuki, J., Sakurai, K., Yamazaki, M., Abe, M., Inada, H., Sakimura, K., Katori, Y., Osumi, N.: Horizontal basal cell-specific deletion of Pax6 impedes

recovery of the olfactory neuroepithelium following severe injury. *Stem Cells Dev.* 24(16), 1923-1933, 2015. 査読有.
DOI: 10.1089/scd.2015.0011.

5) 大隅典子: 神経回路リモデリング: 「三つ子の魂」を神経科学的に考える: 脳の発生発達と高次機能. *実験医学* 33(9), 1397-1398, 2015. 査読無.
<https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758101400/>

6) Takahashi, M., Makino, S., Kikkawa, T., Osumi, N.: Preparation of rat serum suitable for mammalian whole embryo culture. *J Vis Exp.* 90, 2014. 査読有.
DOI: 10.3791/51969.

7) Tsunekawa, Y., Kikkawa, T., Osumi, N.: Asymmetric inheritance of Cyclin D2 maintains proliferative neural stem/progenitor cells: a critical event in brain development and evolution. *Dev Growth Differ*, 56(5), 349-357, 2014. 査読有.
DOI: 10.1111/dgd.12135

8) 吉川貴子、大隅典子: Pax6 による神経幹細胞の分化制御. *医学のあゆみ* 251(12), 1118-1122, 2014. 査読無.
<https://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=925113&AC=14539>

[学会発表] (計 14 件)

1) Casingal, C., Kikkawa, T., Inada, H., Osumi, N.: The role of FMRP and its mRNA targets in corticogenesis, 第10回神経発生討論会, 2017年3月10日, 秋保リゾートホテルクレセント(宮城県仙台市)

2) Casingal, C., Kikkawa, T., Inada, H., Osumi, N.: The role of FMRP and its mRNA targets in corticogenesis, The 2017 Japan-NIH Joint Symposium, 2017年2月16日, 東北大学(宮城県仙台市)

3) Casingal, C., Kikkawa, T., Inada, H., Osumi, N.: The role of FMRP and its mRNA targets in brain development, 第10回リトリート 東北大学 大学院生研究発表会, 2017年1月14日, 東北大学(宮城県仙台市)

4) Casingal, C., Kikkawa, T., Inada, H., Osumi, N.: The role of FMRP and its mRNA targets in brain development. 第39回日本分子生物学会, 2016年12月1日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

5) 大隅典子：カタチと機能：神経幹細胞の形態から考察する哺乳類大脳新皮質の進化。第39回組織細胞化学講習会。2016年8月4日、仙台国際センター（仙台市青葉区）

6) Osumi, N.： Unbalanced n-6/-3 polyunsaturated fatty acid ratio disturbs neocortical development in mice. International Conference on Omega-3 and Human Health. 2016年5月23日, Shanghai; China

7) Kikkawa, T., Sakayori, N., Yuuki, H., Osumi, N.： Dmrt genes regulate Cajal-Retzius cell development of the cerebral cortex. 第9回神経発生討論会, 2016年3月19日, 東京医科歯科大学（東京都文京区）

8) Nakamura, R., Kikkawa, T., Sato, T., Osumi, N.： Pax6 is involved in the development of cortical Sp8 positive inhibitory cells. 第9回神経発生討論会, 2016年3月19日, 東京医科歯科大学（東京都文京区）

9) Kikkawa, T., Sakayori, N., Yuuki, H., Katsuyama, Y., Osumi, N.： Dmrt genes differentially participate in Cajal-Retzius cell development of the cerebral cortex. Neocortical Organization III, 2016年2月11日, 東京大学（東京都文京区）

10) Nakamura, R., Kikkawa, T., Sato, T., Osumi, N.： Pax6 is involved in inhibitory neuron production in the murine cerebral cortex, 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月2日, 神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）

11) 大隅典子：神経幹細胞の増殖と分化に対する脂質シグナル、第37回神経組織培養研究会、2015年11月7日、霧島国際ホテル（鹿児島県霧島市）

12) Kikkawa, T., Sakayori, N., Yuuki, H., Katsuyama, Y., Osumi, N.： Dmrt genes differentially participate in Cajal-Retzius cell development of the cerebral cortex. Society for Neuroscience 45th Annual Meeting, 2015年10月18日, シカゴ; アメリカ

13) Kikkawa, T., Sakayori, N., Yuuki, H., Katsuyama, Y., Osumi, N.： Dmrt genes differentially participate in Cajal-Retzius cell development of the cerebral cortex. Tohoku Forum for

Creativity, Development and Disease. 2015年8月25日、東北大学（仙台市青葉区）

14) Osumi, N.： Molecular and cellular mechanisms of cortical development: Its significance in brain evolution and psychiatric diseases. The 12th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry, 2014年8月24日, Kaohsiung (Ta-Kao); Taiwan

〔図書〕（計 3 件）

1) 大隅典子：脳から見た自閉症～「障害」と「個性」のあいだ。講談社ブルーバックス。254pp, 2016.

2) Takahashi, M., Kikkawa, T., Osumi, N.： Gene Transfer into Cultured Mammalian Embryos by Electroporation. Electroporation Methods in Neuroscience; Springer Protocols, Neuromethods vol. 102 (ed by T. Saito). Humana Press, pp141-257, 2015.

3) Osumi, N., Guo, N., Matsumata, M., Yoshizaki, K. Neurogenesis and sensorimotor gating: bridging a microphenotype and an endophenotype. Curr Mol Med. 15, 129-137, 2015.

〔その他〕

テルモ生命科学芸術財団ホームページ

フクロウ博士の森の教室

第8回「脳の形成と自閉症」

https://www.terumozaidan.or.jp/laboclasse/s2_08/interview01.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大隅 典子 (OSUMI, Noriko)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00220343

(2) 研究分担者

稲田 仁 (INADA, Hitoshi)

東北大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60419893

吉川 貴子 (KIKKAWA, Takako)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90727851