

生命動秩序形成研究領域

(神経細胞生物)

椎名伸之 (准教授)

1) 専門領域：細胞生物学、神経生物学

2) 研究課題：

- a) mRNA 輸送・局所的翻訳を制御する RNG105 のコンディショナルノックアウトマウスの解析
- b) RNA 粒子の集合・分散の分子メカニズムの解析

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 短期記憶が長期記憶へ強化される際には、神経細胞でタンパク質が新規に合成されることが不可欠である。このタンパク質合成は、記憶形成の過程で入力刺激のあったシナプスに局限した「局所的翻訳」であると考えられており、局所的翻訳のためにはシナプスが存在する樹状突起へ mRNA を輸送することが必要である。この mRNA 輸送・局所的翻訳システムによって、入力刺激のあったシナプスでのみタンパク質を合成し、そのシナプスが選択的に強化されて長期記憶が形成されると考えられている。

神経樹状突起へ輸送される mRNA は、「RNA 粒子」と呼ばれる構造体に取り込まれる。RNA 粒子は mRNA、リボソーム、RNA 結合タンパク質等で主に構成される高次複合体で、mRNA 輸送と局所的翻訳制御において中心的役割を担う。我々は、マウスを用いて RNA 粒子が mRNA 輸送・局所的翻訳を制御する分子メカニズムを解析し、そのシナプス形成、神経ネットワーク形成、ひいては記憶や学習における役割について研究を進めている。

我々は以前、RNA 粒子の構成因子として RNG105 という RNA 結合タンパク質を新規に同定した。RNG105 は樹状突起への mRNA 輸送に関与し、その機能が局所的翻訳、さらに神経ネットワークの構築に必要であることを明らかにした (Shiina *et al.*, *J. Neurosci.* **30**, 12816-12830, 2010)。RNG105 ノックアウトマウスを作成したが、胎仔期において脳神経細胞の細胞死が起こり、呼吸不全で生後間もなく致死であった。そこでこの致死性を回避するために、生後の大脳および海馬でノックアウトが起こる CaMKII α -Cre/loxP システムを用いた RNG105 コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを新たに作成し、成熟個体を得た。RNG105 cKO マウスでは、RNG105 タンパク質の発現レベルが特に海馬で顕著に減少していることを確認した。

RNG105 cKO マウスおよび対象として野生型マウスの海馬を用い、神経樹状突起局在に異常を生じる mRNA の網羅的同定に着手した。海馬の錐体神経細胞は細胞体層と樹状突起層がきれいに分かれて分布しており、その各層を解剖によって切り出し、そ

れぞれから RNA を抽出した。その RNA の定量的 RT-PCR により、樹状突起に局在することが知られているいくつかの mRNA が確かに樹状突起層に多く含まれ、逆に細胞体に留まることが知られている mRNA は樹状突起に少ないことを確認した。今後、RNG105 cKO マウスおよび野生型マウスから抽出した mRNA を次世代シーケンスによって網羅的に比較解析し、RNG105 cKO マウスの神経樹状突起 mRNA 輸送にどのような異常が生じているかを明らかにしていく。

さらに、RNG105 cKO マウスの行動解析をおこなった。その一つとして記憶・学習テストである受動的回避テストをおこなった。このテストでは、マウスは箱の中で電気刺激を受け、その状況を記憶したマウスはその後数日以上その箱に進入しなくなる。RNG105 cKO マウスは電気刺激の 5 分後は箱に進入しなかったが、24 時間後には進入するようになった。この結果は、RNG105 cKO マウスは短期記憶は獲得できるが、長期記憶は獲得できないことを示しており、RNG105 の機能が短期記憶から長期記憶への強化に必要であることを示唆した。また、別の記憶・学習テストとしてモリス水迷路テストをおこなった。このテストでは、数日間かけてプールの水面下に隠れている避難場所を学習、記憶する。RNG105 cKO マウスは、この避難場所を全く覚えることができず、このテストでも RNG105 cKO マウスは学習・記憶に障害があることが明らかになった。

RNG105 と RNA 結合ドメインを共有しているパラログとして、RNG140 の解析もおこなっている。RNG105 と RNG140 は異なった種類の RNA 粒子に局在し、異なった時期、すなわち、RNG105 は胎仔期の脳で、RNG140 は成体の脳で発現が高いという点で性質を異にする (Shiina and Tokunaga, *J. Biol. Chem.* **285**, 24260-24269, 2010)。我々は RNG140 ノックアウトマウスを得ており、これは cKO ではなくても成体まで成長することを確認した。このマウスを用いて RNG140 の高次脳機能解析および行動解析をおこなうべく、B6 系統に戻し交配をおこなっている。

- b) 神経細胞の RNA 粒子の過剰凝集は、神経変性疾患と深く関わるということが近年明らかにされつつある。筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭葉変性症 (FTLD) では RNA 粒子が過剰凝集することが観察されており、その原因として RNA 粒子局在タンパク質 FUS/TLS, TDP-43, hnRNPA2B1 等の RNA 粒子への集積が示唆されている。特にそれらタンパク質の天然変性タンパク質領域 (LC/ID 領域) が病態と関連している。一方、通常は RNA 粒子の集合／離散はそれぞれ mRNA 輸送と翻訳抑制／翻訳活性化の役割を担っており、可逆的に制御されている。したがって、RNA 粒子の集合・離散の分子メカニズムを明らかにすることは、神経変性疾患および mRNA 輸送・局所的翻訳制御の理解のための基盤となる。

我々は RNG105 に結合するタンパク質のプロテオミクス解析により、RNA 粒子の集合・離散を制御するタンパク質を新たに見出した。これらは NFAR1 およびその結合タンパク質 NF45 であり、繊維芽培養細胞において NFAR2 の発現は RNA 粒子の集合を

促進し、逆に NF45 の発現は RNA 粒子の離散を引き起こした。

NFAR2はNFAR1と同一遺伝子から転写されるスプライシングバリエーションであるが、両者の機能の違いはこれまで明らかではなかった。我々はNFAR2のみがRNA粒子に局在し、かつRNA粒子の凝集を促進することを見出した。この違いはNFAR2のみがGQSYドメインを持つことに起因し、このドメインがLC/ID領域であり、かつRNG105を含むmRNA-タンパク質(mRNP)複合体に結合することを明らかにした。さらに、GQSYドメインがFUS/TLSのLC/ID領域と機能的に交換可能であることも示した。

NFAR2のもう一つの重要なドメインとしてDZFドメインを同定した。DZFドメインはRNG105 mRNP複合体との結合には関与しないが、RNA粒子の集合を正・負に調節することを見出した。正の調節としてDZFドメインがRNA粒子集合のマスター制御キナーゼであるPKRによってリン酸化されること、負の調節としてDZFドメインがNF45と結合することを明らかにした。

以上の結果から、NFAR2がGQSYドメインとDZFドメインの2つの複合体形成ドメインを介してRNG105 mRNP複合体のコネクターとして機能し、RNA粒子の集合を促進する可能性が考えられた。そのコネクターとしての機能はPKRによるリン酸化によって増強され、逆にNF45の結合によって阻害されると考えられる。今回我々が明らかにした分子メカニズムが脳神経細胞のRNA粒子においてどのような役割を果たすのか、さらに神経変性とどのような関連を持つのかについて、今後解析を進める予定である。

7) 招待講演

椎名伸之「RNA granuleのプロテオミクスから機能解明へ」、2013年度 包括脳ネットワーク夏ワークショップ、名古屋、2013年8月.

8) 学会および社会的活動

学会誌編集委員

The Journal of Biochemistry, Advisory Board (2011-)

Cell Structure and Function, Editorial Board (2013-)

11) 外部獲得資金

科研費新学術領域研究、「包括型脳科学研究推進支援ネットワーク」、椎名伸之（分担）(2010年-2014年).

科研費基盤研究(C)、「mRNA 輸送・翻訳制御粒子の形成・解体メカニズム」、椎名伸之（代表） (2013年-2015年).

公益財団法人大幸財団研究助成金、「mRNA 輸送と局所的翻訳による高次脳機能制御」、椎名伸之（代表）