

博士論文要約 (Summary)

平成 24 年 10 月入学

連合農学研究科 寒冷圏生命システム学専攻

氏 名 小野寺 望

タイトル	ニワトリ胚の脳において高度に発現する軸索性 RNA
「序論及び目的」	
<p>比較的最近まで、ニューロンの軸索にはリボソームや mRNA は存在せず、タンパク質合成は起こらないと考えられてきた。1960 年台の後半には、軸索におけるタンパク質合成やリボソームの存在を、1990 年前後には軸索性 mRNA の存在を示唆するデータが報告され始めたが、それらの存在はすぐには受け入れられなかった。実際、2006 年に執筆された教科書には、軸索ではタンパク質合成が起こらないとの記述がある (Bears et al., 2006)。軸索でのタンパク質合成が初めて明確に示されたのは、イカ神経前終末由来のシナプトソームにおいてであった (Crispino et al., 1997)。脊椎動物の系では、Eng et al. (1999) が、ラット上頸神経節の軸索 mRNA が局所的に新しいタンパク質に翻訳されるだけでなく、β アクチンのごく一部のみが交感ニューロンの軸索区画で生ずることを、区画化培養系を用いて示した。細胞体から切断された培養中の軸索における研究も、軸索性タンパク質合成の存在の証明に寄与している。Campbell & Holt (2001) は、Xenopus の網膜神経節細胞の細胞体から単離した軸索において、ネトリン 1 やセマフォリン 3 A に対する化学向性反応がタンパク質合成阻害剤により阻止されることを見出した。このことも軸索内で局所的翻訳が起こることを示している。</p> <p>様々な種類の神経細胞の軸索で合成されるタンパク質は共通して存在する(細胞骨格タンパク質など)ものがあると共に、その型の神経細胞で特に多く見られるものもあることが、網羅的な RNA プロファイリングにより明らかになりつつある。軸索性 mRNA がコードするタンパク質のうち機能が比較的はっきりしているものの多くは、成長円錐の機能と関連した細胞骨格タンパク質やその調節に関わるタンパク質、例えば β アクチンやコフィリン、RhoA、Par3 などである (Leung et al., 2006; Yao et al., 2006; Piper et al., 2006; Wu et al., 2005; Hengst et al., 2009)。これらの局所的翻訳はネトリン 1、BDNF、Slit2、セマフォリン 3A といったシグナル分子がトリガーを引くことが示されている(総説として Lin & Holt, 2007; Jung et al., 2012)。軸索性 mRNA は軸索から細胞体への逆行性シグナル伝達にも関与することが示されている。例えば、培養背根神経節ニューロンにおいて CREB の軸索性翻訳は、細胞体の核に於いてリン酸化 CREB の蓄積を引き起こし、NGF が誘導する逆行性の生存に必要であることが示されている (Cox et al., 2007)。三叉神経では、BDNF と BMP4 の同時刺激により眼および上顎分枝中の軸索において Smad1/5/8 が局所的に翻訳され、逆行的に輸送されたリン酸化 Smad1/5/8 が三叉神経節内におけるニューロンのアイデンティティの獲得に重要な役割を果たすことが報告されている (Ji & Jaffrey, 2012)。また、軸索性 mRNA の局所的翻訳は、軸索再生にも必要であることが示されている(総説として Willis & Twiss, 2006)。</p> <p>軸索性 mRNA のうち輸送機構が最も良く研究されているのが、β アクチン mRNA である。そのシスエレメントのうちで、軸索を含む細胞末梢への β アクチン mRNA の輸送に非常に重要であるのは、その 3' 非翻訳領域 (UTR) に存在する 54 ヌクレオチド長の zipcode</p>	

である (Kislauskis et al., 1994; Zhang et al., 2001; Willis et al., 2011)。この zipcode に結合するのが zipcode 結合タンパク質 1 (ZBP1/IMP1/IGF2BP1) であり、 β アクチン mRNA の局在、安定性、あるいは翻訳調節に関与することが示されている (Ross et al., 1997; Farina et al., 2003; Huttelmaier et al., 2005)。ZBP1 タンパク質の存在量が β アクチンや GAP43 の mRNA の軸索局在を制限しているということが示されている (Donnelly et al., 2011)。GAP-43 mRNA の場合、その 3'UTR は β アクチンのそれと相同性を示さないが、3'UTR 中の高 AU 調節配列 (ARE) はその軸索局在に必要十分であり、ZBP1 は HuD/Elavl4 と複合体を形成して ARE を通じて GAP-43 mRNA を軸索に局在化させることが提唱されている (Yoo et al., 2013)。HuD は培養 P19 ニューロンの軸索・成長円錐でも、ZBP1 や KIF3A と共に tau mRNA と複合体を形成することが報告されている (Aronov et al., 2002; Atlas et al., 2004)。更に、 β アクチン mRNA の成長円錐への局在や翻訳を hnRNP-R と共に調節する SMN (Rossoll et al., 2003) も HuD と相互作用することが示されている (Akten et al., 2011; Fallini et al., 2011; Hubers et al., 2011)。

中脳視蓋は、哺乳類を除く脊椎動物の視覚情報処理の中樞である。ニワトリの成熟した中脳視蓋は 16 層から成る (Ramón y Cajal, 1911; LaVail & Cowan, 1971; Hunt & Brecha, 1984; Dubbeldam, 1997)。これらの層には、異なる型の網膜神経節細胞が軸索を投射することが示されている (van Gehuchten, 1892; LaVail & Cowan, 1971; Acheson et al., 1980; Yamagata & Sanes, 1995)。脊椎動物の脳が領域化後、構造の複雑化を更に進めていくプロセスを分子レベルでより深く理解するため、ニワトリの中期から後期胚の中脳視蓋において、層構造特異的に発現する遺伝子 (主に転写因子をコードするもの) のスクリーニングを *in situ* ハイブリダイゼーション法 (ISH) により行っていたところ、幾つかの遺伝子に関し、後期胚で線状のシグナルが検出された。シグナルが検出された部位や、染色の形状から、軸索性 mRNA を検出したのではないかと考えられた。古典的な ISH により、軸索性 mRNA のシグナルがこれほど強く検出された例は殆ど無いので、研究の対象をこれらのシグナルに変更することにした。

「材料及び方法」

本実験で用いたニワトリ有精卵はヤマギシズム生活様名実頭地より購入した。購入後、ニワトリ有精卵は 16°C の気相インキュベーター中で実験に用いるまで保管した。孵卵開始後、水を満たした容器も同時に入れることで湿度を保ちながら、気相インキュベーターにより 38.5°C で孵卵した。本実験で用いたマウスは、日本クレアより購入した。ISH におけるプローブ作製のための鋳型 cDNA 断片の多くは、E2 全胚 E9 脳または E18 脳由来のポリ A⁺ mRNA から RT-PCR により単離し、汎用ベクター pBluescript II SK(+) の EcoR V 部位にサブクローニングした。ISH の手順は、高木ら (2006) に従って行った。

「結果」

ニワトリ中脳視蓋の層構造形成過程の分子機構を明らかにするため、層特異的に発現する可能性がある主として転写因子をコードする候補遺伝子の ISH によるスクリーニングを行った。その結果、Scratch2 や Cash1/Ascl1 (マウス Mash1 のホモログ) といった幾つかの遺伝子が、孵卵開始 9 日目 (E9) の中脳視蓋で層構造特異的に発現することを見出した。次に、これらを含む遺伝子のうちの幾つかに関し、E18 の脳における発現を ISH により解析したところ、一方向に揃った線状の強い発現パターンを示す遺伝子が存在することを見出した。これら遺伝子のシグナルが神経軸索を多く含む視蓋の SAC で主として見られたこと、そしてそのシグナルが線状であることは、これらの遺伝子の転写産物が神経軸索に局在している可能性を示唆する。SAC 以外では幾つかの遺伝子に関し、一部の切片において視神経の軸索が通る SO でも線状のシグナルが検出された。

以下の研究では、特に Scratch2 遺伝子とアミロイド前駆タンパク質 (APP) 遺伝子に焦

点を当てつつ行った。Scratch2 遺伝子は zinc finger 転写因子をコードし、神経前駆細胞の移動に関与することが示されている (Nieto, 2002; Itoh et al., 2013)。APP は、病理学的にはアルツハイマー病の原因物質として疑われている $A\beta$ を生ずる一方、正常な神経において多面的な生理学的役割を果たすと考えられている (総説として Müller & Zheng, 2012)。

ISH で検出したシグナルが、神経軸索に対応することを証明するために隣接切片において、Scratch2 遺伝子の ISH と、神経軸索を特異的に染色する抗アセチル化チューブリン抗体を用いた免疫蛍光染色を行ったところ、ISH の染色パターンと似た、線状の蛍光パターンが見られた。更に、同一切片上で Scratch2 の蛍光 ISH と抗アセチル化チューブリン抗体による免疫蛍光抗体法による二重染色を行ったところ、蛍光の重複が見られた。これらのデータは、ISH で得られたシグナルが神経軸索におけるものであり、軸索性 mRNA を検出したことを示す。

ISH で検出された軸索におけるものと思われる染色が特異的なものであるか調べるために、対照実験を行った。対照実験において、(1) 脱パラフィン後、標本に発色液のみ添加したもの、(2) プローブを含まないハイブリダイゼーション溶液を用いたもの、(3) pBluescript II SK(+) 由来のプローブを用いたもの、のどれもシグナルを生じなかった。更に、古典的には対照実験として行われるセンスプローブを用いた ISH を行った。Scratch2、APP のセンスプローブは、それらのアンチセンスプローブと同様の染色パターンを中脳視蓋において示した。即ち、中脳視蓋では軸索性 mRNA と同じ分布パターンをアンチセンス RNA が示した。一方、端脳では、Scratch2 のセンスプローブによる染色は、そのアンチセンスプローブと異なり、見られなかった。このことは、筆者が検出した ISH 染色の特異性を裏付ける。次に、アンチセンス RNA の存在をさらに確認するため、ニワトリ後期胚 (E18) の脳から RNA を抽出し、ノザンプロット解析を行った。その結果、Scr2 と APP に関し、センスおよびアンチセンスプローブの両方でバンドが観察された。このデータは、ニワトリ後期胚の脳におけるアンチセンス RNA の存在を更に支持する。更に、検出した線状の ISH 染色が特異的であることの別の証拠としては、他にも多くの軸索が標本中に存在するにも関わらず、それらの軸索においては強い染色が見られないことも挙げられる。

本実験で同定した軸索性 mRNA のうち、これまでに行われた軸索性 mRNA に関するプロファイリング研究 (Taylor et al., 2009; Zivraj et al., 2010; Gummy et al., 2011) で同定されているものを調べたところ、12 の遺伝子に関し、それらの研究でも軸索性 mRNA として同定されていることが分かった。

次にニワトリ後期胚 (E18) で観察された高レベル軸索性 RNA がいつ頃出現するかを明らかにするため、Scratch2 のアンチセンスプローブおよびセンスプローブを用いて E9, E12, E14, E16 胚の脳切片において ISH を行った。その結果、両プローブとも、E14 の試料で初めて軸索性 RNA を検出した。

筆者が検出した高レベル軸索性 mRNA が軸索において局所的に翻訳されているかどうかを、ニワトリ後期胚 (E18) において、Scratch2 および APP に関して調べた。抗 Scratch2 抗体または抗 APP 抗体と、抗ニューロフィラメント M (NF-M) 抗体による蛍光二重染色を行ったが、抗 Scratch2 抗体および抗 APP 抗体により線状のシグナルは検出されなかった。

本研究で検出した高レベル軸索性 mRNA がどの程度普遍的に見られる現象かを、マウスにおいて調べた。マウス後期胚 (E17)、新生仔 (出生後 0 日目 (P0)、P5、P10)、成体の脳において、Scratch2 mRNA、APP mRNA、そして軸索性 mRNA として最も良く研究されている β アクチン mRNA の分布を ISH で解析した。しかし、何れの場合も、ニワトリ後期胚で検出されたような高レベルのシグナルは軸索において検出されなかった。Ji

& Jaffrey (2012) は、マウス三叉神経において Smad1/5/8 の軸索性 mRNA の局所的翻訳とそれにより生成された Smad1/5/8 転写因子の逆行輸送がニューロンの運命に影響を与えることを示しているが、彼らはまた、マウス E12.5 胚における Smad1/5/8 の三叉神経軸索における ISH データも提示している。このデータにおいてそれらの軸索性 mRNA のシグナルのレベルは非常に低い。筆者は、このデータに関する追試を行ったが、彼らと同様、マウス E12.5 胚の三叉神経軸索における Smad1 の発現レベルは大変低いことを確認した。

ニワトリ後期胚中脳視蓋で見られる高レベル軸索性 RNA を伴う神経軸索の細胞体の位置を特定するため、脂溶性蛍光色素 DiI による軸索の逆行性標識実験を行った。高レベル軸索性 RNA が見られる中脳視蓋後部の SAC に DiI を埋め込んだところ、逆行性に標識された細胞体の多くが、SGC に位置する大型投射ニューロンであった。

一般的に脳室に近い層のニューロンは軟膜側の層のニューロンよりも早い発生段階に生ずるとされている。ニワトリ胚の発生初期に中脳背側で生じ、後方に軸索を伸ばすニューロンは DTmesV ニューロンと視蓋延髄路ニューロンである。中脳視蓋 SGC 付近から延髄に伸びる軸索の起始部に存在するニューロンは、これらのニューロンである可能性がある。そこで、両初期ニューロンの発生を観察するため、一般的に発生中の胚において汎ニューロンマーカーとされている GAP-43 に対する抗体を用いて初期胚の染色を行ったところ、DTmesV ニューロンが GAP-43 陰性であることを見出した。

「考察」

本研究において、筆者はニワトリ後期胚の脳の一部の軸索に通常の ISH により容易に検出が可能な高いレベルで多様な RNA が存在することを見出した。このような高レベル軸索性 RNA が同じぐらいの発生段階のマウスの脳で検出できるかに関し、少数の遺伝子に関し解析を行ったが、マウスでは検出されなかった。筆者が知る限り通常の ISH により軸索で RNA が、筆者が検出したようなレベルで見出された例は、Xenopus のオタマジャクシ幼生の網膜神経節細胞軸索におけるラミン B2 mRNA のみである (Yoon et al., 2012)。一般的にある系において、何かが存在しないことを証明するのは大変難しい。ただ、哺乳類神経細胞では ZBP1 の存在量が軸索性 RNA の量を制限しているという報告があり (Donnelly et al., 2011)、そのことがマウスで高レベルの軸索性 RNA が検出されないことと関係があるのかもしれない。ニワトリや Xenopus の神経細胞では哺乳類に比べた ZBP1 の存在量がどのようになっているのか興味を持たれる。軸索性 mRNA は軸索再生にも参与するので (総説として Willis & Twiss, 2006)、軸索性 mRNA の量が制限されていることは軸索再生能力の制限につながっている可能性がある。Xenopus オタマジャクシ幼生の視神経は再生することが知られている (総説として Tanaka & Ferretti, 2009)。このことと Xenopus の網膜神経節細胞軸索でラミン B2 mRNA が高いレベルで存在することを考え合わせると、ニワトリ後期胚で高レベル軸索性 mRNA を有するニューロンの軸索再生能が哺乳類に比べ高いかどうか、興味のあるところである。この観点から、ニワトリの高レベル軸索性 RNA の局在機構を明らかにすることは、軸索再生研究に貢献するかもしれない。

筆者は、ニワトリ後期胚の脳において、Scratch2 と APP に関し、アンチセンス RNA が存在し、それらの分布が高レベル軸索性 mRNA と一部重複する、もしくは同じ分布を示すことを見出した。古典的な実験では ISH において、センスプローブを負の対照実験として用いることが多かった。しかし、近年のシーケンシング技術の格段の進歩により、ゲノムの大半の部分が転写されることが明らかになっている (Hangauer et al., 2013) ことを鑑みると、センスプローブでシグナルが検出されたことは驚くに当たらない。アンチセンス RNA のうち、miRNA については軸索において少数の報告がこれまでにある (Natera-Naranjo et al., 2010; Sasaki et al., 2014)。

本研究で検出された高レベル軸索性 RNA を伴う軸索は、中脳視蓋 SGC 付近から延髄に

伸びるもの、端脳中央部に後方から伸びるもの、そして中脳視蓋 SO で検出されるものの 3 種類である。このうち SO は視神経が投射する層であり、恐らく網膜神経節細胞軸索でシグナルが検出されていると考えられる。同じ胚由来の切片でも SO でシグナルが検出されるものとそうでないものがあるので、網膜神経節細胞における高レベル軸索性 mRNA の分布は一樣ではないことが予想される。

本研究で同定した高レベル軸索性 RNA の由来が細胞体由来のものか、それともグリアなど周囲の細胞に由来するものかは不明である。これらの軸索が由来するニューロンは、その分布から判断するに、何れも投射ニューロンである。前述の通り、SO で検出される軸索は網膜神経節細胞軸索である可能性が高い。一方、端脳中央部に後方から伸びる軸索は起始部が本研究では良く分からなかった。今後、連続切片を系統的に染色し、三次元再構成することにより、起始部を明らかにできるはずである。

筆者は後期胚の中脳視蓋 SGC 中の大型投射ニューロンの前駆体候補である DTmesV ニューロンが GAP-43 陰性であることを発見した (Onodera et al., 2013)。GAP-43 は軸索伸長に重要であるとされているので (総説として Benowitz & Routtenberg, 1997)、これは予想外の発見であったが、GAP-43 と構造は異なるものの機能的に相同である CAP-23/Basp1 が (Frey et al., 2000)、DTmesV ニューロンで機能しているのかもしれない。あるいは、DTmesV ニューロンでは、GAP-43 が他の初期胚のニューロンと異なる翻訳後修飾をうけ、このため使用した抗 GAP-43 抗体で認識されなかったのかもしれない。

シャルコー・マリートゥース病 (CMT)、脆弱 X 症候群 (FXS)、脊髄性筋萎縮症 (SMA) といった幾つかの遺伝性神経疾患が、軸索性翻訳が損なわれることにより発症することが明らかになりつつある (Wallen & Antonellis, 2012; Bassell & Warren, 2008; Li et al., 2014)。高レベル軸索性 RNA の研究の進展は、前述した再生医療の発展に加え、そのような疾患の診断や予後、治療に大きな寄与をするであろう。