

論文の内容の要旨

論文題目 RNA 結合蛋白質 PTB の神経発生における機能解析

氏 名 柴 寄 孝 幸

背景) 神経系を構成し、その複雑な機能を担う神経細胞やグリア細胞の多くは胎生期に神経幹細胞(以下、NSC)から生み出される。神経発生過程においてNSCはそれらの細胞を適切な時期に、適切な数生み出すよう厳密に制御されている。これまでにNSCの性状に関して、basic helix-loop-helix (bHLH) 転写因子群による段階的な転写制御やDNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティクス制御が自己複製能や時期特異的な分化制御に重要であることが明らかにされている。一方でNSCマーカーとしても知られるMsh1や神経系での発現量が多いHuDなどのRNA結合蛋白質によるmRNAの翻訳制御、安定性制御や細胞内局在制御といった転写後調節がNSCの自己複製や分化制御において重要な役割を担うことが報告されている。さらに、転写後調節機構の1つである選択的スプライシングの役割も注目されつつある。選択的スプライシング制御は主に蛋白質の多様性を補償する機構であり、これまでは多様な種類が存在する分化後の神経細胞の機能発現制御を担う機構として注目され、神経細胞の生存、細胞移動、シグナル伝達などに関与することが報告されてきた。一方で近年、神経分化モデルである胚性癌細胞株P19細胞から神経細胞への分化に伴い多くの遺伝子の選択的スプライシングパターンが変化することが報告され、NSCの自己複製や分化制御においても選択的スプライシングが重要な役割を担っている可能性が示唆されている。

Polypyrimidine tract binding protein (PTB) はhnRNPファミリーに含まれるRNA結合蛋白質である。

これまでの研究により、PTBが標的RNAのポリピリミジン配列に結合し、mRNAの安定性、internal ribosome entry site (IRES)依存的翻訳、細胞内局在及び、選択的スプライシング等の制御に関わることが明らかにされている。また、当研究室において*Ptb*欠損マウスが作製され、PTBがマウスの初期発生に必須の因子であり、マウス胚性幹細胞の増殖や分化に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。PTBの発現は生体内において様々な組織で見られる。特に中枢神経系において、PTBは主にNSCに発現し、神経細胞への分化に伴ってその発現が減少するという興味深い発現様式を示す。また、神経芽腫細胞株N2A細胞においてPTBの発現を抑制すると、P19細胞の神経分化過程で見られる選択的スプライシングパターンの変化をおよそ25%再現できることから、PTBがNSCから神経細胞への分化過程で起こる選択的スプライシングの主な制御因子の1つであることが示唆されている。また、PTBの発現は脳室を満たす脳脊髄液の循環や代謝において中心的な役割を担う神経上皮細胞や脈絡叢の上皮細胞にも見られる。以上の知見から、PTBはNSCおよび神経発生に加え、脳組織の恒常性維持においても重要な役割を担うと考えられた。

目的) 本研究では神経幹細胞および神経発生におけるPTBの生理学的役割を解析することを目的とし、神経組織特異的なPTB欠損マウスを作製し、その表現型を解析した。

方法) NSCでCre組換え酵素を発現する *Nestin-Cre*、*Nestin-Cre^{ERT2}*、*Emx1-Cre* マウスの3つの異なるCreマウスを用いて組織特異的及び、時期特異的な *Ptb* 欠損マウスを作成、主に組織学的な解析手法によりその表現型解析を行った。また、PTB欠損によりNSCに生じた異常の分子メカニズムに迫るため、エクソンアレイを用いた網羅的解析を行った。生データの解析は統計処理ソフトRを用いて行い、PTB欠損神経幹細胞において発現量に変化しているエクソンを同定した。Gene Ontologyによりアノテーション解析を行い、生物学的な意味付けを行った。

結果・考察) *Ptb^{neo/floxed};Nestin-Cre*(*Ptb* cKO)マウスではPTBの発現はE14.5の脳皮質ではほぼ完全に発現が消失した。しかし、E14.5の脳皮質での分化マーカーの発現は *Ptb* cKOとControl(*Ptb^{+/floxed};Nestin-Cre*)との間で大きな差はなかった。この結果からPTB欠損が神経幹細胞および神経発生に与える影響が非常に小さい、もしくは全く影響がないという可能性が考えられた。そこで次に、神経発生過程の異常が蓄積し顕著化することが期待できることに加え、発生過程に影響がない場合には脳の恒常性維持におけるPTBの役割を解析できると考え、生後マウスの解析を行った。その結果、およそ90%(19/22)の *Ptb* cKOマウスが生後10週までに死亡することが明らかとなった。そこで、生後3週マウスの脳を組織学的に解析した結果、*Ptb* cKOマウスでは脳室が異常に拡張しており、*Ptb* cKOマウスの早死の原因が水頭症であることが強く示唆された。

水頭症の主な原因である脳室狭窄部の閉塞は *Ptb* cKOマウスには見られなかったが、脳脊髄液の循環に関わる運動性繊毛をもった神経上皮細胞が側脳室背側領域特異的に欠損していることが明らかとな

った。そこで、*Ptb* cKO マウスにおいてこの領域特異的な異常が水頭症の原因であるのかを確かめるために、側脳室背側領域特異的に Cre 組換え酵素を発現する *Emx1-Cre* マウスを用いて *Ptb^{neo/floxed}; Emx1-Cre* マウスを作製し、その表現型を解析した。その結果、生後 10 日 (P10) の *Ptb^{neo/floxed}; Emx1-Cre* マウスの側脳室背側領域においても *Ptb* cKO マウスと同様に神経上皮細胞が欠損しており、側脳室が異常に拡張し、水頭症様の表現型を呈していることがわかった。この結果から *Ptb* cKO マウスは側脳室背側領域の異常により水頭症を発症していることが示唆された。

次に PTB の欠損により神経上皮細胞が欠損する機構を明らかにするため、まず PTB が神経上皮細胞の成熟や生存に必須であるかどうか検討した。そのために時期特異的に組換え誘導可能な *Nestin-Cre^{ERT2}* マウスを用いて *Ptb^{neo/floxed}; Nestin-Cre^{ERT2}* を作製した。P0 の時点で PTB の発現を消失させるためにタモキシフェンを E16.5 で投与した。P0 の時点で PTB の発現は消失していたが、P10 では Control (*Ptb^{+/floxed}; Nestin^{ERT2}-Cre*) と同様に *Ptb^{neo/floxed}; Nestin-Cre^{ERT2}* マウスの側脳室背側領域においても神経上皮細胞が観察された。この結果から PTB は神経上皮細胞の成熟や生存に必須でないことが明らかとなった。

そこで PTB 欠損 NSC において何らかの異常が生じている可能性を検討するため、E14.5 以降の *Ptb* cKO マウス胎仔脳の側脳室背側領域を詳細に解析した。その結果、接着結合が E14.5 から徐々に消失し始めることが明らかとなった。また、E16.5 胎仔脳を解析した結果、接着結合が消失した領域では NSC からの神経分化が亢進していることが明らかとなった。さらに E18.5 胎仔脳を観察した結果、*Ptb* cKO マウスでは側脳室背側領域の NSC が著しく減少していることが確認された。これらの結果から接着結合の消失により、胎生後期に NSC が枯渇し、神経上皮細胞へ分化できなくなっていることが示唆され、この接着結合の消失が水頭症発症の原因であると考えられた (図 1)。

次に PTB 欠損により接着結合が消失する分子メカニズムを明らかにするためにエクソンアレイ解析を行い、PTB の標的遺伝子の網羅的な探索を試みた。その結果、487 個のエクソンで有意な変化 ($P < 0.05$) が検出された。また、それら有意な変化が見られたエクソンを持つ遺伝子について Gene Ontology によるアノテーション解析を行ったところ、biological process の GO term の上位には「actin filament-based process」、「cytoskeleton organization」、「cell adhesion」、「biological adhesion」がランクされ、そこには *Celser2*、*Cdh17*、*Ctnn11*、*Prkci* 等の接着結合の制御に直接または間接的に関与する遺伝子が多く含まれていることが明らかとなった。

結論) PTB は胎生期神経幹細胞の接着結合の維持に必要である。また、PTB は神経幹細胞において、接着結合関連因子の選択的スプライシング制御を介して接着結合維持に貢献している可能性がある。

展望) 本研究ではこれまで未解明であった RNA 結合蛋白質 PTB の神経発生における生理学的役割を明らかにした。また、PTB の解析を通して、NSC における選択的スプライシング制御の生理学的な役割の一端を明らかにした。本研究では解析できていない NSC からアストロサイトやオリゴデンドロサイトと

いったグリア系の細胞への分化における PTB の役割の解析が今後の課題である。また、神経系以外の多くの組織においても PTB が発現していることや接着結合が造血幹細胞等のいくつかの組織幹細胞の維持に関与することから、今後、他の組織幹細胞において PTB の機能解析が展開されていくことが期待される。

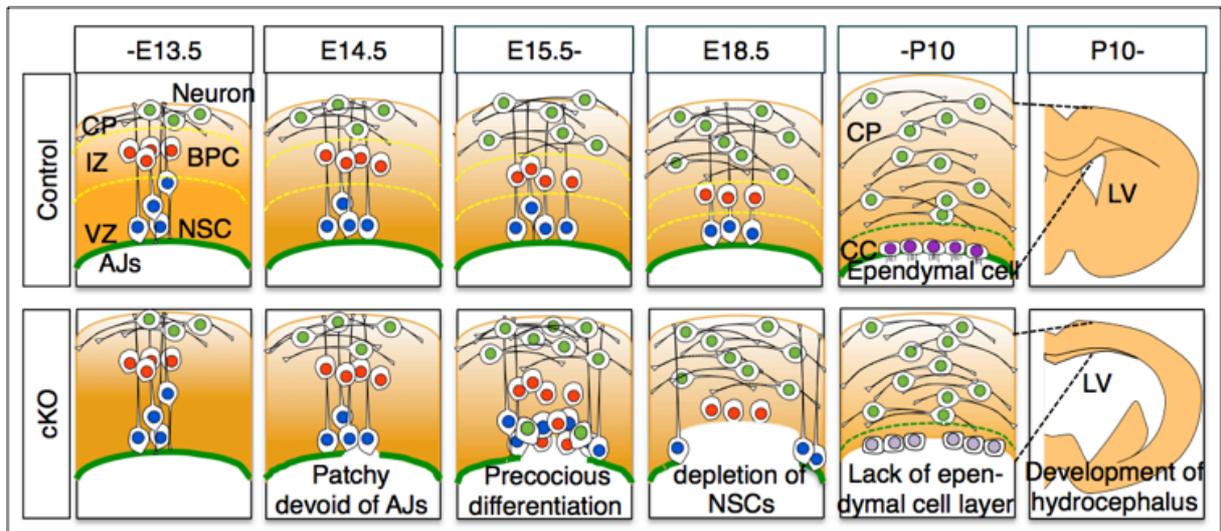


図1 *Ptb* cKO マウスにおける水頭症発症モデル

本研究により得られた結果から考えられる *Ptb* cKO マウスにおける水頭症発症機構。大脳皮質背側領域における接着結合の消失から早熟な神経分化、早期の NSC 枯渇、神経上皮細胞 (Ependymal cell) の欠損を経て水頭症が発症すると考えられる。CP:皮質板、IZ:中間帯、VZ:脳室帯は大脳皮質における層の名称、Neuron:神経細胞、BPC:神経前駆細胞、AJs:接着結合、CC:脳梁、LV:側脳室。