

受賞者

榎本 和生

国立遺伝学研究所 新分野創造センター 神経形態研究部門

研究テーマ

ニューロン樹状突起構造のエピジェネティック制御機構

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

ニューロンは、軸索と樹状突起という機能・構造的に異なる2つの神経突起を介して情報の受け渡しを行なっている。神経突起を介したニューロン間の配線は、発生・成長の過程で構築され、知覚や思考の構造基盤となる。従って、一度作り上げられると、大まかな配線は変化しない。一方、ダウン症候群など特定の精神遅滞疾患では、成長に伴って樹状突起が部分的な退縮を起こすことから、樹状突起の領域を積極的に維持・管理するメカニズムの存在が想定されていた。申請者は、ショウジョウバエ神経系をモデルとした解析から、従来は癌抑制因子として同定・解析されてきたリン酸化酵素ワルツが、神経系においては、形成された樹状突起の維持という全く異なる機能を持つ事を明らかにした (Cell 2004; Nature 2006)。さらに最近、ワルツ・キナーゼと機能的な相互作用を示す因子として、ポリコーム転写制御因子群(PcG)を同定した (Genes Dev. 2007)。PcGはヒストンのメチル化修飾を介して遺伝子発現を負に制御するエピジェネティック制御因子であり、脳神経系では神経前駆体細胞からのニューロン分化制御に関与する可能性が指摘されているが、樹状突起の維持機能については全く知られていない。本研究では、樹状突起維持におけるPcGの作動メカニズムを解明するとともに、エピジェネティック制御異常と精神遅滞疾患発症との関連を細胞・分子レベルで明らかにすることを目指した。

2. 方法

[1] ワルツ・キナーゼとポリコームの機能相関の解明

ポリコーム変異体では、樹状突起の維持に顕著な異常が観察されるが、この表現型はワルツ・キナーゼ変異体と非常に近い。実際、申請者が行なった遺伝学的解析では、両者が同一シグナル伝達経路にマップされており、また免疫沈殿法を用いた生化学的解析から、両者がニューロン内において複合体を形成していることが分かっている。本研究では、主として生化学的手法を用いて、ワルツ・キナーゼとPcGとの機能相関を明らかにすることを目指した。これまでに、PcGのヒストン・メチル化活性は、リン酸化によって制御されている可能性が示唆されており、ワルツ・キナーゼがPcGのリン酸化を担っている可能性が考えられる。そこで、それぞれのリコンビナント蛋白質を別途調整し、in vitro アッセイ系を用いて、ワルツ・キナーゼによるPcGのリン酸化に与える影響を解析した。

[2] ニューロンにおけるポリコーム標的遺伝子の同定：誘導型RNAiライブラリーを用いた解析

最近、PcGにより転写制御を受ける標的候補として約200遺伝子が報告されたが、個々の機能は十分に解析されておらず、またニューロンにおける主要標的遺伝子も不明である。本研究では、ショウジョウバエの誘導型RNAiシステムを用いて、ニューロンにおけるPcGの標的遺伝子を同定することを目指した。誘導型RNAiとは、個々の遺伝子に対するRNAiコンストラクトを組み込んだショウジョウバエ系統のことであり、Gal4/UASシステムと併用することにより、時期および細胞特異的に特定の遺伝子

の機能を抑制することが可能となる。具体的には、各々のPcG標的候補遺伝子に対応するRNAiコンストラクトを、一部のニューロン (post-mitotic neuron) 特異的に発現させて、樹状突起維持に対する影響を解析した。

3. 結果 研究成果

【1】 ワルツ・キナーゼとポリコームの機能相関の解明

ポリコーム複合体を形成する因子群のリコンビナント・タンパク質を基質として、試験管内においてワルツ・キナーゼによるリン酸化実験を行った。用いたワルツ・キナーゼは、C末端にFLAGタグを付加したものを培養細胞に高発現し、その抽出液から抗FLAG抗体樹脂を用いて精製した。平行して、ネガティブ・コントロールとして、キナーゼ活性中心のリジンをアラニンに変換して不活性化したワルツ・キナーゼを同様に精製し用いた。その結果、ポリコーム複合体1 (PRC1) の主要構成因子の1つであるESCタンパク質が、ワルツ・キナーゼにより効率良くリン酸化される事を見出した。現在、このリン酸化の生理的意義を明らかにする為に、マスペクトル解析によるリン酸化部位の同定、およびリン酸化部位を認識する抗体の作製を目指している。

【2】 ニューロンにおけるポリコーム標的遺伝子の同定：誘導型RNAiライブラリーを用いた解析

これまでに、一部のポリコームの標的候補因子を含む約1,000遺伝子についてRNAi解析を終了した。その結果、これまでスクリーニングしたポリコーム標的候補因子のノックダウンでは、樹状突起の維持異常は見られていない。しかし、複数のアンキリン・リピートを含むタンパク質MASKのRNAiノックダウンにより、顕著な樹状突起の維持異常を見出した。この表現型はポリコーム変異体と非常に近く、何らかの機能相関が期待される。MASKは、線虫からヒトまで高度に保存されたタンパク質であり、EGFシグナルとの関連が示唆されているが、具体的な機能は不明な点が多い。現在、MASK遺伝子を欠損した変異体の解析、およびポリコーム変異体との機能相関を解析している。

4. 考察 まとめ

本研究から、ニューロン樹状突起のエピジェネティック制御機構の一端を示す手がかりが得られた。ポリコーム制御因子群の制御メカニズムに関しては、これまでにほとんど知見が無い。今回、私達が得た結果は、ワルツ・キナーゼがESCのリン酸化を介して、メチル化活性もしくはヒストンとの結合を制御している可能性を示唆している。今後、リン酸化の意義について解析を行う必要がある。一方、樹状突起の維持/安定化を制御する新たな分子MASKを同定する事に成功した。MASKは、タンパク質相互作用に関与するアンキリン・リピートを複数持つ事から、スカフォールド (足場) タンパク質として機能すると考えられている。今後、分子生物学的な解析を行う事により、樹状突起の安定化機構における機能を明らかにしたい。これらの仮説を更に検証することにより、将来的に精神遅滞疾患の予防や治療に貢献する基礎データやモデル・システムを提供出来ると考えている。

5. 発表論文、参考文献

1. 榎本和生:「神経突起のパターン形成」特集：神経系の発生とその異常
BRAIN and NERVE 60: 351-364 (2008).

2. 金森崇浩・榎本和生：「脂質代謝物による細胞分裂制御」

ファルマシア 44 : 1157-1160 (2008).

3. 榎本和生：「生体膜リン脂質のダイナミクスを制御する分子機構」(平成18年度日本生化学会奨励賞受賞論文)

生化学80 : 811-819 (2008).