

# 神経前駆細胞の栄養状態に応答した再活性化機構の解明

東京大学大学院 薬学系研究科 生理化学教室  
福山 征光

## 1. 目的

幹・前駆細胞の栄養状態に応答した自己複製や分化の頻度の調節は、個体の健全な成長や組織恒常性維持の細胞生物学的基盤をなし、その破綻は幹細胞プールの涸渇や腫瘍形成といった病態を導くと予想される。しかしながら、栄養応答が認められている幹・前駆細胞の分子基盤に関しては、インスリン/IGF シグナリング(以下、IIS)経路や Target of Rapamycin Complex 1 (TORC1)経路といった既知の栄養シグナル経路の関与をのぞいて不明な点が多い。申請者らは、*C. エレガンス* (以下、線虫)において、孵化直後の休眠状態にある幹・前駆細胞が、餌の投与によって同調的に分裂や分化を開始できる点に着目し、がん遺伝子あるいは oncomir と提唱されているヒト miR-17-92 クラスターの構成因子である microRNA(miRNA) miR-92 の線虫オルソログ miR-235 が、飢餓条件下では発現が亢進し、神経前駆細胞の再活性化を抑制すること、摂食に応答して IIS 経路依存的に miR-235 の発現が抑制されることを報告した (Kasuga et al., 2013)。しかしながら、表皮やグリアが miR-235 を介して、どのようなメカニズムで神経前駆細胞の再活性化を抑制しているか不明である。一般に miRNA は、その相補配列を 3' Untranslated Region (UTR) 上にもつ標的遺伝子の mRNA の発現を抑制する。申請者らは、miR-235 標的遺伝子として、ヒト GCNF の線虫オルソログである核内受容体 *nhr-91* が、*mir-235* 変異体における飢餓時での神経前駆細胞の活性化に関与することを報告したが (Kasuga et al., 2013)、*nhr-91* の強制発現や機能阻害実験の予備データより、他の miR-235 標的遺伝子の発現量が *nhr-91* とともに *mir-235* 変異体において増加し、神経前駆細胞の活性化を促進していると推測している。そこで本申請研究では、*nhr-91* 以外の miR-235 の標的遺伝子群を同定し、その機能解析を進めることで、神経前駆細胞の栄養状態に連動した再活性化機構を解明することを目指した。

## 2. 方法

Targetscan (Garcia et al., 2011) や PicTar (Lall et al., 2006) といったアルゴリズムで miR-235 の標的遺伝子として予測される *nhr-91* 以外の遺伝子群の中で発生の進行を制御すると考えられる転写因子や成長因子などに着目し、飢餓条件下において、野生型より *mir-235* 変異体において、発現が上昇しているものを qRT-PCR により探索した。そして、絞り込まれた遺伝子 (*grl-5* と *grl-7*) を、表皮組織にて強い活性を有する *dpy-7* 遺伝子のプロモーターの下流に融合させたプラスミドを作製し、野生型線虫に形質転換し、飢餓条件下にも関わらず神経前駆細胞が活性化されるか微分干渉顕微鏡下で検討した。このようなアッセイ系で顕著な神経前駆細胞活性化能を示した *grl-7* 遺伝子に関して、飢餓条件下で孵化させて発生停止させた後に摂食させることにより同調培養した線虫から経時的に total RNA を調整し、摂食による発現誘導を qRT-PCR によって解析した。また、*grl-7* プロモーターに *mcherry* 遺伝子および *grl-7* 蛋白質コード領域と *venus* 遺伝子をそれぞれ融合させた発現レポーター遺伝子を作製し、前者にて *grl-7* 遺伝子の発現組織を、後者にて GRL-7 蛋白質の局在を調べた。また、*grl-7* が miR-235 の標的遺伝子であるか検討するために、miR-235 結合サイトを持つ *grl-7* mRNA の 3' UTR コード領域を *gfp* (green fluorescent protein) cDNA の下流に融合したレポーター遺伝子を作製し、*dpy-7* プロモーター下流に *mir-235* を融合させたプラスミドと共に形質転換した。*grl-7* mRNA の 3' UTR コード領域の miR-235 結合サイトに点変異を導入したレポーター遺伝子も同様に miR-235 発現ベクターと共に形質転換し、GFP 発現量の比較をおこなうことにより、miR-235 結合サイトが GFP 蛋白質の発現抑制に寄与するか検討した。また、各種 *patched* (*ptc*) や *ptchd* (*ptr*) 変異体はミネソタ大学にある CGC (線虫のストックセンター) より取り寄せた。

## 3. 結果

Targetscan などのアルゴリズムで miR-235 標的遺伝子として予測される 42 遺伝子群に関して、飢餓条件下においた野生型と *mir-235* null 変異体の 1 齢幼虫における発現量を qRT-PCR 法により比較した。その結果、*hedgehog* 関連遺伝子をコードする 2 つの遺伝子、*grl-5* と *grl-7* が、*mir-235* 変異体で野生

型と比較すると顕著に発現亢進していることが認められた。両遺伝子は、miR-235の発現組織である表皮で発現することが報告されていたことから(Hao et al., 2006)、miR-235の標的遺伝子の有力な候補であることが支持された。そこで、表皮特異的な*dpy-7*遺伝子のプロモーターを用いて、*grl-5*と*grl-7*をそれぞれ飢餓条件下で野生型線虫にて強制発現したところ、*grl-7*を発現している虫で神経前駆細胞の活性化が認められた。また、*venus*遺伝子を*grl-7*遺伝子のプロモーターと蛋白質コード領域下流に融合させたレポーター遺伝子を作製し、その発現パターンを解析したところ、摂食によって顕著に表皮における発現が亢進し、表皮細胞外のアピカル側に局在が認められたことから、GRL-7蛋白質も他の動物のHEDGEHOG蛋白質と同様に細胞外へと分泌されることが示唆された。さらに、*grl-7*の内在転写産物の発現も上述したレポーター遺伝子と同様に、摂食によって誘導されることがqRT-PCRによる解析を用いて見出したことから、*grl-7*とmiR-235は、お互いに逆相関する発現パターンを示すことが示された。そこで、miR-235結合サイトをもつ*grl-7*mRNAの3' UTRを*gfp*遺伝子の下流に融合させたレポーター遺伝子を作製し、miR-235結合サイトに変異を導入したレポーター遺伝子とのmiR-235過剰発現による発現抑制効果を検討した。その結果、野生型miR-235結合サイトをもつレポーター遺伝子のGFP発現が、miR-235が結合できないと考えられる変異型miR-235結合サイトをもつレポーター遺伝子のGFP発現と比較して顕著に抑制されることを見いだした。これらの以上の結果より、*grl-7*遺伝子はmiR-235の標的遺伝子の1つであり、飢餓条件下ではmiR-235の発現亢進により*grl-7*の発現が抑制され、摂食によってmiR-235の発現が低下すると、*grl-7*の発現が亢進し、神経前駆細胞の活性化が促進されることが示唆された。

では、表皮から分泌されたGRL-7蛋白質は、神経前駆細胞に直接作用するのであろうか。それとも、神経前駆細胞とは異なる組織や細胞に作用するのであろうか。上述したように*grl-7*はHEDGEHOG関連因子をコードする。線虫もヒトやショウジョウバエなどと同様にHEDGEHOGの受容体であるPATCHEDを持つ。また、PATCHEDに類似した一次構造を持つPATCHED DOMAIN CONTAINING PROTEIN (PTCHD)/PATCHED-RELATED PROTEIN (PTR)とよばれる蛋白質も、線虫からヒトまで保存されている(Zugasti et al., 2005)。PTCHDの生理機能はマウスやショウジョウバエでも不明な点が多いものの、マウス培養細胞を用いた実験により、hedgehogシグナル伝達経路の関与が示唆されている(Noor et al., 2010)。哺乳動物やショウジョウバエではHEDGEHOGが受容体であるPATCHEDに結合し、PATCHEDの活性を抑制すると考えられていることから、GRL-7の受容体の機能阻害は、*grl-7*の過剰発現と同様に飢餓条件下でも神経前駆細胞が休眠状態を維持できずに活性化させることが推測できる。そこで、*patched*あるいは*ptchd*欠失変異体を飢餓条件下において神経前駆細胞を観察したところ、*patched*変異体では神経前駆細胞は休眠状態を維持されるのに対し、複数の*ptchd*変異体で神経前駆細胞の異常活性化が認められた。そこで、これら神経前駆細胞群の休眠維持に必須であると考えられる*ptchd*遺伝子群のプロモーター下流に*gfp-pest*を融合させたレポーター遺伝子を作製したところ、神経前駆細胞で顕著に発現亢進を示すものを1つ見出した。よって、摂食に応答して表皮から分泌されたGRL-7は、神経前駆細胞群にPTCHDを介して直接作用し、それらの活性化を促進する可能性が示唆された。

#### 4. まとめと考察

本研究にて、IIS経路とmiR-235によって摂食状態を感知した表皮から神経前駆細胞へ活性化を制御する組織間シグナル伝達機構の実体がHEDGEHOG-PTCHDである可能性を見出した。今後このモデルの正当性を評価するべく*ptchd*変異体の救助実験、GRL-7とPTCHDの物理的結合や遺伝学的相互作用などを検討する必要がある。哺乳動物やショウジョウバエなどでは、HEDGEHOGがPATCHEDに結合することによって、SMOOTHENEDが下流へシグナルを伝達するモデルが確立されているが、線虫はSMOOTHENEDオルソログをコードする遺伝子を持っていないことが定説となっている。一方、近年では、哺乳動物においてもPATCHEDの下流でSMOOTHENEDを介さないnoncanonicalなhedgehog経路の存在が示唆されており(Chinchilla et al., 2010)、線虫や哺乳動物のPTCHDもcanonicalなhedgehog経路とは異なる下流シグナル伝達経路を制御する可能性がある。X染色体上の*ptchd1*遺伝子のコピー数多型が、家族性の自閉症や知的障害と関連することがここ数年の間に相次いで報告された(Marshall et al., 2008; Pinto et al., 2010; Whibley et al., 2010; Noor et al., 2010; Ghahramani Seno et al., 2011; Filges et al., 2011; Carter et al., 2011; Chaudhry et al., 2014)。しかながら、ショウジョウバエや哺乳動物におけるPTCHDの生理機能は現在でもほとんど分かっていない。歴史的にショウジョウバエを用いた遺伝学的解析がhedgehog経路研究の先鞭をつけた経緯を考えると、今後、線虫の神経前駆細胞における*ptchd*の介する遺伝学的経路を明らかにすることで、高等動物におけるPTCHDの関与するシグナル伝達経路やその生理機能、ひいてはその破綻により生ずる病態の発症や進展のメカニズムの理解に貢献することが期待できる。

## 5. 参考文献

- Carter et al., Clin Genet. 2011;80:435-443.
- Chaudhry et al., Clin Genet. 2014;doi: 10.1111/cge.12482. [Epub ahead of print]
- Chinchilla et al., Cell Cycle. 2010 Feb 1;9(3):570-579.
- Filges et al., Clin Genet. 2011;79:79-85.
- Garcia et al., Nat Struct Mol Biol. 2011;18:1139-1146.
- Ghahramani Seno et al., Brain Res. 2011;1380:85-97.
- Hao et al., BMC Genomics 2006;7:280.
- Kasuga et al., Nature 2013;497:503-506.
- Lall et al., Curr Biol. 2006;16:460-471.
- Marshall et al., Am. J. Hum. Genet. 2008;82:477-488.
- Noor et al., Sci. Trans. Med. 2010;2:49ra68.
- Pinto et al., Nature. 2010;466:368-372.
- Whibley et al., Am J Hum Genet. 2010;87:173-188.
- Willsey & State, Curr. Opin. Neurobiol. 2015;30:92-99.
- Zugasti et al., Genome Res. 2005;15:1402-1410.