

RNA代謝異常による選択的神経細胞死誘導機構の解明

大阪大学大学院医学系研究科神経遺伝子学教室

河原 行郎

1. はじめに

神経変性疾患は、高齢化社会の到来により今後益々患者数が増加すると考えられ、病態解明と治療法確立が社会的に強く望まれている。近年の技術革新により運動神経細胞が変性する筋萎縮性側索硬化症(ALS)や小脳・脊髄の細胞が変性する脊髄小脳変性症(SCD)などの神経変性疾患では、TDP-43、FUS、Ataxin-2などの複数のRNA結合タンパク質(RBP)に遺伝子変異が同定され、RBPの機能喪失・障害によるRNA代謝障害が発症に関与していることが分かってきた(Ling et al, Neuron, 2013; Castello et al, Trends Genet, 2013)。申請者もTDP-43やAtaxin-2の機能喪失がRNA代謝障害を介して神経変性を誘導することを示してきた(Kawahara et al, PNAS, 2012; Yokoshi et al, Mol Cell, 2014; Li et al, Nat Commun, 2015)。しかし、これらのRBPは脳脊髄組織を含めた全身に幅広く分布しており、なぜ特定の神経細胞だけが選択的に変性するのか長年に渡って未解明である。これには、個々の神経細胞の特徴を、RNA発現プロファイルの観点から明らかにすることが不可欠である。

これまで脳脊髄組織から特定の神経細胞を分離するに当たっては、レーザーマイクロディセクション(LMD)法や蛍光標識した細胞のソーティング(FACS)法などが用いられてきた。LMD法では回収できる細胞数に限りがあり、自身の経験上も細胞を回収するまでに時間を要するためRNAの分解が不可避である(Kawahara et al, Nature, 2004)。FACS法も結合組織の多い神経細胞を単一細胞にするには限界があり、分画するまでの間にRNAの発現プロファイルが変化するリスクを伴う。また、両者とも細胞体は回収できても軸索・シナプスなどに分布するRNAは失ってしまうが、こういった細胞体外に局在するRNAが重要だという報告もある(Alami et al, Neuron, 2014)。そこで、これらの問題点を克服するため、あらかじめ生体内で特定の神経細胞に発現するRNAを標識し、解剖学的に細胞を分離する必要性をなくせばよいのではないかと着想した。これによって、RNA回収までの煩雑なステップがなくなり、質の劣化が軽減できる上に、細胞体だけでなく、軸索やシナプスに分布するRNAも回収可能となることが期待された。このRNA標識法はTU-tagging法と呼ばれ(Gay et al, Genes Dev, 2013)、これまでに血管内皮細胞で有効であることが示されている。しかし、脳を標的とした有用性については不明であった。

そこで本研究では、将来的に経時的なRNA発現の変動を解析することで神経変性に連動する特徴的なRNAを同定し、選択的神経細胞死のメカニズムを解明することを目指して、脳を標的としたTU-tagging法を確立し、各神経細胞に発現するRNAの特徴を明らかにすることを本研究の目的とした。

2. 方法

TU-tagging法では、4-SUをウリジンの代わりにRNAに取り込ませ、4-SUを取り込んだRNAをビオチン化修飾することで標識したRNAだけを回収する(図1)。特定の神経細胞に発現するRNAだけを標識するには、その細胞にだけ4-SUが存在する必要があるが、これには4-TUを4-SUに変換する哺乳類には存在しないuracil phosphoribosyltransferase(UPRT)酵素を、Cre-loxPシステムを使ってマウス特定の神経細胞に発現させる(図1)。具体的には、原生生物*Toxoplasma gondii*由来のUPRT遺伝子上流部分をloxP配列で挟み込んだUPRT Tgマウス(Gay et al, Genes Dev, 2013; Nat Protocols, 2014)と、各神経細胞特異的にCreを発現するTgマウスを交配し、特定の神経細胞でのみUPRTを発現させる(図2)。このマウスの腹腔に4-TU溶液を注射すると、UPRTを発現する神経細胞でのみ4-SUに変換される(図1)。4-SUには特に毒性はなく、また転写にも影響しないことが知られている(Duffy et al, Mol Cell, 2015)。4-SUのチオール基がビオチン化修飾できることを利用し、4-SUを取り込んだRNAだけを回収する(図1)。

本研究では、まずUPRT Tgマウスを、全神経細胞でCreリコンビナーゼを発現するNestin-Creマウスと交配し、ラベル化RNAを回収した。ビオチ

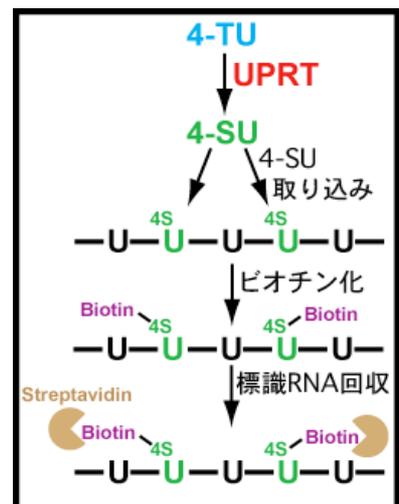


図1. 細胞特異的 RNA 標識と回収法。

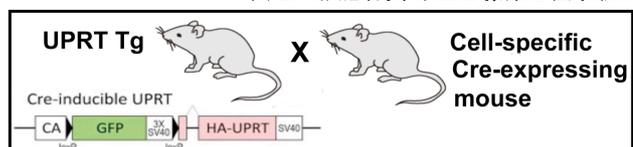


図2. 各神経細胞特異的 UPRT 発現マウスの作成法。

チン化修飾後、ドットプロット法によって、ビオチン化RNAの回収効率を評価した。次に、小脳プルキンエ細胞とアストロサイトで、それぞれCreリコンビナーゼを選択的に発現するPcp2-CreマウスおよびGfap-Creマウスと交配し、TU-tagging法を実施した。各マウスの小脳からRNAを回収した後、RNA-seqを実施し、発現プロファイルを解析した。コントロールとして、非ラベル化マウス（野生型）の小脳を用いた。

3. 結果

はじめに、UPRT Tgマウスを、全神経細胞でCreリコンビナーゼを発現するNestin-Creマウスと交配し、神経細胞全体にUPRTを発現させた。本Nestin-UPRTマウスに、DMSOとコーン油に溶解した4-TU (50 mg/ml) を腹腔に投与し (450mg/Kg体重)、6時間後に安楽死させ全脳を抽出した。複数回投与も検討したが、動物への負荷が高いので、最終的には、投与量、時間などは先行プロトコルに従った (Gay et al, Nat Protocols, 2014)。全脳からtotal RNAをTrizol Reagent (Thermo Fischer)を用いて抽出し、Biotin-MTSEA (Biotium)を用いてビオチン化修飾した。これをニトロセルロースメンブレンにドット状に滴下し、抗ビオチン化抗体を用いたドットプロット法によって、ビオチン化RNAの回収効率を評価した。その結果、Nestin-UPRTマウスに4-TUを投与した場合に、強いビオチン化シグナルが確認できた (図3)。脳特異的にUPRTが発現しているため、同マウスの肝臓からはシグナルを確認できなかった。また、UPRT Tgマウスや野生型マウスに4-TUを投与した場合も、ビオチン化シグナルは確認できなかった (図3)。以上の結果から、腹腔に投与した4-TUは脳血管関門を通過し、脳内のUPRTを発現した細胞内で4-TUへと置換され、RNAに取り込まれていることが確認できた。

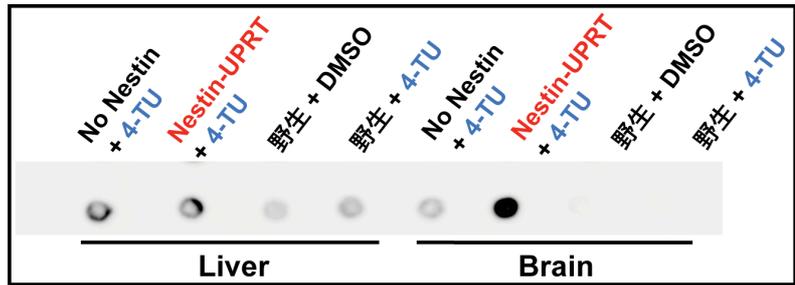


図3. 神経細胞特異的 RNA 標識のドットプロット解析。

次に、最初のモデルとして小脳プルキンエ細胞を選択し、ラベルしていない小脳の発現プロファイルと比較し、TU-tagging法を用いることで小脳プルキンエ細胞由来のRNAを濃縮できるかどうかを検証することとした。比較対照として、アストロサイトを選択し、グリア細胞の特徴を抽出できるのかも検証することとした。具体的には、UPRT Tgマウスを、Pcp2-Creマウスと交配し、小脳プルキンエ細胞にUPRTを発現するマウスを作成した (図4)。UPRT Tgマウスでは、すべての細胞でGFPの発現が確認できる。一方、Pcp2-UPRTマウスでは、プルキンエ細胞のみGFPのシグナルが検出されず、HAタグの発現が確認できることから、プルキンエ細胞特異的にUPRTが発現していることが確認できた (図2, 4)。同様に、UPRT Tgマウスを、Gfap-Creマウスと交配し、全脳アストロサイトにUPRTを発現するマウスも作成した。これらのマウスにおいて、確立したTU-tagging法に従って、4-TUを腹腔に投与し、6時間後に安楽死させ小脳を抽出した。その後、各小脳からtotal RNAをTrizol Reagent (Thermo Fischer)を用いて抽出し、Biotin-MTSEA (Biotium)を用いてビオチン化修飾した。更更に、ビオチン化RNAをμ Macs streptavidin streptavidin kit (Miltenyi Biotec)を用いて回収し、リボソームRNA (rRNA)を除去した後RNA-seq解析を行った。同時に、ラベルしていない野生型マウス的小脳からもtotal RNAを回収し、rRNAを除去した後RNA-seq解析を行った。

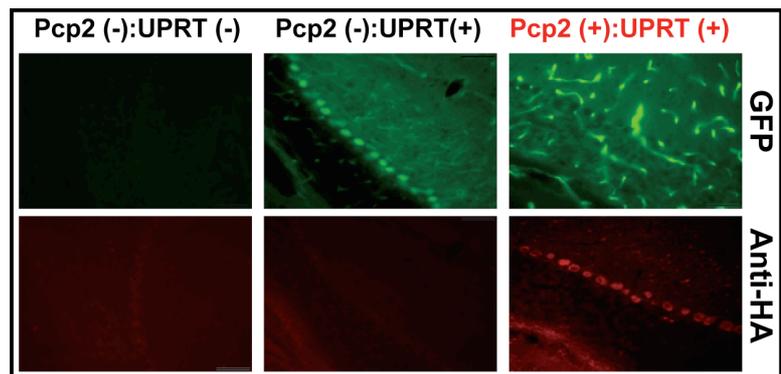


図4. Pcp2-UPRT マウスの小脳プルキンエ細胞におけるUPRT発現。

RNA-seq後のデータを解析した結果を図5に示す。プルキンエ細胞に高発現するトップ100遺伝子 (左)と、アストロサイトに高発現するトップ100遺伝子 (右)のヒートマップを掲載した。

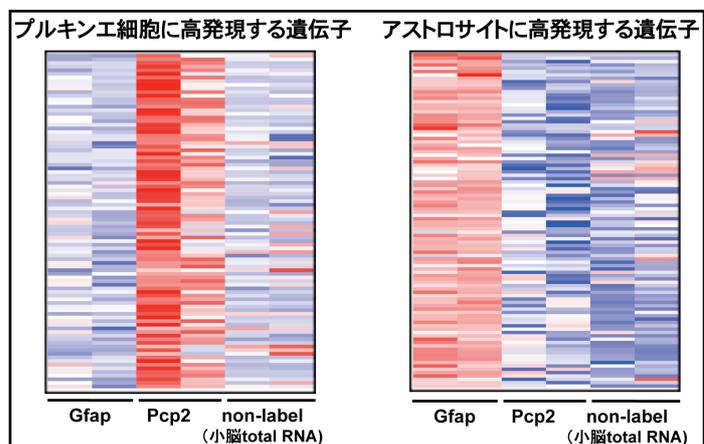


図5. 小脳プルキンエ細胞とアストロサイトに高発現する遺伝子のヒートマップ。

今回は各群2サンプルで実施したが、同じサンプル間での発現傾向は相関性が高く、再現性は高いことが確認できた。また、プルキンエ細胞に高発現している遺伝子はアストロサイトでの発現は低く、またアストロサイトで高発現している遺伝子は、プルキンエ細胞では低発現の傾向が見て取れる。また、ラベルしていないRNAの場合には、その混合型となっており、様々な細胞の集合体としての発現プロファイルを反映しているものと考えられる。プルキンエ細胞高発現遺伝子の中には、プルキンエ細胞マーカーとされる遺伝子も含まれており、ある程度手法の妥当性は検証できたものと考えられた。

4. 考察

RBPの遺伝子変異は神経系に症状が出やすいことが知られており、ALS、SCA2や前頭側頭葉変性症(FTLD)など多数知られている (Castello et al, Trends Genet, 2013)。このため、神経細胞はRBPの機能障害に特に脆弱だと考えられるが、多くの神経変性疾患では変性しやすい神経細胞とそうでない細胞とがある。一方で、ALSにおけるTDP-43のように、鍵を握るRBPは幅広い組織に発現しているケースが多い。このため、各神経細胞をRNA発現プロファイルから特徴付けることは、選択的神経細胞死の機構を解明するための重要な基盤情報となる。しかし、個体から特定の神経細胞だけを抽出することは技術的にハードルが高い。そこで本研究では、あらかじめ生体内で特定の神経細胞に発現するRNAを標識し、解剖学的に細胞を分離する必要性をなくすことで、RNAの発現パターンに影響することなく迅速に高品質なRNAを抽出するTU-tagging法の確立を目指した。本研究を通して、腹腔から投与した4-TUが神経細胞内で4-SUに変換され、RNAに取りこまれることが確認できた。また、確立したTU-tagging法を使って、小脳プルキンエ細胞など各神経細胞由来のRNAを濃縮できることも確認できた。

一方で、オリジナルのプロトコールのままではいくつかの問題があることも分かってきた。まずは、脳内に存在している数の少ない神経細胞を標的とした場合、ラベルされるRNAも少なくなるので、回収率が低下する点である。ラベルされたRNAが大量に存在するサンプルでは、非特異的RNAの混入は無視できるが、ラベルされたRNAが少量になるほど、非特異的に混入するRNAとの識別が困難になる。また、もう一つの問題は、神経細胞にはリボソームが大量に存在しているため、ラベルがrRNAに偏りやすい点である。このため、RNA-seq前にrRNAを除去しているが、実際に得られたデータを解析してみるとrRNAが相当量残存していることも明らかとなった。このため、プロトコールの大幅な改変が必要と思われる。まずは、polyA RNAを精製し、rRNAを除去してからビオチン化修飾されたRNAを回収するようにステップの変更を検討している。また、ラベルされたRNAが少量でも特異性が確認できるようにプロトコールの改良を現在進めている。これらの改良プロトコールが確立されてから、改めて各神経細胞由来のRNAの発現プロファイルを解析する予定である。更に、in situ hybridization (ISH)法によって、結果の検証も進める予定である。その後、まずは脊髄小脳変性症モデルマウスを使って、変性に伴う経時的なプルキンエ細胞内でのRNA発現の変動を解析することで神経変性に連動する特徴的なRNAを同定し、選択的神経細胞死のメカニズムを解明することを予定している。本研究の成果が選択的神経細胞死の解明に向けた突破口となれば、将来的に、他のRBPに起因する疾患はもとより、幅広い疾患研究への応用が期待できる。

最後に、本研究をご支援いただきましたアステラス病態代謝研究会にあらためて深謝いたします。

5. 参考文献

Gay L, Miller MR, Venture PB, Devasthali V, Vue Z, Thompson HL, Temple S, Zong H, Cleary MD, Stankunas K, Doe CQ. Mouse TU tagging: a chemical/genetic intersectional method for purifying cell-type-specific nascent RNA. *Genes & Development*, 27(1); 98-115, 2013.

Uemura Y, Oshima T, Yamamoto M, Reyes CJ, Costa Cruz PH, Shibuya T, Kawahara Y. Matrin3 binds directly to intronic pyrimidine-rich sequences and controls alternative splicing. *Genes to Cells*, 22(9); 785-798, 2017.