

mRNA 輸送と学習記憶・精神神経疾患を繋ぐ分子機構

自然科学研究機構 基礎生物学研究所/岡崎統合バイオ
神経細胞生物学研究室
椎名 伸之

1. はじめに

長期記憶を形成するためには、学習の際に神経細胞内でタンパク質を合成することが必須である。このタンパク質合成は、刺激を受けた後部シナプス近傍の樹状突起で局所的に起こる。したがって、mRNA やリボソームを細胞体から樹状突起へ輸送する必要がある。この輸送を担うのが、RNA-タンパク質高次複合体「RNA 顆粒」である(1)。また近年、RNA 顆粒の過剰凝集体が様々な神経変性疾患、例えば筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭葉変性性認知症 (FTLD) の患者の神経細胞内に形成されることが報告された。これらのことから、RNA 顆粒は、学習記憶や神経疾患と深く関わる重要な構造体だと認識され始めた。

RNA 顆粒は液相-液相分離という物理化学的プロセスによって細胞質に形成される液滴である。しかし単なる液滴ではなく、その内部に固相の「コア」と呼ばれるサブ構造を内包している(図1)。RNA 顆粒の形成・解体のダイナミクスは生物学的に重要で、形成によって翻訳を抑制しつつ mRNA を輸送し、解体によって翻訳を活性化し、記憶形成に関与する。RNA 顆粒の固相化が進み凝集体が形成されると、神経変性疾患のリスクが高まることは上述の通りである。したがって、RNA 顆粒がどのように形成されるのか、特に液相と固相の形成・維持機構を知ることは、学習記憶のメカニズムを理解する上でも神経変性疾患の応用研究を進める上でも、極めて重要である。しかし、RNA 顆粒の液相・固相サブ構造がどのように形成されるのか、分子メカニズムは分かっていない。本研究では、複数の RNA 顆粒形成因子を、単独あるいは組み合わせで培養細胞に発現し、形成された RNA 顆粒の形態およびダイナミクスを計測することにより、RNA 顆粒形成の分子メカニズムの解明に取り組んだ。

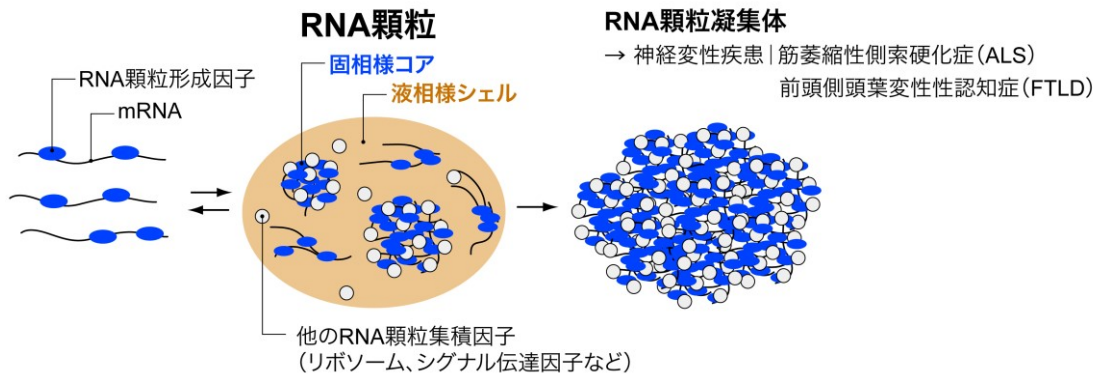


図1 液相-液相分離による RNA 顆粒形成、コア・シェルサブ構造、凝集化

2. 方法

線維芽培養細胞系 A6 に、RNA 顆粒形成因子を GFP 融合タンパク質として発現させた。用いた RNA 顆粒形成因子は、G3BP1, RNG105/caprin1, TDP-43, FUS, Pumilio1, FMR1, TIAR, TIA-1 の 8 種類である。RNG105 は長期記憶形成に必須であること(1)、FMR1 の変異は精神遅滞症 (X 脆弱症候群) の原因となること、TDP-43 および FUS の変異と凝集化は ALS や FTLD と密接に関わることが知られている。

形成された RNA 顆粒のテクスチャーは、蛍光強度ヒストグラムの歪度によって評価した。すなわち、蛍光顕微鏡画像の RNA 顆粒内の 1 ピクセルごとの蛍光強度を計測してヒストグラム化し、そのヒストグラムの歪度を計算することで行った。

RNA 顆粒のダイナミクスは、光褪色後蛍光回復法 (FRAP) により測定した。得られた蛍光強度曲線を最少二乗法で指数関数にフィッティングし、その式から可動性画分 (F_m) および蛍光回復時間 ($t_{1/2}$) を抽出した。また、5 秒間隔のタイムラプスの連続画像 20 枚から、100 秒間における RNA 顆粒の変形率を

算出した。

2種類のRNA顆粒形成因子を共発現させる場合は、片方をGFP融合、もう片方をmRFP1融合タンパク質とした。同一顆粒内での両因子の共局在は、蛍光顕微鏡画像をFijiのColoc2プラグインによって解析することで、ピアソンの相関係数を算出した。

また、神経細胞におけるRNA顆粒のダイナミクス測定と、RNA顆粒形成因子の翻訳後修飾がダイナミクスに与える影響についても解析を行った。神経細胞は、マウス大脳皮質由来の神経初代培養細胞を用いた。翻訳後修飾として、メチル化酵素PRMT1の共発現により、RNA顆粒形成因子が有するRGG boxのメチル化を行い、RNA顆粒ダイナミクスへの影響を評価した。

3. 結果 研究成果

液相および固相のRNA顆粒は、異なる因子によって形成される

RNA顆粒形成因子をそれぞれ単独で細胞に発現すると、大別して2種類のRNA顆粒を形成することが分かった。一つは表面がスムーズなRNA顆粒で、その内部に形成因子は一樣に分布した。このような形態は、顆粒が表面張力を持ち、顆粒内部で形成因子が良くミックスされていることを示唆することから、液相の顆粒であると考えられた。もう一種類の顆粒は、細かい粒子が数多く寄せ集まったラフな形態をしていた。これは表面張力を持たず、固相の顆粒であると考えられた。液相様の顆粒はG3BP1, RNG105, TDP-43によって形成され、一方の固相様の顆粒はFUS, Pumilio1, FMR1, TIAR, TIA-1によって形成された。

このような2種類の顆粒のテクスチャーの違いは、顆粒内ピクセル蛍光強度のヒストグラムの歪みの違いとして定量化することができた。すなわち、スムーズな液相様顆粒は負の歪み、ラフな固相様顆粒は正の歪みを持った顆粒として種類分けされた。

液相様および固相様RNA顆粒は、それぞれ動的、静的性質を持つ

形成されたRNA顆粒のFRAPを行い、 F_m および $t_{1/2}$ の関係を液相、固相様顆粒の間で比較した。その結果、 $t_{1/2}$ が遅い場合、固相様因子は低い F_m を示した。つまり、固相様因子がRNA顆粒に強く相互作用している場合、その因子は顆粒内で不動状態にあるということが分かった。一方、液相様因子は、 $t_{1/2}$ が遅い場合でも高い F_m を示した。このことは、液相様因子はRNA顆粒に強く相互作用しているにもかかわらずミックスされることを示している。

また、 $t_{1/2}$ と顆粒変形率の関係を、液相、固相様顆粒の間で比較した。その結果、 $t_{1/2}$ が遅い場合、液相様顆粒は大きな変形率を示した。これは、液相様因子がRNA顆粒に弱く相互作用している場合、顆粒の表面張力は弱くなり、その結果変形率が大きくなったと考えられる。一方、固相様顆粒は、 $t_{1/2}$ が遅い場合でも変形率が低かった。このことは、固相様顆粒が表面張力で形態を保っているわけではないことを示唆する。以上のダイナミクス解析の結果から、液相様顆粒、固相様顆粒はそれぞれ液相、固相の性質を持つことが示された。

RNA顆粒の液相および固相サブ構造は、液相様および固相様因子の共発現によって形成される

次に、2種類のRNA顆粒形成因子をA6細胞に共発現させた。液相様因子どうしを共発現した場合、あるいは固相様因子どうしを共発現した場合、2種類の因子は液相様顆粒あるいは固相様顆粒で極めて高い共局在($r > 0.9$)を示した。

液相様因子と固相様因子の異なる組み合わせで共発現した場合も同様に、両因子は同一のRNA顆粒に集積した。しかし、顆粒内での共局在は低く、最も低い組み合わせ(G3BP1とPumilio1)では相関係数(r)は0.28であった。これは、両因子が同一顆粒に集まりながらも、異なるサブ構造を形成していることを意味する。異なる組み合わせでも相関係数が高い組み合わせもあり、例えばRNG105とFMR1では $r=0.92$ であった。

以上の結果から、液相様因子と固相様因子の共発現によって、サブ構造を持ったRNA顆粒を形成することが分かった。また、RNA顆粒は一樣にミックスした構造ではなく、選択性を持ちながら因子どうしが相互作用し、液相様および固相様サブ構造を形成・維持していると考えられた。

固相様顆粒の不動状態は液相様顆粒との相互作用によって減少する

液相様因子と固相様因子の異なる組み合わせで共発現した場合、互いのダイナミクスにどのような影響を及ぼすか、FRAPを用いて解析した。その結果、液相様因子のダイナミクスは、固相様因子の共発現あり、なしによって何ら影響を受けなかった。一方、固相様因子のダイナミクスは、液相様因子の共発現によって強く影響を受けた。 $t_{1/2}$ は因子の組み合わせによって、大きくもなり、小さくなる場合もあった。それに対して F_m は一貫性があり、液相様因子の共発現によって常に大きくなった。つまり、固相様因子の単独発現では、固相様顆粒内に不動画分が多く存在していたものが、液相様顆粒が相互作用することによって可動画分に転換したことを意味する。この結果から、RNA顆粒の液相様サブ構造は、固相

様サブ構造のダイナミクスを制御する能力をもつことが示唆された。

RNA 顆粒ダイナミクス解析の神経細胞への応用

RNA 顆粒のダイナミクスがどのように制御されるかを神経細胞で解析することは、学習記憶のメカニズムを解析する上でも、神経変性疾患の研究を進める上でも重要な課題となる。そこで本研究では、神経細胞を用いた解析も開始した。

マウス大脳皮質由来の神経初代培養細胞に RNG105-GFP あるいは TIAR-GFP を発現して RNA 顆粒を形成させ、そのダイナミクスを FRAP で解析した。さらに、RNA 顆粒形成因子の翻訳後修飾がダイナミクスに与える影響を調べるために、メチル化酵素 PRMT1 を共発現した。PRMT1 は、多くの RNA 顆粒形成因子が有する RGG box をメチル化する。RNG105 は RGG box を持つが、TIAR は持たない。FRAP 解析の結果、RNG105 は PRMT1 の共発現によりダイナミックに変換、すなわち、 $t_{1/2}$ が速くなり F_m が増加した。一方、TIAR のダイナミクスは PRMT1 によって影響を受けなかった。

以上のように、本研究で用いた実験系は、神経細胞においてメチル化や様々な環境変化に伴う RNA 顆粒動態変化のモニタリングに応用可能である。よって、将来、薬剤スクリーニング系の確立や、神経変性疾患をはじめとする様々な病態の診断・予防治療法の開発研究に貢献することが期待される。

4. 考察 まとめ

RNA 顆粒は液相-液相分離によって形成される液滴であるが、その内部には固相のコアが存在する。従来コアは、液相が単に濃縮して凝集した構造ではないかと考えられていた。しかし本研究の結果は、液相と固相は異なる RNA 顆粒形成因子によって形成・維持されることを強く示した。このことは、RNA 顆粒形成メカニズムに関して新たな道を開いたと言える。本研究の結果はさらに、固相の中で形成される不動状態（凝集状態）は、液相の相互作用によって解消されることを示した。この現象は、RNA 顆粒のダイナミクス制御について新たなモデルを提示すると同時に、神経変性疾患で形成される過剰凝集体を如何に制御すれば良いかという応用面にも貢献できる可能性がある。

5. 発表論文、参考文献

(1) Nakayama K[†], Ohashi R[†], Shinoda Y, Yamazaki M, Abe M, Fujikawa A, Shigenobu S, Futatsugi A, Noda M, Mikoshiba K, Furuichi T, Sakimura K and Shiina N ([†]Equal contribution). RNG105/caprin1, an RNA granule protein for dendritic mRNA localization, is essential for long-term memory formation. *eLife* 6, e29677 (2017).