

Title	Cytoplasmic polyadenylation element-like sequences are involved in dendritic targeting of BDNF mRNA in hippocampal neurons
Author(s)	大江, 総一
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59697
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	おお え そう いち 大 江 総 一
博士の専攻分野の名称	博 士（医学）
学 位 記 番 号	第 2 5 5 6 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 24 年 4 月 20 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学 位 論 文 名	Cytoplasmic polyadenylation element-like sequences are involved in dendritic targeting of BDNF mRNA in hippocampal neurons （海馬の神経細胞においてBDNF mRNAの樹状突起への局在化にはcytoplasmic polyadenylation element様の配列が関与する。）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 米 田 悦 啓 （副査） 教 授 遠 山 正 彌 教 授 原 田 彰 宏

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

神経細胞の樹状突起には細胞体とは別に、ポリリボソーム、tRNA、rRNAなどの翻訳装置や、小胞体、ゴルジ体が存在し、細胞外刺激に応答して局在化したmRNAの樹状突起における局所翻訳を担っていると考えられている。また、そのようなmRNAの局在化には、RNA内の一次配列または二次構造、それを認識するRNA結合タンパク質、微小管上を移動するモータータンパク質等の相互作用が必須である。Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)は神経細胞の生存、分化、シナプス可塑性において重要な役割を担う栄養因子の一つであり、そのmRNAも脱分極刺激によりその局在が樹状突起の基部から遠位へと亢進することが報告されていたがその局在化機構は未解明であった。そこで、BDNF mRNAの局在化責任配列を同定、RNA結合タンパク質を探索、その相互作用を解析することでその局在化メカニズムを解明しようと考えた。

〔 方法ならびに成績 〕

BDNF mRNAの樹状突起局在化責任配列を同定するために様々な欠損変異体をEGFPベクターに挿入しラット海馬培養神経細胞に遺伝子導入し*in situ* hybridizationによりその細胞内局在を観察した。その結果、BDNFの翻訳領域から3'UTRの最初の166塩基の配列内に局在化責任配列が存在する事が明らかとなった。さらに同様の実験系を用いて、遺伝子導入後に高KCl刺激を処理し*in situ* hybridizationにより細胞内局在を観察したところ、3'UTRの166塩基から326塩基の配列だけで局在化することが明らかとなった。このことからBDNF mRNAの樹状突起局在化には通常培養条件下での局在化機構と活動電位依存的な局在化機構

が存在することが示唆された。

次にBDNF mRNAと相互作用する結合因子を探索するためにNorth-western screeningを行いCPEB (cytoplasmic polyadenylation element binding protein)を同定した。また、抗CPEB抗体による免疫沈降法とRT-PCRを用いて細胞内でCPEBと相互作用しているRNAの中にBDNF mRNAが含まれている事を確認し、North-western blottingによりリコンビナントのCPEBとBDNF mRNA 3'UTRの最初の326塩基とが直接結合していることを明らかにした。さらにBDNFの局在化責任配列を遺伝子導入した神経細胞においてそのRNAとCPEBが共局在することを*in situ* hybridizationにより確認した。

またBDNFの局在化責任配列内にはCPEBが結合すると考えられるcytoplasmic polyadenylation element (CPE) : UUUUUAAUに類似した配列が4つ存在する事からそれぞれを欠損した変異体を遺伝子導入しその細胞内局在を観察したがどの欠損変異体においても局在化の有意差はなく、4つのCPEをすべて欠損させた場合でのみ局在化が抑制された。このことから、局在化責任配列内のCPE様配列は相補的にCPEBと相互作用しうることが示唆された。

さらにBDNF mRNAとCPEBとの相互作用が通常培養条件下と高KCl刺激下で変化するかを検証するために、それぞれの条件での細胞抽出液をビオチンラベルした各種BDNF mRNA配列と混合しアビジンビーズによりpull-downし、結合しているCPEBをWestern blottingにより検出した。その結果3'UTRの166塩基から326塩基の配列と相互作用するCPEB量が高KCl刺激下で増大することが明らかとなった。これは活動電位依存的な局在化機構の一端を担うものと考えられる。

〔 総 括 〕

これまで神経細胞において種々のmRNAが樹状突起に局在化しそれぞれのmRNAでその局在化責任配列と結合因子が同定されており、中枢神経系におけるシナプス可塑性や記憶・学習の形成との関連が報告されている。今回の研究から、神経細胞におけるBDNF mRNAの樹状突起への局在化には、翻訳領域から3'UTRの最初の166塩基が担う通常条件下での局在化機構と、3'UTRの166塩基から326塩基が担う活動電位依存的な局在化が存在する事が明らかとなった。またその局在化機構にはBDNF mRNA内のCPE様配列とCPEBとの相互作用が関与しており、特に活動電位依存的な局在化の際にBDNF mRNAとCPEBとの相互作用が増大している事が明らかとなった。今後さらにこれらの分子メカニズムと高次脳機能発現との関連性についても検討が必要である。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

これまでの研究から神経細胞の樹状突起におけるmRNAの局在化とその後の局所翻訳はシナプス可塑性や学習・記憶の形成などの高次脳機能発現に重要である事が分っている。申請者の研究により、神経細胞の生存や分化に必須な脳由来神経栄養因子 (BDNF) のmRNA局在化機構には通常の局在化と、脱分極刺激下における活動電位依存的な局在化が存在する事が示唆され、それぞれをmRNA上の異なる配列が担うことが示唆された。またBDNF mRNAの輸送因子としてCPEBというRNA結合タンパク質を同定し、*in vitro*と*in vivo*両方においてBDNF mRNAとCPEBが相互作用する事が明らかとなった。さらにBDNF mRNAの局在化を担う配列内にはCPEBが認識するCPE配列が複数確認され、CPEBとの結合において相補的に機能し得ることが確認された。また脱分極刺激下において、BDNF mRNAの局在化を担う配列とCPEBとの相互作用が増大することが明らかとなり活動電位依存的な局在化機構の一端を担っていると考えられた。以上の研究成果は神

経細胞におけるmRNA局在化機構の多様性を明らかにし、今後、高次脳機能発現を解析するための新たな研究モデルになり得ると考えられるため、博士（医学）の学位授与に値する。