The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【６】

氏　　名	大　江　総　一（おお え そう いち）
博士の専攻分野の名称	博　士（医学）
学　位　記　番　号	第　２５５６０　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 刺激下で変化するの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。