

## 脳内オートファジーと連動する新規経路の解析

相原 拓馬 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 鶴田 文憲 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景・目的】

哺乳動物の脳内では、温度変化をはじめとする特定の条件下において、ダイナミックなシナプス再構成が生じる。例えば、冬眠動物では睡眠時と覚醒時で体温変化に連動した神経細胞の形態変化、ならびにシナプスの消失・形成が観察される。動物が低温状態に晒されると RNA-binding motif protein 3 (RBM3) と Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) と呼ばれる低温応答性タンパク質 (Cold shock protein: CSP) が発現する。前者は、神経変性によるシナプスの消失を抑える神経保護の役割を持ち、神経可逆性にも大きく関与している。一方、後者は UV 照射、低酸素などの外部ストレスを受けたときにも発現され、ストレス応答を制御する働きを持つ。しかし、脳内における CSP の詳細なメカニズムは明らかになっていない。

本研究室では、脳神経系におけるオートファジーの役割を検証するために神経特異的 Autophagy-related protein 7 欠損マウス (ATG7 KO) を用いて解析を行ってきた。オートファジーは細胞内の不要になったタンパク質やオルガネラを分解する、生体にとって必須の制御機構である。この機能が損なわれると、異常な構造を持ったタンパク質が脳内に蓄積し、神経変性につながる。Affymetrix GeneChip Exon array を用いた本研究室の先行研究で、ATG7 KO マウス脳では、野生型マウス (WT) のもの比べて RBM3 がより多く発現することを見出している。しかし、現段階では、オートファジーと RBM3 ならびに CIRP との関連や生理的意義の詳細は解明されていない。

本研究では、低温刺激 (Cold shock: CS) 応答が脳依存的か調べるために Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) とマウス脳を用いて RBM3 や CIRP の mRNA 量が CS 依存的に上昇するか調べた。また、オートファジー経路の欠損が CS 応答を引き起こすかを調べるために、ATG5 KO マウスの MEF、及び ATG7 KO マウスの脳で RBM3 と CIRP の量が増えるかを調べた。

## 【実験方法】

## 1. 細胞・マウスへの CS

1.0×10<sup>6</sup>個の野生型 (WT)、ならびに ATG5 KO の mouse embryonic fibroblasts (MEFs) をそれぞれ 6 cm ディッシュに撒き、37°Cで一晩培養した。その後、細胞に CS (4°Cで30分、30°Cで24時間、そして33°Cで24時間) を与え、速やかに回収した。P14のWTマウス (C57BL/6) に CS (4°Cで3時間) を与えた後、マウスの大脳皮質と小脳の一部を撹取した。同様に高温刺激 (Heat shock: HS) がこれらのタンパク質の発現に影響を与えるか調べるために、WTマウスに HS (37°Cで3時間) を与え、脳の一部を回収した。

## 2. 免疫組織染色 (IHC)

パラフィン包埋によって作成した P16 の WT マウス、及び ATG7 KO マウスの脳切片を脱パラフィン化し、RBM3 抗体と CIRP 抗体を用いて染色した。これらの CSP の発現領域の違いを、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

## 3. RT-qPCR

撹取したサンプルを Isogen II で処理し、ReverTra Ace を用いて逆転写を行った。得られた逆転写産物と Thunderbird SYBR qPCR Mix を用いて、RBM3 と CIRP の発現量の違いを qPCR で測定した。

## 【結果】

ATG7 KO 脳で RBM3 の発現量が上昇していたことから、他の細胞でもオートファジー異常によって RBM3 mRNA が上昇するか、ATG5 KO MEFs を用いて検証した。その結果、RBM3 や CIRP の発現量は、WT と ATG5 KO の間で差が見られなかった。このことから、RBM3 や CIRP の発現には細胞特異性が関与すると考えられた。

次に ATG7 KO 脳の切片を用いて、RBM3 や CIRP の発現領域を解析した。その結果、RBM3 の発現は大脳海馬で、CIRP の発現は大脳海馬と小脳のプルキンエ細胞層で見られた。また興味深いことに、ATG7 KO の海馬歯状回 (Dentate gyrus: DG) では細胞数に大きな変化が認められなかったものの、WT と比較して CIRP の発現量が特異的に減少することを見出した (図参照)。

最後に、野生型マウスを用いて、温度変化による RBM3、ならびに CIRP の発現変動を qPCR で解析した。その結果、大脳よりも小脳で RBM3、及び CIRP の発現量が多いことが分かった。また RBM3 発現量の増加は、CS をかけたマウスの小脳で顕著に上昇した。一方、CIRP の発現量は大脳・小脳の両方で、CSのみならず HS でも上昇した。よって、温度変化による RBM3 や CIRP の発現誘導には異なった経路の存在が推測できた。

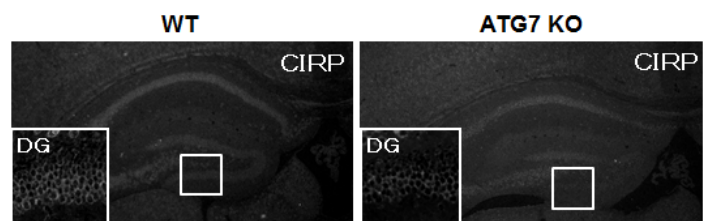


図: WT マウスと ATG7 KO マウスの海馬。ATG7 KO と比べ、WT の DG で CIRP がより多く発現していた。

## 【考察・今後の展望】

低温環境下では、細胞内の転写・翻訳効率は抑制されることが知られている。細胞、ならびにマウスに CS をかけた後に復温 (rewarming) することで、RBM3 と CIRP の転写・翻訳が促進し、これら CSP の発現量に変化が見られる可能性がある。

今後は、ATG7 KO マウスに様々な温度刺激をかけたときの RBM3 と CIRP の発現量の違いを WT と比べて検証していく。また、温度ショックをかけた WT マウスと ATG7 KO マウスの脳切片を作り、これらの CSP の発現様式の違いを検証する。RBM3 と CIRP の標的 RNA は解明されていないので、これらの標的 RNA を同定し、オートファジーとの関連を明らかにする。