

中枢神経系における低温応答性タンパク質 RBM3 の発現制御

中村 準之助 (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)

【背景と目的】

哺乳類の新生児は、出生後、光や音といった様々な環境刺激にさらされる。中でも外気温変化は新生児の体温変化に影響を及ぼすことが知られている。例えば、ヒトでは母胎内の温度は約 38°C 程度だが、出生後の新生児は 25°C 前後の環境下にさらされ、体温も一過的に 35°C 台まで低下する。その後、自発的な熱産生機構が働いて 37°C 前後まで回復する。この寒冷刺激は新生児にとって重要な刺激であるが、体温の回復が起こらず低体温状態が続くと低血糖症や低酸素血症の原因となる。このことから、外部温度と連動した新生児の体温調節は、出生直後の環境変化に適応するための重要な生理現象と言える。しかしながら、新生児がどのようにして寒冷刺激による体温低下を抑制し、一定の体温まで回復させていくのか、詳細なメカニズムは明らかとなっていない。

近年、脳内におけるオートファジーが体温調節に関与することが示唆されている。先行研究から、オートファジー必須遺伝子の 1 つである Autophagy-related protein 7 (Atg7) を成体マウス視床下部の神経細胞で欠損させると軸索投射が破綻し、わずかながら体温も低下する。このように脳内オートファジーと体温調節には何らかの関わりがあるといえるが、哺乳動物における出生後の体温調節との関連性やその分子メカニズムは明らかとなっていない。そこで本研究では、出生後の脳内オートファジーが体温制御に関わるか明らかにすることを目的とした。またこの生理現象を調節する候補因子として、本研究室のスクリーニングで見出した低温応答性タンパク質 RBM3 に着目し、このタンパク質の発現制御メカニズムを解析した。

【方法】

(1) マウスおよび細胞培養

神経幹細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウス (NestinCre マウス) と Atg7^{flx/flx} マウスを交配し、神経幹細胞特異的 Atg7 KO マウス (Atg7 cKO マウス) を産出した。初代神経細胞は野生型 (WT) マウス胎児大脳皮質 (ICR, E14.5) から単離し、B27 を含んだ Neurobasal 培地で 7 日間培養したものを用いた。同様に初代アストロサイトはマウス新生仔大脳皮質 (ICR, P1) から単離し、10% FBS を含んだ DMEM 培地で 14 日間培養したものを用いた。

(2) 組織免疫染色

WT、Atg7 cKO マウスを 4% PFA/PBS で灌流固定して脳を取り出し、30% スクロース/PBS 溶液で 2 日間 4°C で静置した。その後、OCT compound に包埋し、クライオスタットを用いて、厚さ 30 μ m の冠状断面の切片を作成した。作成した凍結切片は、抗 NeuN 抗体 (1:500, Millipore)、抗 RBM3 抗体 (1:500, Proteintech)、抗 GFAP 抗体 (1:500, SIGMA) を用いて染色を行った。核は Hoechst33342 (1:1000, Invitrogen) を用いて染色した。

(3) Western Blotting

初代培養アストロサイトにリソソーム系阻害剤である BafilomycinA1 (300 nM) を添加した。4 時間培養した後、新しい培地を添加して 6 時間培養し、その培地上清を初代培養神経細胞

の培地と置換した。このアストロサイト条件培地 (ACM) で神経細胞を 24 時間刺激した後、細胞を回収して発現タンパク質をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。その後、PVDF 膜に転写し、5% スキムミルク/TBST で blocking した後、抗 Tubulin 抗体 (1:1000, SIGMA)、抗 RBM3 抗体 (1:1000, Proteintech) を用いてタンパク質を検出した。

【結果】

まず脳内オートファジーが寒冷環境下での体温低下に関係するか、WT 及び ATG7 cKO の幼若マウス (P14) を 4°C で刺激した後、体温を測定した。その結果、WT マウスの体温は刺激前後とも大きな変化は認められなかったが、ATG7 cKO マウスでは体温が劇的に低下していた。このことから幼若マウスの脳内オートファジーは、寒冷条件下で体温低下を防ぐことが考えられた。

そこで、どのような遺伝子が体温調節に関与しているか、WT と ATG7 cKO マウス脳で発現変化する遺伝子を DNA array で解析したところ、ATG7 cKO マウスでは低温応答性タンパク質 RBM3 が発現上昇していた。RBM3 は低温刺激で発現上昇する RNA 結合タンパク質で、神経細胞では細胞死抑制に働くことも報告されている。まず RBM3 が種間を超えて保存されているかデータベースを解析したところ、哺乳類全般で 95% 以上の高い相同性で保存されていた。一方、鳥類以下では、一部の例外を除いて、RBM3 の発現は見出せなかった。このことから、RBM3 は哺乳類で特別な働きを持つことが考えられた。

次に、RBM3 が脳内のどの領域で発現が増加しているのか免疫組織染色で検証したところ、Atg7 cKO マウスでは視床下部での神経細胞で発現が上昇していた。そこで神経細胞でのオートファジーの欠損が RBM3 の発現を誘導しているのか、初代培養神経細胞にオートファジー阻害剤を処理して検証した結果、期待に反して、RBM3 の発現量に変化は生じなかった。また周辺細胞のオートファジー機構が神経細胞の RBM3 発現上昇を調節しているのではないかと考え、初代アストロサイトの ACM を神経細胞に添加したところ、アストロサイトのオートファジー活性とは関係なく ACM 処理によって神経細胞 RBM3 の発現量が増加した。このことから神経細胞における RBM3 の発現はアストロサイトによってコントロールされる可能性が示唆された。

【展望】

本研究では、脳内オートファジーが低温刺激による体温低下を抑制することを見出した。また、低温刺激と連動して発現上昇する RBM3 がアストロサイトによって制御されている可能性を見出した。今後、CRISPR/Cas9 を用いて RBM3 遺伝子改変マウスを作成し、RBM3 と出生後の体温の関係性を明らかにしていく。また LS/MS を用いた解析で RBM3 の発現を誘導する因子の特定、ならびにオートファジー欠損と RBM3 発現上昇の分子メカニズムを明らかにしていく予定である。