

大脳皮質層形成における USP15 の役割の解明

植松 雪乃 (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】

哺乳動物の大脳皮質は、胎児期に神経細胞が産生され、その後、特定の位置まで移動して大脳皮質の基本構造が形成される。その後、神経回路網の形成やグリア細胞の増殖、細胞外マトリックスの構築によって、大脳皮質は徐々に厚みを増していく。この脳の発達に伴う皮質層変化に関連して、所属研究室では脱ユビキチン化酵素 USP15 のノックアウト (KO) マウスでは、大脳皮質層が薄くなることを見出している。USP15 は標的の脱ユビキチン化を介してストレス応答や細胞増殖など種々の経路を調節することが示唆されている。しかし、なぜ USP15 の異常によって大脳皮質が薄くなるのか、その詳細なメカニズムは不明であった。そこで本研究では、USP15 がどのようにして正常な大脳皮質の層形成を制御しているのか明らかにすることを目的とした。

【実験方法】

(1) 免疫組織染色

生後 7 日の野生型 (WT) マウス、USP15 KO マウスを 4% PFA/PBS で灌流固定後、脳を 4% PFA/PBS 中で一晩浸透させた。その後、30%スクロース/PBS に置換し、30%スクロース/OTC (1:1) で包埋後、クライオスタットで 40 μ m の凍結切片を作成した。染色には抗 TBR1 抗体 (1:500, abcam) と Hoechst33342 (1:10000, Invitrogen) を用いた。

(2) His-pull down アッセイ

His-ユビキチン、HA-TBR1、FLAG-USP15 を過剰発現させた培養細胞 (HEK293T) 回収後、細胞液を分割し Lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) にて溶解 (①) または Extraction buffer (6M guanidinium-HCl, 50 mM sodium phosphate buffer [pH 8.0], 300 mM NaCl, 5mM imidazole) を添加後に 40 秒間超音波破碎 (②) し、①を Input としてサンプル化した。②に対して His に特異的に結合する Talon metal affinity resin (Clontech) を添加後、室温で 3 時間ローテーションした。洗浄バッファー (50 mM sodium phosphate buffer [pH 8.0], 300 mM NaCl, 5mM imidazole) により 3 回洗浄した後に 250 mM imidazole を加えて溶出させサンプル化した。両者のサンプルをウエスタンブロッティングにより解析した。

(3) ウエスタンブロッティング

生後 3.5 日、および二か月齢の WT、および USP15 KO マウスの脳を Lysis buffer 中でホモジナイズし、14,000 rpm で 5 分間遠心後、上清をサンプルとし、Bradford 法によりタンパク量を定量した。サンプルは 4× Sample buffer (125 mM Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 10% Sucrose, 0.01% Bromophenol blue, 10% 2-Mercaptoethanol) を添加した後、100°C で 3 分間ボイルした。SDS-PAGE によりタンパク質を分離後、Transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10% Ethanol) を用いて、ポリアクリルアミドゲルから PVDF 膜へ 100V で 60 分間転写を行った。PVDF 膜は、2.5-5% スキムミルク/TBS-T (10 mM Tris-HCl, 150 mM

NaCl, 0.1% Tween20) によりブロッキング後、5% BSA/TBS-T で希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させた。一次抗体には、抗 TBR1 抗体 (1:1000, abcam)、抗 USP15 (1:1000, CST) 抗体、抗 Tubulin 抗体 (1:100000, SIGMA) を用いた。その後、TBS-T で洗浄し、5% スキムミルク/TBS-T に 1/20000 で希釈した二次抗体を 1 時間反応させた。TBS-T で洗浄し、PVDF 膜をケミルミワ Super (nacalaitesque) で検出した。

【結果・考察】

USP15 KO では、大脳皮質の第 V・VI 層が特に薄くなっていたことから、これらの層の神経細胞で発現する転写因子 TBR1 に着目した。TBR1 は第 VI 層神経細胞で強く発現し、複数の遺伝子の転写活性化を介して大脳皮質形成に対し重要な役割を担う [1]。また、USP15 KO と同様、TBR1 の KO マウスも皮質層が薄くなる [2]。USP15 も第 V・VI 層近傍で発現量が高いことから、TBR1 が USP15 の標的である可能性が考えられた。そこで、大脳皮質における USP15 の TBR1 への影響を確認するため、免疫組織染色を行った。USP15 KO マウスでは WT と比較し、TBR1 陽性細胞の密度が低下していた。また、USP15 KO マウスでは、第 VI 層と第 V 層の境界領域における TBR1 の発現に異常が観察された。以上の結果から、実際の脳組織において、USP15 によって TBR1 の発現が制御されていることが示唆された。

次に、USP15 がタンパク質レベルで TBR1 の発現量を調節するか、WT および USP15 KO マウスのウエスタンブロッティングを行った。その結果、生後 3.5 日の脳では、USP15 KO マウスにおける TBR1 のタンパク質レベルが減少しており、二か月齢のマウス脳では、USP15 KO におけるユビキチン化様のシグナルがより強く観察された。また His pull down アッセイの結果から、USP15 が TBR1 の脱ユビキチン化を促進することが示唆された。以上の結果から、USP15 は脳組織において TBR1 の翻訳後修飾を制御し、その機能が幼少期と成人期とで変化していることが示唆された。

WT と USP15 KO の大脳皮質層の厚みの差は、生後徐々に顕著となり、生後 1 か月前後で有意な差が認められる。TBR1 は神経細胞で特異的に発現する転写因子であり、USP15 KO では幼少期において TBR1 のタンパク量が減少していた。これらのことから、USP15 が TBR1 のタンパク量を維持することによって下流の標的因子の発現が適切に調節され、その結果、大脳皮質深層における脳内環境が適切に制御され、正常な大脳皮質が形成される可能性が考えられた。今後、大脳皮質層が薄くなる表現型がどのようなメカニズムによってもたらされているのか、大脳皮質深層における細胞種ごとの密度の定量などを行う予定である。

【参考文献】

- [1] F. Bedogni *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (29) 13129-13134, 2010
- [2] S. Nambot *et al.*, *Eur J Hum Genet*, 28 (6) 770, 2020