

## 116. 結節性硬化症の発症分子機構の解析

池内 与志穂

東京大学 生産技術研究所 物質・環境系部門 分子細胞工学分野

Key words : タンパク質合成, 結節性硬化症, 神経, 発生

### 緒言

自閉症、てんかん、脳腫瘍、知的障害などの中樞神経系の症状を伴う遺伝性の発達障害である結節性硬化症は、原因遺伝子 *TSC1* と *TSC2* の変異によって引き起こされる。これまでに、*TSC1* タンパク質と *TSC2* タンパク質の複合体は、mTORC1 リン酸化酵素複合体の活性を制御することでタンパク質合成を中心とした細胞内代謝を調節することが明らかにされている。神経における *TSC1/2* による mTORC1 の制御機構が明らかになりつつある一方、神経において mTORC1 の下流で制御される分子の挙動は十分に理解されていない。そこで本研究では、神経において *TSC1/2*-mTORC1 シグナル経路は特定の標的遺伝子群の発現をタンパク質合成の段階で制御することによって脳の発生と機能に寄与し、これらの標的遺伝子群の発現異常によって結節性硬化症が引き起こされると仮説を立て、神経において *TSC1/2*-mTORC1 依存的にタンパク質が合成される遺伝子を探索した。

### 方法

#### 1. 細胞

神経細胞は、妊娠 16 日目の ICR マウス (日本クレア) 胎児の大脳皮質からトリプシン (Life Technologies) と DNase I (Roche) を用いて分離した初代培養神経細胞を用いた。8 日間培養皿で神経培地 (Neurobasal medium、2 % B27 supplement、0.5 mM Glutamine、1 % Penicillin-Streptomycin (Life Technologies)) 中で培養を行った後、mTOR 阻害剤 Torin1 (Tocris Bioscience) 100 nM で 2.5 時間処理し、後述のリボソームプロファイリング解析を行った。Torin1 は ATP 競合型の mTOR 阻害剤であり、rapamycin よりも強力に mTOR を阻害する。細胞株は、マウス神経芽細胞腫由来細胞株 Neuro-2a とヒト胎児腎細胞由来細胞株 HEK293T の 2 種類を用いた。継代 21 時間後に mTOR 阻害剤 Torin1 100 nM を添加した上で、さらに 24 時間培養した。

#### 2. リボソームプロファイリング

遺伝暗号を読み出されている最中のメッセンジャー RNA を次世代シーケンサーを利用して定量的に解析する手法であるリボソームプロファイリングを用いて解析を行った<sup>1)</sup>。mTOR 阻害剤 Torin1 添加および非添加 (コントロール) の 2 つの条件について、リボソームプロファイリングを実施した。各条件において実験を 3 回ずつ行った。リボソームプロファイリングの手順は次の通りである。まず、培養した神経細胞をシクロヘキシミド (Sigma Aldrich) を含む溶液で溶解し、次に、超遠心によってポリソーム (メッセンジャー RNA 上にタンパク質合成中のリボソームが連なって存在するもの) をペレットとして抽出する。シクロヘキシミドはタンパク質合成中のリボソームに作用し、mRNA 上で停止させる働きを持つ。抽出したポリソームをリボヌクレアーゼ RNase I (Life Technologies) で処理することで、リボソームにより保護されていない部分の mRNA を分解する。尿素 (Wako) を含む変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、30 塩基程度の RNA 断片を回収することによって mRNA のうちリボソームが結合していた部分だけを得る。これを次世代シーケンサーにより解析することで、mRNA の遺伝情報を読み取っているリボソームのゲノムの位置と数を定量的に示したデータが得られる。次世代シーケンサーは HiSeq2500 (Illumina) を 1×50 bp で使用した。データをマウスのゲノム情報 (GRCm38) と照合し、各遺伝子のタンパク質合成中の mRNA 断片の定量的なデータを得た。並行してオリゴ dT によって精製した poly A<sup>+</sup> mRNA を次世代シーケンサーで解析し、mRNA の発現量

を解析した。各遺伝子のタンパク質合成中の mRNA 断片の量を mRNA の量で割ることによって、mRNA あたりタンパク質合成を行っている最中のリボソーム数を相対的に求めることができ、これをタンパク質合成効率 E とすることができる。Torin1 添加と非添加（コントロール）の2つの条件での各遺伝子のタンパク質合成効率 E の変化率 ( $R = E_{\text{Torin1}}/E_{\text{Control}}$ ) を網羅的に求めた。全遺伝子中で有意にタンパク質合成効率が変わった遺伝子を抽出するために2つの指標を用いた。1つ目の指標は、タンパク質合成効率 E の Torin1 処理による変化の有意確率 P である。有意確率 P の算出には統計解析ソフトウェア『R』の拡張パッケージ『Babel』を利用した<sup>2)</sup>。また、2つ目の指標として3回の実験の R 値（それぞれ R1、R2、R3 とする）の幾何平均  $R_{\text{Ave}} = (R1 \cdot R2 \cdot R3)^{1/3}$  を用いた。

## 結 果

### 1. 網羅的なタンパク質合成制御の解析

マウス初代培養大脳皮質神経細胞における、mTOR 阻害剤 Torin1 添加および非添加（コントロール）の2つの条件でのタンパク質合成効率の変化をリボソームプロファイリングによって解析した。独立した3検体ずつを Torin1 添加および非添加の条件で調製し、次世代シーケンサーによる解析を行った。

その後まず、統計解析ソフト『R』のリボソームプロファイリングデータ解析用の拡張パッケージ『Babel』を用いて各遺伝子のタンパク質合成効率変化の有意確率 P を算出した。有意確率 P が小さい遺伝子ほど、タンパク質合成効率の変化が統計的に有意であると言える。mRNA のリード数（次世代シーケンサーで検出された回数）が10以上である遺伝子群について、有意確率  $P < 0.025$  を満たす遺伝子群を抽出すると、671 遺伝子の遺伝子リストが得られた。そのうち、Torin1 添加時にタンパク質合成効率が減少した遺伝子は610個で、増加した遺伝子は61個だった。

次に、独立した3回の実験における、タンパク質合成効率の変化率 R の幾何平均  $R_{\text{Ave}}$  を指標として解析を行った。Torin1 添加時にタンパク質合成効率の幾何平均  $R_{\text{Ave}}$  が40%以上減少、あるいは増加した遺伝子を抽出した。 $R_{\text{Ave}}$  が40%以上減少した遺伝子は1,734個であった。一方、 $R_{\text{Ave}}$  が40%以上増加した遺伝子は851個であった。

最後に、2つの解析に共通して登場した遺伝子を抽出した。 $R_{\text{Ave}}$  が40%以上減少し、かつ  $P < 0.025$  である遺伝子を抽出すると、遺伝子数は504個に絞られた。一方、 $R_{\text{Ave}}$  が40%以上増加し、かつ  $P < 0.025$  である遺伝子は55個であった。抽出された遺伝子のうち、大部分はすでに神経細胞以外で mTOR シグナル伝達経路に依存してタンパク質合成が行われることが知られている遺伝子であったが、これまで報告されていなかった遺伝子も多数含まれていた。これらのうち、細胞骨格と細胞の形態形成に関連する候補遺伝子 ( $R_{\text{Ave}} = 0.50$ ) に着目して、細胞内のタンパク質を定量した。

### 2. 候補遺伝子由来アイソフォームの定量的解析

リボソームプロファイリング解析によって合成効率が低下したタンパク質の量が実際に減少しているか調べるため、ウエスタンブロッティングによる生化学的な解析を行った（図1）。

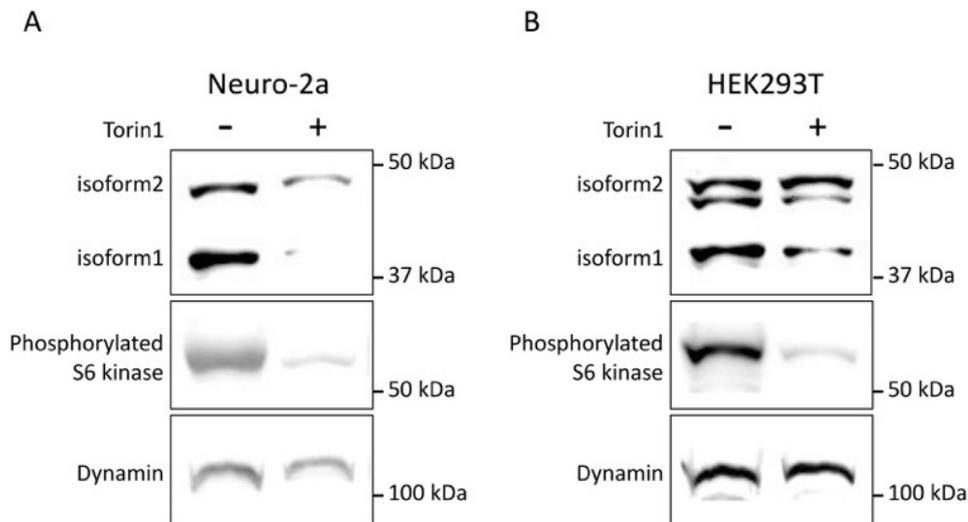


図1. mTOR 阻害剤 Torin1 の添加による候補遺伝子の発現量の変化

本研究による探索によって見出された遺伝子から複数のアイソフォームが産出されており、神経系細胞 Neuro-2a においてアイソフォーム 1 および 2 の両方が mTOR 阻害剤 Torin1 によって減少していることが明らかになった (A)。興味深いことに、同様の解析を非神経系細胞である HEK293T において行ったところ、Torin1 処理によってアイソフォーム 1 の量は減少していたものの、アイソフォーム 2 の量は減少していなかった (B)。このことから、アイソフォーム 2 は神経特異的に mTOR シグナル伝達経路によって制御されていることが示唆された。A: マウス神経芽細胞腫由来細胞株 Neuro-2a、B: ヒト胎児腎細胞由来細胞株 HEK293T。mTOR の基質である S6 kinase のリン酸化が Torin1 処理によって減少したことから、Torin1 処理によって mTOR を抑制できていることが確認できた。Dynamin はローディングコントロールとして示した。

神経系細胞 Neuro-2a を用いた解析の結果、候補遺伝子から複数のアイソフォーム (同じ mRNA から作られる、ペプチド鎖長の異なるタンパク質) が産出されており、アイソフォーム 1 および 2 の両方が Torin1 処理によって減少していることが明らかになった (図 1A)。興味深いことに、同様の解析を非神経系細胞である HEK293T において行ったところ、Torin1 処理によってアイソフォーム 1 の量は減少していたものの、アイソフォーム 2 の量は減少していなかった (図 1B)。このことから、アイソフォーム 2 は神経特異的に mTOR シグナル伝達経路によって制御されていることが示唆された。

## 考 察

本研究ではリボソームプロファイリング解析を用いて、mTOR シグナル伝達経路依存的にタンパク質の合成効率が制御される遺伝子群を探索した。見出された遺伝子の生化学的解析から、mTOR 経路に依存して複数のアイソフォームが合成される神経発生制御の候補遺伝子を同定した。特筆すべきは、同一遺伝子から産生される複数のアイソフォームが、独立に細胞種に依存した制御を受けることを見いだすことができた点である (図 2)。今後、この候補遺伝子のアイソフォームの発現量を人工的に調節することによって神経細胞の形態形成における候補遺伝子の役割を明らかにする必要があるだろう。また、TSC1/2 と候補遺伝子の発現量を同時に調節することによって、候補遺伝子が TSC1/2 の下流で働いていることを調べることができる。さらに、リボソームプロファイリングにより見出された他の遺伝子についても、今後同様に機能解析を行う予定である。

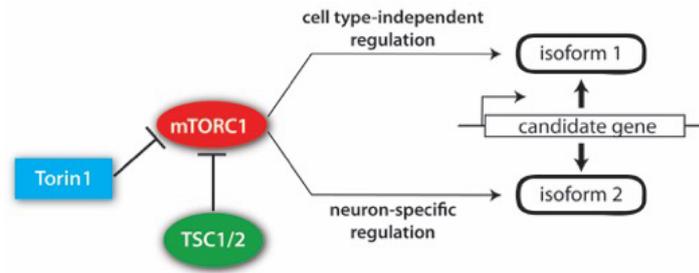


図2. 本研究から示唆された神経特異的なタンパク質合成制御機構の概略

同一遺伝子から産生される複数のアイソフォームが、独立に細胞種に依存して mTOR シグナル伝達経路による制御を受ける様子の模式図。

本研究の結果をもとに、今後 TSC1/2 と mTOR シグナル伝達経路の下流で合成が制御されているタンパク質の神経の発生と機能における役割を明らかにしていきたい。そこから得られた知見は、結節性硬化症をはじめとして mTOR シグナル伝達経路が関連する疾患に対する治療法開発の緒となると期待できる。

また、形態形成だけでなく、神経細胞の脳における高次機能を明らかにする上でも、神経特異的なタンパク質合成制御機構を明らかにすることが重要であると考えている。神経細胞に特徴的な細胞内分子制御機構の一つとして、樹状突起や軸索における局所タンパク質合成が挙げられる<sup>3-5)</sup>。細胞外からの刺激を受けた時に、細胞体からタンパク質を長距離輸送するのではなく、必要なタンパク質を局所的に合成する機構であると考えられている。しかし、どのようなタンパク質が神経突起において局所的に合成されているかについては議論が続いている。今後、単離した神経突起を対象にリボソームプロファイリングを行えば、局所タンパク質合成の実態に迫ることができるだろう。また、局所タンパク質合成は記憶の形成および神経細胞の可塑性に必須な役割を果たすと考えられている<sup>3, 6)</sup>。本研究を今後発展させることによって記憶の形成メカニズムにも迫ることができると期待している。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は東京大学大学院化学生命工学専攻の梅垣祐介である。

## 文 献

- 1) Ingolia NT, Brar GA, Rouskin S, McGeachy AM, Weissman JS. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat Protoc.* 2012;7(8):1534-50. doi: 10.1038/nprot.2012.086. PubMed PMID: 22836135; PubMed Central PMCID: PMC3535016.
- 2) Olshen AB, Hsieh AC, Stumpf CR, Olshen RA, Ruggiero D, Taylor BS. Assessing gene-level translational control from ribosome profiling. *Bioinformatics.* 2013;29(23):2995-3002. doi: 10.1093/bioinformatics/btt533. PubMed PMID: 24048356; PubMed Central PMCID: PMC3834798.
- 3) Sutton MA, Schuman EM. Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell.* 2006;127(1):49-58. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.014. PubMed PMID: 17018276.
- 4) Jung H, Yoon BC, Holt CE. Axonal mRNA localization and local protein synthesis in nervous system assembly, maintenance and repair. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(5):308-24. doi: 10.1038/nrn3210. PubMed PMID: 22498899; PubMed Central PMCID: PMC3682205.
- 5) Steward O, Schuman EM. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:299-325. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.299. PubMed PMID: 11283313.
- 6) Cooke SF, Bliss TV. Plasticity in the human central nervous system. *Brain.* 2006;129(Pt 7):1659-73. doi: 10.1093/brain/awl082. PubMed PMID: 16672292.