



網膜神経節細胞特異的RNA結合タンパク質HERMESの機能解析

古川, 真理

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2015-03-25

(Date of Publication)

2016-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6328号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006328>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

網膜神経節細胞特異的 RNA 結合タンパク質

HERMES の機能解析

平成 27 年 1 月

神戸大学大学院理学研究科

古川 真理

目次

目次	1
要旨	2
第一章 序論	4
第二章 材料と方法	10
第三章 結果	16
第四章 考察	26
謝辞	33
参考文献	34
図	43

要旨

細胞の個性は遺伝子の時間的・空間的・量的発現制御によって形成、維持される。このような複雑かつ巧妙な遺伝子発現制御の背景には、RNA 結合タンパク質による RNA の局在、安定性、翻訳効率などの制御（転写後制御）があることが示唆されている。HERMES (HEart And RRM Expressed Sequence) は RNA recognition motif (RRM) 型の RNA 結合モチーフを 1 つもち、網膜組織においては網膜神経節細胞（以下 RGC）特異的に発現する機能未知の RNA 結合タンパク質である。RGC は軸索を脳に投射することによって網膜が受容・処理した視覚情報を脳に伝達する唯一の細胞であるが、その特異的な形態や機能が転写後レベルでどのように制御されるかは明らかにされていない。HERMES の RGC 特異的な発現は脊椎動物間で広く保存されていることから、この RNA 結合タンパク質が RGC において何らかの機能的な重要性をもつことが予想される。本研究は HERMES による転写後制御機構の解明を目標に、マウス RGC 由来培養細胞（RGC-5 細胞）を用いた機能解析を行なった。

RGC-5 細胞は、非選択的 PKC 阻害剤スタウロスポリン (STS) の刺激によって神経突起を有する神経様の細胞に分化することが知られている。この系に DsRed 融合 HERMES を強制発現させて HERMES の細胞内局在を検討したところ、HERMES は RGC-5 細胞の分化状態にかかわらず細胞質で顆粒を形成することが示された。生化学的な解析から、HERMES はパラスペックル構成因子である NonO や PSF、ストレス顆粒構成因子である G3BP1 と分化した RGC-5 細胞の細胞質で特異的に顆粒を形成することが明らかになり、この細胞質性の顆粒は神経突起にも局在することが示された。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A (TSA) 刺激によって分化を誘導した RGC-5 細胞においても細胞質に HERMES-NonO-G3BP1 顆粒の形成が観察された。この顆粒には

RNA が含まれることが示唆されたことから、細胞質 HERMES-NonO-G3BP1 顆粒は神経分化に関連して形成される細胞質 RNP (ribonucleoprotein) であると考えられる。亜ヒ酸や過酸化水素によるストレス条件下において NonO は細胞質で顆粒化しなかったことから、HERMES-NonO-G3BP1 顆粒はストレス顆粒ではないことが示唆される。ヒト子宮頸ガンに由来する HeLa 細胞を STS で刺激しても NonO と G3BP1 の細胞質における顆粒化は誘導されず、HERMES の過剰発現は NonO, G3BP1 の顆粒化や局在に影響しなかった。これらの結果は、HERMES-NonO-G3BP1 顆粒が神経細胞特異的に形成される細胞質 RNP であることを示唆している。さらに、G3BP1 とモータータンパク質である KIF5 が分化した RGC-5 細胞の神経突起で共局在したことから、細胞質 HERMES-NonO-G3BP1 RNP 顆粒は KIF5 との相互作用を介して RNA を神経突起に輸送する輸送 RNP であると考えられる。

siRNA による *Hermes* 遺伝子発現抑制は STS 刺激による RGC-5 細胞の分化に目に見える影響を及ぼさず、また NonO の細胞質における顆粒化にも影響しなかった。これらの結果は、HERMES が STS 刺激によって誘導される RGC-5 細胞の神経突起伸長や細胞質における NonO の顆粒化を制御しないことを示唆している。一方、siRNA によって *Hermes* 遺伝子の発現を抑制した RGC-5 細胞の集団では、細胞の分化状態に関わらず生細胞数が増加することが明らかになった。このことから、HERMES は RGC-5 細胞の増殖を負に、あるいは細胞死を正に制御すると考えられる。

以上の結果から、HERMES は分化した RGC-5 細胞において輸送 RNP の構成因子として働くだけでなく、分化の前後で常に顆粒を形成して細胞増殖や細胞死を制御する可能性が示唆される。

第一章 序論

1. はじめに

多細胞生物は複数の細胞から構成される生命体である。1 個体あたりの細胞数は少ないものでは 4 個、多いものでは 1 万兆個以上と差があるが、全ての細胞が一つの受精卵に由来するために原則として同一のゲノムをもつこと、それらが一つの生命体として協調して働くことは共通な特徴である。我々ヒトを例に考えてみると、37 兆個もの細胞がそれぞれに専門化した機能（個性）を発揮することで個体の『生』に貢献している。細胞の個性は遺伝子の量的、時間的、空間的発現制御によって形成・維持されるが、この過程では、転写因子に加え、RNA 結合タンパク質が重要な役割を担う。RNA 結合タンパク質は標的となる RNA に結合してスプライシング、輸送、局在化、安定性、翻訳効率などを制御（転写後制御）することが知られている。脊椎動物では数千の RNA 結合タンパク質がそれぞれに特異性をもって RNA やタンパク質と相互作用することで、複雑かつ巧妙な転写後制御が行なわれる。神経細胞では分化、成熟、維持、機能制御の全てのプロセスに RNA 結合タンパク質の関与が示唆されていることから、神経細胞における RNA 結合タンパク質の機能解析は、高次生命現象の根底にある転写後レベルでの遺伝子発現制御機構の理解に貢献すると考えられる。そこで、私は網膜組織においては神経節細胞特異的に発現する RNA 結合タンパク質 HERMES に着目し、HERMES による転写後制御機構の解明を目標として研究を進めた。

2. HERMES タンパク質

HERMES (HEart And RRM Expressed Sequence) は RNA recognition motif (RRM) 型の RNA 結合モチーフを 1 つもつ、脊椎動物間で良く保存された RNA 結合タンパク質である (図 1)。初期発生過程においてマウス、ニワトリでは心臓原基、アフリカツメガエルでは心臓原基、前腎、網膜神経節細胞層 (以下 RGC)、松果体での発現が報告されており (Gerber et al., 1999)、近年、HERMES が成体網膜組織において RGC 特異的に発現すること、その細胞腫特異的な発現パターンは哺乳類で広く保存されていることが示された (Rodriguez et al., 2014)。また、アンチセンスモルフオリノによって *hermes* 遺伝子の機能を阻害したゼブラフィッシュとツメガエルの初期胚では RGC 軸索ブランチングに異常が見られたことから、Hermes が RGC の成熟過程で何らかの機能をもつものと考えられる (Hörnberg et al., 2013)。HERMES には機能的な重複が予想される相同遺伝子 *Rbpms2* が存在し、これらはツメガエルとゼブラフィッシュの卵母細胞の植物極において RNA とタンパク質からなる RNP (ribonucleoprotein) 複合体を形成することが報告されている (Kosaka et al., 2007; Zearfoss et al., 2004)。ヒト胎児腎細胞に由来する HEK293 細胞を用いた PAR-CLIP (photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation) 解析は、HERMES が CAC リピートを標的として核と細胞質の両方で RNA に結合することを示しており、この RNA 結合活性には RRM ドメインと C 末端領域の両方が必要であることがツメガエルを用いた解析から示唆されている (Gerber et al., 2002)。HERMES は Ataxin 1, Atrophin 1, QKI, SMAD2, SMAD3, SMAD4 などのタンパク質と相互作用することが示唆されているが (Lim et al., 2006; Sun et al., 2006)、分子的役割はほぼ未解明であり、ツメガエルの初期胚において標的 mRNA の 3' 非翻訳領域 (UTR) を介した翻訳抑制が示唆されるに留まっている (Song et al., 2007)。

3. 神経細胞における細胞質 RNP 顆粒

ツメガエルの RGC では、軸索の成長円錐において Hermes が顆粒状に局在することが報告されている (Hörnberg et al., 2013)。前述のツメガエルとゼブラフィッシュ卵母細胞の知見をふまえると、この顆粒は Hermes と他のタンパク質、RNA からなる RNP であると考えられる。神経細胞には RNA の輸送に関わる輸送 RNP、細胞がストレスにさらされると出現してハウスキーピング遺伝子の翻訳抑制に働くストレス顆粒、mRNA 分解装置を含む Processing body (以下 P ボディ) の 3 種の RNP が存在するが、中でも重要なのが輸送 RNP である。軸索ガイダンスやシナプス可塑性といった神経細胞に特異的な高次生命現象は、輸送 RNP による特定の RNA の輸送、局在化とそれに伴う局所的翻訳によって制御される。軸索ガイダンスでは成長円錐内部での局所的な翻訳がタンパク質の偏在化を引き起こし、軸索の曲がる方向を決定する。シナプス可塑性は刺激の入ったシナプスにおいてのみ mRNA が翻訳されることでシナプスの伝達効率に関わる因子が局所的に供給され、制御されることが考えられている。輸送 RNP には Staufen、FMRP といった RNA 結合タンパク質やシナプス可塑性を制御する重要な因子であるカルモジュリン依存性キナーゼ II (CamK II) の α サブユニット mRNA、Arc、 β アクチンなどのアクチン線維の再編成に関わるタンパク質をコードする mRNA の他に、リボソームや翻訳制御因子が含まれる (Kanai et al., 2004)。輸送 RNP 中の RNA 結合タンパク質はどの RNA を RNP にリクルートするか決定するだけでなく、運搬中の RNA の翻訳抑制やシナプス刺激依存的な翻訳制御に働くことが報告されている。輸送 RNP に含まれる RNA 結合タンパク質は均一でないことから (Antar et al., 2005)、輸送 RNP は複数種存在してそれぞれに異なる性質をもつものと考えられる。輸送 RNP、ストレス顆粒、P ボディはいくつかのタンパク質を共有している。eIF4E、FMRP などはその例で、ストレス顆粒と輸送 RNP には存在するが P ボディには見られないタンパ

ク質 (G3BP) もある (Anderson & Kedersha, 2006)。mRNA のデキャッピング因子である DCP1 や RNA 分解酵素 XRN1 は P ボディにのみ存在して輸送 RNP やストレス顆粒には局在しない。このことは、輸送 RNP とストレス顆粒が性質的に似通った構造体であることを示唆している。これらにリクルートされた mRNA は、複合体を構成する因子のリモデリングによって、翻訳が抑制された状態で保管されるのか、複合体から放出されて翻訳されるのか、あるいは P ボディに受け渡されて分解されるのか、選別されると考えられている (Barbee et al., 2006; Cougot et al., 2008; Kedersha et al., 2005)。

4. 神経細胞における RNA 結合タンパク質の役割

RNA 結合タンパク質は RNP 顆粒を形成して RNA の輸送、安定性を制御するだけでなく、スプライシングや翻訳効率の制御を介して神経細胞の分化を制御することが示唆されている (Okano et al., 2002)。その代表例として、RRM をもつ Hu タンパク質と Musashi タンパク質が挙げられる。Musashi は神経系幹細胞や神経系前駆細胞で強く発現し (Kaneko et al., 2000; Nakamura et al., 1994; Sakakibara et al., 1996, 2001)、Hu は神経細胞への分化が決定された細胞や成熟神経細胞で高レベルに発現する (Okano & Darnell, 1997)。Musashi は mammalian-*numb* (以下 *m-numb*) 遺伝子の 3' UTR 上に存在する (G または A) UnAGU [n = 1~3] を基調とする標的配列に結合し、翻訳を抑制することで未分化能の維持に貢献する (Imai et al., 2001)。m-Numb は神経幹細胞の分化を抑制する Notch シグナル伝達経路の Notch に直接結合して拮抗することで神経細胞の分化を正に調節する (Wakamatsu et al., 1999)。Hu は HuA (HuR), HuB, HuC, HuD からなる相同性の高いファミリーを構成し、そのうち HuB, HuC, HuD は神経細胞特異的に発現する。Hu は標的 RNA の 3' UTR に存在する AU-rich element (ARE) に結合し、安定性あるいは翻訳を制御す

ると考えられている (Deschênes-Furry et al., 2006; Fukao et al., 2009)。この他にも神経特異的選択的スプライシングを制御する nPTB タンパク質、Nova1 タンパク質などの重要な RNA 結合タンパク質が同定されており (Boutz et al., 2007; Jensen et al., 2000)、また nPTB のスプライシングアイソフォームである PTB は 3' UTR 上のポリピリミジントラクトへの結合を介して標的 RNA の microRNA-124 への感受性を変化させ、神経分化を抑制するなど (Xue et al., 2013)、RNA 結合タンパク質を中心とした複雑な転写後制御ネットワークの存在が示唆されている。

5. 網膜神経節細胞

脊椎動物の網膜は発生学的に中枢神経系に属し、比較的単純な構造をとること、体表に突出して扱い易いことから中枢神経系の良いモデルとして考えられてきた。網膜は 5 種類の神経細胞、すなわち RGC、アマクリン細胞、双極細胞、水平細胞、視細胞からなり、これらの局在化によって脳に見られるような層構造を形成する (図 2)。網膜が受けた光情報は視細胞によって受容、神経シグナルに変換された後に、双極細胞を経て RGC に伝達される。RGC は細胞の成熟過程で軸索を脳の外側膝状体、大脳皮質視覚野へと伸展させ、標的細胞とシナプス結合を形成 (投射) する。網膜が処理した神経シグナルは RGC の軸索を介して脳へと伝達されるため、RGC は網膜の最終出力ニューロンであると言われる。水平細胞とアマクリン細胞は介在ニューロンに分類され、視細胞から RGC までの縦方向のシグナル経路を修飾する機能をもつ。それぞれの神経細胞は全く異なる形態や機能を有するが、これらは全て共通の前駆細胞に由来する。RGC は Math5 や Brn3a, Brn3b, Brn3c などの転写因子の働きによって神経前駆細胞から最初に分化し (Wang et al., 2002; Xiang et al., 1993)、Ephrin, Sema3D, Wnt3 などのガイダンス因子によってお互いの位置関係を保つ形で標的領域内

の細胞へと投射する (Erskine & Herrera, 2007)。このように、RGC の分化、成熟過程を制御する機構については多くの知見が得られている。しかしながら、RGC の網膜最終出力ニューロンとしての機能の背景にどのような分子基盤が存在し、またそれが RNA レベルでどのように制御されるかは明らかにされていない。RGC にはマウス由来の培養細胞株 (RGC-5 細胞) が樹立されており (Van Bergen et al., 2009)、PKC 阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の刺激によって神経様細胞への分化を誘導できることから (Wood et al., 2010)、生体や初代培養細胞では困難な分子レベルの機能解析も比較的簡便に行うことができる。

6. 本研究の概要

以上のように、RNA 結合タンパク質は神経細胞において重要な働きをもつことがわかっているが、機能が明らかになっているものはごく一部である。そこで私は網膜組織では RGC 特異的に発現する *Hermes* 遺伝子に着目した。HERMES は RGC において機能解析が行なわれた唯一の RNA 結合タンパク質である。しかしながらその分子機能は未知であり、HERMES がどのような転写後制御に関与するのかは謎に包まれている。HERMES の機能解析は、RGC で特異的に発現する RNA 結合タンパク質の機能を明らかにするだけでなく、RNA 結合タンパク質の細胞種特異性がどのような生理的意義をもつのかを理解する上で有益な知見をもたらすと期待される。

本研究では HERMES による転写後制御機構の解明を目標に、RGC-5 細胞を用いて分子生物学的機能解析を行なった。第二章では実験に用いた材料と実験方法を示す。第三章では実験結果について述べ、第四章では得られた結果をもとに HERMES の機能や RGC 特異的に発現する生理的意義について考察する。

第二章 材料と方法

1. 培養細胞

RGC-5 細胞と HeLa 細胞は 37 °C、5% CO₂ 条件下で 10% FBS、1% ペニシリン-ストレプトマイシンを加えた DMEM 培地（ナカライテスク）を用いて培養した。継代時はトリプシン-EDTA で細胞をはがし、5000 cell / cm² の細胞密度で播種した。神経様細胞への分化誘導には DMSO で希釈したスタウロsporin（シグマアルドリッチ）とトリコスタチン A（シグマ）を用いた。

2. プラスミド

pCS2, HA-HERMES

HA タグが導入された pCS2+ベクターに、RGC-5 細胞由来 cDNA を用いて PCR 増幅した HERMES ORF が XhoI / XbaI サイトで挿入されている。

mHermes F1 (5'-ORF) : CCCTCGAGATGAACGGCGGCGGCAAAGC

mHermes R2 (201, 3'-ORF) : GCTCTAGATCAGCAGAACTGCCGTGACT

pCS2, FLAG-HERMES

FLAG タグが導入された pCS2+ベクターに、RGC-5 細胞由来 cDNA を用いて PCR 増幅した HERMES ORF が EcoRI / XbaI サイトで挿入されている。

mHermes F2 (5'-ORF, EcoRI) : CGGAATTCATGAACGGCGGCGGCAAAGC

mHermes R2 (201, 3'-ORF) : GCTCTAGATCAGCAGAACTGCCGTGACT

pCS2, DsRed

当研究室で作成されたものを使用。

pCS2, DsRed-HERMES

pCS2, HA-HERMES を XhoI / NotI で切り出し、pCS2, DsRed プラスミドの XhoI / NotI サイトに挿入した。

pCS2, GFP

当研究室で作成されたものを使用。

pCS2, GFP-NonO

pCS2, GFP の XhoI / XbaI サイトに NonO ORF 配列を挿入した。

NonO ORF は RGC-5 細胞由来 cDNA と下記のプライマーを用いて PCR により増幅した。

NonO F1 : CCCTCGAGATGCAGAGCAATAAAGCCTT

NonO R1 : GCTCTAGACTAATATCGGCGGCGTTTAT

pCS2, FLAG-NLS-MS2 coat protein-EGFP-SV40

当研究室で作成されたものを使用。

3. トランスフェクション

QIAGEN 社の polyfect reagent を用いてトランスフェクションを行った。5000 cell / cm² で播種した細胞を 48 時間培養し、下の表に示す量のプラスミドを血清・抗生物質不含 DMEM 培地に懸濁して polyfect を加えた。Vortex で良く混ぜ、室温で 5 分インキュベートした後に、新しい培地に置換した細胞培養皿に添加した。

dish	plasmid (ug)	polyfect (ul)
12 well	0.75	2
10 cm	10	45

4. siRNA による遺伝子発現抑制実験

Dharmacon 社の Dharmafect 4 reagent を用いて siRNA のトランスフェクションを行った。12 well multiplate に 5000 cell / cm² で 播種した細胞を 24 時間培養し、終濃度 50 nM 分の siRNA (Dharmacon) と 1.2 ul の Dharmafect 4 を血清・抗生物質不含 DMEM 培地でそれぞれ 100 ul にメスアップし、よくピペティングして室温で 5 分静置した。これらを併せてピペティングで懸濁し、室温で 20 分静置した。抗生物質不含 DMED 培地で 1 ml にメスアップし、古い培地を除いた培養皿に添加して 48 時間培養した。STS 刺激による分化誘導、プラスミドのトランスフェクションは siRNA を導入してから 24 時間後に行った。6 well multiplate を用いる場合も同じ密度で細胞を播種し、同じ終濃度の siRNA を倍量の試薬で調製して細胞に添加した。

5. 細胞免疫染色

live cell imaging 同様トランスフェクション後 24 時間培養した細胞を準備し、PBS で 2 回洗い、3% ホルマリン / PBS で室温 15 分静置して固定した。PBS で 2 回洗浄後、0.1% Triton / PBS を加え、室温で 15 分静置した。PBS で 2 回洗浄し、ブロッキングエースで室温 30 分ブロッキングした。その後 2% BSA / PBS で希釈した一次抗体を細胞にマウントし、4 °C でオーバーナイト反応させた。一次抗体には、抗アセチル化チューブリン抗体 (1:5000, Developmental Studies Hybridoma Bank), 抗 NonO 抗体 (1:400, SIGMA), 抗 PSF 抗体 (1:200, SIGMA), 抗 G3BP1 抗体 (1:200, abcam), 抗 KIF5A 抗体 (1:200, Bethyl), 抗 PABP 抗体 (1:600, Abcam), 抗 hnRNP K 抗体 (1:500, Abcam) を用いた。

PBS で 3 回洗い、2% BSA / PBS で 500 倍希釈した Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG、Alexa Fluor® 546 goat anti-mouse IgG を細胞にマウントし、室温で 30 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄した後、Fluosavor (退色剤) をのせて封入した。細胞内の RNA はホルマリン固定した細胞を 500 nM SYTO RNASelect (Life Technologies) で室温、20 分インキュベートすることで染色し、脱膜、ブロッキングの後に一次抗体反応を行った。

6. 培養細胞からの RNA 回収

培養細胞からの total RNA 抽出は ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて行った。方法は推奨プロトコルに従った。

7. RT-PCR

RNA 溶液からの cDNA 合成は PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ) を用いてプロトコルに従って行った。PCR 反応は Ex taq ポリメラーゼを用い、そのプロトコルに従った。

HERMES qPCR 用プライマー

mHermes F1 : TTCAAGGGCTATGAAGGTTCTCTC

mHermes R1 : TTTGGAGTCCCTACGAGTTTGTTTC

8. 細胞抽出液の作成

PBS で細胞を 1 回洗浄し、1 ml PBS とともに細胞をスクレーパーではがしとって回収した。D バッファー [20mM HEPES-KOH (pH7.9), 50mM KCl, 200uM EDTA, 4% グリセロール] に細胞を懸濁し、超音波破碎を行うことで細胞破碎液を得た。これを 4 °C、15,000 rpm で 5 分遠心し、上清を細胞抽出液とした。

9. 免疫沈降

PBS で細胞を 1 回洗浄し、1 ml PBS とともに細胞をスクレーパーではがし
とって回収した。Complete Mini EDTA free(ロシュ)を加えた IP buffer [25 mM
Tris, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM EDTA, 5% グリセロール] 300 ul でペレ
ットを懸濁し、超音波破碎を行った (5sec sonication を 10 cycle)。これを 4 °C、
15,000 rpm で 5 分遠心し、上清を細胞抽出液とした。抗体 3 または 5 ug, protein
G / A beads 15 ul (Life Technologies) を 200 ul IP buffer に加え、4 °C で 30
分 rotate することで抗体-protein G / A beads 複合体を得た。抗体には抗 HA 抗
体 (Bethyl) , 抗 FLAG 抗体 (Sigma-Aldrich) , 抗 G3BP1 抗体を用いた。細
胞抽出液を加えて IP buffer で 500 ul にメスアップし、得られた抗体-ビーズ複
合体を加えて 4 °C で 1 時間 rotate した。IP buffer で 6 回洗浄した後、1 ml PBS
を加えてピペッティングにより懸濁した。500 ul ずつエッペンに分注し、30 ug
/ mL RNase A を 3 ul 加えて 4 °C、1.5 時間 rotate した。PBS で 2 回洗い、LDS
sample buffer を加えて 95 °C、5 分間熱変性処理を行った後に上清を回収して
ウェスタンブロッティングの泳動サンプルとした。免疫沈降のネガティブコン
トロールとして、抗体の代わりに normal mouse / rabbit IgG (SantaCruz)
を用い、RNase 処理のネガティブコントロールには当量の水を用いた。

10. ウェスタンブロッティング

細胞抽出液に LDS sample buffer を加えて 95 °C、5 分熱処理したサンプル、
または免疫沈降より得られた泳動サンプルを 10% SDS-PAGE で電気泳動し、
PVDF 膜に転写した。転写した PVDF 膜を 2% スキムミルクまたは 5%
EasyBlocker (GeneTex) / PBST でブロッキングし、ブロッキング剤で希釈
した一次抗体に反応させた。一次抗体には抗 FLAG 抗体 (1:1000) , 抗 NonO
抗体 (1:2000) , 抗 RBPMS 抗体 (SantaCruz, 1:200) , 抗 β -ACTIN 抗体 (Cell

Signaling Technology, 1:1000), 抗 G3BP1 抗体(1:1000), 抗 HA 抗体(1:5000) を用いた。PBST で 5 分、3 回洗浄後、ブロッキング剤で 2000 倍に希釈した HRP 標識二次抗体 (GE Healthcare, GeneTex) と反応させた。検出には Luminata Forte Western HRP substrate (ミリポア) を使用した。

11. 質量分析

免疫沈降から得られた IP サンプルを 10% SDS-PAGE で泳動し、Dodeca Silver Stain Kit, Small (Bio-Rad) を用いてプロトコルに従って染色した。MilliQ ですすいだカミソリでバンドを切り出し、神戸大学アイソトープセンターに質量分析を 外注した。

12. ゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は水温 28.5 °C、明期 14 時間、暗期 10 時間の条件で飼育した。受精卵は前日にゼブラフィッシュの雌雄を数匹ずつ同じ水槽にいれ、翌日の朝に採取し、その後、28.5 °C で発生させた。

13. ホールマウント免疫染色

ゼブラフィッシュ 48 時間胚を 4% PFA / PBS で室温 2 時間固定し、MeOH 置換した後に Protease K で処理して室温、1 時間、ブロックエース (DS ファーマバイオメディカル) でブロッキングした。500 倍希釈した抗 zHermes 抗体 (Kosaka et al., 2007) で 4 °C、オーバーナイト反応させた後、PBST で 30 分 4 回洗った。その後 1500 倍に希釈した Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (Life Technologies) で 4 °C オーバーナイト反応させ、10% スクロースに置換した後に Tissue-Tek O.C.T. Compound (SAKURA) に包埋して凍結サンプルを得た。これをクリオスタットで 10 um に薄切して蛍光顕微鏡下で観察した。

第三章 結果

1. zHermes はゼブラフィッシュ初期胚の網膜組織において RGC 特異的に発現する

Hermes が網膜組織において RGC 特異的に発現することを確認するため、当研究室でモデル動物として維持しているゼブラフィッシュを用いて Hermes のタンパク質レベルでの組織内局在を調べることにした。これまでに、受精後 39 時間 (39 hpf) のゼブラフィッシュ網膜で RGC 特異的な zHermes の発現が観察されており (Hörnberg et al., 2013)、また 48 hpf には視神経が確認できることから (Dooley & Zon, 2000)、本研究では 48 hpf のゼブラフィッシュ網膜から作成した凍結切片を用いて抗 zHermes 抗体と RGC のマーカーとして知られる抗 Zn-8 抗体による免疫染色を行った。結果、zHermes と Zn-8 の発現する層の一致が見られ、zHermes がゼブラフィッシュ初期胚において RGC 層特異的に発現することが確認できた (図 3)。

2. HERMES は RGC-5 細胞で恒常的に発現し、細胞質顆粒を形成する

RGC-5 細胞は非選択的プロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤スタウロsporin (以下 STS) の刺激により神経様の形質を獲得することが知られている (Wood et al., 2010)。そこで当研究室でも RGC-5 細胞の分化系を確立するため、論文で報告のある 316 nM STS で RGC-5 細胞を 24 時間刺激し、成熟した神経のマーカーとして知られる抗アセチル化チューブリン抗体を用いて免疫染色を行った。結果、RGC-5 細胞は STS 刺激下においてアセチル化修飾されたチューブリンを有する神経突起様の構造体を効率良く形成した (図 4A)。このことから私は 316 nM STS による 24 時間刺激が RGC-5 細胞の分化を誘導するのに十分であると結論付け、以後この条件で実験を行うこととした。Hermes 遺伝子の

発現レベルが細胞の分化状態によって変化するかを調べるために、STS で刺激した細胞（分化した RGC-5 細胞）と未刺激の細胞（未分化 RGC-5 細胞）の total RNA から cDNA を合成し、リアルタイム PCR による *Hermes* mRNA の定量を行った。結果、*Hermes* mRNA 量は細胞の分化状態に関わらず一定であることが示唆された（図 4B）。次に HERMES の細胞内局在を明らかにするため、DsRed を N 末端に融合した HERMES 組換えタンパク質（DsRed-HERMES）を RGC-5 細胞に強制発現させ、蛍光顕微鏡下で観察した（図 5A）。核は N 末端に核局在シグナルを付加した GFP（NLS-GFP）をコトランスフェクションすることで可視化した。コントロールとして DsRed 発現ベクターを用いた（図 5B）。細胞の分化状態に関わらず、HERMES は細胞質に局在して顆粒状の構造体を形成した。また、STS で分化を誘導した細胞では神経突起の先端にも HERMES 顆粒が観察された（図 5C 矢頭）。以上の結果は、HERMES が RGC-5 細胞の分化の前後で顆粒化して機能する可能性を示唆している。

3. *Hermes* 遺伝子発現抑制は RGC-5 細胞の生存を亢進する

STS は様々な細胞でアポトーシスを誘導することが知られており、本研究で RGC-5 細胞の分化誘導に用いた条件でもアポトーシスが惹起されることが報告されている（Schultheiss et al., 2012）。実際、STS で刺激した RGC-5 細胞では未刺激の細胞に比べて培養皿からの剥離が顕著になり、著しい生細胞数の減少が観察された（図 6A）。この細胞数の減少に HERMES が関与するか調べるため、siRNA で *Hermes* 遺伝子をノックダウンした RGC-5 細胞を STS で刺激し、生細胞数の計測を行った。結果、*Hermes* 遺伝子ノックダウンは STS による生細胞数の減少を是正することが明らかになった（図 6A）。また、STS で刺激しなかった RGC-5 細胞においても *Hermes* 遺伝子ノックダウンによる生細胞数の増加が観察された。siRNA をトランスフェクションした細胞について抗ア

セチル化チューブリン抗体による免疫染色を行ったところ、control siRNA と Hermes siRNA で同様の染色像が観察され、HERMES が RGC-5 細胞の分化に必須ではないことが示された (図 6B)。siRNA による *Hermes* 遺伝子のノックダウン効率は RT-PCR で確認した (図 6C)。

4. HERMES は STS 刺激によって RNA の介在なしに NonO と結合する

RGC-5 細胞における HERMES の分子機能を明らかにするために、HERMES と相互作用するタンパク質の同定を図 7 に示す方法で行った。まずは RGC-5 細胞に発現する全てのタンパク質から HERMES と結合する物だけを単離するために、N 末端に FLAG タグを融合した FLAG-HERMES 組換えタンパク質を RGC-5 細胞に強制発現させ、それらの細胞から抽出液を作成して抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行った。得られた免疫沈降物はポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分子量で分離した後に、銀染色で可視化した。未分化 RGC-5 細胞と分化した RGC-5 細胞の免疫沈降物の泳動パターンを比較した結果、分化した RGC-5 細胞特異的に HERMES に結合するタンパク質が得られた (図 8A)。それらは NonO (Non-POU Domain-Containing Octamer-Binding Protein) と PSF (Polypyrimidine Tract-Binding Protein-Associated-Splicing Factor) であることが質量分析より示唆された。図 7 の方法で得られた免疫沈降物について抗 NonO 抗体によるウェスタンブロッティングを行ったところ、NonO が STS 刺激下でのみ HERMES に結合すること、またその結合は RNase 処理による RNA 分解の影響を受けないことが明らかになった (図 8B)。以上のことは、STS 刺激をきっかけとして HERMES が NonO と直接的に相互作用することを示唆している。抗 PSF 抗体によるウェスタンブロッティングから HERMES が PSF と結合するという予備的な知見を

得ているが、非常に弱い相互作用であったために図には示さない。

5. HERMES と NonO は STS 刺激下で細胞質顆粒を形成し、神経突起で共局在する

NonO, PSF は核に局在するタンパク質で、機能未知の核内構造体パラスペクトルの構成因子として知られるほか、転写、スプライシング、mRNA の核内リテンションなどを制御することが報告されている (Shav-Tal & Zipori, 2002)。また、神経細胞の細胞質では mRNA の輸送に関与することが示唆されており、核だけでなく細胞質においても重要な役割を担うと考えられる (Kanai et al., 2004)。そこで、まずは RGC-5 細胞における NonO の細胞内局在を調べるために、抗 NonO 抗体による免疫染色を未分化 RGC-5 細胞と分化した RGC-5 細胞について行った (図 9A)。結果、NonO は未分化 RGC-5 細胞では核にのみ局在するが、分化した RGC-5 細胞では核に加えて細胞体や神経突起で顆粒状に局在することが明らかになった (図 9A 矢頭)。抗 NonO 抗体と抗 PSF 抗体を用いた免疫二重染色は、PSF が RGC-5 細胞の神経分化の前後で NonO と同様の局在様式をとり、この 2 つのタンパク質が核・細胞質を問わず常に共局在することを示した (図 9B)。次に、STS 刺激下で観察される NonO 顆粒が HERMES 顆粒と共局在するか調べるために、GFP 融合 NonO タンパク質 (GFP-NonO) と DsRed-HERMES を RGC-5 細胞に強制発現させて蛍光顕微鏡による観察を行った (図 9C)。大部分の未分化 RGC-5 細胞では GFP-NonO は内在性 NonO 同様に核にのみ局在したが、一部の細胞では核局在に加えて細胞質での顆粒形成も観察された。対して、DsRed-HERMES は細胞質に限定的に局在し、多くの細胞で GFP-NonO と DsRed-HERMES が相互排他的に局在することが観察された。STS 刺激によって分化した RGC-5 細胞では、DsRed-HERMES と GFP-NonO の顆粒が神経突起で観察され、それらは部分的に共局在することが

明らかになった (図 9C 矢頭)。さらに細胞内の RNA を SYTO® RNASelect で標識し、抗 NonO 抗体による免疫染色を行ったところ、STS 刺激によって形成された細胞質性の NonO 顆粒は RNA と共局在したことから、NonO 顆粒が RNA を含む複合体、すなわち RNP であることが示唆された (図 9D 矢頭)。以上の結果は、STS 刺激によって分化した RGC-5 細胞では、何らかの機構で NonO が細胞質に移行し、HERMES とともに RNP 顆粒を形成すること、しかし一方で、未分化 RGC-5 細胞においても強制発現させた NonO では細胞質へのミスローカリゼーションが起こりうることを示唆した。NonO の顆粒化や細胞内局在が HERMES によって制御されるか調べるために、*Hermes* 遺伝子と機能的な重複が疑われる *Hermes2* (一般に *Rbpms2* として知られる) 遺伝子の発現を siRNA で抑制した RGC-5 細胞に GFP-NonO を強制発現させ、蛍光観察を行った。結果、*Hermes* 遺伝子の発現抑制は、細胞の分化状態に関わらず、GFP-NonO の顆粒化と細胞内局在に影響を及ぼさなかった (図 10A, B)。siRNA による遺伝子発現抑制効果は、*Hermes* と *Hermes2* のそれぞれに特異的なプライマーを用いた RT-PCR と HERMES と HERME2 の両方に反応する抗 RBPMS 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって確認した (図 11)。以上の結果から、NonO の顆粒化や局在の制御に HERMES は必須ではないことが示唆された。

6. HERMES と NonO は STS 刺激下でストレス顆粒マーカである G3BP1 と相互作用する

近年、ヒト胎児由来腎臓細胞 (HEK293 細胞) を用いた解析により、HERMES はストレス条件下で G3BP1 と共局在することが示された (Farazi et al., 2014)。G3BP1 はストレス顆粒 (以下 SG) と呼ばれる多数の RNA 結合タンパク質と RNA からなる細胞質構造体の主要な構成因子であり、SG の形成に重要な役割をもつことが示唆されている (Matsuki et al., 2013; Vanderweyde et al.,

2013)。HERMES が RGC-5 細胞においても G3BP1 と相互作用するか調べるため、HA タグ付き HERMES 組換えタンパク質 (HA-HERMES) を RGC-5 細胞に強制発現させ、細胞抽出液を作成して抗 HA 抗体による免疫沈降を行なった。得られた免疫沈降物について抗 G3BP1 抗体と抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行なった結果、RGC-5 細胞の分化状態にかかわらず、G3BP1 と HERMES の間には常に弱い相互作用があることが明らかになった (図 12A)。この相互作用は RNase A 処理によってしばしば減弱したことから、RNA が部分的に介在する可能性が示唆された。同じ実験をヒト子宮頸癌由来培養細胞株 (HeLa 細胞) を用いて行なったところ、RGC-5 細胞同様に HA-HERMES と G3BP1 の相互作用が同定できたが、RNA を介さない点が異なっていた (図 12B)。これらの結果は、HERMES と G3BP1 の相互作用がどのような細胞でも起こりうることを示唆している。

次に、G3BP1 と NonO の相互作用を調べるために、未分化・分化した RGC-5 細胞から細胞抽出液を作成し、抗 G3BP1 抗体を用いて免疫沈降を行なった。結果、内在性 G3BP1 と NonO は STS による分化誘導の有無にかかわらず、常に相互作用することが明らかになった (図 13A)。RNase によって RNA を取り除いた後も G3BP1-NonO の結合は維持されたことから、この 2 つのタンパク質は RNA を介さず直接的に相互作用すると考えられた。G3BP1 と NonO が RGC-5 細胞において共局在するか調べるため、抗 G3BP1 抗体と抗 NonO 抗体を用いた免疫二重染色を STS で刺激した細胞と未刺激の細胞について行なった。結果、G3BP1 は未分化 RGC-5 細胞においては核と細胞質に一樣に存在したが、分化した RGC-5 細胞では細胞体や神経突起に顆粒を形成して局在することが観察された (図 13B 矢頭)。この細胞質の G3BP1 顆粒は NonO 顆粒と共局在した。以上の結果は、STS 刺激による分化誘導をきっかけとして、HERMES が NonO と相互作用することで HERMES, NonO, G3BP1 を構成因子とする細胞質 RNP

顆粒が形成されることを示唆している。

7. HERMES-NonO-G3BP1 RNP 顆粒はストレス顆粒ではない

SG は細胞がストレスに曝されたときに形成される構造体で、mRNA の安定化や翻訳抑制に働くと考えられている (Anderson & Kedersha, 2006; Buchan & Parker, 2009)。本研究で見出した細胞質性の HERMES-NonO-G3BP1 RNP 顆粒は SG なのか、あるいは G3BP1 を含む SG 以外の RNP なのかを検証するために、ストレス条件下においた RGC-5 細胞について抗 NonO 抗体と抗 G3BP1 抗体による免疫二重染色を行なった。細胞ストレスの誘導には亜ヒ酸と H_2O_2 を用いた。結果、亜ヒ酸、 H_2O_2 で処理したいずれの RGC-5 細胞においても細胞質に G3BP1 顆粒が観察され、SG の形成に十分な細胞ストレスが加わったことが示唆された (図 14 矢頭)。一方 NonO の局在は核に限定されており、細胞質における NonO 顆粒の形成は認められなかった (図 14)。この結果は NonO を構成因子とする細胞質 RNP 顆粒が細胞ストレスに応答して形成される構造体ではないことを示しており、HERMES-NonO-G3BP1 RNP 顆粒が SG ではないことを示唆している。

8. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A による分化誘導刺激によっても HERMES-NonO-G3BP1 RNP 顆粒は形成される

これまでの結果から、HERMES は STS の刺激下で NonO, G3BP1 と細胞質 RNP 顆粒を形成する可能性があることが明らかになった。しかしながら HERMES-NonO-G3BP1 RNP 顆粒の形成に STS がどのように作用するかは未知であり、STS によって RGC-5 細胞に神経分化が誘導された結果この RNP 顆粒が形成されるのか、あるいは STS が PKC などの細胞内酵素を阻害したためにこのような構造体が副産物として生まれるのかは検討すべき問題である。そ

ここで、STS とは異なる機序で RGC-5 細胞に神経分化を誘導すると考えられているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A (TSA) を用いて RGC-5 細胞を処理し (Kim et al., 2012; Schwechter et al.)、抗 NonO 抗体と抗 G3BP1 抗体による免疫二重染色を行なった。結果、TSA 刺激によって神経分化した RGC-5 細胞では細胞質性の NonO, G3BP1 顆粒が観察され、それらが神経突起においても共局在することが示された (図 15A 矢頭)。また DsRed-HERMES と GFP-NonO を強制発現させた RGC-5 細胞では、TSA 刺激による GFP-NonO の細胞質移行が観察され、神経突起において GFP-NonO 顆粒と DsRed-HERMES 顆粒が共局在することが明らかになった (図 15B 矢頭)。以上の結果は STS 刺激下で得られた HERMES, NonO, G3BP1 の挙動と一致しており、HERMES-NonO-G3BP1 RNP 顆粒が RGC-5 細胞の神経分化に関連して形成される細胞質顆粒であることを強く示唆している。

9. HERMES-NonO-G3BP1 RNP 顆粒は神経細胞特異的に形成される輸送 RNP である

最後に、神経細胞でない細胞を STS で刺激しても HERMES-NonO-G3BP1 RNP 顆粒が細胞質に形成されるか検討した。RGC-5 細胞と同じ条件で刺激した HeLa 細胞を抗 NonO 抗体と抗 G3BP1 抗体で免疫二重染色し、観察を行なった。結果、STS で刺激していないコントロールの HeLa 細胞と同様に、STS で刺激した HeLa 細胞の NonO は核に限定的に局在し、G3BP1 は核と細胞質に一様に局在した (図 16A)。一方、亜硫酸処理によってストレスを与えた HeLa 細胞では細胞質に G3BP1 顆粒が観察できたことから (図 16A 矢頭)、実験に使用した HeLa 細胞は細胞質 RNP 顆粒を形成し得る細胞であることが示された。これらの結果は、非神経細胞である HeLa 細胞を STS で刺激しても、分化した RGC-5 細胞で見られるような細胞質性の NonO, G3BP1 顆粒は形成されないことを示

している。

HeLa 細胞は Hermes 遺伝子の発現が低い細胞であると言われている (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RPMS>)。先の実験で NonO と G3BP1 が細胞質顆粒を形成しなかったのは、HERMES の発現量が不十分であったからである可能性がある。そこで HeLa 細胞に DsRed-HERMES と GFP-NonO を強制発現させ、HERMES の存在が NonO の細胞内局在にどのような影響を及ぼすか検討した。結果、STS で刺激しなかった HeLa 細胞では DsRed-HERMES は細胞質に、GFP-NonO は核に局在して顆粒を形成することが示された (図 16B)。また STS で刺激した細胞では DsRed-HERMES と GFP-NonO の顆粒化は認められなかったが、それぞれが細胞質と核に局在して細胞内で住み分けていることが観察できた (図 16B)。STS で刺激した HeLa 細胞では、細胞状態の悪化が原因であると思われる著しいトランスフェクション効率の低下が見られ、これにより DsRed-HERMES と GFP-NonO の顆粒化が妨げられたものと考えられる。以上の結果から、HERMES が十分に存在する HeLa 細胞においても STS 刺激誘導性の細胞質 NonO, G3BP1 顆粒は形成されないことが明らかになり、HERMES-NonO-G3BP1 顆粒は神経細胞特異的に形成される細胞質 RNP 顆粒であることが示唆された。

これまでに NonO がキネシンスーパーファミリータンパク質 (KIF) に属する分子モータータンパク質 KIF5 と相互作用して輸送 RNP の一因として振る舞う可能性が示唆されている (Kanai et al., 2004)。そこで、HERMES-NonO-G3BP1 RNP 顆粒と KIF5 との相互作用を検証するために、G3BP1 と KIF5 の神経特異的アイソフォームである KIF5A に対する抗体を用いて RGC-5 細胞の免疫二重染色を行った。結果、KIF5A は分化した RGC-5 細胞の神経突起で G3BP1 と共局在することが明らかになり、HERMES-NonO-G3BP1 RNP 顆粒が KIF5 と相互作用する可能性が示唆され

た (図 17 矢頭)。

さらに、ストレス顆粒や輸送 RNP の構成因子としてこれまでに報告されている hnRNP K, PABP, STAU1, SMN, TIA-1 が HERMES-NonO-G3BP1 顆粒に含まれるかを免疫二重染色によって検証した (Anderson & Kedersha, 2006; Torvund-Jensen et al., 2014)。結果、NonO と hnRNP K、PABP と G3BP1 は RGC-5 細胞の分化状態によらず非常に良く似た局在をとり、STS 刺激下では hnRNP K, PABP の顆粒が NonO, G3BP1 の顆粒と神経突起でそれぞれ共局在することが示された (図 18A, B 矢頭)。また、hnRNP K 顆粒と PABP 顆粒の神経突起における共局在も観察された (図 18C)。これらは、hnRNP K, PABP が HERMES-NonO-G3BP1 RNP 顆粒の構成因子であることを示唆している。

以上の結果から考えられるスキーム図を図 19 に示す。

第四章 考察

1. HERMES は RGC-5 細胞の細胞質において顆粒を形成する

HERMES は、RGC-5 細胞の分化状態にかかわらず、常に細胞質で顆粒を形成した。しかしながら NonO, PSF, hnRNP K は分化した細胞の HERMES 顆粒にのみ含まれることが示唆され、HERMES 顆粒を構成する因子が分化の前後で均一ではないことが明らかになった。このことから、HERMES は細胞の分化状態に応じて性質の異なる顆粒を形成する可能性が考えられる。本研究では、STS や TSA で刺激していない細胞を『未分化細胞』、これらの化合物刺激によって神経突起を形成した細胞を『分化した細胞』と定義づけている。これは RGC-5 細胞の分化条件を検討した論文に則ってのことであるが (Wood et al., 2010)、ここでいう『未分化』な状態とは、生体内ではどのような状態に相当するのだろうか。未分化 RGC-5 細胞において、RGC の分化後に発現する転写因子 Brn3a が発現していることを RT-PCR で確認しており (データ示さず)、またツメガエル網膜では *hermes* mRNA は RGC の分化直後から発現し始めること (Hörnberg et al., 2013)、RGC-5 細胞において *Hermes* mRNA は分化状態によらず一定のレベルで発現したことをふまえると、未分化 RGC-5 細胞は細胞運命を決定づけられる前の細胞ではなく、ある程度分化が進行した細胞であると考えられる。Hörnberg らの論文は、ツメガエル RGC の成長円錐に xHermes 顆粒が存在することを示しており、本研究で同定した HERMES 顆粒が培養細胞でのみ形成されるアーチファクトではないこと、生体においても HERMES-NonO-G3BP1 RNP 顆粒が形成される可能性があることを強く示唆している。

NonO は分化誘導刺激によって最もダイナミックに局在が変化した HERMES 顆粒構成因子である。未分化な RGC-5 細胞では NonO は核に限定的に局在するが、分化した RGC-5 細胞では核に加えて細胞質にも局在するようになる。NonO

の細胞質局在を示した論文はこれまでになく、KIF との生化学的な相互作用から輸送 RNP の構成因子である可能性が示唆されていたのみである (Cambray et al., 2009; Kanai et al., 2004)。NonO を一員とする輸送 RNP と KIF の相互作用には、RRM 型の RNA 結合ドメインをもつセリン/スレオニンキナーゼ KIS の介在が示唆されている (Cambray et al., 2009)。では、STS や TSA による分化誘導刺激は、どのようにして NonO の細胞質への移行を誘導したのであろうか。考えられる可能性の一つに、NonO の核外輸送の亢進がある。hnRNP K は核局在シグナルと nucleocytoplasmic shuttling (NS) ドメインを併せ持つ RNA 結合タンパク質で (Michael et al., 1997)、ERK (extracellular signal-regulated kinase) による NS ドメイン内のセリン残基のリン酸化によって細胞質に移行し、翻訳抑制に働く (Michael et al., 1997)。hnRNP K は未熟な神経細胞では核に限定的に局在するが、成熟した神経細胞では核と細胞質の両方に局在する (Liu et al., 2008)。これらは、神経細胞の成熟にともなう細胞内シグナルの変化が hnRNP K の細胞質移行を誘導することを示唆している。NonO は、このような神経分化にともなって核から細胞質に移行する因子と相互作用することで、積極的に核外に輸送されているのかもしれない。NonO の局在と核外輸送の関係は、代表的な核外輸送受容体である CRM1/Exportin1 をレプトマイシン B で阻害した細胞に分化誘導刺激を加え、NonO の細胞内局在を観察することで検討したい。

2. 細胞質 HERMES 顆粒の機能

1. で述べた通り、HERMES 顆粒を構成する因子は細胞の一生を通じて均一ではない。神経突起を伸長する前 (未分化 RGC-5 細胞) では NonO, PSF, hnRNP K を含まない顆粒を、神経突起伸長後 (分化した RGC-5 細胞) ではこれらのタンパク質に加えて RNA を含む顆粒を形成する。このことは、HERMES 顆粒の機能が神経突起を伸長する前 (未分化 RGC-5 細胞) と神経突起伸長後 (分化した

RGC-5 細胞) で異なる可能性を示唆している。ここからは、これらの顆粒の機能について考察する。

本研究で私は、RGC-5 細胞の神経突起伸長に関連して、HERMES が NonO, PSF, G3BP1 とともに細胞質 RNP 顆粒を形成することを見出した。この顆粒は神経細胞で特異的に形成され、KIF5A との相互作用を介して神経突起に移動、局在化することが示唆された。KIF5A は神経特異的に発現するモータータンパク質で (Kanai et al., 2000)、アミロイド前駆体タンパク質やアポリポタンパク質 E 受容体 2 を乗せた輸送担体を軸索に輸送し、AMPA 型受容体を含む輸送担体や mRNA-タンパク質複合体 (mRNP) を樹状突起に輸送することが報告されている (Kamal et al., 2000; Kanai et al., 2004; Setou et al., 2002; Verhey et al., 2001)。これらの知見は、HERMES-NonO-G3BP1 RNP 顆粒が樹状突起に mRNA を輸送する輸送 RNP であることを強く示唆している。HERMES 輸送 RNP はどのようにして KIF5A と相互作用するのだろうか。NonO と KIF5A は RNA を介して間接的に結合することがこれまでに示唆されていることから、HERMES 輸送 RNP と KIF5A を直接的に結びつける因子は NonO ではないと推測される (Kanai et al., 2004)。HERMES 輸送 RNP がどのような RNA を輸送するかは明らかになっていない。しかしながら HERMES 輸送 RNP の構成因子である PSF は、3' UTR 配列を介して *CamK II α* mRNA を樹状突起に輸送することが示唆されているため (Kanai et al., 2004)、HERMES RNP が *CamK II α* mRNA を輸送する可能性は十分に考えられる。一般に、輸送 RNP に含まれる mRNA は、異所的な翻訳を防ぐために翻訳抑制状態におかれる。また HERMES 輸送 RNP は翻訳抑制の場として働くストレス顆粒の主要な構成因子を内包することから、HERMES 輸送 RNP は『翻訳抑制』という性質をもつ顆粒であることが強く示唆される。

以上のように、HERMES 顆粒は分化した RGC-5 細胞において輸送 RNP として機能する。しかしながら、HERMES, NonO, G3BP1 の細胞質における局在は完

全に一致するわけではなく、未分化 RGC-5 細胞で形成されるような NonO を含まない HERMES 顆粒も細胞質中に存在すると考えられる。では、NonO を含まない HERMES 顆粒はどのような機能をもつのだろうか。

siRNA によって *Hermes* 遺伝子の発現を抑制した RGC-5 細胞の集団では、細胞の分化状態にかかわらず、野生型の細胞集団と比較して常に細胞数が増加することが明らかになった。この結果は、HERMES が RGC-5 細胞の増殖を負に、あるいは細胞死を正に制御することを示唆している。HERMES 顆粒はこれらの調節因子をコードする mRNA をリクルートして翻訳のタイミングや安定性を決定する場として働き、恒常的に細胞増殖や細胞死の制御に貢献する可能性がある。また、HERMES がタンパク質間相互作用によって調節因子そのものを顆粒内に取り込み、それらの機能を時空間的に制限することも考えられる。

3. HERMES が RGC 特異的に発現する意義

HERMES はなぜ RGC 特異的に発現するのだろうか。以下にいくつか仮説を立てて考察する。

1. HERMES は RNP 顆粒を構成する RNA に RGC 特異性を形成する

HEK293T 細胞を用いた CLIP-seq 解析は、HERMES が多種多様な RNA に結合することを示した (Farazi et al., 2014)。これは、HERMES 自体の RNA に対する特異性が決して高くないことを示唆している。では HERMES 顆粒は、HERMES が結合し得る RNA が寄せ集まってできた、機能的に関連のない RNA とタンパク質の複合体なのだろうか。おそらくそうではない。HERMES 輸送 RNP を例に考えてみると、この顆粒には樹状突起に輸送されるべき RNA が含まれ、関係のない RNA は含まれないはずである。このような RNA の選択性はどのようにして形成されるのだろうか。

スプライシング反応を制御する RNA 結合タンパク質 RBFOX と筋特異的 RNA 結合タンパク質 SUP-12 は、それぞれの認識配列がグアニン 1 塩基を挟んで隣り合う領域において安定な複合体を形成し、11 塩基からなる配列を正確に認識することで *egl-15* mRNA 前駆体の筋特異的選択的スプライシングに貢献する (Kuwasako et al., 2014)。このことは、特異的かつ多様性の高い RNA 認識の背景に、複数の RNA 結合タンパク質の協働があることを示唆している。HERMES 顆粒では HERMES と他の RNA 結合タンパク質との協働によって顆粒にリクルートされるべき RNA が選別され、結果として顆粒を構成する RNA に RGC 特異性が形成されると考えられる。KIF5 と相互作用する輸送 RNP には少なくとも 40 種のタンパク質が含まれることから (Kanai et al., 2004)、HERMES と協働する RNA 結合タンパク質は 1 つではないことが予想される。RGC では、HERMES との相互作用を基点として、RNA 結合タンパク質による遺伝子発現制御ネットワークが RGC 特異的な様式に変成されているのかもしれない。

2. HERMES は RGC 軸索が脳に到達するまでの過程を保障する

網膜を構成する神経細胞の中で、長距離投射をする細胞は RGC だけである。HERMES はこの RGC 特異的な投射に必要なのだろうか。*hermes* 遺伝子の発現をアンチセンスモルフォリノオリゴで抑制したゼブラフィッシュとツメガエルでは、RGC の軸索ブランチングの複雑性は低下するものの標的細胞への軸索伸長は正常に行われる (Hörnberg et al., 2013)。本研究でも siRNA による *Hermes* 遺伝子発現抑制が RGC-5 細胞の神経突起伸長に目に見える影響を及ぼさないという結果を得ており、HERMES は RGC の標的細胞への軸索伸長に関与しないことが示唆される。よってこの仮説は棄却できる。

3. HERMES は RGC の軸索ブランチングを制御する

軸索ブランチングの過程では、ダイナミックなブランチの付加と刈り込みが観察される。アンチセンスモルフォリノオリゴによって *hermes* 遺伝子の発現を抑制したゼブラフィッシュとツメガエルでは、RGC の軸索ブランチの付加が抑制されることがわかっている。一方で、付加されたブランチの刈り込みには影響が見られなかったことから、Hermes はブランチの付加を制御する機構で何らかの機能をもつと考えられる。RRM より C 末端側の領域を削った変異型 Hermes においても同様の抑制効果が得られたことから、Hermes は C 末端領域を介して何らかの因子と相互作用することで軸索ブランチングを制御することが示唆される。

ブランチの付加には、細胞外シグナル因子による細胞骨格の再編成が誘導される必要がある。RGC の軸索ブランチングを惹起する細胞外シグナル因子としては Netrin-1 や BDNF (brain-derived neurotrophic factor) が挙げられ (Manitt et al., 2009)、これらの刺激は ENA/VASP (enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein) によるアクチンフィラメントの伸長促進に重要であることが示唆されている (Bear & Gertler, 2009; Lebrand et al., 2004)。ENA/VASP の欠失はツメガエル RGC の軸索ブランチングを減少させる (Dwivedy et al., 2007)。この他にも軸索ブランチングを制御する因子が多数同定されており (Kalil & Dent, 2014)、HERMES はそれらの因子を転写後レベルで制御することで正常な軸索ブランチングを保障するのかもしれない。

4. 今後の課題

本研究では、これまで謎に包まれていた HERMES の分子機能を理解する上で重要な知見を得ることができた。しかしながら、HERMES 輸送 RNP がどのような RNA を神経突起に輸送するかは明らかにできていない。また今回同定した NonO, G3BP1 を構成因子とする HERMES 輸送 RNP が生体 RGC にも存在するかは確認できていない。加えて、未分化 RGC-5 細胞で形成される NonO を含まない HERMES 顆粒の機能は未解明である。今後はモデル生物を用いた解析を検討するとともに、RGC-5 細胞の分化の前後で HERMES 顆粒に含まれる RNA とタンパク質を免疫沈降によって回収し、それらを次世代シーケンサーや質量分析によって網羅的に同定することで HERMES による転写後遺伝子発現制御の実体を明らかにしたい。

謝辞

本研究は多くの方のお力添えのもと進めることができました。井上邦夫教授、坂本博教授、高崎輝恒特命助教、ラボの皆様、ゼブラフィッシュ網膜の免疫染色に力を注いでくださった 2013 年度卒業生の佐竹祥子さんには心からお礼を申し上げます。また RGC-5 細胞を提供してくださった神戸大学医学部眼科教室の金森先生、明石先生、HeLa 細胞を提供してくださった神戸大学バイオシグナル研究センターの鎌田先生、マウス網膜を提供してくださった生物学専攻の森田先生、マウス脳を提供してくださった生物学専攻の前川先生にもこの場を借りてお礼申し上げます。

最後になりましたが、自分勝手な私を優しく受け入れてくれた両親、弟、夫に心から感謝します。

参考文献

- Anderson, P., & Kedersha, N. (2006). RNA granules. *J. Cell Biol.* **172**, 803–808.
- Antar, L.N., Dichtenberg, J.B., Plociniak, M., Afroz, R., & Bassell, G.J. (2005). Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes, Brain Behav.* **4**, 350–359.
- Barbee, S.A., Estes, P.S., Cziko, A.-M., et al. (2006). Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* **52**, 997–1009.
- Bear, J.E., & Gertler, F.B. (2009). Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. *J. Cell Sci.* **122**, 1947–1953.
- Van Bergen, N.J., Wood, J.P.M., Chidlow, G., Trounce, I.A., Casson, R.J., Ju, W.-K., Weinreb, R.N., & Crowston, J.G. (2009). Recharacterization of the RGC-5 retinal ganglion cell line. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 4267–4272.
- Boutz, P.L., Stoilov, P., Li, Q., Lin, C.-H., Chawla, G., Ostrow, K., Shiue, L., Ares, M., & Black, D.L. (2007). A post-transcriptional regulatory switch in polypyrimidine tract-binding proteins reprograms alternative splicing in developing neurons. *Genes Dev.* **21**, 1636–1652.
- Buchan, J.R., & Parker, R. (2009). Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol. Cell* **36**, 932–941.

- Cambray, S., Pedraza, N., Rafel, M., Garí, E., Aldea, M., & Gallego, C. (2009). Protein kinase KIS localizes to RNA granules and enhances local translation. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 726–735.
- Cougot, N., Bhattacharyya, S.N., Tapia-Arancibia, L., Bordonné, R., Filipowicz, W., Bertrand, E., & Rage, F. (2008). Dendrites of mammalian neurons contain specialized P-body-like structures that respond to neuronal activation. *J. Neurosci.* **28**, 13793–13804.
- Deschênes-Furry, J., Perrone-Bizzozero, N., & Jasmin, B.J. (2006). The RNA-binding protein HuD: a regulator of neuronal differentiation, maintenance and plasticity. *Bioessays* **28**, 822–833.
- Dooley, K., & Zon, L.I. (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 252–256.
- Dwivedy, A., Gertler, F.B., Miller, J., Holt, C.E., & Lebrand, C. (2007). Ena/VASP function in retinal axons is required for terminal arborization but not pathway navigation. *Development* **134**, 2137–2146.
- Erskine, L., & Herrera, E. (2007). The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Dev. Biol.* **308**, 1–14.
- Farazi, T. a, Leonhardt, C.S., Mukherjee, N., et al. (2014). Identification of the RNA recognition element of the RBPMS family of RNA-binding proteins and their transcriptome-wide mRNA targets. *RNA* **20**, 1090–1102.

Fukao, A., Sasano, Y., Imataka, H., Inoue, K., Sakamoto, H., Sonenberg, N., Thoma, C., & Fujiwara, T. (2009). The ELAV protein HuD stimulates cap-dependent translation in a Poly(A)- and eIF4A-dependent manner. *Mol. Cell* **36**, 1007–1017.

Gerber, W. V., Yatskievych, T.A., Antin, P.B., Correia, K.M., Conlon, R.A., & Krieg, P.A. (1999). The RNA-binding protein gene, hermes, is expressed at high levels in the developing heart. *Mech. Dev.* **80**, 77–86.

Gerber, W. V., Vokes, S.A., Zearfoss, N.R., & Krieg, P.A. (2002). A role for the RNA-binding protein, hermes, in the regulation of heart development. *Dev. Biol.* **247**, 116–126.

Hörnberg, H., Wollerton-van Horck, F., Maurus, D., Zwart, M., Svoboda, H., Harris, W. a., & Holt, C.E. (2013). RNA-binding protein Hermes/RBPMS inversely affects synapse density and axon arbor formation in retinal ganglion cells in vivo. *J. Neurosci.* **33**, 10384–10395.

Imai, T., Tokunaga, A., Yoshida, T., Hashimoto, M., Mikoshiba, K., Weinmaster, G., Nakafuku, M., & Okano, H. (2001). The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3888–3900.

Jensen, K.B., Dredge, B.K., Stefani, G., Zhong, R., Buckanovich, R.J., Okano, H.J., Yang, Y.Y., & Darnell, R.B. (2000). Nova-1 regulates neuron-specific alternative splicing and is essential for neuronal viability. *Neuron* **25**, 359–371.

Kalil, K., & Dent, E.W. (2014). Branch management: mechanisms of axon branching in the developing vertebrate CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 7–18.

- Kamal, A., Stokin, G.B., Yang, Z., Xia, C.-H., & Goldstein, L.S.. (2000). Axonal Transport of Amyloid Precursor Protein Is Mediated by Direct Binding to the Kinesin Light Chain Subunit of Kinesin-I. *Neuron* **28**, 449–459.
- Kanai, Y., Okada, Y., Tanaka, Y., Harada, A., Terada, S., & Hirokawa, N. (2000). KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons. *J. Neurosci.* **20**, 6374–6384.
- Kanai, Y., Dohmae, N., & Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**, 513–525.
- Kaneko, Y., Sakakibara, S., Imai, T., Suzuki, A., Nakamura, Y., Sawamoto, K., Ogawa, Y., Toyama, Y., Miyata, T., & Okano, H. (2000). Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev. Neurosci.* **22**, 139–153.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., & Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* **169**, 871–884.
- Kim, Y.-H., Chang, Y., & Jung, J.-C. (2012). Staurosporine induces ganglion cell differentiation in part by stimulating urokinase-type plasminogen activator expression and activation in the developing chick retina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **423**, 67–72.

- Kosaka, K., Kawakami, K., Sakamoto, H., & Inoue, K. (2007). Spatiotemporal localization of germ plasm RNAs during zebrafish oogenesis. *Mech. Dev.* **124**, 279–289.
- Kuwasako, K., Takahashi, M., Unzai, S., et al. (2014). RBFOX and SUP-12 sandwich a G base to cooperatively regulate tissue-specific splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 778–786.
- Lebrand, C., Dent, E.W., Strasser, G.A., Lanier, L.M., Krause, M., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., & Gertler, F.B. (2004). Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. *Neuron* **42**, 37–49.
- Lim, J., Hao, T., Shaw, C., Patel, A.J., Szabó, G., Rual, J.F., Fisk, C.J., Li, N., Smolyar, A., Hill, D.E., Barabási, A.L., Vidal, M., & Zoghbi, H.Y. (2006). A Protein-Protein Interaction Network for Human Inherited Ataxias and Disorders of Purkinje Cell Degeneration. *Cell* **125**, 801–814.
- Liu, Y., Gervasi, C., & Szaro, B.G. (2008). A crucial role for hnRNP K in axon development in *Xenopus laevis*. *Development* **135**, 3125–3135.
- Manitt, C., Nikolakopoulou, A.M., Almarino, D.R., Nguyen, S.A., & Cohen-Cory, S. (2009). Netrin participates in the development of retinotectal synaptic connectivity by modulating axon arborization and synapse formation in the developing brain. *J. Neurosci.* **29**, 11065–11077.
- Matsuki, H., Takahashi, M., Higuchi, M., Makokha, G.N., Oie, M., & Fujii, M. (2013). Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. *Genes Cells* **18**, 135–146.

Michael, W.M., Eder, P.S., & Dreyfuss, G. (1997). The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J.* **16**, 3587–3598.

Nakamura, M., Okano, H., Blendy, J.A., & Montell, C. (1994). Musashi, a neural RNA-binding protein required for Drosophila adult external sensory organ development. *Neuron* **13**, 67–81.

Okano, H.J., & Darnell, R.B. (1997). A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. *J. Neurosci.* **17**, 3024–3037.

Okano, H., Imai, T., & Okabe, M. (2002). Musashi: a translational regulator of cell fate. *J. Cell Sci.* **115**, 1355–1359.

Sakakibara, S., Imai, T., Hamaguchi, K., Okabe, M., Aruga, J., Nakajima, K., Yasutomi, D., Nagata, T., Kurihara, Y., Uesugi, S., Miyata, T., Ogawa, M., Mikoshiba, K., & Okano, H. (1996). Mouse-Musashi-1, a neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev. Biol.* **176**, 230–242.

Sakakibara, S., Nakamura, Y., Satoh, H., & Okano, H. (2001). Rna-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS. *J. Neurosci.* **21**, 8091–8107.

Schultheiss, M., Schnichels, S., Miteva, K., Warstat, K., Szurman, P., Spitzer, M.S., & Van Linthout, S. (2012). Staurosporine-induced differentiation of the RGC-5 cell line leads to apoptosis and cell death at the lowest differentiating concentration. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **250**, 1221–1229.

Schwechter, B.R., Millet, L.E., & Levin, L.A. Histone Deacetylase Inhibition – Mediated Differentiation of RGC-5 Cells and Interaction with Survival. , doi: 10.1167/iovs.06-1364.

Setou, M., Seog, D.-H., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M., & Hirokawa, N. (2002). Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* **417**, 83–87.

Shav-Tal, Y., & Zipori, D. (2002). PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett.* **531**, 109–114.

Song, H.-W., Cauffman, K., Chan, A.P., Zhou, Y., King, M. Lou, Etkin, L.D., & Kloc, M. (2007). Hermes RNA-binding protein targets RNAs-encoding proteins involved in meiotic maturation, early cleavage, and germline development. *Differentiation.* **75**, 519–528.

Sun, Y., Ding, L., Zhang, H., Han, J., Yang, X., Yan, J., Zhu, Y., Li, J., Song, H., & Ye, Q. (2006). Potentiation of Smad-mediated transcriptional activation by the RNA-binding protein RBPMS. *Nucleic Acids Res.* **34**, 6314–6326.

Torvund-Jensen, J., Steengaard, J., Reimer, L., Fihl, L.B., & Laursen, L.S. (2014). Transport and translation of MBP mRNA is regulated differently by distinct hnRNP proteins. *J. Cell Sci.* **127**, 1550–1564.

Vanderweyde, T., Youmans, K., Liu-Yesucevitz, L., & Wolozin, B. (2013). Role of stress granules and RNA-binding proteins in neurodegeneration: a mini-review. *Gerontology* **59**, 524–533.

Verhey, K.J., Meyer, D., Deehan, R., Blenis, J., Schnapp, B.J., Rapoport, T.A., & Margolis, B. (2001). Cargo of Kinesin Identified as Jip Scaffolding Proteins and Associated Signaling Molecules. *J. Cell Biol.* **152**, 959–970.

Wakamatsu, Y., Maynard, T.M., Jones, S.U., & Weston, J.A. (1999). NUMB localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1. *Neuron* **23**, 71–81.

Wang, S.W., Mu, X., Bowers, W.J., & Klein, W.H. (2002). Retinal ganglion cell differentiation in cultured mouse retinal explants. *Methods* **28**, 448–456.

Wood, J.P.M., Chidlow, G., Tran, T., Crowston, J.G., & Casson, R.J. (2010). A comparison of differentiation protocols for RGC-5 cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 3774–3783.

Xiang, M., Jiang, H., Jin, K., & Qiu, F. (1993). Molecular Control of Retinal Ganglion Cell Specification and Differentiation.

Xue, Y., Ouyang, K., Huang, J., et al. (2013). Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell* **152**, 82–96.

Zearfoss, N.R., Chan, A.P., Wu, C.F., Kloc, M., & Etkin, L.D. (2004). Hermes is a localized factor regulating cleavage of vegetal blastomeres in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **267**, 60–71.



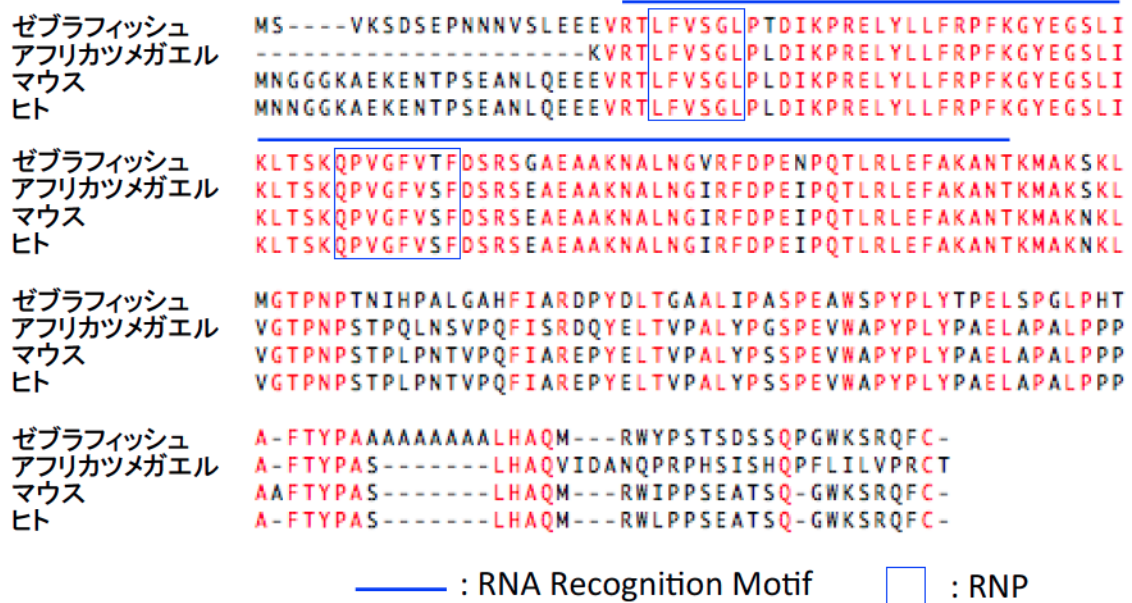


図 1 HERMES は脊椎動物間でよく保存された RNA 結合タンパク質である

ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエル、マウス、ヒト HERMES のアミノ酸配列を示す。青い線は RNA Recognition Motif の位置を表し、青い四角で囲われた部分は N 末端側からそれぞれ RNP2、RNP1 である。

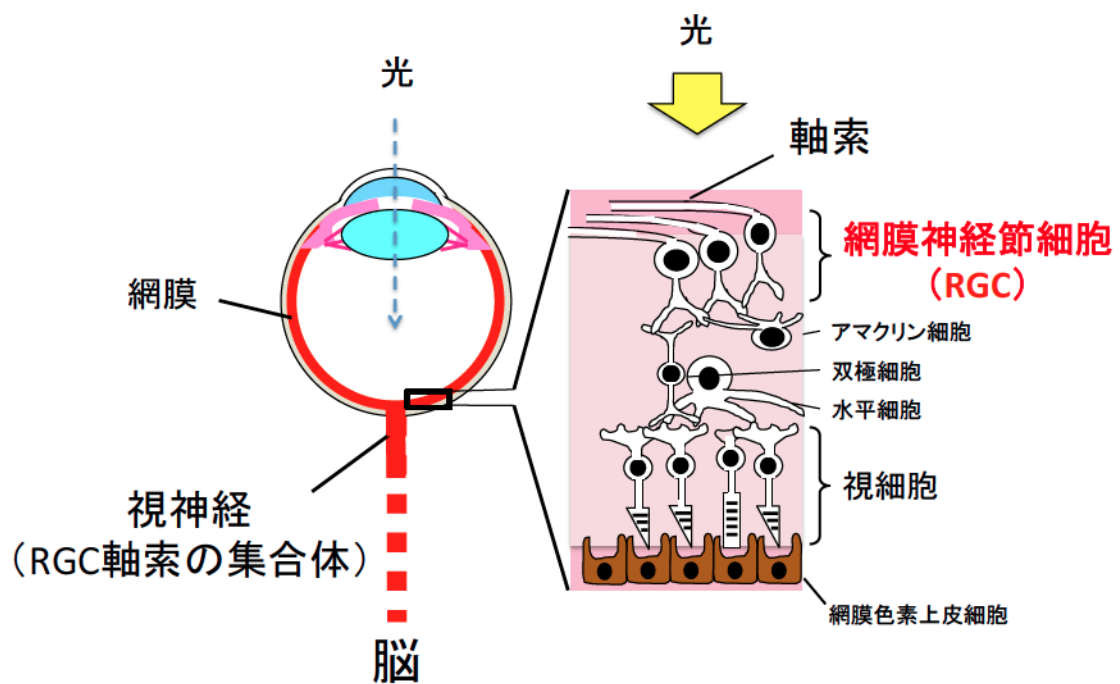


図 2 網膜の構造

網膜は 5 種類の神経細胞が層状に配置した感覚器官である。外界からの光刺激は視細胞によって受容、神経シグナルに変換され、水平細胞、アマクリン細胞による修飾を受けながら双極細胞を経て網膜神経節細胞 (RGC) へと伝達される。RGC の軸索は眼球から脱出して視神経を形成し、脳に投射することで脳と網膜を物理的に連絡している。

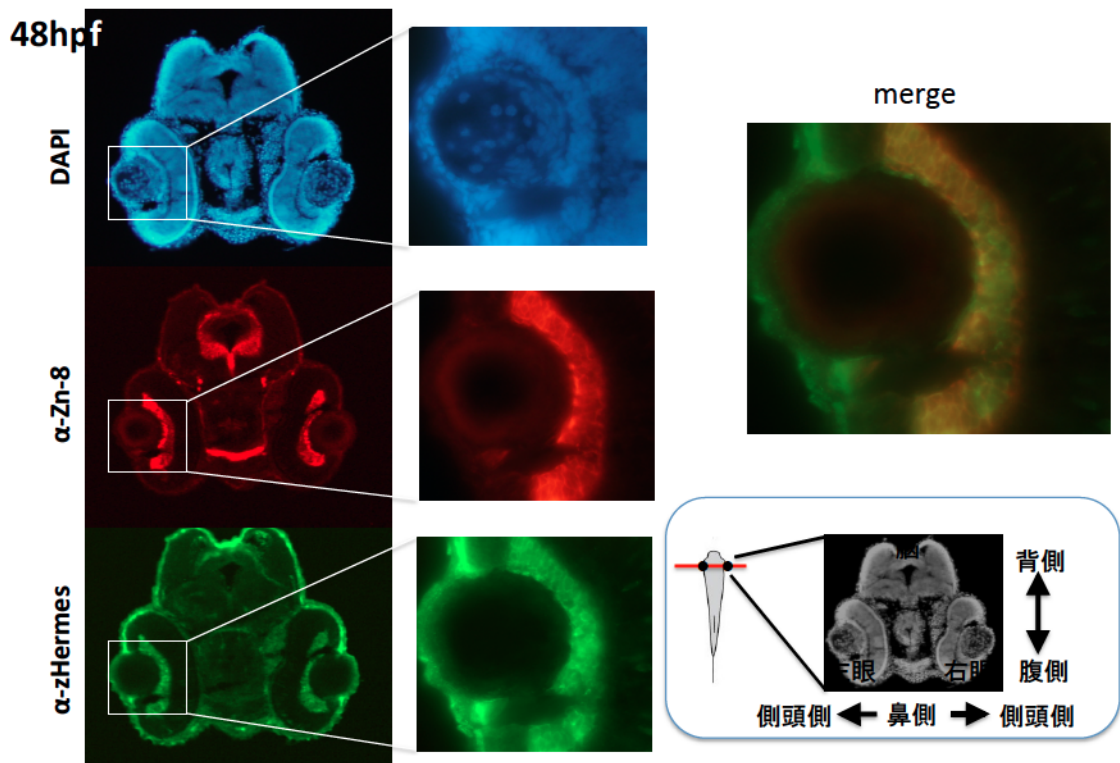


図3 zHermesはゼブラフィッシュ初期胚の網膜組織においてRGC層特異的に発現する

ゼブラフィッシュ 48hpf 胚から網膜組織の凍結切片を作成し、抗 Zn-8 抗体と抗 zHermes 抗体を用いて免疫二重染色実験を行った。Zn-8 は RGC 特異的に発現する膜貫通型糖タンパク質である。核染色には DAPI を用いた。

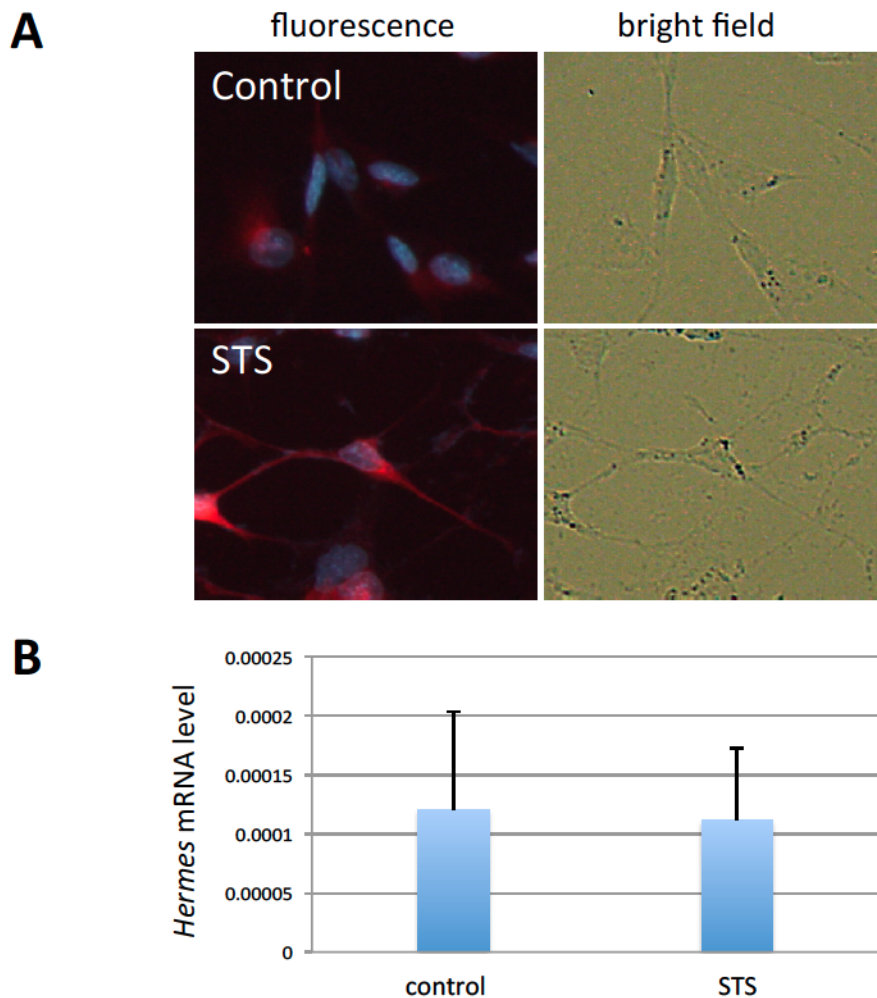


図4 *Hermes* mRNAの発現量はRGC-5細胞の分化の前後で一定である (A) RGC-5細胞をSTSかコントロール溶液 (STSを溶かした溶媒: DMSO) で24時間刺激し、固定、脱膜した後に抗アセチル化チューブリン抗体による免疫染色を行った。抗アセチル化チューブリン抗体による染色像 (赤) とDAPIによる核染色 (青) をマージしたものを明視野像とともに示す。(B) STS刺激によって分化を誘導したRGC-5細胞と未分化RGC-5細胞からtotal RNAを抽出し、cDNAを合成してreverse transcriptional-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) による*Hermes* mRNAレベルの定量を行った。内在性コントロール遺伝子には*Cyclophilin*を用い、この遺伝子の発現レベルを基準として*Hermes* mRNAレベルのノーマライゼーションを行った。グラフは3回試行の平均値+標準偏差を表している。

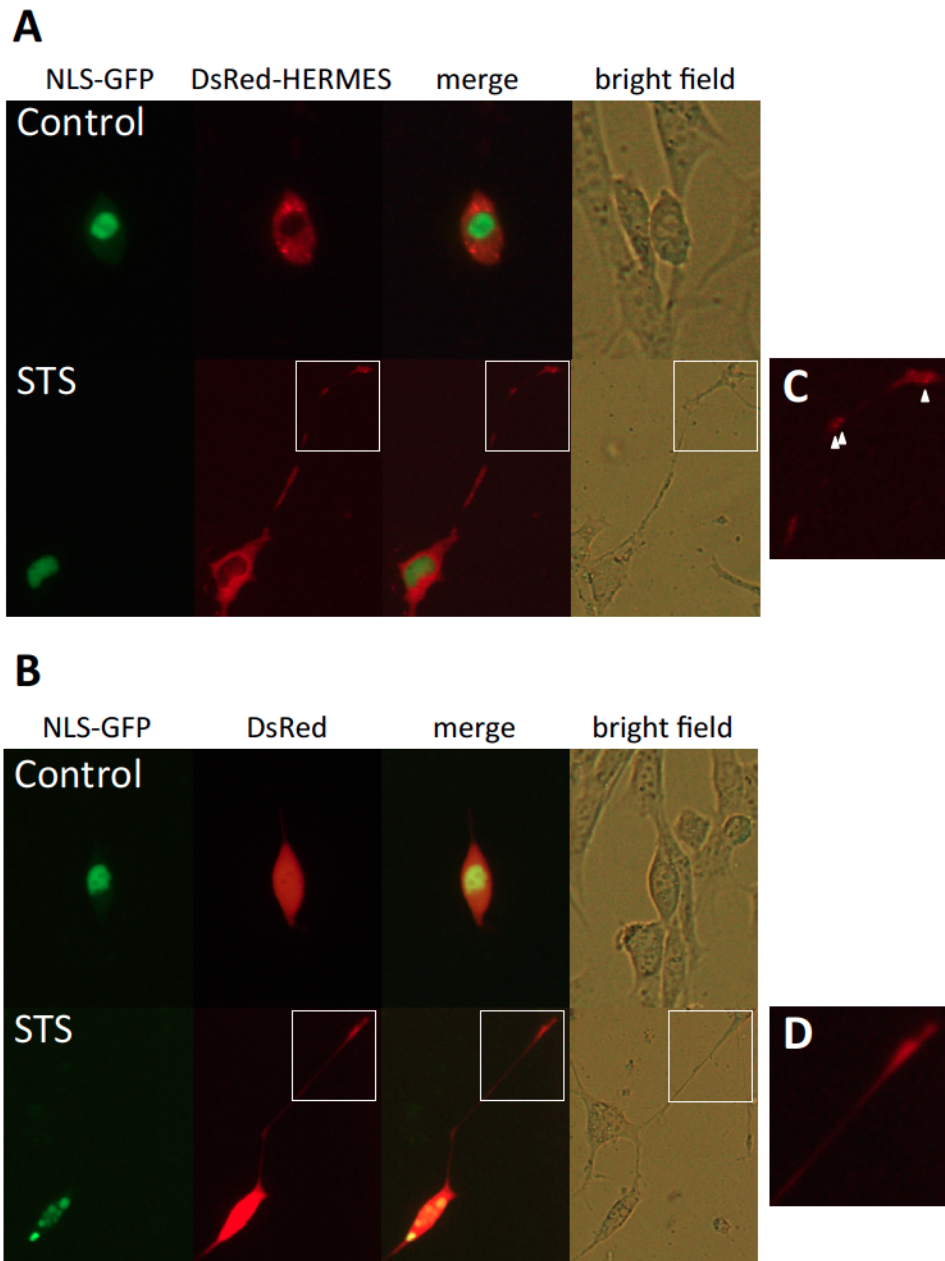


図 5 HERMES は RGC-5 細胞の分化状態にかかわらず細胞質で顆粒を形成する

STS 刺激によって分化を誘導した RGC-5 細胞とコントロール溶液で刺激した未分化 RGC-5 細胞に DsRed (B) あるいは DsRed-HERMES 発現ベクター (A) を核移行シグナルを付加した GFP (NLS-GFP) 発現ベクターとコトランスフェクションし、24 時間後に蛍光観察を行った。C, D は A, B の白枠で囲った部分をそれぞれ拡大したものであり、矢頭は神経突起における HERMES の顆粒状の構造体を示している。

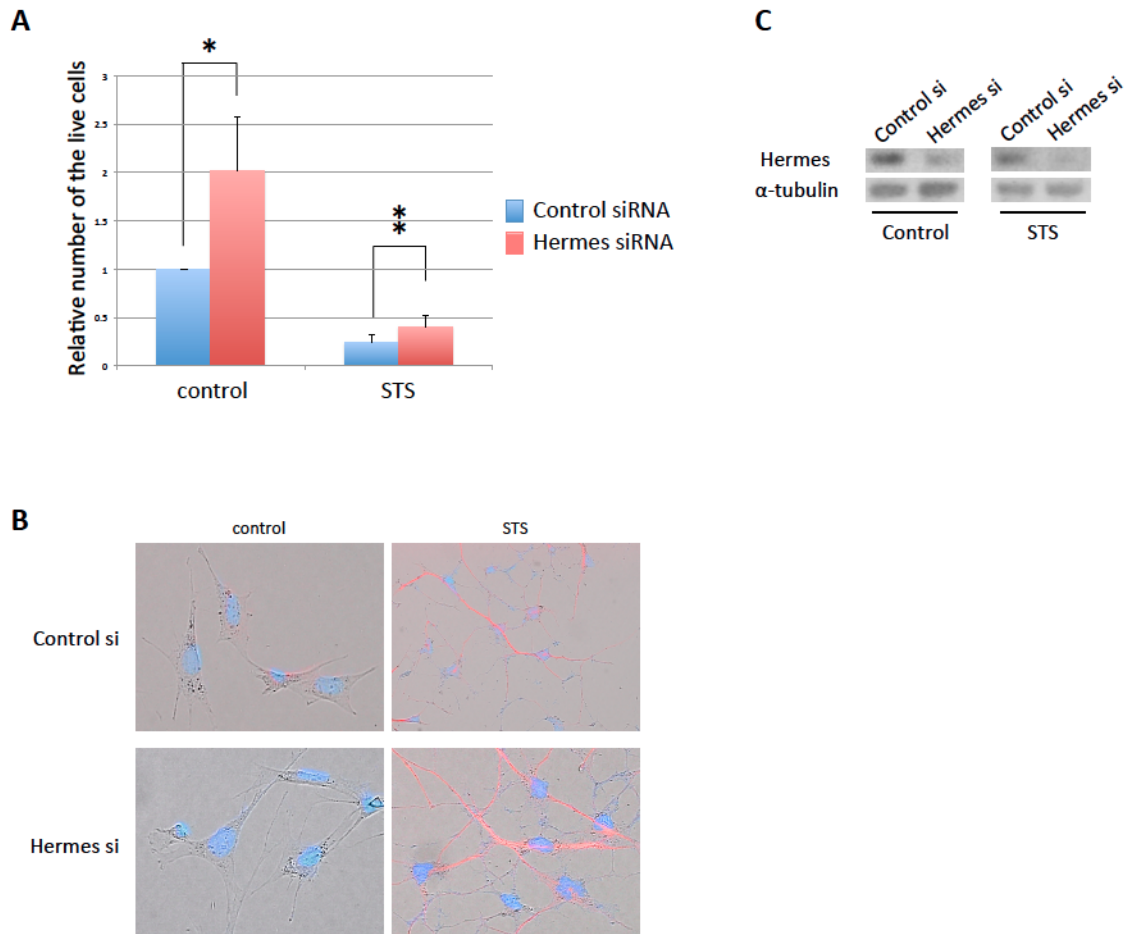


図 6 siRNA による *Hermes* 遺伝子ノックダウンは RGC-5 細胞の生細胞数を増加させる

(A) Hermes siRNA を導入した RGC-5 細胞を STS またはコントロール溶液で刺激し、24 時間後に生細胞数を計測した。コントロール溶液で刺激し、Control siRNA を導入した RGC-5 細胞の生細胞数を 1 としたときの相対値をグラフに示す。比の t 検定より、危険率 $p < 0.05$ (*)、 0.01 (**) で有意差有り。平均+標準偏差、 $N = 3$ 。(B) Control siRNA または Hermes siRNA をトランスフェクションした RGC-5 細胞を STS あるいはコントロール溶液で刺激し、免疫染色を行った。抗アセチル化チューブリン抗体による染色像 (赤) を明視野像にマージしたものを示す。核は DAPI で染色した。(C) Hermes siRNA duplex を RGC-5 細胞にトランスフェクションし、24 時間培養した後に STS で 24 時間刺激して分化を誘導した。これらの細胞について *Hermes* 遺伝子の発現を RT-PCR で検討した。内在性コントロールとして α -チューブリン遺伝子を用いた。

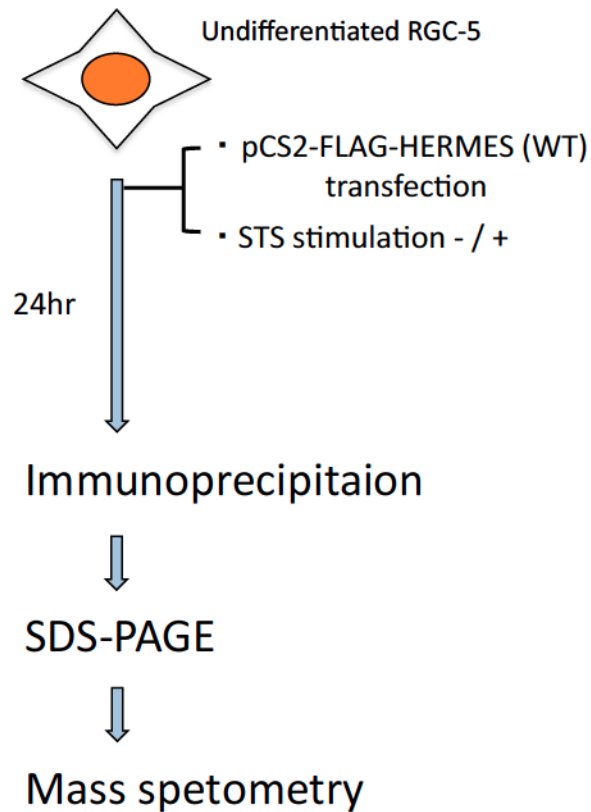


図 7 HERMES と相互作用するタンパク質同定のためのスキーム
 FLAG-HERMES 発現ベクターを RGC-5 細胞にトランスフェクションし、STS
 あるいはコントロール溶液で 24 時間刺激した後にこれらから細胞抽出液を作成
 した。得られた細胞抽出液について抗 FLAG 抗体による免疫沈降実験を行い、
 免疫沈降物を SDS-PAGE で分離した後に銀染色で可視化した。その後、興味
 あるタンパク質バンドを切り出して質量分析を行った。免疫沈降のネガティブ
 コントロールには IgG を用いた。

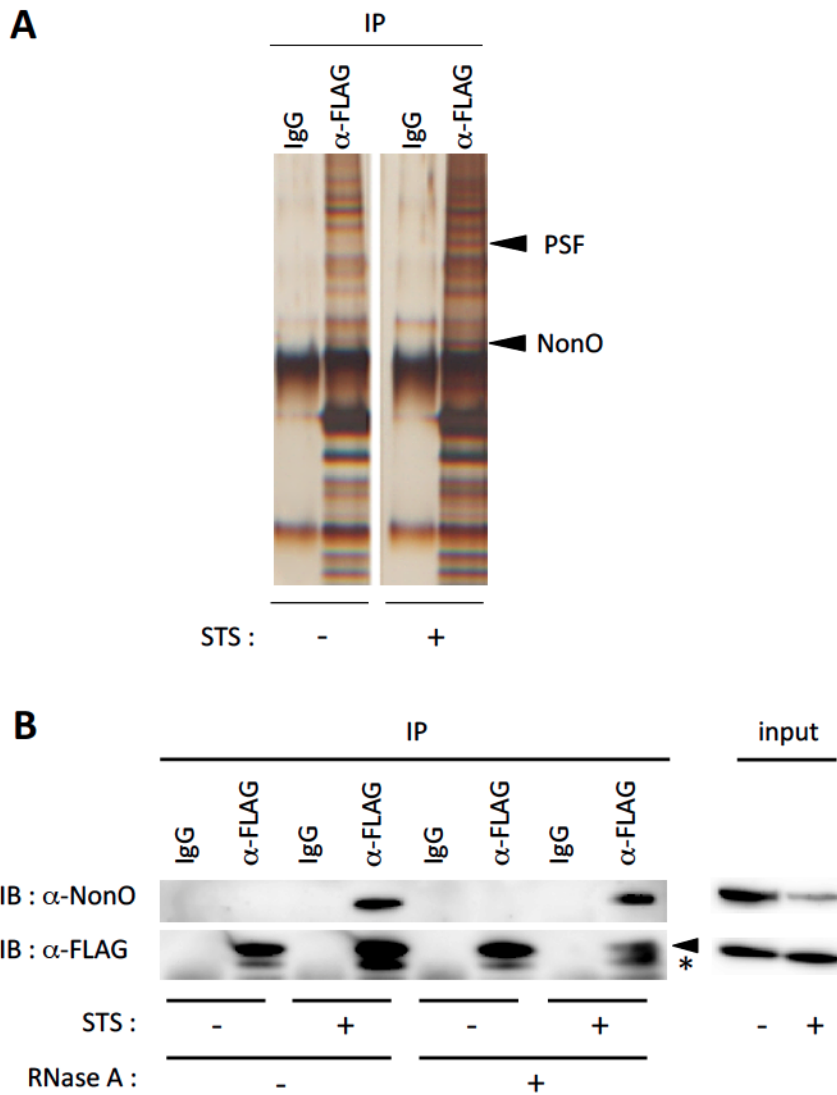


図8 Hermes は STS 刺激によって分化した RGC-5 細胞において NonO、PSF と相互作用する

(A) FLAG-HERMES と共沈降したタンパク質の SDS-PAGE 後の銀染色像。実験のスキームは図 7 に示した通り。矢頭は HERMES と共沈降したタンパク質群のうち、STS 刺激によって分化した RGC-5 細胞特異的に得られたものを示す。質量分析の結果、これらは NonO、PSF であることが示唆された。IP: immunoprecipitation (免疫沈降), α : anti. (B) 図 7 のスキームで得られた免疫沈降物を RNase A で処理し、複合体中の RNA を分解した後に、抗 FLAG 抗体、抗 NonO 抗体によるウェスタンブロッティングを行った。RNase 処理のネガティブコントロールには水を用いた。矢頭は FLAG-HERMES を、アスタリスクは IgG のバンドをそれぞれ示す。IB: immunoblot (ウェスタンブロッティング).

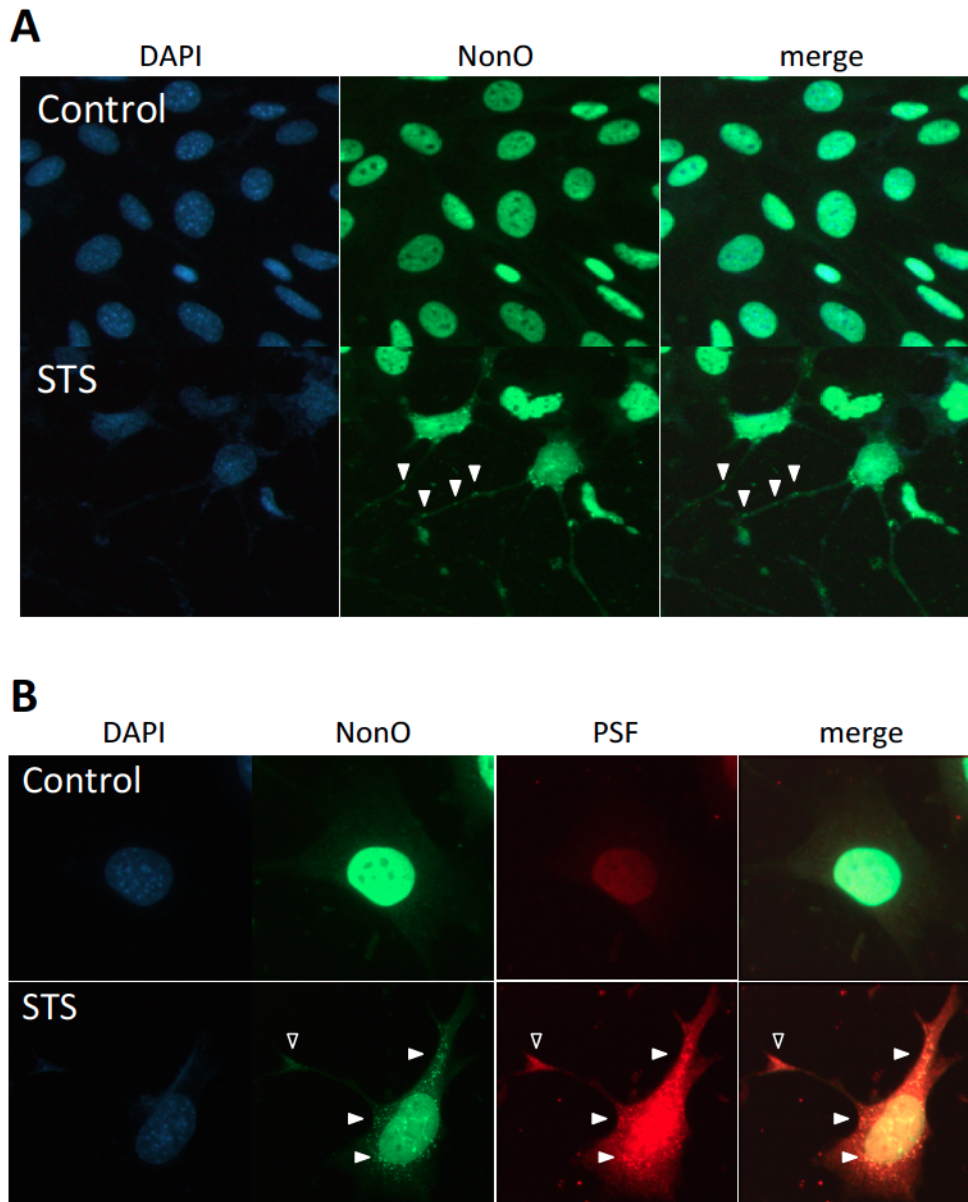


図 9 HERMES は RNA を内包する NonO 顆粒と神経突起で共局在する
 (A) RGC-5 細胞を STS またはコントロール溶液で 24 時間刺激し、固定、脱膜した後に抗 NonO 抗体による免疫染色を行った。核の対比染色には DAPI を用いた。矢頭は神経突起に局在する NonO 顆粒を示している。(B) (A)と同様の方法で分化を誘導した RGC-5 細胞と未分化 RGC-5 細胞を固定、脱膜し、抗 NonO 抗体と抗 PSF 抗体を用いて免疫二重染色を行った。核は DAPI で対比染色した。白矢頭は細胞体、黒矢頭は神経突起における NonO と PSF の共局在を示す。

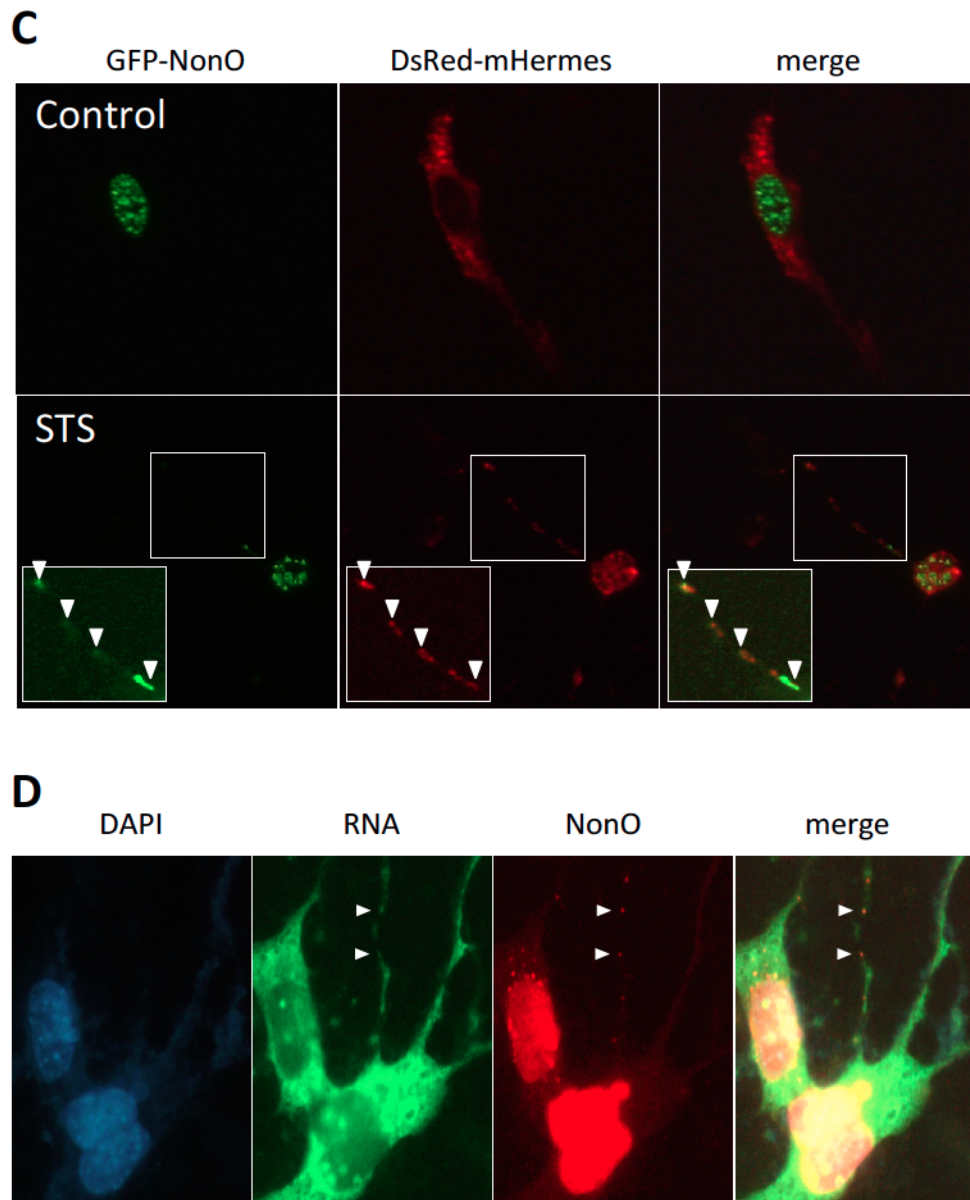


図 9 HERMES は NonO と神経突起で共局在する

(C) DsRed-HERMES と GFP-NonO を発現するベクターを RGC-5 細胞にコトランスフェクションし、STS またはコントロール溶液で 24 時間刺激した。矢頭は神経突起において HERMES と NonO が共局在している部位を示す。左下の白枠内に示す像は中央やや上の白枠で囲われた部分を拡大し、蛍光シグナルを増強させたものである。(D) STS 溶液で 24 時間刺激した RGC-5 細胞を固定し、SYTO® RNASelect で RNA を選択的に染色した後に抗 NonO 抗体による免疫染色を行った。核の対比染色には DAPI を用いた。矢頭は RNA と NonO 顆粒の神経突起における共局在を示す。

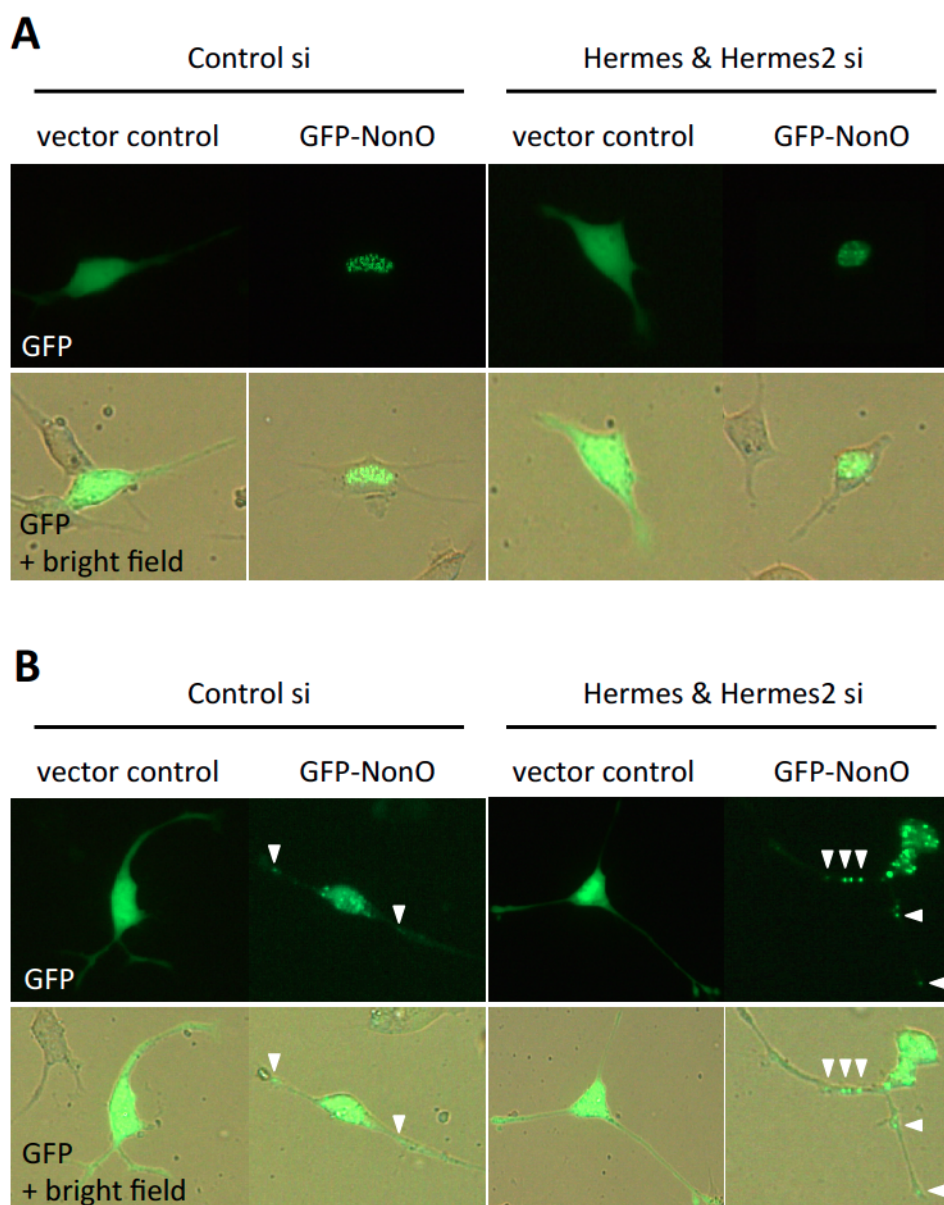


図 10 *Hermes* 遺伝子発現抑制は NonO の細胞質における顆粒化に影響しない

Hermes と *Hermes2* (*Rbpms2*) 遺伝子に対する siRNA を RGC-5 細胞にトランスフェクションし、24 時間インキュベートした後に GFP-NonO を強制発現させて STS (B) またはコントロール溶液 (A) で 24 時間刺激した。図は GFP の蛍光像とそれを明視野像にマージしたものを示す。siRNA のネガティブコントロールにはコントロール siRNA duplex を使用した。また GFP 発現ベクターをコントロールとしてトランスフェクションした。神経突起における GFP-NonO の局在を矢頭に示す。

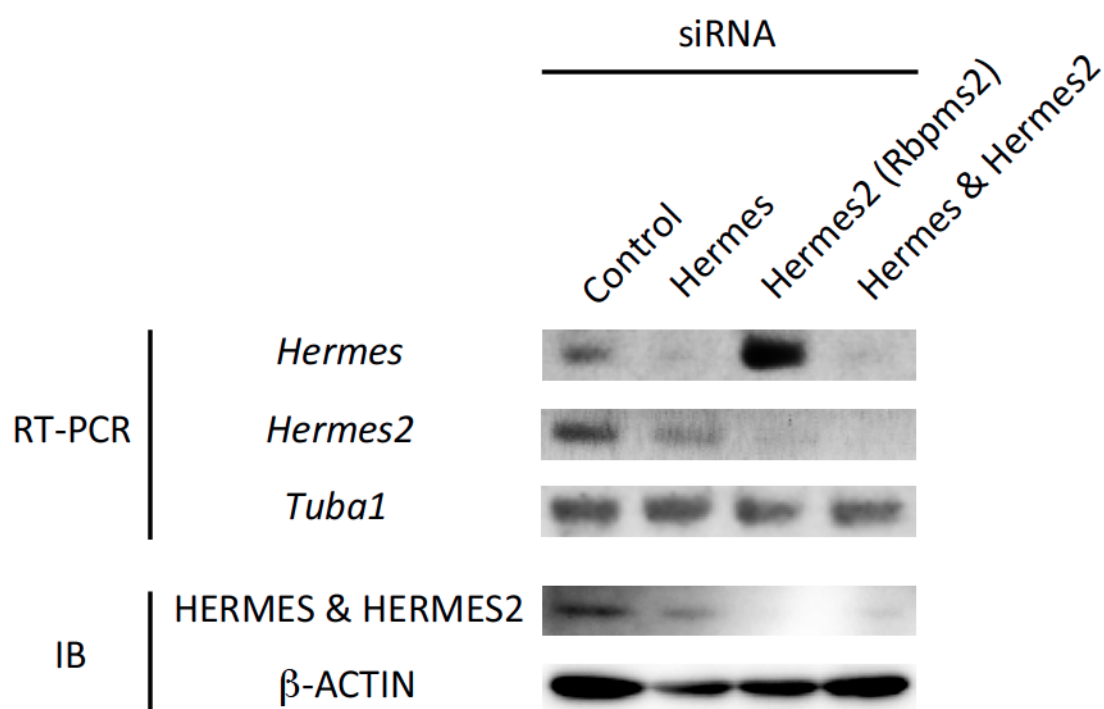


図 11 siRNA による遺伝子発現抑制効果のウェスタンブロッティングによる検証

Hermes siRNA と Hermes2 siRNA を RGC-5 細胞にトランスフェクションし、24 時間インキュベートした後に STS 溶液で 24 時間刺激して分化を誘導した。これらの細胞から細胞抽出液を作成し、HERMES と HERMES2 のどちらにも反応する抗 RBPMS 抗体と抗β-ACTIN 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。siRNA のネガティブコントロールにはコントロール siRNA duplex を用いた。

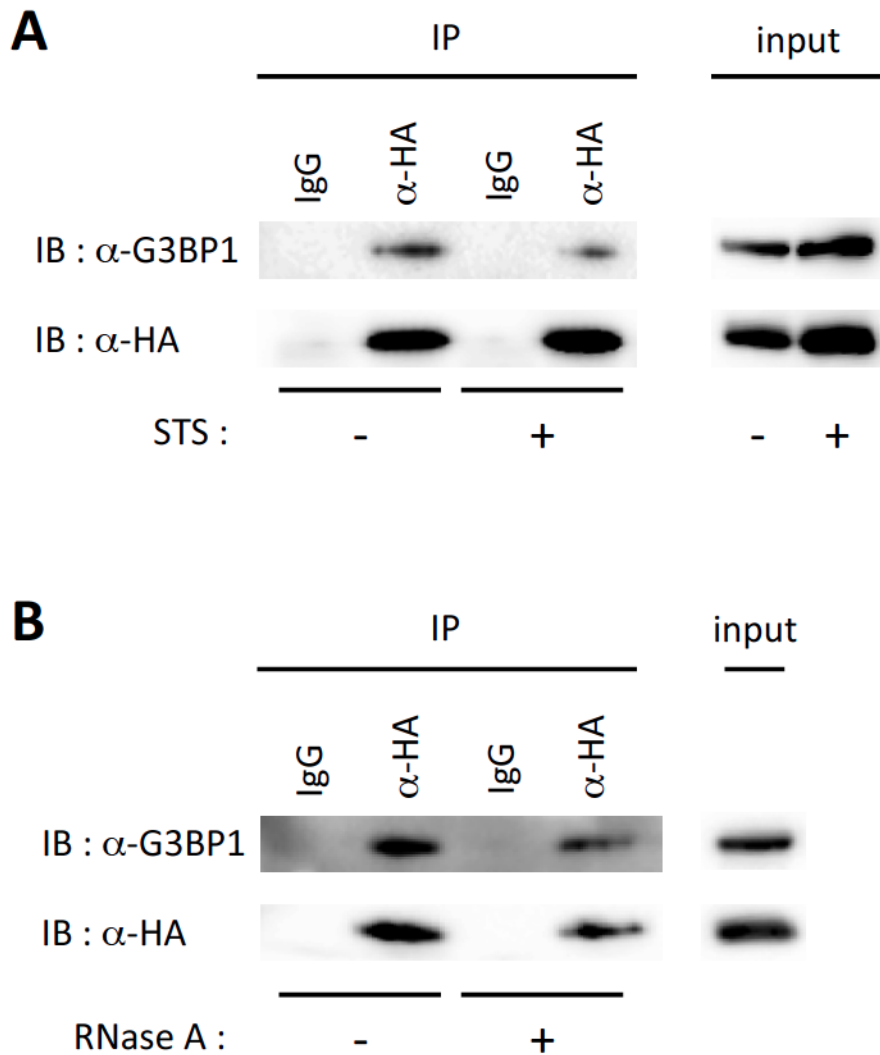


図 12 HERMES と G3BP1 は RNA を介さずに直接的に相互作用する
 (A) HA-HERMES 発現ベクターを RGC-5 細胞にトランスフェクションし、STS またはコントロール溶液で 24 時間刺激した。これらの細胞から作成した細胞抽出液を用いて抗 HA 抗体による免疫沈降を行い、得られた免疫沈降物について抗 G3BP1 抗体、抗 HA 抗体によるウェスタンブロッティングを行った。免疫沈降のネガティブコントロールには IgG を用いた。(B) HA-HERMES 発現ベクターを HeLa 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収して細胞抽出液を作成した。この細胞抽出液を用いて抗 HA 抗体による免疫沈降を行い、得られた免疫沈降物を RNase A で処理して抗 G3BP1 抗体、抗 HA 抗体によるウェスタンブロッティングを行った。免疫沈降と RNase 処理のネガティブコントロールにはそれぞれ IgG と水を用いた。

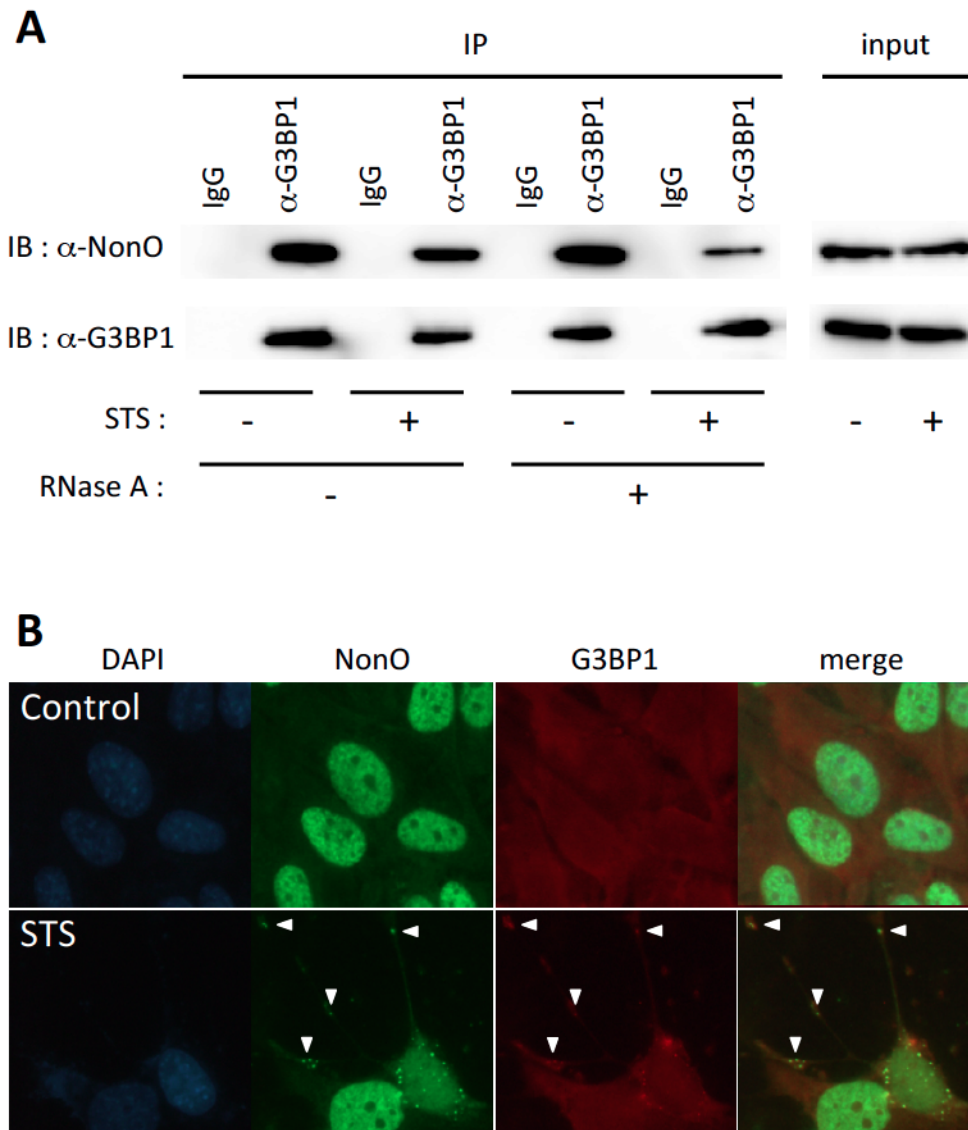


図 13 NonO と G3BP1 は直接的に相互作用し、神経突起で顆粒を形成して共局在する

(A) STS またはコントロール溶液で 24 時間刺激した RGC-5 細胞から細胞抽出液を作成し、抗 G3BP1 抗体を用いて免疫沈降を行った。得られた免疫沈降物を RNase A で処理し、抗 NonO 抗体、抗 G3BP1 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。免疫沈降と RNase 処理のネガティブコントロールにはそれぞれ IgG と水を用いた。(B) STS またはコントロール溶液で 24 時間刺激した RGC-5 細胞を固定、脱膜処理し、抗 NonO 抗体と抗 G3BP1 抗体を用いて免疫二重染色を行った。核は DAPI を用いて対比染色した。矢頭は神経突起における NonO と G3BP1 の共局在を示す。

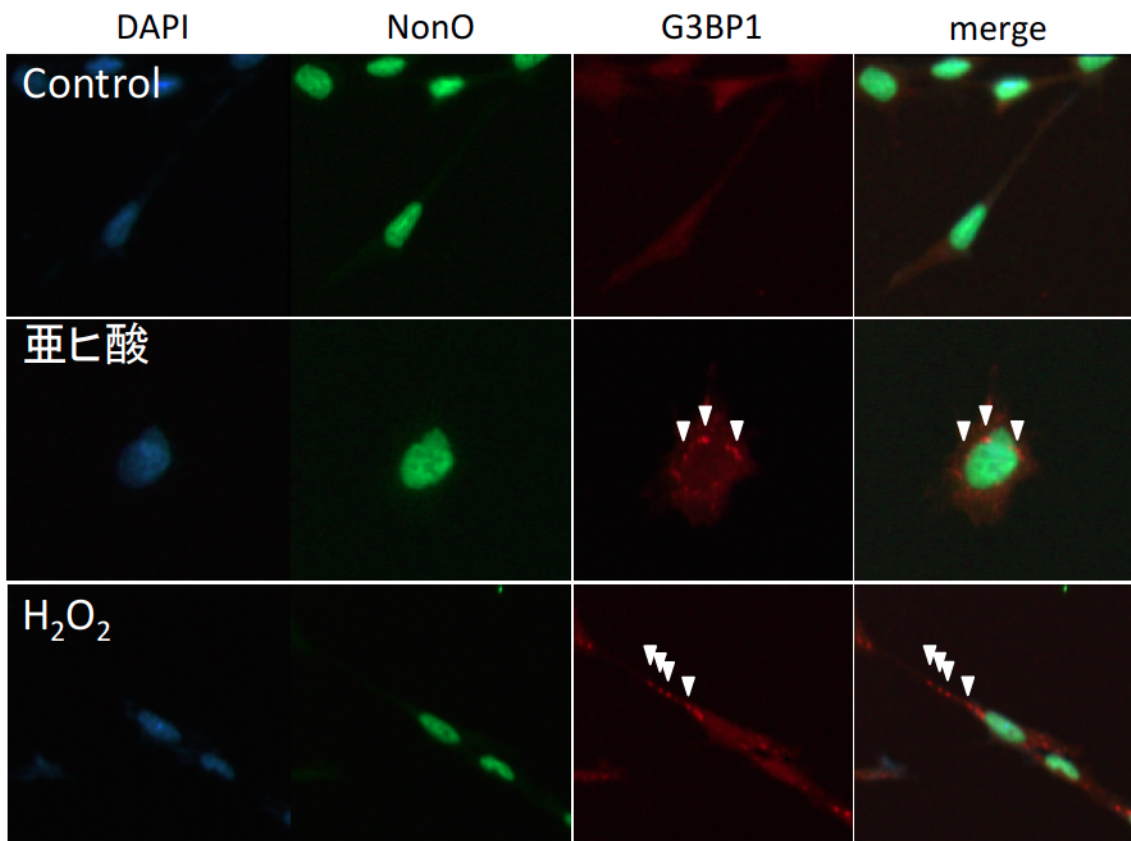


図 14 細胞ストレスは NonO の細胞質における顆粒形成を誘導しない
 亜ヒ酸または H₂O₂ で処理して細胞ストレスを誘導した RGC-5 細胞を、固定、
 脱膜処理し、抗 NonO 抗体、抗 G3BP1 抗体による免疫二重染色を行った。核
 の対比染色には DAPI を用いた。細胞質における G3BP1 顆粒を矢頭で示す。

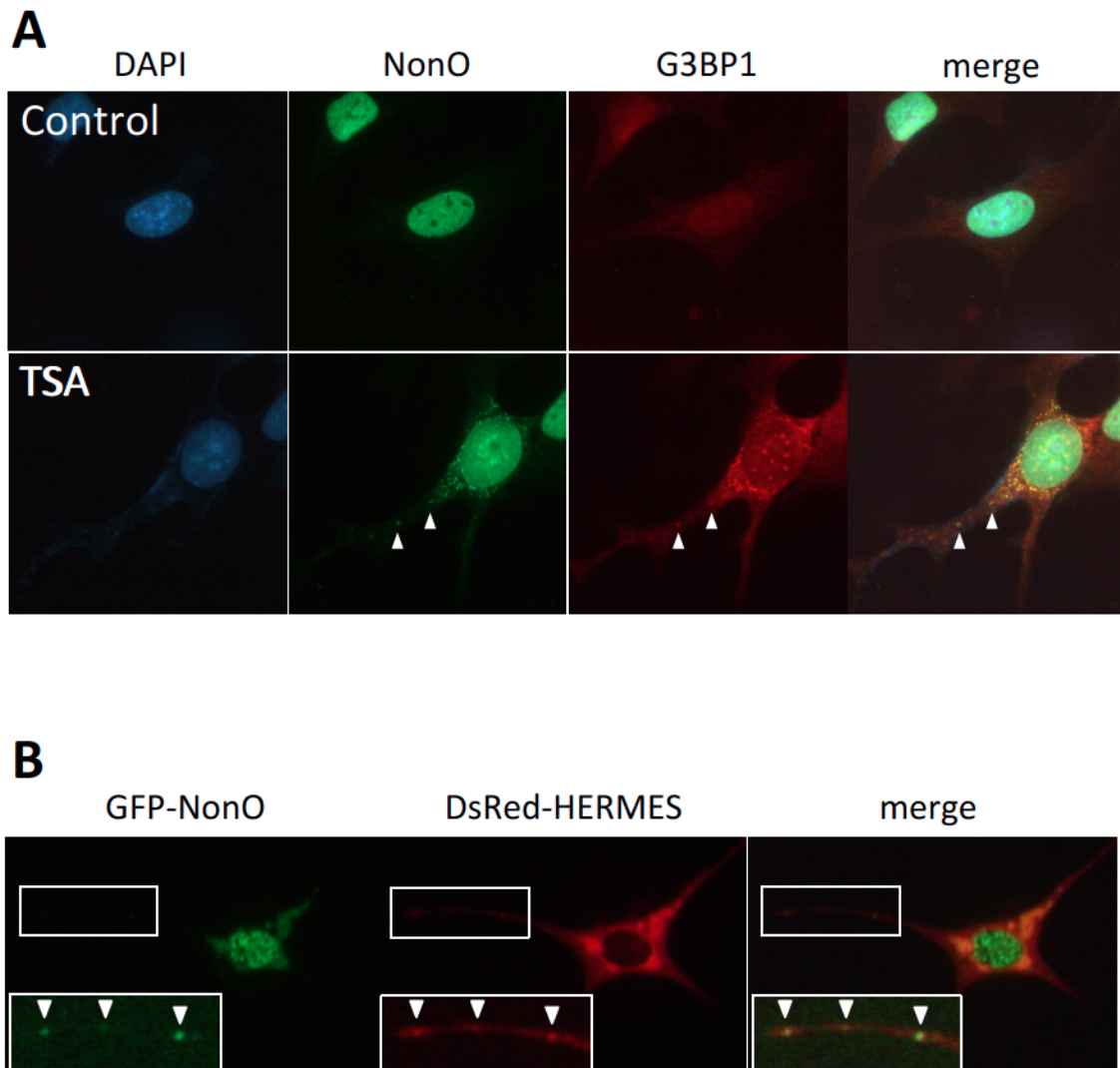


図 15 TSA は HERMES, NonO, G3BP1 を構成因子とする細胞質 RNP 顆粒の形成を誘導する

(A) TSA またはコントロール溶液 (DMSO) で 24 時間刺激した RGC-5 細胞を固定、脱膜し、抗 NonO 抗体と抗 G3BP1 抗体による免疫二重染色を行った。核は DAPI を用いて対比染色した。細胞質における NonO と G3BP1 の共局在を矢頭で示す。(B) DsRed-HERMES と GFP-NonO を RGC-5 細胞に強制発現させ、TSA で 24 時間刺激した後に蛍光顕微鏡下で観察した。左下の白枠内の像は左上の白枠で囲われた部分の蛍光シグナルを増大させたものである。矢頭は DsRed-HERMES と GFP-NonO の神経突起における共局在を示している。

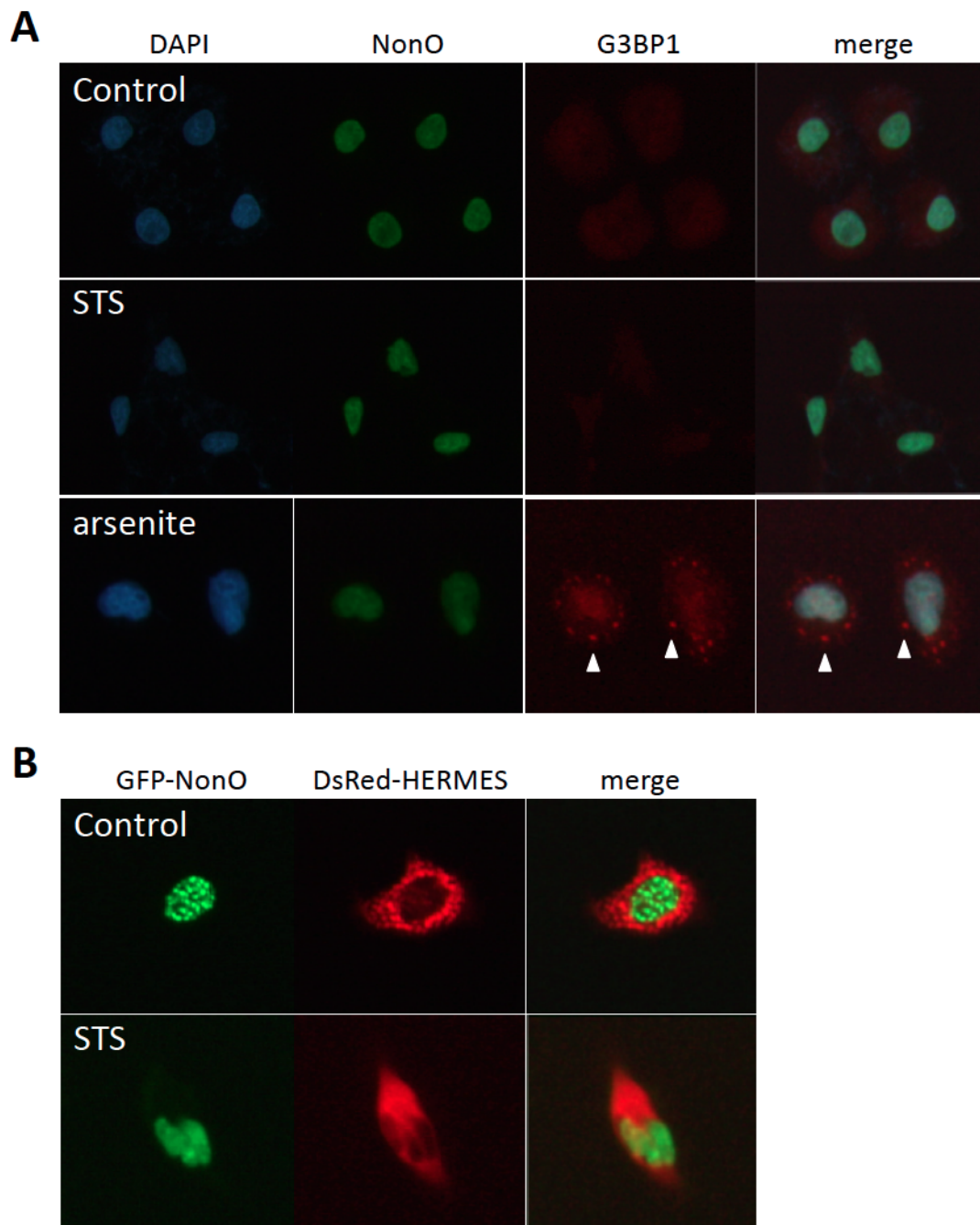


図 16 HeLa 細胞では細胞質における NonO 顆粒の形成は誘導されない
 (A) STS、亜ヒ酸、コントロール溶液のいずれかで刺激した HeLa 細胞を固定、脱膜処理し、抗 NonO 抗体と抗 G3BP1 抗体を用いて免疫二重染色した。核の対比染色には DAPI を使用した。矢頭は細胞質における G3BP1 顆粒を示す。(B) DsRed-HERMES と GFP-NonO を HeLa 細胞に強制発現させ、STS またはコントロール溶液で 24 時間刺激した後に蛍光顕微鏡下で観察した。

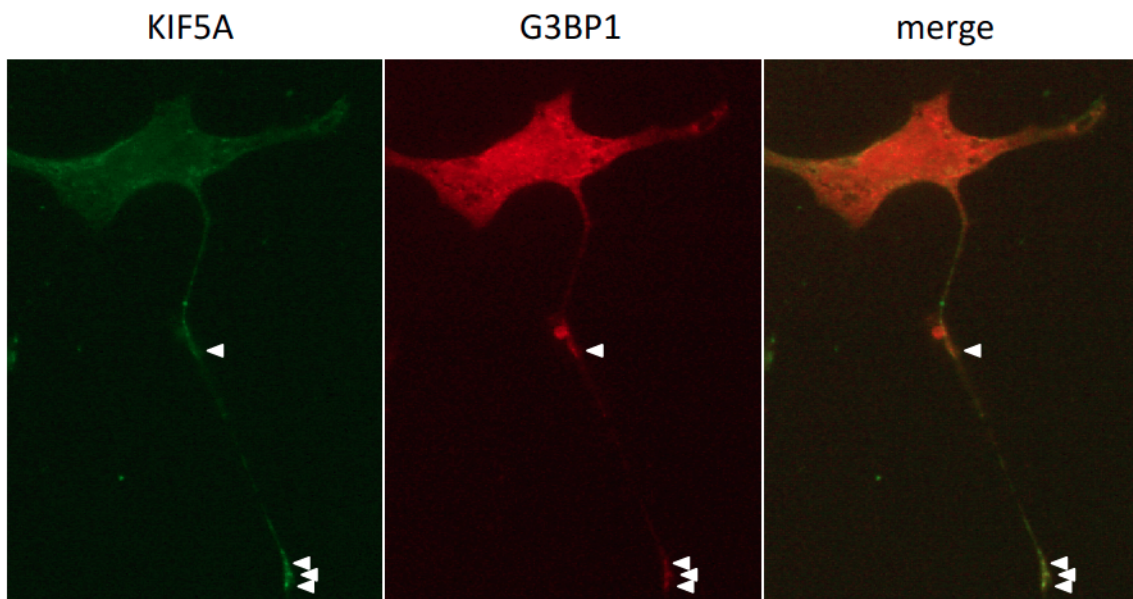
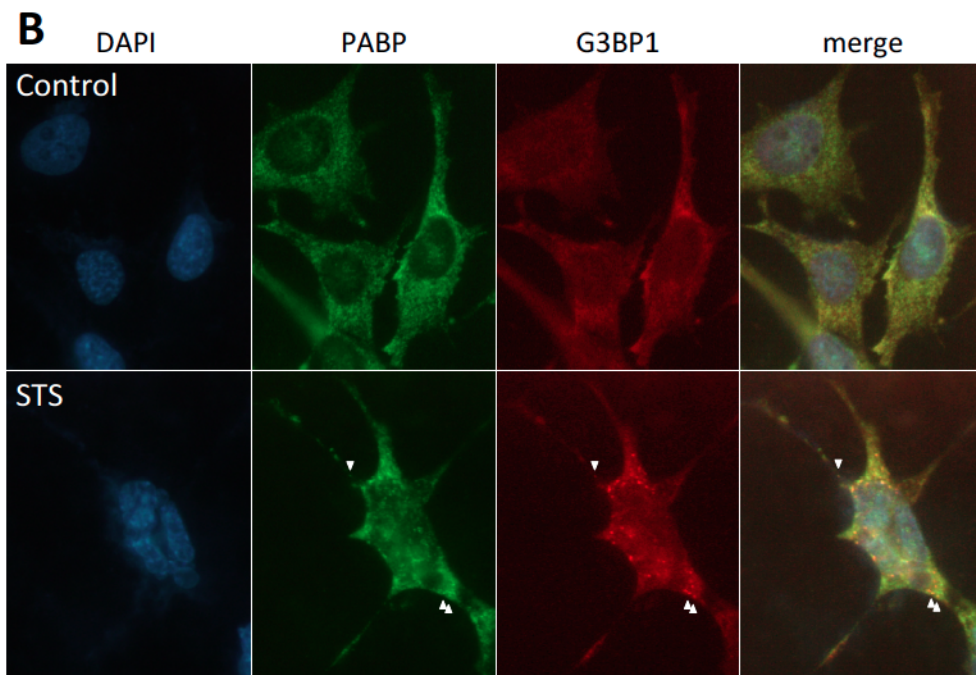
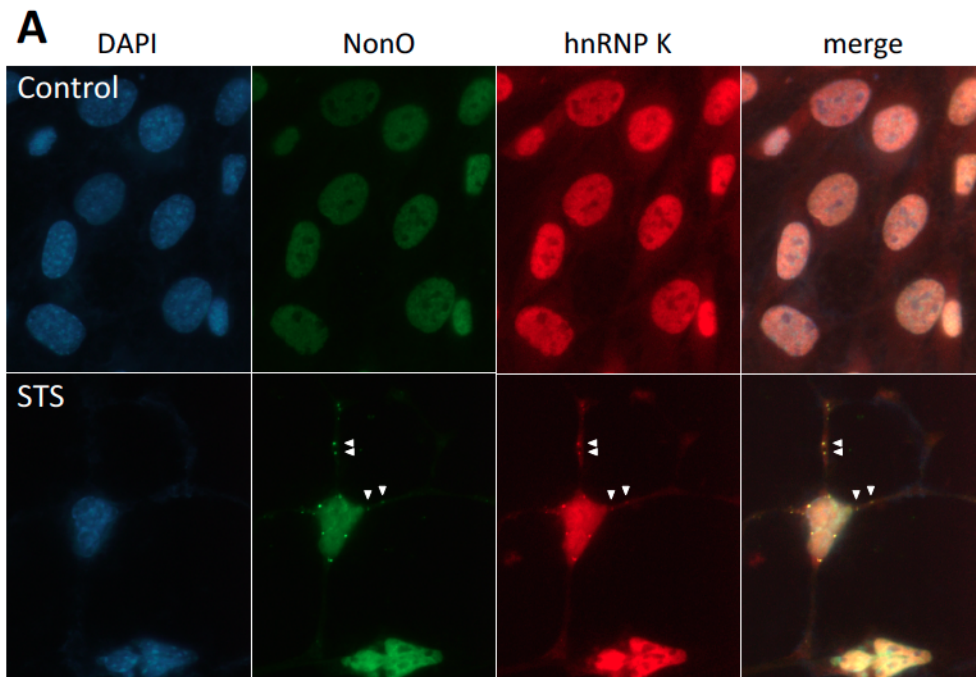


図 17 G3BP1 と KIF5A は RGC-5 細胞の神経突起において共局在する STS で 24 時間刺激した RGC-5 細胞を固定、脱膜処理し、抗 G3BP1 抗体と抗 KIF5A 抗体を用いて免疫二重染色した。核の対比染色には DAPI を用いた。神経突起における G3BP1 と KIF5A の共局在を矢頭で示す。



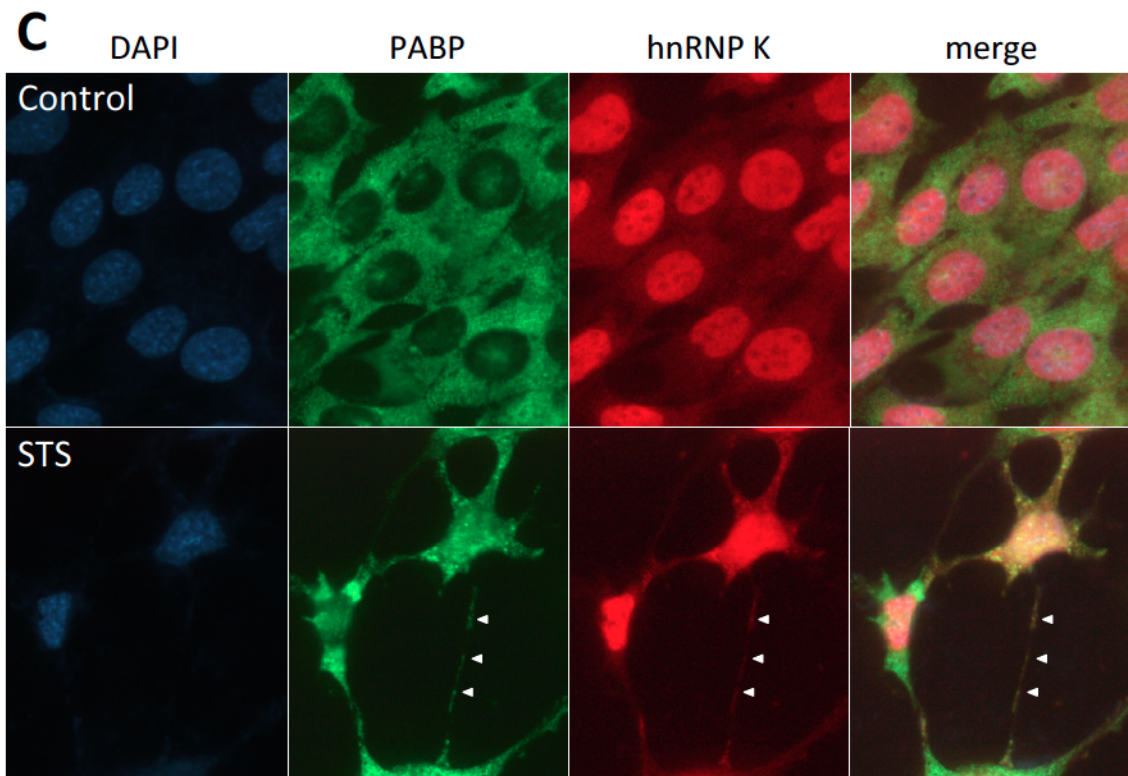


図 18 hnRNP K, PABP は NonO, G3BP1 を構成因子とする細胞質顆粒と共局在する

STS またはコントロール溶液で 24 時間刺激した RGC-5 細胞を固定、脱膜処理し、抗 NonO 抗体と抗 hnRNP K 抗体 (A)、抗 PABP 抗体と抗 G3BP1 抗体 (B)、抗 PABP 抗体と抗 hnRNP K 抗体 (C) を用いて免疫二重染色した。核は DAPI を用いて対比染色した。神経突起におけるそれぞれのタンパク質の共局在を矢頭で示す。

未分化RGC-5細胞 (STS / TSA刺激-)



分化したRGC-5細胞 (STS / TSA刺激+)

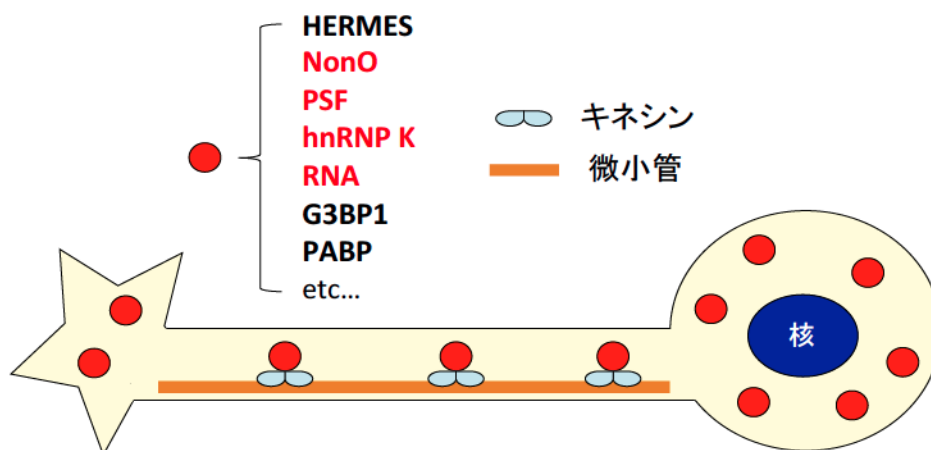


図 19 HERMES は RGC-5 細胞の分化にともなって NonO, hnRNP K などと細胞質 RNP 顆粒を形成し、KIF との相互作用を介して輸送 RNP として働く