



# 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。



(別紙様式 3)

## 論文内容の要旨

氏名 古川 真理

専攻 生物学

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

網膜神経節細胞特異的 RNA 結合タンパク質 HERMES の機能解析

指導教員 井上 邦夫

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 結合タンパク質は RGC において何らかの機能的な重要性をもつと考えられる。本研究では RGC における HERMES の機能を分子レベルで明らかにすることを目標に、マウス RGC 由来培養細胞 (RGC-5 細胞) を用いた解析を行った。第一章では序論として研究の背景について述べており、第二章では研究に使用した材料と方法を、第三章では実験結果、第四章では第三章に示す結果をもとに、HERMES の機能と RGC 特異的に発現することの生理的意義について考察している。以下では第三章の結果と第四章の考察について要約する。

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。亜硝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。またこの輸送 RNP には、これまでにストレス顆粒や輸送 RNP の構成因子として報告されていた hnRNP K や PABP も含まれることが示唆された。

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。

氏名	古川 真理		
論文題目	網膜神経節細胞特異的 RNA 結合タンパク質 HERMES の機能解析		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	井上 邦夫
	副査	教授	坂本 博
	副査	教授	前川 昌平
	副査		
			印
要 旨			
<p>遺伝子発現の転写後制御は、神経細胞分化・維持・成熟や神経機能に重要な役割を果たすことが示唆される。RNA レベルでの転写後制御機構としては、核内における RNA プロセッシング、mRNA 核外輸送や品質管理、細胞質における輸送・局在、mRNA の安定性や翻訳制御などが知られている。神経細胞においては、とりわけ、軸索や樹状突起における mRNA-タンパク質複合体 (mRNP) の輸送・局在化、および、輸送過程や局在化した mRNA の翻訳制御が神経機能や神経ネットワークの構築に不可欠と考えられることから、その分子基盤の解明は重要な課題である。</p> <p>RNA レベルでの転写後制御機構には、RNA 結合タンパク質の働きが不可欠である。本論文は、多くの脊椎動物種で網膜神経節細胞に強く発現することが報告されている RNA 結合タンパク質 HERMES/RBPMS に着目し、その機能の解明を通して、神経細胞における転写後制御機構の生理的な役割を理解することを目的として行われたものである。</p> <p>本論文は 第一章の序論、第二章の実験手法と材料、第三章の結果、第四章の考察の全 4 章で構成されている。</p> <p>第一章では、神経細胞における細胞質 RNP 顆粒や RNA 結合タンパク質の役割に関するこれまでの知見を整理し、本研究の背景と目的をまとめている。</p> <p>第三章では、主にマウス網膜由来の培養細胞株である RGC-5 細胞を用いた解析を行っている。この細胞は、特定の薬剤で処理することによって神経様に変化することが知られている。本論文では、まず、非選択性のプロテインキナーゼ PKC 阻害剤であるスタウロsporin 処理によってアセチル化チューブリン陽性の神経突起の伸長が促進されることを確認するとともに、このような分化誘導処理の前後で HERMES の発現量に大きな変化が見られないことを示した。また、RNAi によって HERMES の発現阻害を行った場合、細胞数が増</p>			

氏名	古川 真理
----	-------

加する傾向が見られるものの、神経突起伸長に影響がないことが示唆された。

次に、免疫沈降実験及び免疫染色実験から、スタウロスポリンによって分化誘導処理した RGC-5 細胞の細胞質や神経突起において、HERMES タンパク質が、核内パラスペックル構成因子として知られる RNA 結合タンパク質 NonO や PSF、細胞質のストレス顆粒構成因子として知られる G3BP1 とともに RNA-タンパク質 (RNP) 顆粒を形成することを示している。RNA 結合タンパク質 hnRNP K や PABP もこの顆粒に共局在していた。また、RGC-5 細胞をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A によって神経様に分化誘導した場合にも、これらのタンパク質を含む RNP 顆粒が観察されたこと、一方、亜硫酸や過酸化水素によるストレス条件下においた RGC-5 細胞では細胞質に G3BP1 を含むストレス顆粒が形成されるが、NonO は核外移行せず、ストレス顆粒に含まれなかったことなどから、HERMES、NonO、PSF、G3BP1 などを含む細胞質性の RNP 顆粒は、RGC-5 細胞の神経様分化に伴って形成される神経細胞特異的な RNP 顆粒であると結論づけている。さらに、分化 RGC-5 細胞の神経突起中で G3BP1 とモータータンパク質 KIF5 が共局在していること示し、この RNP 顆粒が輸送 RNP 顆粒としての役割を持つものと推論している。

第四章において、本研究から得られた結果を総合し、HERMES タンパク質を含む RNP 顆粒の形成機構や、網膜神経節細胞における輸送 RNP 顆粒の生理的な役割に関して議論している。

本研究は、網膜由来の神経様細胞を用いて神経突起に存在する RNA-タンパク質顆粒についての新しい発見をした研究であり、神経細胞における転写後の遺伝子発現制御機構の理解に大きなインパクトを与える重要な知見を得たものとして、価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の古川 真理は、博士 (理学) の学位を得る資格があると認める。