

「不飽和脂肪酸が制御する新たな神経回路形成機構の解明」

関西学院大学生命環境学部 鳥山 道則

1 研究の背景と目的

発生時期の脳内では膨大な数の神経細胞が生み出され、それらが「神経シナプス」と呼ばれる構造体により連結されることで回路網形成が作られ記憶、学習、運動など高次脳機能の発揮が可能となる。神経シナプスでは軸索末端（前シナプス）と樹状突起スパイン（後シナプス）により構成される。特に樹状突起スパインは神経伝達物質の受容を司る重要な構造体であり、神経細胞の活動に必要な役割を担う。アルツハイマー病などの認知症ではこの樹状突起スパインの数が減少することで神経細胞間の情報伝達に弊害を起し、認知障害を起すことが解っている。一方で、不飽和脂肪酸の一つであるドコサヘキサエン酸 (DHA) は樹状突起スパインの形成を促進する働きがあることが先行研究から示されている。これによりDHAが記憶/学習能力など脳機能の向上に関わると予想されてきたが、その詳細な分子機構は長らく不明のままであった。我々はこの点を鑑み、DHAによる神経細胞の遺伝子発現の制御に着目し研究を進めてきた。その結果、次世代シーケンサーを用いた解析からDHAにより発現量が変動する遺伝子群の同定に成功した。そこで本研究ではDHAにより発現量が上昇する遺伝子の一つであるRNF39 (Ring Finger Protein 39) に注目し、樹状突起スパイン形成に与える影響の解析することで、不飽和脂肪酸による神経回路網形成の分子機構を明らかにすることを目的とした。

2 研究方法・研究内容

① 初代培養海馬神経細胞の培養と樹状突起スパインの解析

胎生 16 日目のマウスより海馬を摘出し、Poly-D-Lysine でコートしたガラスカバースリップに分散培養を行った。培養開始 7 日目に DHA および各種阻害剤を添加し培養を続けた。培養開始 14 日目に細胞を固定し、樹状突起スパインを認識する抗 PSD-95 抗体を用い免疫染色を行った。RNF39 の過剰発現、発現抑制プラスミドは神経細胞を分散後、電気穿孔法により神経細胞内に導入し培養を行った。免疫染色の蛍光画像から樹状突起に存在する PSD95 陽性シグナル数を計測した。

② DHA 投与マウスにおける樹状突起スパインの解析

生後 14 日目のマウスに DHA を 50 mg/kg になるように腹腔内に投与した。その 2 日後に全脳を摘出し固定した後、ビブラトームを用いて 200  $\mu\text{m}$  の冠状切片を作製した。作製した脳切片の脳梁付近に 0.2~0.5 mm 角の DiI 結晶を挿入し、37°C で 2 週間反応させ神経細胞を標識した。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて大脳皮質に存在する神経細胞の樹状突起スパインの数およびその形態を観察した。

③ RNF39 と MDM2 の相互作用およびタンパク質分解の解析

HEK293T 細胞で FLAG-RNF39 および MYC-MDM2 を共発現させ、免疫沈降法により両者の相互作用を解析した。また、大腸菌で発現/精製した両タンパク質を用いた結合実験を行い結合様式の解析を行った。さらに、RNF39 による MDM2 のユビキチン化修飾とプロテアソームによるタンパク質分解による量的変化を western blot 法により解析した。

### 3 研究成果

#### 1) DHA は樹状突起スパインの形成を促進する

培養液に DHA を添加し培養した海馬神経細胞では樹状突起スパインの数がコントロールと比較し有意に増加した(図 1)。DHA の受容体分子として G タンパク質共役型受容体である GPR40 が報告されている。そこで、GPR40 のアンタゴニストである DC260126 で処理した場合、DHA による樹状突起スパインの形成促進はコントロールと同等レベルまでキャンセルされた。一方で、GPR40 のアゴニストである GW9508 で処理した場合には DHA 刺激と同様に樹状突起スパインの形成が促進されることが解った。

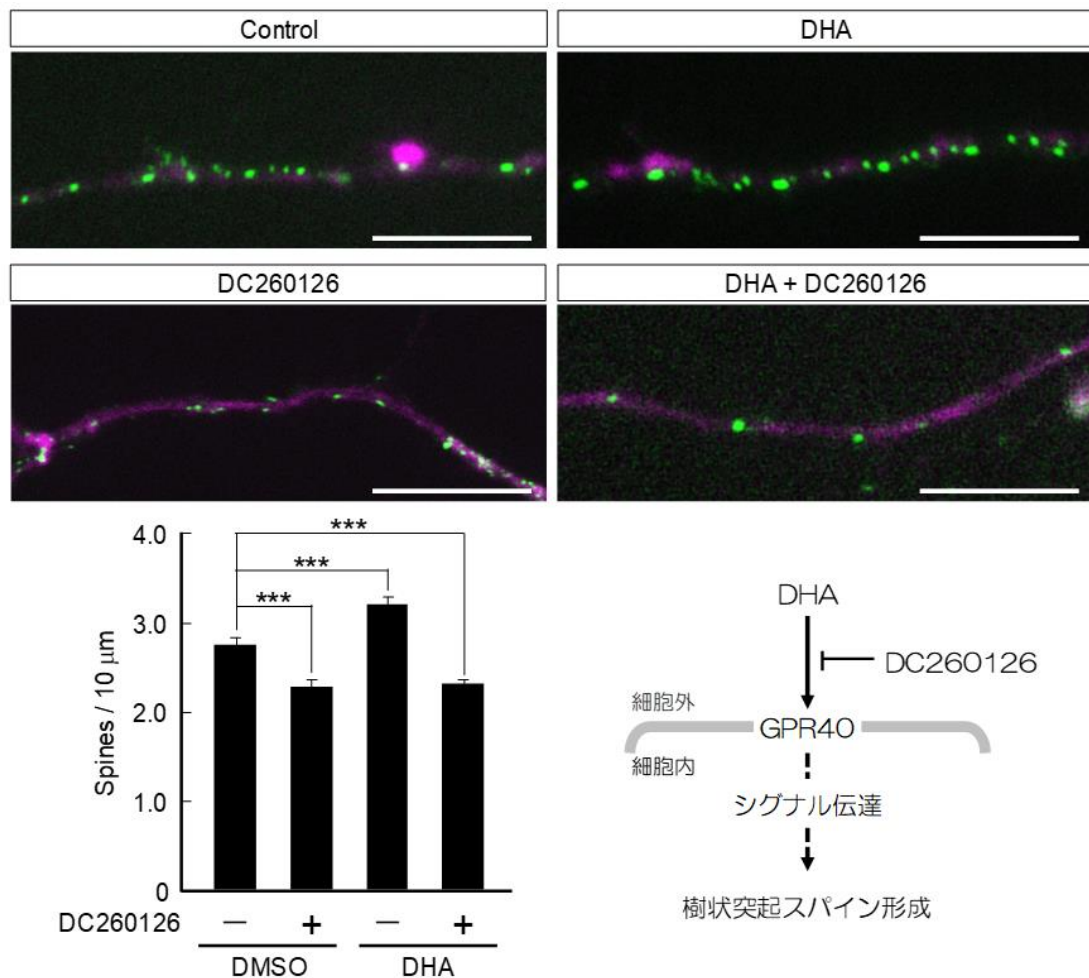


図1. DHAは培養海馬神経細胞の樹状突起スパイン形成を促進する

DHA, DHA受容体GPR40のアンタゴニストであるDC260126処理した神経細胞の免疫染色像  
緑の点 (PSD-95)は樹状突起スパインを示す。(Bars : 10 μm)

さらに生体マウスを用いて DHA による樹状突起スパイン形成の影響を解析したところ、DHA の投与が樹状突起スパインの数を有意に増加させることが解った (図 2)。また、GPR40 のアゴニストである GW9508 の投与で樹状突起スパイン数の増加が認められた。以上の結果から、DHA による神経細胞の樹状突起スパインの形成促進には GPR40 が関与することが明らかとなった。

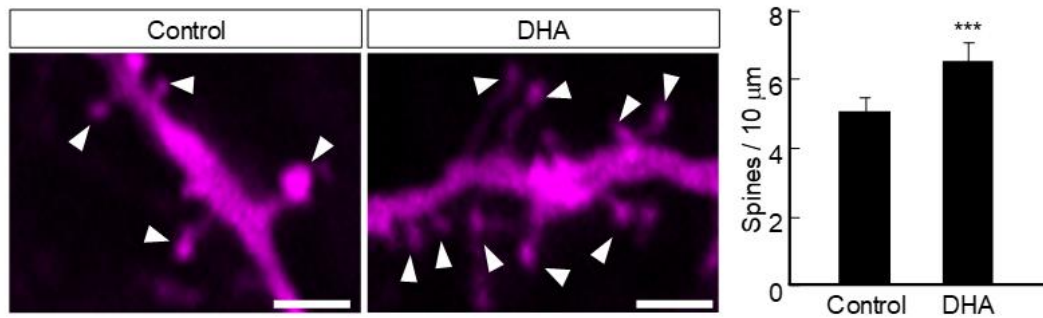


図2. 生体マウスへのDHAの投与は樹状突起スパイン形成を促進する

マウス大脳皮質の神経細胞をDiIで標識した蛍光観察像および樹状突起スパイン数の解析結果。矢頭は樹状突起スパインを示す。(Bars : 2  $\mu\text{m}$ ) (\*\*\*)  $p < 0.001$ )

## 2) RNF39 は樹状突起スパイン形成に関与する

我々の研究グループではこれまでにDHAによる遺伝子発現の変化に注目した解析を行い、DHAにより発現量が増加する遺伝子の1つとしてRNF39 (Ring Finger Protein 39) を同定している。そこで、DHAによるRNF39の発現増加が樹状突起スパイン形成に関与する可能性を考え研究を進めた。RNF39を過剰発現させた神経細胞では樹状突起スパインの数が有意に増加することが解った。一方、RNF39の発現を抑制した神経細胞では樹状突起スパインの数が低下することが解った(図3)。さらに、RNF39を発現抑制した神経細胞ではDHAによる樹状突起スパインの形成の促進が認められなかった。これらの結果から、DHAによる神経細胞の樹状突起スパインの形成促進はRNF39の発現増加を介する可能性が示唆された。

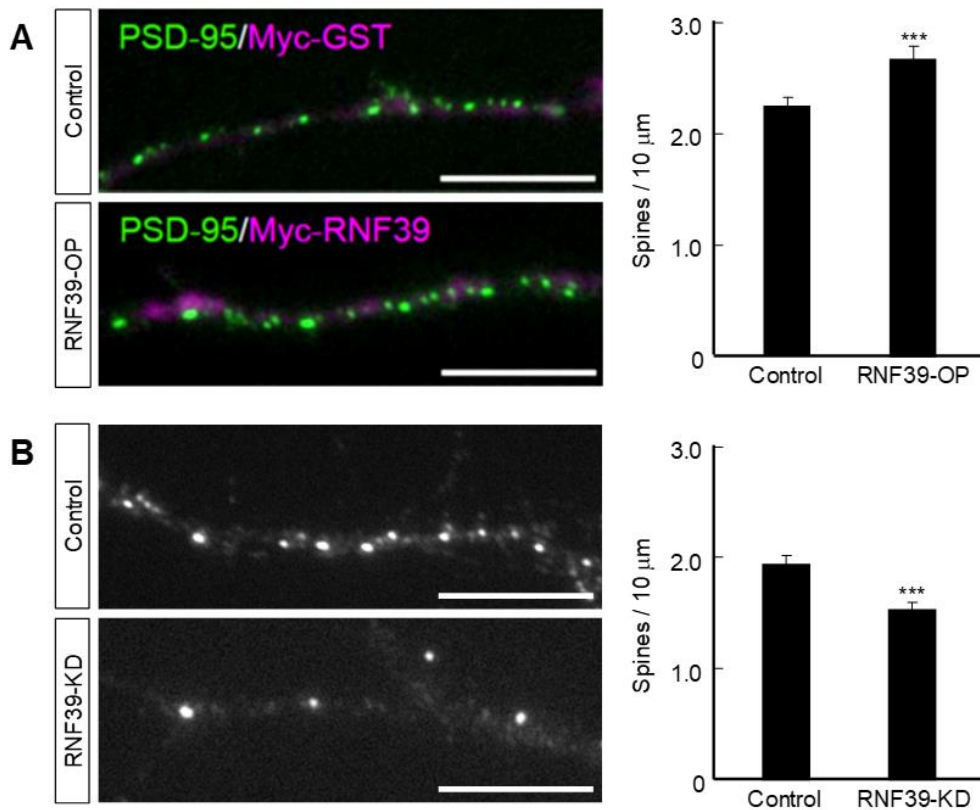


図3. RNF39は樹状突起スパイン形成に関与する

A: RNF39過剰発現細胞 (RNF39-OP) における樹状突起スパインの免疫染色像  
 B: RNF39過剰発現細胞 (RNF39-KD) における樹状突起スパインの免疫染色像  
 右のグラフは樹状突起スパイン数を定量したもの (Bars : 10  $\mu\text{m}$ )

3) RNF39 は MDM2 との相互作用を介し MDM2 のタンパク質分解を誘導する

樹状突起スパインの形成と維持には多くの分子の関与が報告されている。特に細胞形態の変化を司る細胞骨格分子群やそれらを制御するシグナル伝達関連分子の時空間的な制御が必要とされる。RNF39 結合分子の一つである MDM2 は E3 ユビキチンリガーゼとして機能することで樹状突起スパイン形成を促進する微小管結合分子 Doublecortin のタンパク質分解を誘導することで、樹状突起スパイン形成を抑制することが知られている。本研究から RNF39 は MDM2 と直接結合すること。さらに、MDM2 のユビキチン化修飾を経て MDM2 のタンパク質分解誘導することも明らかとなった。

以上の結果から、DHA により神経細胞の樹状突起スパイン形成が促進される分子機構として、DHA の刺激により RNF39 の遺伝子発現が誘導され、その後、RNF39 が MDM2 のタンパク質分解を誘導することで、樹状突起スパイン形成を正に制御する Doublecortin のタンパク質量の増加により、樹状突起スパイン形成が促進されることが明らかとなった。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究の解析対象である DHA は不飽和脂肪酸の一つであり、先行研究から心筋梗塞、動脈硬化の予防に効果があることが解っている。さらに、脳・神経系では、神経幹細胞からの神経細胞に産生、神経回路網の形成促進を経て、記憶/学習能力の向上に関与することも解っている。また、アルツハイマー病などの認知症の予防や症状緩和にも有効性が示唆されており、予防医学の方面への波及も期待される。