

氏 名 大橋 りえ

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2088 号

学位授与の日付 平成 31年 3 月 22日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 RNG105 (Caprin1) 依存的に樹状突起へ局在化する mRNA
の網羅的同定を手掛かりとした脳・神経機能制御機構の解析

論文審査委員 主 査 教授 東島 眞一
准教授 椎名 伸之
教授 吉田 松生
室長 木村 展之 国立長寿医療研究センター
認知症先進医療開発センター

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 Ohashi, Rie

論文題目 RNG105 (Caprin1) 依存的に樹状突起へ局在化する mRNA の網羅的同定を手掛かりとした脳・神経機能制御機構の解析 (Regulatory mechanisms of brain and neuronal functions revealed through comprehensive identification of mRNAs localized to dendrites by RNG105 (Caprin1))

Spatiotemporal translational regulation plays important roles in increasing local concentrations of specific proteins to exert their functions at specific timing and location in cells. In neurons, specific mRNAs are recruited to RNA granules, membraneless RNA-protein assemblies, to be transported to dendrites and locally translated around excitatory postsynapses (also called as spines) in response to synaptic inputs. This regulatory system, called “local translation”, is responsible for synaptic potentiation, which is believed to be the basis of learning and memory. However, it is not fully understood whether RNA granule components play roles in dendritic mRNA localization *in vivo* and impact on higher-order brain and mental functions.

In this study, I focused on one of the RNA-binding proteins in RNA granules, RNA granule protein 105 (RNG105, also known as Caprin1). RNG105 is responsible for the dendritic transport of its binding mRNAs in primary cultured neurons *in vitro*, and is required for the formation of long-term memory, which was revealed by behavioral analyses of RNG105 conditional knockout (cKO) mice in which the *Rng105* gene had been deleted in the cerebrum and hippocampus after birth. However, it remains unknown whether RNG105 is responsible for the dendritic localization of mRNA *in vivo*, and if so, what kind of mRNA is localized to dendrites by RNG105 and how RNG105 impacts on long-term memory through regulating the dendritic mRNA localization. Another question is whether RNG105 is associated with neurodevelopmental and mental disorders: *Rng105* heterozygous nonsense *de novo* mutation was found in an autism

spectrum disorder (ASD) patient, but causal relationship between RNG105 deficiency and ASD-like behavior is unknown. In this study, I conducted comprehensive behavioral analysis of RNG105 heterozygous knockout (*Rng105^{+/-}*) mice to reveal the influence of RNG105 deficiency on brain and mental functions. Furthermore, I comprehensively analyzed the somato-dendritic mRNA distribution in the hippocampus of RNG105 cKO mice to reveal the underlying mechanism of the ASD-like behavior and impaired long-term memory formation in RNG105-deficient mice. The mRNA distribution analysis identified a new panel of dendritic mRNAs for ADP-ribosylation factor (Arf) regulators, which provided a new insight into the mechanism of synapse formation and plasticity regulated through dendritic mRNA localization.

In Chapter I, *Rng105^{+/-}* mice were subjected to a comprehensive behavioral test battery. *Rng105^{+/-}* mice exhibited reduced sociality in a home cage and reduced preference for social novelty. Consistently, *Rng105^{+/-}* mice showed reduced preference for novel objects and novel place patterns. Moreover, although *Rng105^{+/-}* mice exhibited normal memory acquisition, they tended to have relative difficulty in reversal learning in spatial reference tasks. These findings suggested that RNG105 heterozygous knockout leads to a reduction in sociality, response to novelty and flexibility in learning, which are implicated in ASD-like behaviors.

In Chapter II, genome-wide profiling of mRNA distribution in the hippocampus was conducted by dissecting somatic and dendritic layers followed by RNA-seq analysis. Although control mice showed asymmetric somato-dendritic localization of mRNA in the hippocampus, this asymmetric distribution pattern was impaired by RNG105 cKO. Particularly, RNG105 cKO reduced the dendritic localization of mRNAs encoding regulators of AMPA receptor (AMPA) cell surface expression. Consistent with this, RNG105 knockout in neurons reduced surface AMPARs and attenuated homeostatic AMPAR scaling in dendrites. These results suggested that RNG105 is required for synaptic potentiation such as AMPAR surface expression, which is considered to be an

underlying mechanism of ASD-like behavior and the loss of long-term memory in RNG105-deficient mice.

In Chapter III, I focused on a panel of mRNAs for Arf GEFs and GAPs, which had been identified as mRNAs enriched in dendrites in an RNG105-dependent manner. mRNA localization analysis using MS2 system in cultured neurons demonstrated that the Arf GEF and GAP mRNAs were localized to dendrites in a depolarization stimulation-independent and dependent manner, respectively. Furthermore, knockdown experiments demonstrated that the Arf GEFs and GAPs were classified into two groups: one group consisted of positive regulators of spine maturation and AMPAR surface expression, and the other consisted of negative regulators of immature spine formation. These results suggested that Arf GEFs and GAPs play important roles in tuning spine formation, maturation, and AMPAR surface expression through their mRNAs being localized to dendrites at specific timing.

In conclusion, this study demonstrated that RNG105 plays key roles in the dendritic localization of mRNAs *in vivo*, which is considered to impact on the higher-order brain and mental functions through regulating the surface expression and homeostatic scaling of AMPARs. In addition, this study has provided a novel insight into the regulatory mechanism of AMPAR surface expression and synaptic plasticity through localizing a set of Arf regulator mRNAs to dendrites.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 大橋 りえTitle
論文題目 RNG105 (Caprin1) 依存的に樹状突起へ局在化する mRNA の網羅的同定を手掛かりとした脳・神経機能制御機構の解析

出願者は、神経樹状突起への mRNA 局在化機構およびその高次脳機能における役割に関して、マウスを用いた研究を行った。まず、RNA 顆粒構成因子 RNG105 のヘテロ欠損マウスの、25 種類からなる網羅的行動テストを行った。その結果、RNG105 ヘテロ欠損マウスは野生型マウスと比較して、1) 社会的相互作用の様式が異なる、2) 新奇対象と既知対象とで、本来新奇対象に対して示す高い反応性や選択性を示さない、3) 正常な学習・記憶獲得能力を有し、特定の課題では野生型マウスよりも高い遂行能力を示すが、状況が変化する逆転学習では遂行能力が低下する、という主な行動特性を持つことを見出した。これらの行動特性は、自閉症スペクトラム症候群 (ASD) の行動特性と一致することから、RNG105 のヘテロ欠損は ASD 様行動を引き起こすことが示された。ヒトの ASD 患者で RNG105 ヘテロナンセンス変異が一例報告されているが、この患者は平均より高い IQ を持つアスペルガー症候群と診断されている。RNG105 ヘテロ欠損マウスの行動特性との関連性から、RNG105 ヘテロ欠損が ASD の原因となる可能性が示唆された。

次に、出願者は、RNG105 が生後の大脳および海馬でコンディショナルにノックアウト (cKO) される RNG105 cKO マウスを用い、mRNA の局在解析を行った。海馬 CA1 領域の錐体細胞層および放線状層を解剖によって切り出し、各々から RNA を抽出後、次世代 RNA シークエンシングによって比較解析することにより、細胞体層および樹状突起層に濃縮する mRNA 群を網羅的に同定した。コントロールマウスとの比較の結果、RNG105 cKO によって、mRNA の細胞体層-樹状突起層局在の非対称性が減少することを見出した。この非対称性減少の原因は、樹状突起への mRNA 局在化の減少であることを、神経初代培養細胞における mRNA 局在解析により示した。遺伝子オントロジー (GO) 解析により、これら樹状突起局在性 mRNA が多く含まれる GO カテゴリーの一つとして、Arf 制御カテゴリーを同定した。Arf は低分子量 G タンパク質であり、AMPA 受容体等の細胞表面-エンドソーム間の輸送を担うことが報告されている。そこで出願者は、RNG105 ノックアウト神経初代培養細胞を用いて、樹状突起表面に提示された AMPA 受容体の定量解析を行った。その結果、野生型の神経細胞と比較して、樹状突起表面の AMPA 受容体が減少し、さらに、長時間の神経活動抑制時に本来見られる樹状突起表面 AMPA 受容体の増加制御 (恒常的スケールリング) も減弱することを見出した。以上の結果から、RNG105 は、Arf 制御因子をコードする mRNA 等の樹状突起局在を介して、AMPA 受容体の樹状突起表面発現制御に関与することが示唆された。このことは、これまで明らかにされた RNG105 cKO マウスにおける興奮性シナプス後電位の低下および長期記憶の低下や、RNG105 ヘテロ欠損マウスにおける ASD 様行動をよく説明し、それらの基盤となるメカニズムであると考え

られた。

さらに出願者は、RNG105 cKO によって樹状突起層局在が低下した Arf 制御因子 (guanine nucleotide exchange factor (GEF)および GTPase-activating protein (GAP)) mRNA 8 種類について、それらの樹状突起局在を、神経初代培養細胞における mRNA の GFP タグによる可視化法を用いて解析した。その結果、Arf GEF mRNA は神経活動非依存的に、一方 Arf GAP mRNA は依存的に樹状突起へ局在化することを見出した。さらに、shRNA によるノックダウンにより、8 種類の Arf GEF および GAP は、成熟型スパインの形成および AMPA 受容体の樹状突起表面発現といったシナプス強化に関与するグループと、未成熟型スパイン形成の抑制に関与するグループとに大別できることを見出した。これらの結果から、8 種類の Arf GEF および GAP は、それらの mRNA が特定の神経活動状態に応じて樹状突起に局在化することで、スパイン形成・成熟および AMPA 受容体表面発現の調節に関わる可能性が示された。

以上の出願者の研究は、RNA 顆粒構成因子 RNG105 が *in vivo* の脳神経において mRNA の樹状突起局在に必要であること、また、AMPA 受容体の樹状突起表面発現を介して高次脳機能に関与することを示した。さらに、Arf 制御因子 mRNA の樹状突起局在に関する研究は、AMPA 受容体表面発現およびシナプス可塑性を調節する新たな分子機構の解明に繋がる研究である。よって、本研究は、博士論文に十分値するものと判断した。

また、博士論文審査会では、出願者は質疑に対して適切に返答し、博士論文の周辺分野に関する十分な知識を有し、適切な考察を行ったことから、博士学位授与に十分な能力を有していると判断した。出願者は国際紙に英語論文を發表していること、海外の国際学会において發表を行っていることから、博士学位授与に相応しい英語能力を有すると判断した。なお、日本語の論文題目は多義に解釈できてしまうことから、修正が必要である。

(備考)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格 (JIS) A 4 縦型とする。
2. 1 行あたり 40 文字 (英文の場合は 80 文字)、1 ページあたり 40 行で作成する。
3. 上マージン、下マージン、右マージンは 2 cm、左マージンは 2.5 cm とする。
4. タイトルと本文の間は、1 行空ける。
5. ページ番号は入れない。
6. 出願者 (申請者) が論文審査に合格し、博士号が授与された場合は、本紙を総合研究大学院大学リポジトリにおいて、インターネット公開する。

Note:

1. The sheets must be Japanese Industrial Standard (JIS) A4 vertical.
2. Each line shall have approximately 40 characters in Japanese or 80 characters in English, and each page shall have 40 lines.
3. The top, bottom, and right margins must be 2 cm and the left one must be 2.5 cm.
4. Single spacing is required between the title and the text.
5. There must be no page numbers.
6. If the applicant is conferred a doctoral degree, this paper will be published on the SOKENDAI Repository.