

アルギニンメチル化に着目したうつ病発症機構の解明

近畿大学東洋医学研究所

石野 雄吾

1. 諸言

近年、精神疾患を患う患者数は大幅に増加しており、特にうつ病の患者数の増加は著しいものがある。これら精神疾患の発症には、遺伝的な要因と共にストレス等の様々な環境要因が大きく関与することが知られている。慢性的なストレス暴露がストレス応答系である視床下部-下垂体-副腎軸 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis : HPA axis) の調節不全を引き起こし、うつ病などの精神疾患を発症すると想定されているが、その分子機序や脳の機能的変化に関して詳細は不明な部分が多い。われわれはこれまでに、慢性ストレス暴露により引き起こされるうつ様症状の出現におけるマウス脳内の特異的な変化を見出し、分子機序の解析を行ってきた¹⁾。その1つが脳内のグリア細胞の1つであるオリゴデンドロサイト特異的に起こるタンパク質リン酸化経路の活性化である²⁾。このリン酸化経路がアルギニンのメチル化によって制御される可能性が最近になって報告された³⁾。そこで本研究では、オリゴデンドロサイトの構造・機能異常に着目しリン酸化シグナル経路とアルギニンメチル化の関連性を分子レベルで解明することを目指した。

2. 方法

2.1 オリゴデンドロサイト前駆細胞 (oligodendrocyte precursor cell : OPC) の単離

生後 4-6 日の ICR マウスを低温麻酔下で断頭し、大脳皮質を取り出した。OPC の単離は細胞表面の遺伝子マーカーである血小板由来成長因子受容体 (platelet derived growth factor receptor alpha : PDGFR α) の発現を指標にして、ミルテニー製品のプロトコール通りに磁気ビーズを用いて行った。単離した OPC はポリ-L-オルニチン (poly-L-ornithine : PLO) / ラミニンでコートしたカバーガラス上で培養した。培養液は、増殖用培地として DMEM/F12 に B27 および 10 ng/mL 毛様体神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor : CNTF)、1 ng/mL ニューロトロフィン (neurotrophin 3 : NT3)、10 ng/mL PDGF-AA を添加したものを使用した。

2.2 オリゴデンドロサイト分化アッセイ

磁気ビーズを用いて回収した OPC を増殖用培地下で 2 日間培養した後、分化培地に変更して 5 日間培養した。その際、アルギニンメチル化酵素の阻害剤を添加することで、その効果を観察した。分化培地として、DMEM/F12 に B27, 10 ng/mL CNTF および 30 ng/mL T3 を添加した培地を使用し、2 日に一度半量を培地交換した。

2.3 後根神経節神経細胞の培養

胎生 13 日のマウスから頸髄および胸髄レベルの脊髄神経節を回収し、PLO および 10%マトリゲルでコートしたカバーガラス上で 2~3 週間培養し OPC との共培養系に用いた。培地として Neurobasal medium に B27, 10 ng/mL 神経成長因子 (nerve growth factor : NGF) を添加したものをを用いて行い、2 日ごとに半量を培地交換した。

2.4 OPC および後根神経節神経細胞の共培養

上記の方法で培養した後根神経節神経細胞と生後脳から回収した OPC を Neurobasal medium および DMEM/F12 培地を 1:1 で混合したものに、B27, N2, 10 ng/mL NGF, 10 ng/mL CNTF および 30 ng/mL T3 を添加した培地下で 2 週間培養し、髄鞘形成を観察した。その際、アルギニンメチル化酵素の影響を調べるため阻害剤を添加した。

2.5 RNA 抽出

アルギニンメチル化酵素阻害剤またはコントロールとして dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加した分化培地で OPC を 24 時間培養後、NucleoSpin RNA kit (MACHEREY) を用いてプロトコールに従って RNA を抽出した。

2.6 real-time PCR

上記 RNA を SuperScript IV VILO (Thermo Fisher Scientific) により cDNA を作成し、オリゴデンドロサイトのマーカー遺伝子の発現解析を行った。

2.7 免疫細胞染色

4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde : PFA) により室温で 20 分間固定後、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline : PBS) にて 3 回洗浄した。0.5% TritonX-100 を含む PBS で 10 分間処理した後、一次抗体を 4°C にて一晩反応させた。PBS による洗浄後、蛍光色素標識された二次抗体を反応させた。一次抗体として、chicken-GFP 抗体、mouse- β III tubulin 抗体、Rabbit-Olig2 抗体、Rat-PLP 抗体を使用した。

3.結果

3.1 アルギニンメチル化酵素の機能抑制によりオリゴデンドロサイトの分化は低下

オリゴデンドロサイトの分化・成熟に関してタンパク質のメチル化修飾の影響を調べるために、アルギニンメチル化酵素阻害剤の存在下で OPC からの分化を解析した。今回は特に、非対称性のジメチル化を担うタンパク質を標的にし、阻害剤の影響を観察した。分化培地で5日間培養後、オリゴデンドロサイトの分化マーカーとしてミエリンプロテオリピド蛋白質 (proteolipid protein : PLP) の発現を指標に観察したところ、対照群では多数の PLP 陽性細胞が確認されたが、阻害剤添加によってその数は顕著に減少した (図 1)。さらにより詳細にオリゴデンドロサイト分化への影響を調べるため、オリゴデンドロサイトマーカー遺伝子の発現解析を行った。分化開始 24 時間で RNA を抽出し、定量的 PCR を行ったところ、特に分化に必要とされる Sox10, Cnp, Myrf といった遺伝子の発現が減少傾向を示していた (図 2)。

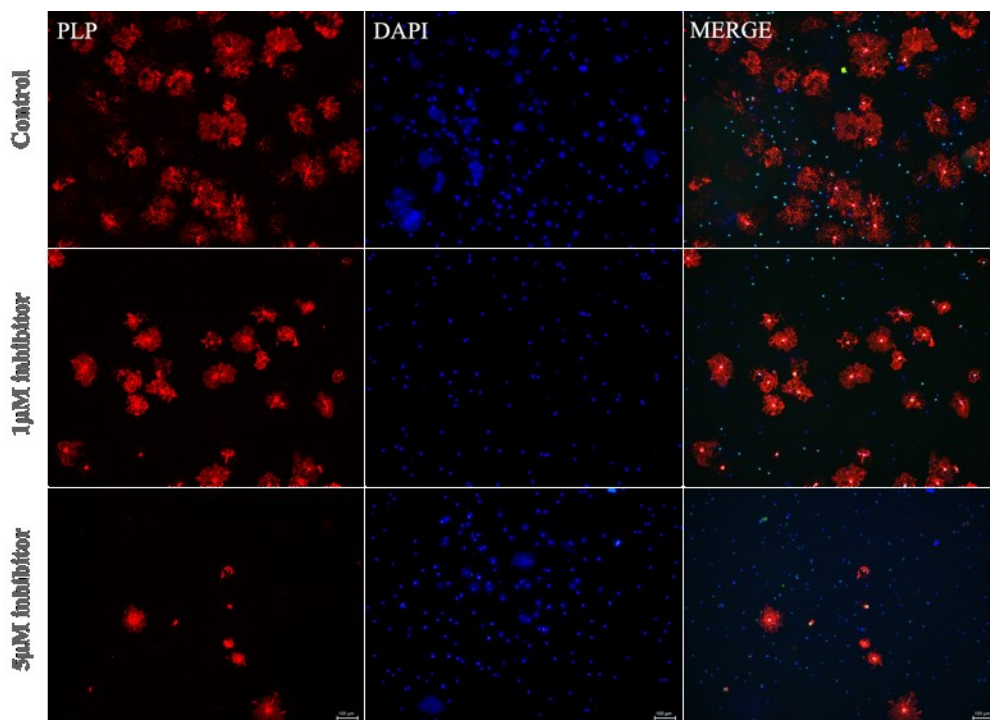


図 1 メチル化酵素機能抑制によるオリゴデンドロサイト分化への影響
アルギニンメチル化酵素の機能抑制により、オリゴデンドロサイトへの分化が低下した。PLP 染色 (赤)、核染色 (DAPI、青)。

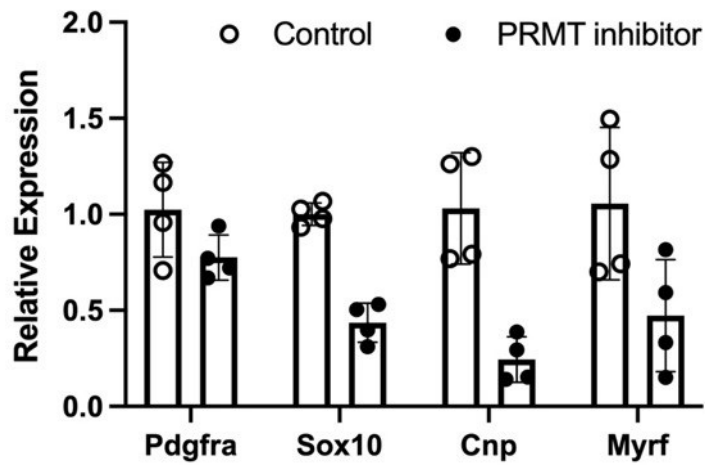


図2 メチル化酵素機能抑制によるオリゴデンドロサイトマーカー遺伝子の発現変化
アルギニンメチル化酵素の機能抑制により、オリゴデンドロサイトのマーカー遺伝子の発現が減少傾向を示した。

3.2 アルギニンメチル化の阻害により髄鞘形成が障害

神経軸索に対する髄鞘形成におけるアルギニンメチル化の影響を調べるため、OPC と後根神経節神経細胞との共培養を行った。胎生期マウスの後根神経節神経細胞を2～3週間培養し、軸索が十分伸長したことを確認後、阻害剤の存在下または非存在下で髄鞘形成を観察した。OPCの分化誘導後2週間培養し、髄鞘化のマーカーとしてPLPの染色を行った。阻害剤の非存在下では軸索の伸長方向に沿ったPLPのシグナルが確認され髄鞘化が観察された。一方、阻害剤の存在化ではPLPのシグナルは見られるものの、そのシグナルは断片化し軸索の伸長方向に沿ったものは減少していた。このことから、アルギニンメチル化酵素の機能阻害によって神経軸索の髄鞘形成が障害されることが確認された(図3)。

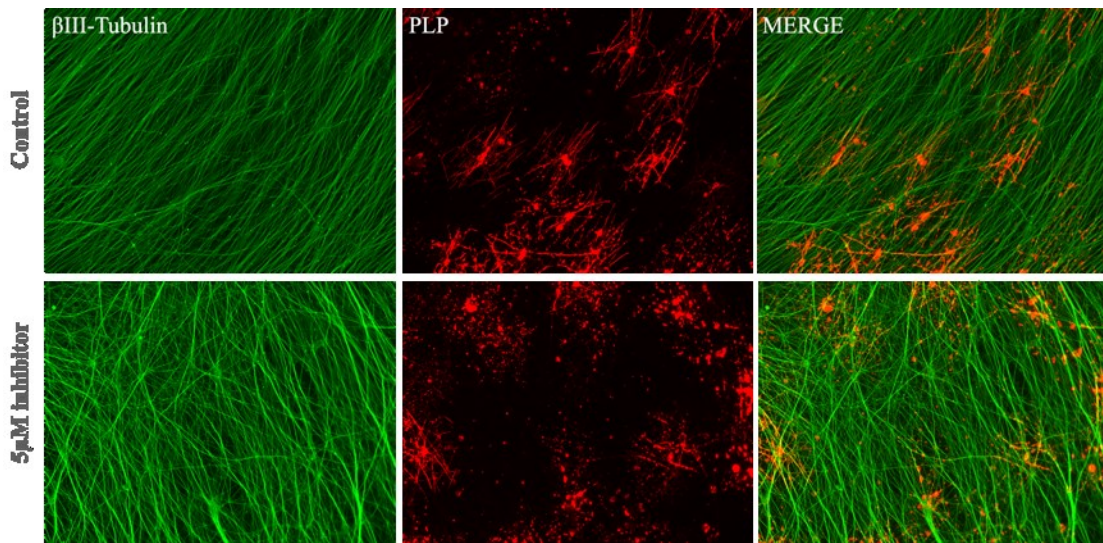


図3 メチル化酵素機能抑制による髄鞘の断片化

阻害剤非存在下では軸索にそった髄鞘のシグナルが観察されるが、アルギニンメチル化酵素の機能抑制により、オリゴデンドロサイト由来の PLP シグナルが断片化していることがわかる。軸索(β III-Tubulin、緑)、オリゴデンドロサイト (PLP、赤)。

4.考察

本研究によってこれまでオリゴデンドロサイトの分化制御分野においてそれほど注目されてこなかったアルギニンメチル化の重要性が明らかになった。これまでに PRMT1 のノックアウトマウスの解析はされていたが、広く神経系の細胞でノックアウトされているためオリゴデンドロサイト単独での影響は不明であった⁵⁾。本研究によりオリゴデンドロサイトを単離して解析することで、確かにオリゴデンドロサイトの分化においてアルギニンメチル化酵素が重要な機能を担っていることが確かめられた。

これまで注目を集めてきたアルギニンメチル化修飾は主にヒストンタンパク質に関してであった。ヒストンのアルギニンメチル化修飾によってエピジェネティックな遺伝子発現変化が重要な役割を担っていることがわかっている。一方で、非ヒストンタンパク質のアルギニンメチル化についても近年報告が増えており、アルギニンメチル化の機能が多岐にわたることがわかってきた。本研究では基質の特定には至らなかったが、今後の研究によってより詳細な分子メカニズムの解明が期待される。

5.結語

本研究によってこれまで注目が低かったアルギニンメチル化がオリゴデンドロサイトの分化に重要な役割を担っていることが示された。シグナル伝達に非常に重要であるタンパク

質リン酸化とのクロストークが指摘されており、今後の研究によって慢性ストレスによって惹起されるオリゴデンドロサイトの機能障害となるメカニズムの解明および新規治療方法へと発展することが期待される。

6.文献

- 1) Miyata S, Taniguchi M, Koyama Y, Shimizu S, Tanaka T, Yasuno F, et al. Association between chronic stress-induced structural abnormalities in Ranvier nodes and reduced oligodendrocyte activity in major depression. *Sci Rep.* 2016;6:23084.
- 2) Miyata S, Koyama Y, Takemoto K, Yoshikawa K, Ishikawa T, Taniguchi M, et al. Plasma corticosterone activates SGK1 and induces morphological changes in oligodendrocytes in corpus callosum. *PLoS One.* 2011;6(5):e19859.
- 3) Yamagata K, Daitoku H, Takahashi Y, Namiki K, Hisatake K, Kako K, et al. Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Mol Cell.* 2008;32(2):221-231.
- 4) Chen Y, Wu H, Wang S, Koito H, Li J, Ye F, et al. The oligodendrocyte-specific G protein-coupled receptor GPR17 is a cell-intrinsic timer of myelination. *Nat Neurosci.* 2009;12(11):1398-1406.
- 5) Hashimoto M, Murata K, Ishida J, Kanou A, Kasuya Y, Fukamizu A. Severe Hypomyelination and Developmental Defects Are Caused in Mice Lacking Protein Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1) in the Central Nervous System. *J Biol Chem.* 2016;291(5):2237-2245.

7.成果発表

学会発表

- Yugo I, Shoko S, Masaya T, Shingo M. Towards understanding of novel molecular mechanisms regulating oligodendrocyte differentiation and myelination. 63th The Japanese Society for Neurochemistry. Tokyo. 2020