

関西学院大学 研究成果報告

2023年 3月 13日

関西学院大学 学長殿

所属：理工学研究科
職名：博士研究員
氏名：鈴木 慎一郎

以下のとおり、報告いたします。

研究制度	<input type="checkbox"/> 特別研究期間 <input type="checkbox"/> 自由研究期間 <input type="checkbox"/> 大学共同研究 <input type="checkbox"/> 個人特別研究費 <input checked="" type="checkbox"/> 博士研究員 ※国際共同研究交通費補助については別様式にて作成してください。
研究課題	ドコサヘキサエン酸 (DHA)による樹状突起スパイン形成促進機序の解明
研究実施場所	関西学院大学大学院理工学研究科 矢尾研究室
研究期間	2022年 11月 1日 ~ 2023年 3月 31日 (5ヶ月)

◆ 研究成果概要 (2,500字程度)

上記研究課題に即して実施したことを具体的に記述してください。

【背景】

ドコサヘキサエン酸 (DHA)に代表される長鎖不飽和脂肪酸は、正常な脳の発生や脳機能の向上に必要な栄養成分の一つとして認知されている。食事から摂取されたDHAは血液脳関門で運搬体分子MFSD2Aの働きにより血液中から脳へと供給される。近年、このMFSD2Aに遺伝子変異を持つヒト疾患患者やモデルマウスでは脳内のDHAの減少に伴い、小頭症・脳室拡大・脳梁形成不全をはじめとする顕著な脳構造の異常を示すことが報告された (Alakbarzade et al., *Nature Genetics*, 2015)。これらの知見から、DHAは正常な脳・神経系の発生および脳機能の発揮に必要な不可欠な役割を担うことが予想された。

DHAの機能の一つとして、神経細胞の樹状突起スパインの形成促進が挙げられる (He et al., *PNAS*, 2009)。樹状突起スパインは神経細胞の樹状突起に存在する棘状の構造体であり、神経伝達物質を受容することで神経細胞間の情報伝達を司り、記憶・学習などの高次脳機能の発揮に必要とされる (Kasai et al., *Trends Neurosci*, 2010)。しかし、脳内に供給されたDHAがどのように樹状突起スパイン形成に関わるかは、その作用機序を中心に未解明な点が数多く残されている。これまでに、DHAが神経細胞内のCa²⁺濃度上昇を介して、転写因子NFATの活性化を誘導することが明らかになっている。通常、転写因子は複数の遺伝子発現を制御

することが知られており、DHA刺激により多数の遺伝子発現が変動すると考えた。そこで、DHAにより発現が誘導される遺伝子群の同定およびこれら遺伝子の機能解析を通じて、神経回路網形成におけるDHAの作用機序の解明を目指した。

【成果】

① DHAによる樹状突起スパインの形成促進はGPR40を介する

まず、DHAによる樹状突起スパインの形成促進作用のシグナル伝達経路の同定を試みた。DHAは細胞膜の受容体分子GPR40 (G-Protein Coupled Receptor 40)や核内受容体PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ)により受容される経路や、脂質二重層へ移行して膜の流動性を上昇させる作用が報告されている。培養海馬神経細胞をGPR40のアゴニストで処理したところ、樹状突起スパイン形成が促進された。一方で、GPR40のアンタゴニストとDHAで処理したところ、DHAによる樹状突起スパイン形成促進効果が消失した。これらの結果から、DHAはGPR40により受容され下流のシグナルの活性化を経て、樹状突起スパイン形成を促進する可能性が考えられた。GPR40は細胞内Ca²⁺濃度の上昇を経て遺伝子発現を制御することから、DHAによる遺伝子発現の制御が樹状突起スパイン形成に寄与すると予想された。

② DHAにより遺伝子発現がダイナミックに制御される

続いて、DHAによる遺伝子発現の制御に着目して研究を進めた。次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を行い、DHAの刺激により発現量が変動する遺伝子の網羅的同定を行った。その結果、1.5倍以上に発現量が上昇する遺伝子は114個、2/3倍以下に発現量が減少する遺伝子は146個となった。この結果から、DHAが神経細胞の遺伝子発現をダイナミックに制御することが示された。発現量が上昇した遺伝子の中には、分子機能が報告されていない機能未知の遺伝子が多数含まれており、これら遺伝子の機能解析からDHAの新たな生理機能の解明のみならず、脳・神経系の正常な発生機序を理解する上で重要な発見が期待された。

③ DHAにより発現誘導されるRNF39は樹状突起スパインの形成を促進する

DHA刺激により発現量が上昇する遺伝子のうち、RING Finger Protein 39 (RNF39)に着目した。RNF39は長期増強 (LTP: long-term potentiation)の誘発により発現量が上昇することが報告されている (Matsuo et al., *BBRC*, 2001; Ploski et al., *J Neurochem*, 2010)。LTPは、神経細胞に発現しているNMDA受容体の活性化の結果、樹状突起スパインの形成促進やシナプスの伝達効率の上昇が起こり、それが長時間維持する現象であり、記憶や学習に関連すると考えられている。一方で、DHAは樹状突起スパイン形成を促進する機能を有することが報告されている (He et al., *PNAS*, 2013)。これらのことから、DHAによる樹状突起スパインの形成促進や記憶・学習能力向上はRNF39を介する可能性が考えられた。

そこで、樹状突起スパインの形成におけるRNF39の機能解析を行った。RNF39を過剰発現させた培養海馬神経細胞では樹状突起スパイン形成が促進された。一方で、RNF39の発現抑制により樹状突起スパインの形成が抑制された。また、RNF39を発現抑制させた細胞においてDHAで処理したところ、樹状突起スパイン形成の促進が認められなかった。以上より、DHAはRNF39を介して樹状突起スパイン形成を促進することが示唆された。

④ RNF39はMDM2と結合することでMDM2のタンパク質分解を誘導する

RNF39による樹状突起スパインの形成促進機構を解析するために、RNF39と結合するタンパク質の探索を行った。その結果、新規RNF39結合分子としてMDM2を同定した。先行研究により、マウス嗅球の抑制性神経細胞において、MDM2は樹状突起スパインの形成を抑制する機能を有すると報告されている (Yoshihara et al., *Cell Rep*, 2014)。そこで、RNF39はMDM2の機能を抑制することで樹状突起スパイン形成を促進する可能性が考えられた。

RNF39によるMDM2への影響を解析した結果、MDM2のみ発現させた細胞に比べて、RNF39とMDM2を共発現させた細胞ではMDM2のタンパク質量が顕著に減少した。一方で、プロテアソーム阻害剤で処理した場合にはMDM2のタンパク質量に変化は認められなかった。これらの結果から、RNF39がMDM2のプロテアソームによるタンパク質分解を誘導することが示唆された。

⑤ RNF39 は DCX を安定化させる

先行研究により、MDM2はDCX (Doublecortin)の分解誘導を介して樹状突起スパインの形成を抑制すると報告されている (Yoshihara et al., *Cell Rep*, 2014)。そこで、RNF39によるDCXへの影響を解析した。その結果、DCXのみ発現させた細胞に比べて、RNF39とDCXを共発現させた細胞ではDCXのタンパク質量が有意に増加した。

以上の結果より、DHAにより樹状突起スパイン形成が促進される分子機構として、①DHAがGPR40を介してRNF39の遺伝子発現を誘導し、②RNF39が樹状突起スパイン形成を抑制するMDM2の分解を誘導してDCXを安定化させることにより、③樹状突起スパインの形成を促進することが示唆された。樹状突起スパイン形成が記憶・学習に密接に関与すると考えられていることから、DHAがRNF39を介した樹状突起スパイン形成を促進することで、記憶・学習能力など高次脳機能の向上につながる可能性が考えられた。

以 上

提出期限：研究期間終了後2ヶ月以内

※個人特別研究費：研究費支給年度終了後2ヶ月以内 博士研究員：期間終了まで

提出先：研究推進社会連携機構（NUC）

※特別研究期間、自由研究期間の報告は所属長、博士研究員は研究科委員長を経て提出してください。

◆研究成果概要は、大学ホームページにて公開します。研究遂行上大学ホームページでの公開に支障がある場合は研究推進社会連携機構までご連絡ください。