

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21444

研究課題名（和文）マイクロエクソン選択調節プログラムの獲得が人類の脳機能の高度化をもたらしたのか？

研究課題名（英文）Microexon splicing code for higher order brain functioning in human

研究代表者

吉田 知之（Yoshida, Tomoyuki）

富山大学・学術研究部医学系・准教授

研究者番号：90372367

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトが高度な社会性などの固有の脳機能を獲得した機序として、神経回路構築を担うマイクロエクソン（ME：3～27ntのエクソン）のスプライシング機構に注目した。シナプス誘導因子PTPRDの持つ3つのMEの選択的スプライシングは、シナプスの標的選別とシナプスの性質決定を担う。ヒトiPS細胞由来神経細胞とマウス神経細胞の間でこれらのME選択パターンを比較したところ、特定のMEの選択比率がヒト神経細胞で低いことがわかった。また、両者のME選択は神経活動によっても調節を受けたが、そのパターンの変化は互いに異なっていたことから、ヒトとマウスの間で神経活動依存的な神経回路構築機構が異なる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では脳神経回路構築において重要な役割を担うシナプスオーガナイザー遺伝子のマイクロエクソンの選択プログラムがマウスとヒトで異なることを明らかにした。本成果はヒトとマウス間の脳神経回路構築の基本原則が異なることを示したものであり、ヒトの脳進化を紐解く重要な知見として学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The evolutionary mechanisms in which humans have acquired unique brain functions remain largely unknown. In this study, we focused on the microexons' splicing program of a synapse organizer gene, PTPRD, which governs synaptic target selection and synaptic properties. Comparisons of alternative splicing patterns of human and mouse PTPRD/Ptprd gene microexons using cultured mouse neurons and human iPS cell-derived neurons revealed that human PTPRD gene microexons were included in the transcripts less frequently. Furthermore, the KCl treatments to induce depolarization of neurons rapidly altered the alternative splicing patterns in both mouse and human neurons, however the direction of the KCl-treatment effects on the microexons' inclusion/exclusion was totally different between mouse and human neurons. These results suggest that the principle of activity-dependent neural network formation in human brain likely to be different from that in mouse.

研究分野：神経科学一般

キーワード：脳神経回路 高次脳機能 マイクロエクソン 選択的スプライシング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

人類は言語を操り、複雑な社会や文明を構築するなど、極めて高次で固有の脳機能を獲得してきた。ヒトと他の哺乳類の間ではゲノム構造や保有する遺伝子レパートリーが高度に保存されており、個々の遺伝子産物のアミノ酸配列もマウスとの間で平均 80%以上、チンパンジーとの間で 99%が同じである。このような遺伝子配列レベルでの高い保存性にもかかわらず、脳機能の種差が生まれ、ヒトが固有の高次脳機能を獲得できた理由はよく判っていない。他の哺乳類と比べた際のヒトの脳の特徴は、大脳皮質の大きさ、シナプス数の多さ、シナプスの多様性にある。凡そ 1000 億個の神経細胞が形成するシナプスの数は 150 兆個に上ると推定される。この膨大なシナプスの構築を制御するヒトに固有の遺伝的プログラムの獲得こそがヒト脳機能の高度化に大きく寄与したと考えられる。近年、哺乳類の神経細胞において選択的に利用される 3~27ヌクレオチド (nt) の極めて短いエクソン (マイクロエクソン, micro-exon (me)) の存在が明らかになり、神経系で働くタンパク質の機能に多様性を生む新たなメカニズムとして注目されている。また、自閉スペクトラム症患者の脳において、マイクロエクソンの選択調節の異常が認められることから、コミュニケーション能力などヒト特有の高次脳機能の発達にマイクロエクソン選択調節が重要な役割を担うことが示唆されている。私達の研究グループはマウスを用いた研究から、神経回路形成において中心的役割を担うシナプスオーガナイザー遺伝子 *Ptprd* の 3つのマイクロエクソンの選択的スプライシングがシナプス標的の選択とシナプス誘導量を決定することを見出していた (Yoshida et al., J. Neurosci, 2011; Yoshida et al., J. Neurosci, 2012; Yamagata et al., Nat. Commun, 2015; Yamagata et al., Sci Rep, 2015)。また、ヒトのオソログ遺伝子 *PTPRD* の変異は自閉スペクトラム症との関連が示唆されていた。このような背景から、ヒトの高次脳機能を支える神経回路の高度化 (ヒト化) の一端に *PTPRD* 遺伝子マイクロエクソンの選択的スプライシングプログラムの獲得が寄与するとの仮説を持った。ヒト脳機能の分子基盤に関する研究では、倫理的な問題からヒト標本の使用に制約があり、仮説の検証が困難であったが、現在では iPS 細胞から分化誘導した神経細胞を用いることによってシナプスや神経回路レベルでの仮説の検証が可能となっている。また、ゲノム編集技術によって、ヒト型遺伝子をマウス等に導入して、その影響を評価することも可能になってきている。そこで、ヒト iPS 細胞由来神経細胞を用いた *PTPRD* 遺伝子マイクロエクソンの選択的スプライシングプログラムの解析とマイクロエクソンの選択的スプライシングプログラムをヒト化したマウス系統の作出と解析を行うことで、上記仮説の検証を行うことにした。

2. 研究の目的

本研究の目的はヒトの脳機能が他の哺乳類に比べて著しく発達した進化的機序を明らかにすることである。神経回路構築の設計図となるシナプスオーガナイザー *PTPRD/Ptprd* 遺伝子のマイクロエクソンの選択的スプライシング機構に注目して、ヒトの脳神経系に特徴的な *PTPRD* 遺伝子マイクロエクソン選択調節機構の獲得が脳機能の高度化 (ヒト化) をもたらした可能性を実験的に検証することを目指した。

3. 研究の方法

(1) マウスとヒトの *PTPRD/Ptprd* 遺伝子マイクロエクソンの選択的スプライシングプログラムの比較解析

シナプス前部オーガナイザーである受容体チロシン脱リン酸化酵素 *PTPRD* は、3つのマイクロエクソン (meA3, meA6 および meB) の選択的スプライシングによって 8種類のスプライスバリエーションが作り出され、バリエーションごとに異なる種類のシナプスを誘導する。マウス *Ptprd* 遺伝子のマイクロエクソンの選択的スプライシングが脳部位や発達時期 (遺伝的要因) に応じてどのように調節されているのか、また神経活動 (環境要因) によってどのように調節されるかを、8種類の *Ptprd* スプライスバリエーションの発現比率を算出する PCR フィンガープリント法で明らかにする。また、ヒト iPS 細胞から誘導した神経細胞 (ヒト iPS 神経細胞) を用いて、発達段階に応じた *PTPRD* 遺伝子のマイクロエクソンの選択パターンや神経活動 (電気刺激、KCl 処理) によるその変化を解析し、マウス *Ptprd* 遺伝子とヒト *PTPRD* 遺伝子間のマイクロエクソン選択的スプライシングプログラムの違いの有無を明らかにする。

(2) マイクロエクソンスプライシングプログラムのヒト化モデルマウスの作出と解析

シナプス形成調節の鍵となるマウス *Ptprd* 遺伝子の 3つのマイクロエクソンの選択調節を担うシスエレメント (intron 5~9 までの約 9kb) をヒト *PTPRD* 遺伝子の対応領域 (intron 12-16) とスワップしたマウス系統 (*Ptprd^{me}* ヒト化マウス) を作出し、マウスの脳内各部の *Ptprd* マイクロエクソンの選択比率の算出、各種シナプスマーカー抗体染色による回路形態の観察、更に社会性テスト、学習テスト等を含む行動バッテリーテストを行い、マイクロエクソン選択プログラムのヒト化が神経回路構築および行動パターンに与える影響を解析し、脳機能の高度化 (ヒト化) をもたらすか否かを評価する。

4. 研究成果

(1) マウスとヒトの *PTPRD*/*Ptprd* 遺伝子マイクロエクソンの選択的スプライシングプログラムの比較解析

マウス脳組織および培養神経細胞における *Ptprd* 遺伝子マイクロエクソンの選択的スプライシングプログラムの解析

様々な発達段階のマウス脳内各部位より cDNA ライブラリーを作製し、*Ptprd* 遺伝子の 3 つのマイクロエクソンの選択状態 (8 種類のスプライスバリエーションの発現比率) を PCR フィンガープリント法で解析した。その結果、8 種類のスプライスバリエーションは脳内部位ごとに固有の比率で発現し、その比率は発達段階に応じて変化することがわかった (図 1)。また、この比率には個体差が殆どなく、遺伝的に決められたマイクロエクソンの選択的スプライシングプログラムに従って調節されることが示唆された。また、培養神経細胞の電気刺激や高カリウム刺激では、速やかに (1 時間程度で) *Ptprd* 遺伝子の meB の選択状態が変化することも明らかになった。

ヒト iPS 神経細胞における *PTPRD* 遺伝子マイクロエクソンの選択的スプライシングプログラムの解析

ヒト *PTPRD* 遺伝子についても 8 種類のスプライスバリエーションの発現比率を算出できるようにマウス同様の PCR フィンガープリント法をデザインした。ヒト iPS 神経細胞 (リプロセル社) の培養開始から経時的にサンプリングし、8 種類のスプライスバリエーションの発現比率を解析すると、培養開始時には 3 つのマイクロエクソンはスプライシングによる選択制御を殆ど受けないことがわかった。その後、培養 1 週間から 2 週間にかけて各マイクロエクソンの選択率は増加した。しかし、各マイクロエクソンの選択比率はマウスのいずれの脳組織のものよりも低いものであった (図 2)。

培養 2 週間後のヒト iPS 神経細胞に KCl 処理を施し、その 4 時間後の各マイクロエクソンの選択率・8 種類のスプライスバリエーションの発現比率の変化を調べると、特定のスプライスバリエーションの発現比率が急激に変化することが明らかとなったが、この変化のパターンはマウス神経細胞を KCl 処理および電気刺激した際のものとは大きく異なっていた (図 3)。

現在、細かい神経活動 (電気刺激) パターンに応じたヒト *PTPRD* 遺伝子およびマウス *Ptprd* 遺伝子マイクロエクソンの選択的スプライシングパターン変化の比較検討を進めている。

(2) マイクロエクソンスプライシングプログラムのヒト化モデルマウスの作出と解析

データベースの解析から、マウス *Ptprd* 遺伝子およびヒト *PTPRD* 遺伝子の 3 つのマイクロエクソンの上流イントロンには選択的スプライシング調節に関わるコンセンサス配列 (intronic splicing enhancer sequence: ISE) が存在することがわかった。これら全てを含むマウス *Ptprd* 遺伝子上の 9 kb の領域を *PTPRD* 遺伝子の対応領域に置き換えるヒト化モデルマウスの作出を試みた。マウス *Ptprd* 遺伝子上の 2 箇所 (エクソン 5 内およびイントロン 9 内) を切断するガイド RNA をデザインした。また、ヒト *PTPRD* 遺伝子のイントロン 12-16 を含み、5'側を相同組換えで、一方 3'側を 2 本鎖切断面の末端修復機構によって導入するため (コンピクリスパー法) のターゲティングベクターを作製

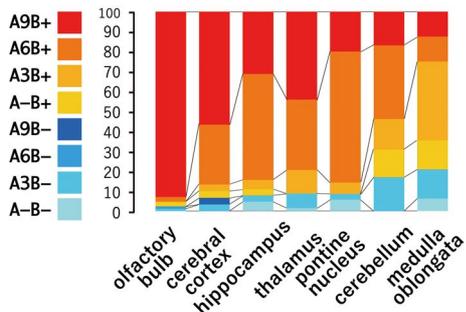
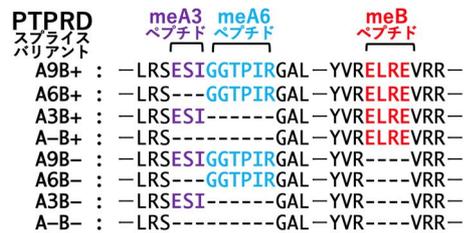


図 1. 脳内各部位における *Ptprd* スプライスバリエーションの発現比率
マウス *Ptprd* 遺伝子の 3 つのマイクロエクソンの選択的スプライシングによって生じる 8 つのスプライスバリエーション (転写産物) は 2 週間マウス脳内で部位ごとに固有の比率で発現する。

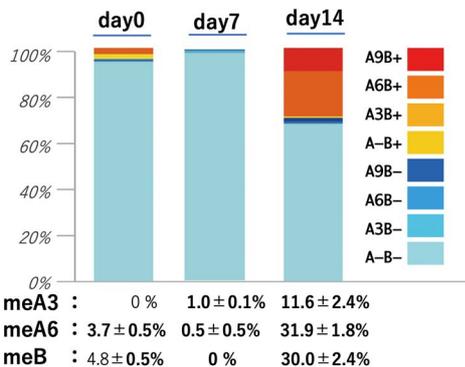


図 2. ヒト iPS 神経細胞の培養日数と *PTPRD* スプライスバリエーションの発現比率 (上)、および各マイクロエクソンの選択率 (下)

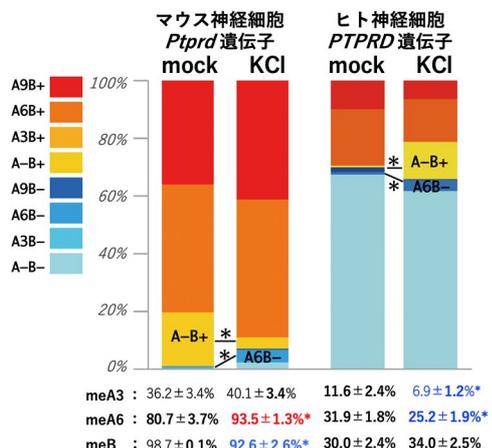


図 3. マウスおよびヒト神経細胞の KCl 刺激による *Ptprd*/*PTPRD* 遺伝子のスプライスバリエーションの発現比率 (上) および各マイクロエクソンの選択率 (下) の変化

した。これらと Cas9 タンパク質をマウス受精卵へマイクロインジェクションし、ノックインマウス系統のスクリーニングを行った。しかしながら、これまでのところ、目的としているマウス *Ptprd* 遺伝子エクソン 5-10 およびヒト *PTPRD* 遺伝子エクソン 12-17 の間のスワップ個体は得られていない。本研究で標的としたマウス *Ptprd* 遺伝子とヒト *PTPRD* 遺伝子の対応領域はとても長く (9 kb)、イントロンを含めて塩基配列が極めてよく保存されているため、相同性アームでの組換えが起きにくいと考えられた。そこで、マウス *Ptprd* 遺伝子上の対応領域 (エクソン 5 - イントロン 9) を一旦、切り出したマウス系統を樹立したのちに、ヒト *PTPRD* 遺伝子のイントロン 12-16 を再度ゲノム編集によって導入する方法に変更して、現在、マウス系統樹立を進めている。系統樹立後に行動バッテリー試験を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kanakano Ishizuka, Tomoyuki Yoshida, Takeshi Kawabata, Ayako Imai, Hisashi Mori, Hiroki Kimura, Toshiya Inada, Yuko Okahisa, Jun Egawa, Masahide Usami, Itaru Kushima, Mako Morikawa, Takashi Okada, Masashi Ikeda, Aleksic Branko, Daisuke Mori, Toshiyuki Someya, Nakao Iwata, Norio Ozaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Functional characterization of rare NRXN1 variants identified in autism spectrum disorders and schizophrenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurodevelopmental Disorders	6. 最初と最後の頁 25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s11689-020-09325-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yukitoshi Takahashi, Shigeko Nishimura, Emiko Takao, Risa Kasai, Kaoru Enokida, Kuniko Ida, Masataka Fukuoka, Takayoshi Koike, Hiroo Omatsu, Tokito Yamaguchi, Shiho Takano, Tomoyuki Yoshida, Hisashi Mori	4. 巻 349
2. 論文標題 Characteristics of internalization of NMDA-type GluRs with antibodies to GluN1 and GluN2B	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroimmunology	6. 最初と最後の頁 577427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jneuroim.2020.577427.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shuya Fukai, Tomoyuki Yoshida	4. 巻 -
2. 論文標題 Roles of type IIa receptor protein tyrosine phosphatases as synaptic organizers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.15666.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 T Yoshida, A Yamagata, A Imai, J Kim, H Izumi, S Nakashima, T Shiroshima, A Maeda, S Iwasawa-Okamoto, K Azechi, F Osaka, T Saitoh, K Maenaka, T Shimada, Y Fukata, M Fukata, J Matsumoto, H Nishijo, K Takao, S Tanaka, S Okabe, K Tabuchi, T Uemura, M Mishina, H Mori, S Fukai	4. 巻 12
2. 論文標題 Canonical versus non-canonical transsynaptic signaling of neuroligin 3 tunes development of sociality in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1848
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-22059-6.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yaku K, Palikhe S, Izumi H, Yoshida T, Hikosaka K, Hayat F, Karim M, Iqbal T, Nitta Y, Sato A, Migaud ME, Ishihara K, Mori H, Nakagawa T	4. 巻 12
2. 論文標題 BST1 regulates nicotinamide riboside metabolism via its glycohydrolase and base-exchange activities.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-27080-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 吉田 知之
2. 発表標題 マイクロエクソンの取捨選択調節が作り出す脳神経回路の設計図
3. 学会等名 第7回先進イメージング医学研究会・学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和泉 宏謙, 出村 舞奈, 今井 彩子, 吉田 知之, 小川 良平, 森 寿
2. 発表標題 グルボシネットばく露に伴う中枢神経系への影響評価
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金 三英, Hamid Sm. Ahasanul, 今康 身依子, 吉田 知之, 筒井 秀和
2. 発表標題 微小電極とニューロンの分子特異的な接合にむけて
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 出村 舞奈, 今井 彩子, 田端 俊英, 森 寿, 吉田 知之
2. 発表標題 大脳皮質神経細胞の電気刺激によるPtpd遺伝子の微小エクソン選択調節
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第38回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Yamagata, Tomoyuki Yoshida, Shuya Fukai
2. 発表標題 Structural basis of selective interaction between Iia RTP and Liprin
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayako Tabata-Imai, Mizuki Sendo, Hironori Izumi, Keizo Takao, Hisashi Mori, Tomoyuki Yoshida
2. 発表標題 Microexon splicing of Ptpd gene controls locomotor activity and social behavior
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 出村 舞奈, 今井 彩子, 田端 俊英, 森 寿, 吉田 知之
2. 発表標題 大脳皮質神経細胞の電気刺激によるPtpd遺伝子微小エクソンの選択的スプライシング調節
3. 学会等名 第67回中部日本生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Krasovec Gabriel, 保住 暁子, 吉田 知之, 濱田 麻友子, 白石 慧, 佐竹 炎, 堀江 健生, 森 寿, 笹倉 靖徳
2. 発表標題 D-serineは脊索動物ホヤの変態時に表皮細胞からの細胞外基質の分泌を制御する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北嶋悠希, 今井彩子, 吉田知之, 森寿, 田端俊英
2. 発表標題 電気刺激を用いたヒトiPS 細胞由来ニューロンによる神経回路形成の促進法の開発
3. 学会等名 第39回日本生化学会北陸支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川瀬 修平, 今井彩子, 北嶋悠希, 赤羽絢夏, 田端俊英, 森寿, 吉田知之
2. 発表標題 シナプスオーガナイザーPtpd遺伝子の微小エクソン選択パターンの解析
3. 学会等名 第39回日本生化学会北陸支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和泉宏謙, 出村舞奈, 今井彩子, 吉田知之, 小川良平, 森寿
2. 発表標題 シナプス形成を指標としたグルホシネート曝露による中枢神経系への影響評価
3. 学会等名 第55回日本実験動物技術者協会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Izumi Hironori, Maina Demura, Ayako Imai, Tomoyuki Yoshida, Ryohei Ogawa, Hisashi Mori
2. 発表標題 Effect of the herbicide glufosinate-ammonium exposure on neural synapse formation
3. 学会等名 第4回医薬品毒性機序研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田知之
2. 発表標題 Ptprd遺伝子マイクロエクソンの取捨選択調節が作り出す脳神経回路の設計図
3. 学会等名 生理学研究所研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 吉田知之	4. 発行年 2021年
2. 出版社 バイオサイエンスとインダストリー	5. 総ページ数 5
3. 書名 シナプス接着タンパク質NLGN3を介した社会性の発達を調節する分子機構	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>富山大学医学部分子神経科学講座ホームページ http://www.med.u-toyama.ac.jp/molneurosci/index.html 富山大学大学院生命融合科学教育部ホームページ https://www.ils.u-toyama.ac.jp</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	田端 俊英 (Tabata Toshihide) (80303270)	富山大学・学術研究部工学系・教授 (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関