

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249013

研究課題名（和文）スプライシング暗号の解読による神経発生過程の解明

研究課題名（英文）Analyzing neuronal development through deciphering splicing code

研究代表者 萩原 正敏（HAGIWARA MASATOSHI）
京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10208423

研究成果の概要（和文）：神経発生過程での選択的スプライシング制御の全容とその制御因子の発現プロファイルを網羅的に同定し、これまで全く分かっていなかった脳形成時のスプライシング制御の全貌を世界で初めて明らかにした

研究成果の概要（英文）：We could identified genome wide level of alternative splicing regulation regarding spliced genes and RNA-binding proteins during neuronal development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21年度	15,700,000	4,710,000	20,410,000
22年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
23年度	10,700,000	3,210,000	13,910,000
年度			
年度			
総計	37,100,000	11,130,000	48,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：スプライシング、大脳皮質形成、エクソンアレイ、スプライシング調節因子、プロファイリング解析

1. 研究開始当初の背景

神経系の中でも哺乳類の大脳は、運動、知覚、認知、思考など最も高度な機能を担っており、その形成メカニズムには今だ謎が多い。大脳形成過程では、均一な神経幹細胞で形成する神経管という非常に単純な構造から、最終的には何千種類もの性格の異なる神経細胞で神経層や神経核を構成していくが、これは転写因子による遺伝子の発現制御の概念

だけでは到底説明できない複雑さを呈している。そこで我々は、神経特異的な pre-mRNA の選択的スプライシングの制御が、大脳形成過程において重要な役割を果たしていると考え、本研究を構想した。

2. 研究の目的

本研究では、我々がモデル生物の線虫を使って蓄積した情報や技術をもとに、大脳皮質

形成過程でスプライシングパターンの変化する遺伝子を網羅的に検索し、その選択的スプライシング制御機構、すなわち“スプライシング暗号”を解読することによって、神経発生過程の解明を目指す。さらに神経発生・分化において遺伝子のアイソフォームごとの機能解析を行うことにより、スプライシング暗号が脳のどのような形成過程(転写因子発現、神経細胞移動、軸索投射、シナプス形成、レセプター&チャンネル特性など)を制御しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、独自に開発した選択的スプライシングレポーターベクターを用いて、哺乳類のスプライシング暗号を解明する。具体的には、作成したレポーター遺伝子やアイソフォームごとの cDNA をマウスの胎児脳内に導入し、発生時期の神経細胞の分化度や種類や脳内の部位の違いによるスプライシングパターンの変化とそれらの機能を調べると同時に、マウス胎児脳への電気穿孔法でアプローチできないような、発生の早期や脳内の特定部位や特定の神経細胞でのスプライシング制御の解析および、レポーター遺伝子を持った神経細胞またはスライス培養による *in vitro* のアッセイに用いるために、すでにラボで着手している、選択的スプライシングのレポーター遺伝子ベクターからのトランスジェニックマウス作成を行う。この独自のレポーター系とエクソンアレイ (Exon array) によるプロファイリング、CLIP 法による標的 RNA 同定などを組み合わせて、神経発生過程を規定するスプライシング暗号を解明する。

4. 研究成果

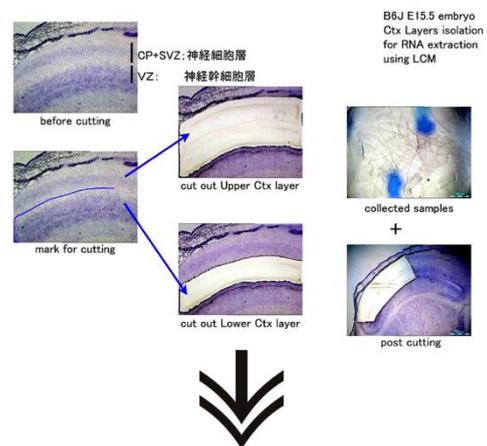
神経発生過程での RNA 制御の全貌を網羅的に捉えるために、マウス胎児脳からサンプル

を作成し、LaserCaptureMicroscope により神経幹細胞部分と分化神経細胞部分を切り分け、それぞれから total RNA を抽出した。



さらにこの total RNA をエクソンアレイを用いて解析を行うことで、選択的スプライシング制御を受ける遺伝子とそれを制御すると想定される RNA 結合タンパク質の発現を網羅的に同定した。

Laser Capture Microdissection により大脳皮質の上層(分化し移動を開始した神経細胞の存在する層) vs 下層(未分化神経幹細胞の存在する層)を分離して total RNAを抽出 (stage : E15.5 mouse Ctx)



Exon Array による発現およびスプライシング解析 (Affimetrix GeneChip® Mouse Exon 1.0 ST Array)

全ゲノム中からタンパク構造上 RNA 結合能をもつ分子 (スプライシング制御因子) を抽出してリスト化し、約 950 個の RNA 結合タンパク質を同定した。さらに LaserCaptureMicroscopy と ExonArray の組み

Gene Symbol	Gene name
Atp2b4	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, plasma membrane 4
Lrrfp1	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1
Agap2 (PIKE)	ARFAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2
Anks1b	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1B
Ostm1	osteopetrosis associated transmembrane protein 1
Gphn	gephyrin
Cltb	clathrin, light polypeptide (Lcb)
Camk2g	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II gamma
Camk2g	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II gamma
Mapk8	mitogen-activated protein kinase 8
Celsr1	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (flamingo homolog, Drosophila)
Celsr1	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1 (flamingo homolog, Drosophila)
Nptxr	neuronal pentraxin receptor
Cadm2 (Igsf4d)	cell adhesion molecule 2
Cadm2 (Igsf4d)	cell adhesion molecule 2
Ncam2	neural cell adhesion molecule 2
Spire1	spire homolog 1 (Drosophila)
Spire1	spire homolog 1 (Drosophila)
Wdr7	WD repeat domain 7
Syt7	synaptotagmin VII
Syt7	synaptotagmin VII
Camsap1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1
Camsap1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1
Meis2 (Mrg1)	Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog 2 (mouse)
Slc1a2 (GLT-1)	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2
Gyg	glycogenin
Asph	aspartate beta-hydroxylase
Epb4.1	erythrocyte protein band 4.1
Kif1b	kinesin family member 1B
Macf1	microtubule-actin crosslinking factor 1
Map3k7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
Ptrpf	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F
Ptrpf	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F
Unc13b	unc-13 homolog B (C. elegans)
Adam22	ADAM metalloproteinase domain 22
Akap9	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9
Polo	piccolo (presynaptic cytomatrix protein)
Srgap3	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 3
Usp5	ubiquitin specific peptidase 5 (isopeptidase T)
Odz4	odz, odd Oz/ten-m homolog 4 (Drosophila)
Fat1	FAT tumor suppressor homolog 1
Ndr4	NDRG family member 4
Odz3	odz, odd Oz/ten-m homolog 3 (Drosophila)
Clasp2	cytoplasmic linker associated protein 2
Clasp2	cytoplasmic linker associated protein 2
Dmx2	Dmx-like 2
Myo5a	myosin VA (heavy polypeptide 12, myosin)
Myo5a	myosin VA (heavy polypeptide 12, myosin)
Tcf12	transcription factor 12 (HTF4, helix-loop-helix transcription factors 4)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- 1) 武内章英、萩原正敏 可視化スプライシング・レポーターシステムで開く哺乳類の mRNA 制御の世界 (2012) 細胞工学 Vol. 31 No. 6 2012 年 6 月号、査読なし
- 2) 萩原正敏、片岡直行 RNA を標的とした新しい創薬戦略 (2012) 実験医学 2012 増刊疾患克服をめざしたケミカルバイオロジー P. 46-52 査読なし
- 3) 萩原正敏 スプライシング制御機構の解明とその臨床応用 (2010) メディカル・サイエンス・ダイジェスト Vol. 36, No. 13, 2-3 査読なし

- 4) 野島孝之、萩原正敏 RNA スプライシングの可視化による創薬スクリーニング (2010) 細胞工学 Vol. 29, No. 02, 175-180 査読なし
- 5) 萩原正敏 RNA プロセッシング異常 RNA 病を斬る 基礎の基礎 (2010) 細胞工学 Vol. 29, No. 02, 126-130 査読なし
- 6) 萩原正敏 mRNA スプライシング制御から難治疾患の治療へ (2009) 実験医学 Vol. 27, No. 17, 2870-2875 査読なし
- 7) Kuroyanagi H, Watanabe Y, and Hagiwara M. (2013) CELF family RNA-binding protein UNC-75 regulates two sets of mutually exclusive exons of the unc-32 gene in neuron-specific manners in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS Genet.** 9(2):e1003337 査読有
- 8) Ohno G, Ono K, Togo M, Watanabe Y, Ono S, Hagiwara M, Kuroyanagi H (2012) Muscle-specific splicing factors ASD-2 and SUP-12 cooperatively switch alternative pre-mRNA processing patterns of the ADF/cofilin gene in *C. elegans*. **PLoS Genet** 8(10) e1002991. 査読有
- 9) Ninomiya K, Kataoka N, and Hagiwara M. (2011) Stress-responsive maturation of Clk1/4 pre-mRNAs promotes phosphorylation of SR splicing factor. **J Cell Biol.** 195(1):27-40.
- 10) Debdab M, Carreaux F, Renault S, Soundararajan M, Fedorov O, Filippakopoulos P, Lozach O, Babault L, Tahtouh T, Baratte B, Ogawa Y, Hagiwara M, Eisenreich A, Rauch U, Knapp S, Meijer L, Bazureau JP (2011) Leucettines, a class of potent inhibitors of cdc2-like kinases and

- dual specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases derived from the marine sponge leucettamine B: modulation of alternative pre-RNA splicing. **J Med Chem.** 54(12):4172-4186.
- 1 1) Nishida A, Kataoka N, Takeshima Y, Yagi M, Awano, H, Ota, M, Itoh K, **Hagiwara M**, and Matsuo M (2011) Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the *dystrophin* gene. **Nature Commun** 2, 308.
- 1 2) Takeuchi A, Hosokawa M, Nojima T, **Hagiwara M** (2010) Splicing reporter mice revealed the evolutionally conserved switching mechanism of tissue-specific alternative splicing. **PLOS One** 5, e10946.
- 1 3) Kuroyanagi H, Ohno G, Sakane, H, Maruoka, H, and **Hagiwara M** (2010) Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation *in vivo* using fluorescence reporters in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Nature Protoc.** 5, 1495-1517.
- 1 4) Nojima T, Oshiro-Ideue T, Nakanoya H, Kawamura H, Morimoto M, Kawaguchi Y, Kataoka N and **Hagiwara M** (2009) Herpesvirus protein ICP27 switches PML isoform by altering mRNA splicing. **Nucleic. Acids Res.** 37, 6515-6527. 査読有
[学会発表] (計 12 件)
1. **Masatoshi Hagiwara**, Challenges to Congenital Genetic Disorders with "RNA-targeting" Chemical Compounds, The 22nd CDB Meeting, June 11, 2012. Kobe
2. **Masatoshi Hagiwara**, New chemical screens for drugs of congenital genetic disorders targeting pre-mRNAs, Gordon Research Conference, July 19, 2012. Newport, USA.
3. **Masatoshi Hagiwara**, Challenges to congenital genetic disorder with "RNA-targeting" chemical compounds, SLAS2013 2nd Annual Conference & Exhibition, Jan. 14. 2012. ORLAND, FL, USA.
4. **Masatoshi Hagiwara**, Modulation of pre-mRNA splicing patterns with synthetic chemicals and their clinical applications 第10回上原記念生命科学財団 国際シンポジウム[生体制御分子科学]2011.6・東京
5. **Masatoshi Hagiwara**, Visualization of alternative splicing and the therapeutic manipulation with chemical compounds US-Japan Sumer Conference, August4-5. 2011, USA.
6. **Masatoshi Hagiwara**, New therapeutics by alteration of mRNA expression and processing with small chemicals", *International Chemical Biology Conference, October 11-12, USA, 2011*
7. **Masatoshi Hagiwara**, 'Visualization and manipulation of RNA splicing to cure RNA diseases' Gordon Research Conference in Newport, RI July 18-23, 2010
8. **Masatoshi Hagiwara**, 'Splicing resume from stress response' Asian Cold Spring Harbor Laboratory 'RNA Biology' in Suzhou Dushu Lake Conference Center, China, November

- 1-5, 2010
9. 萩原正敏、Visualization of Alternative Splithin with Multi-color Splicing Reporters and Their Application for Screen of Trans-acting Factors and Small Chemicals, The 16th Annual Meeting of the RNA Society/The RNA Society of Japan 13th Annual Meeting Kyoto, Japan June 14-18, 2011
10. 萩原正敏、「RNA を標的とする創薬によって難治疾患に挑む」、第 36 回阿蘇シンポジウム、2012 年 8 月 3 日、熊本
11. 萩原正敏、「Neural development and splicing code」、第 35 回日本神経科学大会「RNA 結合タンパクと病態シンポジウム」、2012 年 9 月 21 日、名古屋
12. 萩原正敏、「プロテオームの多様性創出のメカニズムについて」JHUP0 サテライトシンポジウム、2013 年 1 月 18 日、京都

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称 : Transgenic reporter system that reveals expression profiles and regulation mechanisms of alternative splicing in mammalian organisms

発明者 : 萩原正敏、武内章英

権利者 : 萩原正敏、武内章英

種類、番号 : (US. 61/350, 420) (PCT/JP2011/003059)

出願年月日 : 2010 年 6 月 1 日 (米国)、2011 年 5 月 31 日 (PCT)

国内外の別 : 国外

名称 : 遺伝性疾患の予防・改善剤

発明者 : 萩原正敏、片岡直行、松尾雅文、西田篤史

権利者 : 萩原正敏、片岡直行、松尾雅文、西田篤史

種類、番号 : (特願 2010-146699)

(PCT/JP2011/003655)

出願年月日 : 2010 年 6 月 28 日 (日本)、2011 年 6 月 27 日 (PCT)

国内外の別 : 国内

○取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-002/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

萩原 正敏

(HAGIWARA MASATOSHI)

研究者番号 : 10208423

(2) 研究分担者

大野 欽司

(OONO KINJI)

研究者番号 : 80397455

研究分担者

武内 章英

(TAKEUCHI AKIHIDE)

研究者番号 : 90436618

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :