

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

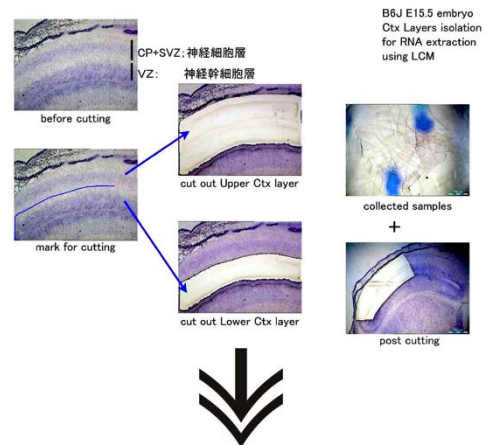
神経発生過程での RNA 制御の全貌を網羅的に捉えるために、マウス胎児脳からサンプル

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

合わせて、神経発生過程で発現が変動する RNA 結合タンパク質につき解析を行い、分化神経細胞に高発現の RNA 結合タンパク質 83 個、分化神経細胞に高発現の RNA 結合タンパク質 188 個を同定した。

1. 分化した神経細胞の存在する層特異的に発現の高かったRNA結合タンパク質

$FC = \text{Upper Layer} / \text{Lower Layer} (>1.5)$

Protein ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	FC	l-test	ROM	RBP	
6896790	138	154	176	1862	1778	1804	1162	0.000	1	1															
6949198	135	106	65	1084	753	836	876	0.002	1	1															
6949373	52	83	96	483	499	569	526	0.000	1	1															
6751525	206	204	152	1046	922	989	526	0.000	1	1															
6748437	844	740	756	2949	2401	2472	333	0.000	1	1															
6816362	124	171	135	696	675	715	485	0.000	1	1															
6839136	86	64	78	371	184	322	2.91	0.014	1	1															
6872010	77	54	57	356	287	192	3.72	0.016	1	1															
6844246	83	119	72	378	342	262	3.70	0.001	1	1															
6765110	1988	1775	2021	7195	6870	6731	3.60	0.000	1	1															
6791453	551	600	554	2147	2128	1661	3.48	0.001	1	1															
6748437	844	740	756	2949	2401	2472	3.33	0.000	1	1															
6808616	62	89	111	277	268	306	3.24	0.000	1	1															
7013502	101	82	99	327	270	293	3.15	0.000	1	1															
6872888	277	301	282	820	815	861	2.88	0.000	1	1															
6899594	232	241	236	894	899	720	2.98	0.000	1	1															
6787281	492	489	422	1382	1465	1351	2.96	0.000	1	1															
6981604	142	149	134	439	428	366	2.90	0.000	1	1															
6775489	1099	1152	1146	2699	3146	3682	2.90	0.002	1	1															
6833027	384	491	510	1145	1288	1438	2.80	0.001	1	1															
6787750	333	329	289	933	858	851	2.78	0.000	1	1															
6887089	608	614	511	1702	1804	2201	2.60	0.004	1	1															
6884520	1059	1098	1084	2892	2794	2688	2.57	0.000	1	1															
6889403	518	521	513	1135	1440	1347	2.53	0.001	1	1															
6773713	75	89	71	255	174	154	2.48	0.021	1	1															
6899622	188	219	181	473	447	486	2.41	0.001	1	1															
6838135	2810	2642	2727	8478	8720	8750	2.36	0.000	1	1															
6867276	961	1091	1142	2779	2247	2418	2.33	0.001	1	1															
6784042	3668	3718	3673	9240	8518	7661	2.30	0.000	1	1															
6792031	1168	1205	1169	2768	2643	2730	2.29	0.000	1	1															
6894823	655	608	617	1508	1291	1498	2.29	0.000	1	1															
6818956	588	616	595	1560	1467	1011	2.25	0.012	1	1															
6849595	184	223	202	418	467	458	2.24	0.000	1	1															
6758558	189	193	220	505	405	483	2.22	0.010	1	1															
6930008	338	334	403	772	758	810	2.18	0.000	1	1															
6950216	636	656	607	1650	1458	981	2.15	0.022	1	1															
6819284	535	550	627	1393	1393	1860	2.11	0.006	1	1															
6790356	178	205	188	423	386	417	2.15	0.000	1	1															
6775206	489	505	494	1128	988	1051	2.13	0.000	1	1															
6858575	1432	1424	1436	2845	3038	3140	2.06	0.000	1	1															
6774907	228	276	250	540	593	391	2.02	0.014	1	1															
6899278	745	627	714	1466	1395	1331	2.01	0.000	1	1															
6806779	599	656	649	1277	1196	1330	2.00	0.000	1	1															
6810021	738	743	712	1693	1392	1359	1.96	0.001	1	1															
6899889	1647	1799	1864	2739	3558	3658	1.95	0.005	1	1															
7011776	1578	1584	1405	3103	2832	2952	1.95	0.000	1	1															
6847821	912	867	895	1860	1865	1763	1.90	0.000	1	1															
6895425	213	162	166	460	491	511	1.89	0.000	1	1															
6769271	471	495	501	846	1065	844	1.88	0.004	1	1															
6779818	1850	1894	1988	3350	3971	3724	1.87	0.000	1	1															
6852973	108	120	134	201	254	216	1.86	0.004	1	1															
6834568	88	81	90	162	160	154	1.83	0.000	1	1															
7019609	135	131	123	240	239	234	1.83	0.000	1	1															
6848505	155	205	185	288	325	382	1.82	0.010	1	1															
6930335	584	589	589	1013	1093	1056	1.81	0.000	1	1															
7020802	129	132	126	304	328	149	1.79	0.088	1	1															
6899384	5034	5171	5013	8870	9100	9021	1.77	0.000	1	1															
6870980	817	856	884	1607	1547	1331	1.75	0.000	1	1															
6790648	1595	1561	1456	2646	2677	2713	1.74	0.000	1	1															
6861774	823	829	767	1704	1247	1250	1.74	0.018	1	1															
6812894	1896	1806	1900	3667	3385	2807	1.72	0.013	1	1															
6838988	751	835	717	1071	1304	1569	1.71	0.000	1	1															
6958819	2118	1988	2034	3571	3394	3314	1.70	0.000	1	1															
6820425	449	387	371	727	673	603	1.69	0.004	1	1															
6879020	123	111	104	255	157	156	1.68	0.083	1	1															
6779355	339	342	279	602	527	476	1.67	0.007	1	1															
7010764	339	270	292	605	439	437	1.65	0.031	1	1															
6888118	3713	3207	3198	5750	5108	5697	1.64	0.001	1	1															
6940329	724	644	671	1094	1098	1074	1.62	0.002	1	1															
6955935	425	456	524	825	767	659	1.60	0.008	1	1															
6966148	150	264	233	277	333	422	1.60	0.077	1	1															
6778998	560	544	516	1107	838	628	1.59	0.084	1	1															
6907869	511	684	587	994	1082	721	1.57	0.047	1	1															
6884892	392	388	379	633	528	656	1.57	0.005	1	1															
6784137	916	958	964	1864	1495	1229	1.55	0.017	1	1															
6827321	545	663	641	1008	984	880	1.55																		

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
Ptpnf	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F
Ptpnf	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 :