

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500469

研究課題名(和文) 神経筋接合部特異的スプライシング機構の解明

研究課題名(英文) Identification of specific splicing regulation at neuromuscular junctions

研究代表者

増田 章男 (Masuda, Akio)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10343203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Laser micro dissection法により、マウス骨格筋から神経筋接合部に存在する微量RNAを回収し、microarrayおよびRNA-seqなどの網羅的解析を行った。

解析の結果、神経筋接合部には、従来知られていた遺伝子発現変化に加え、独特のスプライシング制御が行われていることが明らかになった。

これらのRNA代謝制御は、筋芽細胞セルラインC2C12を筋幹細胞に分化させ、Agrin/Neuregulin刺激を加えることで再現でき、実験により、神経筋接合部特異的なRNA代謝制御因子として、スプライシング因子であるSRタンパクを同定した。

研究成果の概要(英文)：To analyze specific regulation of RNA processing in neuromuscular junctions, we harvested RNA from neuromuscular junctions in mouse skeletal muscles with laser microdissection, and performed microarray and RNA-seq analysis. Our analysis revealed that alternative splicing was distinctly regulated at neuromuscular junctions.

We also examined C2C12 myotubes stimulated with Agrin/Neuregulin, and found that SR proteins were deeply involved in the specific regulation of mRNA splicing at neuromuscular junctions.

研究分野：神経医学、ゲノム科学

キーワード：神経筋接合部 スプライシング 筋分化

1. 研究開始当初の背景

随意運動は、脳から発せられた信号が、運動神経を伝導し、筋肉に達し、筋肉が収縮することで、成り立っている。信号は、いくつかの細胞を乗り換えており、細胞間の複雑なシナプス形成が指令の伝達に必須である。脳から運動神経までは基本的に信号伝達に特化した神経細胞間のやりとりであるが、神経筋接合部では、収縮に特化しているはずの筋肉細胞が、接合部でのみ全く別種の信号伝達・シナプス形成という役割を担っている。これは、神経筋接合部で、特異的な筋分化制御が行われていることを示唆する。

現在にいたるまで、運動神経からの刺激に応じた一部の遺伝子発現増強が、シナプス形成に特化した筋肉細胞分化を局所的に促すことが明らかとなっている。しかし、それ以外の分化調節機構の存在は、不明である。

本研究課題で行われた、laser microdissection 法による神経筋接合部 RNA 解析は、すでに3報の既報告があるが、いずれも mRNA 発現解析のみで、スプライシング解析は、まったく行われていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨格筋神経筋接合部に特有なスプライシング制御機構の存在を明らかにし、その神経筋接合部形成・筋細胞分化における生理的意義を解明することである。

さらに、神経筋接合部の分子異常によって生じる先天性筋無力症の病態形成における、この特異的なスプライシング制御機構の役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

Laser microdissection 法を用いて、AChE 染色で神経筋接合部を染色したマウス切片から、神経筋接合部および通常骨格筋部位の total RNA を回収し、Gene Chip (exon array) および RNA-seq 解析により、それぞれの部位のスプライシングパターンを網羅的に解析する。

続いて、生化学的手法によりスプライシングパターンの違いの核となるスプライシング因子を同定し、神経筋接合部特異的なスプライシング制御機構の詳細を解析する。

4. 研究成果

(1) マウス骨格筋切片を用いた Laser microdissection 法を行うにあたり、神経筋接合部の染色法を検討した。

神経筋接合部の染色法としては、ACh レセプターに特異的に結合する α -bungarotoxin による染色と、酵素活性を利用した AChE 染色法がある。前者は、蛍光色素標識を利用することが効率的であるが、Laser

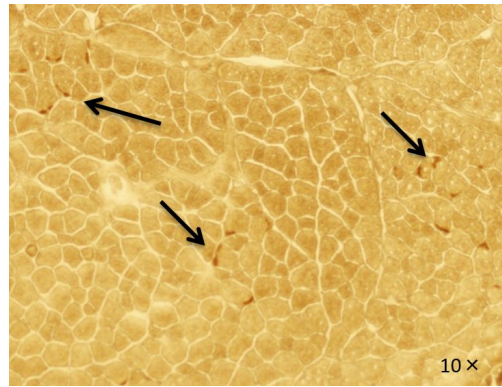


図1 マウス骨格筋切片の AChE 染色。4 5分 incubation

microdissection 用顕微鏡は、蛍光検出装置が無いため、後者を検討した。AChE 染色は、酵素活性を見るため通常 37 度で incubate する必要があるが、この条件では RNA がほぼ完全に分解されてしまった。低温での染色を検討したところ、最終的に 4 度 5 分間の incubation でも光学顕微鏡で観察できる程度に、染色されることが判明した(図 1)。過去に、この様な低温条件での AChE 染色は、報告されていない。バイオアナライザーによる RNA の品質評価では、染色後の切片から回収した RNA で RIN 値が 6 以上あり、十分な quality であった。

(2) 続いて、Laser microdissection を行った。

神経筋接合部 (NMJ-N) および通常の骨格筋領域 (control-N) それぞれ、3 samples の RNA を回収した。NMJ は、それぞれ 4000-6000 個の神経筋接合部領域を Laser microdissection 法により回収し、抽出した RNA である。

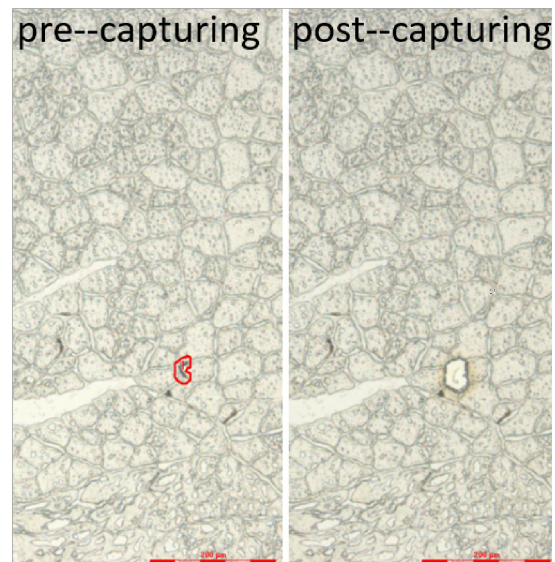


図2 Laser microdissection の施行例
赤線で囲まれた領域 (pre-capturing) の辺縁を laser で焼き切り、内部の切片を回収する (post-capturing)。

次に回収された RNA の RIN 値および濃度 (total 10 ul) を示す。

Sample	RIN	concentration(pg/ul)
NMJ-1	6.2	1856
control-1	6.6	1600
NMJ-2	7.4	2348
control-2	8.1	662
NMJ-3	6.6	235
control-3	8.9	109

得られた RNA は、網羅的解析に十分な品質を保っていたが、total 1-20 ng と極めて微量であった。これは、神経筋接合部が極めて限定した領域にしか存在せず、少ない体積から RNA を回収したためと考えられる。

(3) Exon array 解析

回収された RNA は、微量であり、そのままでは exon array 解析ができない。Ovation pico WTA system V2 kit による RNA 増幅を行い、exon array 解析を行った。

まず、遺伝子発現について解析を行ったところ、通常筋組織と比べ神経筋接合部で 2 倍以上有意 ($p < 0.05$) に発現上昇する遺伝子を 1264 個、逆に 0.5 倍未満に発現低下する遺伝子を、338 個同定した。今までの報告で 100 個程度の発現上昇遺伝子があることが知られていたが、我々の解析で極めて多数の遺伝子の発現変化があることが初めて明らかとなった。Gene ontology 解析では、発現上昇した遺伝子には、細胞間および細胞内シグナル伝達に関わる分子が多く含まれていることが判明した (図 3)。

Term	RT	Genes	Count
BP00274:Cell communication	RT		28
BP00114:MAPKKK cascade	RT		11
BP00102:Signal transduction	RT		60
BP00170:Neuromuscular synaptic transmission	RT		5
BP00248:Mesoderm development	RT		16
BP00166:Neuronal activities	RT		18
BP00193:Developmental processes	RT		37
BP00172:Other neuronal activity	RT		7
BP00111:Intracellular signaling cascade	RT		18
BP00108:Receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	RT		8
BP00124:Cell adhesion	RT		14
BP00167:Synaptic transmission	RT		9

図 3 神経筋接合部で発現上昇した 1264 個の遺伝子の Go Term 解析

DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), PANTHER_BP_ALL, $p < 0.01$

続いて神経筋接合部でのスプライシング解析を行った。我々の研究室で開発した、exon array 用スプライシング解析ツール (Journal of Human Genetics (2012) 57, 368-374) を使用し、37 個 (cassette exon 19 個、5' splice sites 10 個、3' splice sites

8 個) の神経筋接合部特異的なスプライシング変化を同定した。

これらスプライシング変化を認めた遺伝子には、細胞内カルシウムシグナル伝達に関与する遺伝子が多く存在していた。RT-PCR 法で、これらの遺伝子のスプライシングが神経筋接合部で実際に変化していることを確認した (図 4)。

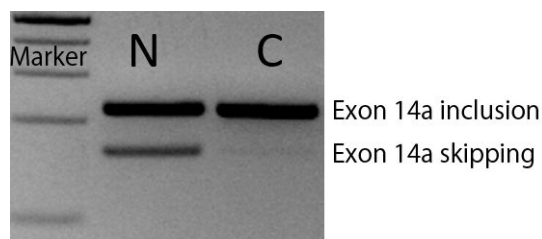


図 4 RT-PCR 法による、Camk2b 遺伝子 exon14a のスプライシング解析。神経筋接合部 (N) では、通常筋組織 (C) に比べ、exon14a の skipping が誘導されている。

(4) RNA-seq 解析

近年の次世代シーケンサー技術の発展には、目覚ましいものがあり、1 細胞からの RNA-seq 解析も解析となってきている。我々は、神経筋接合部の微量 RNA-seq 解析に取り組み、成功した。

NMJ-1, NMJ-2, control-1, control-2 の 4 サンプルから Illumina TruSeq total RNA kit を用いてライブラリー構築を行い、HiSeq2000 で sequencing を行った。いずれのサンプルからも 5000 万以上という十分なリード数が得られた。

まず、TopHat-cufflinks アルゴリズムにより、遺伝子発現解析を行った。RNA-seq による遺伝子発現レベルは、microarray 解析と良い相関を示した。通常筋組織と比べ神経筋接合部で 2 倍以上有意 ($p < 0.05$) に発現上昇する遺伝子を 381 個、逆に 0.5 倍未満に発現低下する遺伝子を、98 個同定した。Gene ontology 解析でも、exon array 解析と同様の傾向を示した (図 5)。

Term	RT	Genes	Count
BP00274:Cell communication	RT		39
BP00124:Cell adhesion	RT		24
BP00170:Neuromuscular synaptic transmission	RT		6
BP00193:Developmental processes	RT		50
BP00102:Signal transduction	RT		76
BP00275:Extracellular matrix protein-mediated signaling	RT		6
BP00285:Cell structure and motility	RT		27
BP00120:Cell adhesion-mediated signaling	RT		14
BP00248:Mesoderm development	RT		16
BP00207:Cell cycle control	RT		13

図 5 RNA-seq 解析で、神経筋接合部で発現上昇を示した 381 個の遺伝子の Go Term 解析

DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), PANTHER_BP_ALL, $p < 0.01$

次に、MISO アルゴリズム (Nature Methods (2010) 7, 1009-1015) によるスプライシング解析を行った。下記に示すように、740 個の神経筋接合部特異的スプライシング変化を同定した。

選択的 5' スプライスサイト	119
カセットエクソン	205
相互排他的エクソン	40
Retained イントロン	224
選択的 3' スプライスサイト	152
計	740

Bayes Factor > 2

以上の結果から、神経筋接合部において特異的な遺伝子発現制御およびスプライシング制御が行われていることが明らかとなった。

(5) 神経筋接合部特異的スプライシング制御機構の解析

マウス筋芽細胞 C2C12 は、筋管細胞に分化させた後、Agrin 刺激を加えることで、疑似的に神経筋接合部を再現できることが知られている。我々は、この条件の細胞で神経筋接合部特異的スプライシングが再現できるか、RT-PCR 法で解析した。図6に示すように、多くの遺伝子で RNA-seq で同定されたスプライシング変化と同様な変化が認められた。

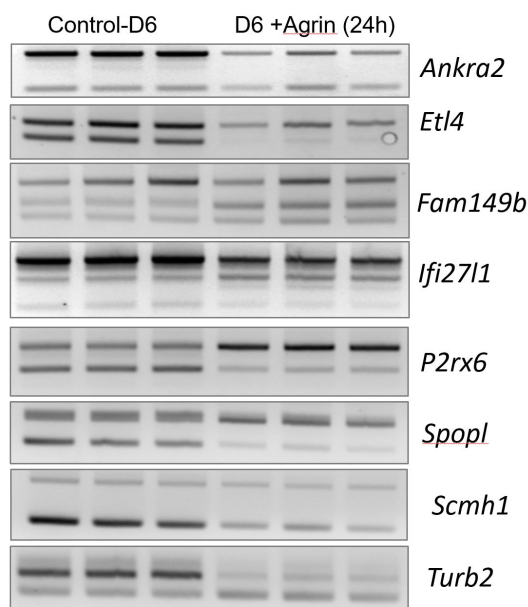


図6 筋管細胞分化6日目のC2C12細胞にAgrin刺激を加え(D6+Agrin)24時間後にRNAを回収し、RT-PCR法によりRNA-seqで同定された遺伝子のスプライシングを解析した。コントロールは、Agrin刺激無し(Control-D6)の細胞を使用した。

続いて、Splice aid2

(http://193.206.120.249/splicing_tissue.html)を用いて、これらスプライシング変化が生じる exon 周囲に結合しうるスプライシング因子を調べたところ、SR protein が顕著に結合することが判明した。

この SR protein の発現をロックダウンした C2C12 細胞を用いて、スプライシングを解析したところ、図6で認められた Agrin 刺激によるスプライシング変化が、ロックダウンで減弱することが判明した。

以上の結果をまとめると、我々は、本研究課題において、神経筋接合部において広範な遺伝子の発現制御とスプライシング制御が行われていることを明らかにした。スプライシング制御は、Agrin を中心とした神経末端からの刺激により行われており、細胞内の SR protein のスプライシング活性がその分子メカニズムとして重要であることが示唆された。

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 20 件)

Shibata A, Okuno T, Rahman MA, Azuma Y, Takeda JI, Masuda A, Selcen D, Engel AG, Ohno K. IntSplice: prediction of the splicing consequences of intronic single-nucleotide variations in the human genome. J Hum Genet. 査読あり 2016. in press

Masuda A, Takeda J, Ohno K. FUS-mediated regulation of alternative RNA processing in neurons: insights from global transcriptome analysis. Wiley Interdiscip Rev RNA. 査読あり 2016 May;7(3):330-40.

Otsuka K, Ito M, Ohkawara B, Masuda A, Kawakami Y, Sahashi K, Nishida H, Mabuchi N, Takano A, Engel AG, Ohno K. Collagen Q and anti-MuSK autoantibody competitively suppress agrin/LRP4/MuSK signaling. Sci Rep. 査読あり 2015 Sep 10;5:13928

Rahman MA, Azuma Y, Nasrin F, Takeda J, Nazim M, Bin Ahsan K, Masuda A, Engel AG, Ohno K. SRSF1 and hnRNP H antagonistically regulate splicing of COLQ exon 16 in a congenital myasthenic syndrome. Sci Rep. 査読あり 2015 Aug 18;5:13208.

Nasrin F, Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K. hnRNP C, YB-1 and hnRNP L coordinately enhance skipping

of human MUSK exon 10 to generate a Wnt-insensitive MuSK isoform. Sci Rep. 査読あり 2014 Oct 30;4:6841
Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Ito M, Hutchinson DO, Mayeda A, Engel AG, Ohno K. HnRNP L and hnRNP LL antagonistically modulate PTB-mediated splicing suppression of CHRNA1 pre-mRNA. Sci Rep. 査読あり 2013 Oct 14;3:2931.

〔学会発表〕(計 1 件)

Masuda A, Takeda J, Okuno T, Ohno K. 神経変性疾患関連 RNA 結合タンパク FUS による早期転写終結機構の解明 第 27 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日～11 月 27 日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市

〔図書〕(計 1 件)

Masuda A, Ohno K. Neurodegeneration-associated RNA-binding protein, FUS, regulates mRNA length. AoS Nordic AB, Stockholm, 2016 in press

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 章男 (MASUDA, AKIO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：10343203

(2) 研究分担者

なし