

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04277

研究課題名(和文) 神経細胞の生命情報の多様化を制御するRNA情報発現メカニズムと機能解明

研究課題名(英文) The RNA-based mechanism and function underlying molecular diversity in the nervous system

研究代表者

飯島 崇利 (IIJIMA, Takatoshi)

東海大学・創造科学技術研究機構・准教授

研究者番号：90383702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系において選択的スプライシングを制御するメカニズムに注目し、時空間的に選択的スプライシングを制御するRNA結合タンパク質SAM68とSAM-like molecule (SLM)のスプライシングプログラムの解明を行ってきた。網羅的解析によって、SAM68に特異的なスプライシング傾向として3' UTRを含んだexonが強く変動することがわかった。シナプス形成因子IL1RacPは3'-endプロセッシング異常により分泌型フォームとなってしまうことで、欠損マウス脳においてIL1RacP依存的なシナプス集積能の低下やIL1シグナルに依存的な神経可塑性に異常をきたすことを明らかにした(投稿中)。

研究成果の概要(英文)：Neuronal alternative splicing is dynamically regulated in a spatiotemporal fashion. We previously found that STAR family proteins (SAM68, SLM1, SLM2) regulate spatiotemporal alternative splicing in the nervous system. However, the whole aspect of alternative splicing programs by STARs remains unclear. Here, we deciphered the alternative splicing programs of SAM68 and SLM1 proteins using transcriptomics. We found that SAM68 controls alternative 3' UTR exons. SAM68 is necessary for proper 3' UTR isoform selection of a novel target, interleukin 1-receptor accessory protein (Il1rap), through alternative last exon (ALE) usage. The ALE usage results in two variants encoding different isoforms, a membrane-bound (mIL1RacP) and a soluble (sIL1RacP) type. SAM68 knockout causes conversion from mIL1RacP into sIL1RacP in the brain, which significantly disturbs IL1RacP function. Thus, we uncovered the critical role in proper selection of alternative 3' UTR isoforms by the SAM68 splicing program.

研究分野：神経化学

キーワード：選択的スプライシング RNA結合タンパク質 神経細胞 3'UTR

1. 研究開始当初の背景

転写調節から RNA プロセッシング、翻訳制御までに至る RNA 情報の発現制御は遺伝子発現の多様な出力の重要な仕組みの一つであり、生物が進化の過程で高次機能を獲得する上で充実させた仕組みの一つであると考えられる。これまで申請者は神経系における RNA 情報発現系について研究を行ってきた。近年、申請者が遺伝子情報の多様化に特に重要な RNA 制御として注目してきたのがスプライシング機構である。哺乳類のシナプス形成に必須のタンパク質として知られる Neurexin は 3000 種類以上のバリエーションをもち、スプライシング活動によってタンパク質間の多様かつ特異的相互作用が生み出されることが知られる (Boucard et al., 2003; Chih et al., 2005)。申請者は近年 STAR ファミリーに属する RNA 結合タンパク質 SAM68 と SAM-like Molecule (SLM) が Neurexin の時空間的な選択的スプライシングのキーファクターであることを明らかにし (Iijima et al., 2011 & 2014)、シナプスタンパク質の多様性がシナプス結合の特異性やシナプス可塑性に強く関わっていることを示唆してきた。生命情報の多様化に最も密接な選択的スプライシングは多彩な神経機能を創出する重要な要素と推測され、同時に本研究はスプライス多様性の普遍的な理解に繋がるものと信じ、本助成を申請するに至った。

2. 研究の目的

高等動物の脳は約 1000 億個にも及ぶ多様な神経細胞がネットワークを築き、複雑な同期によって高次活動が営まれる典型的な臓器である。しかしながら、僅か 2 万個程度という限られた遺伝子数によってどのようにこの複雑な生命現象が制御されているのかは未だに大きな議論を残すところである。申請者は神経細胞における遺伝子産物の多様化を生み出す RNA の選択的スプライシングに注目し、これまでに神経細胞間のシナプス形成に重要な接着分子の時空間的スプライシングを制御する RNA 結合タンパク質、SAM68 と SLM1 および SLM2 を同定した。本研究では、

- (1) これら上記の分子によって時空間的に制御される選択的スプライシングのメカニズムを明らかにし、スプライシング活動によって生み出される生命情報の多様性と複雑な脳機能との関連性について検討した。
- (2) スプライシング異常に起因する生命情報の多様性の変化によっておこる精神・神経疾患の病態解明をめざした。

3. 研究の方法

本研究ではこれまで申請者が世界をリードして行ってきた神経系に特異的な 2 つのスプライシング活動に焦点を当てた。それぞれのスプライシング機構の制御因子 STAR ファ

ミリー (SAM68, SLM1, SLM2) のノックアウトの解析と標的 RNA 群の同定をメインに行い、網羅的なスプライシングプログラムの解析と合わせ、神経回路の特異的形成能、シナプスの可塑的变化などを指標としてスプライス多様性の機能的側面のリードアウトを試みた。生化学・細胞生物学的手法のみならずバイオインフォマティクス、またノックアウトマウスなどを用いた形態・生理レベルでのアプローチを多分に取り入れ、分子・細胞レベルのみならず組織・個体レベルで神経系におけるスプライス多様性と生理意義について多角的に解析を行った。

(方法 1) 神経活動依存のおよび組織・細胞種特異的な時空間的スプライシングの生理的意義の解明

脳内で特定の組織・神経細胞に限局して発現する SLM1 と SLM2 は、組織・細胞サブタイプ特異的なスプライシング制御に関与する (Iijima et al., 2014)。このことから、神経細胞タイプにおける個性決定、特異的回路形成を担うことが予想され、これに関わる表現型をスクリーニングした結果、SAM68/SLM1 ダブルノックアウトマウス小脳において特定の神経回路の特異的な形成に顕著な異常を発見し、特定の細胞種に特異的なスプライシング多様性がシナプス接着の領域特異性に強く関与していることを示唆する有力な手がかりを得た (未発表データ)。このようなノックアウトマウスの神経系における表現型のスクリーニングと平行して、以下の研究方法に示す標的 pre-mRNA の網羅的解析情報から異常を引き起こす原因となりうる基質 RNA を生化学的、細胞生物学的手法により同定を試みた。

(方法 2) 神経活動依存のおよび組織・細胞種特異的な時空間的スプライシングプログラムの同定

(1) 小脳顆粒細胞において脱分極誘導される選択的スプライシングプログラムの網羅的検索

これまでシナプスタンパク質をコードする複数の pre-mRNA が神経活動依存的に選択的スプライシング制御を受け、成熟脳でのシナプス可塑性に強く関与していることが示唆されてきたが、(Xie & Black, 2001)、どれだけの神経系分子がこのような制御を受けるのかシステムティックに解析された例はまだない。そこで本研究においては、より網羅的に神経活動によってスプライシング変化が誘導される pre-mRNA 群を解析するため、培養小脳顆粒細胞を薬理的に脱分極させて、そのスプライシング変化を次世代シーケンシング (NGS) と exon array を用いて調べた。この中から特にシナプス形成、伝達、特異的結合などに重要と思われる分子に注目し、その新規スプライシング変化について取り上げ、これについて分子生物学的手法で解析を行った。

(2) 時空間的な選択的スプライシングに関わ

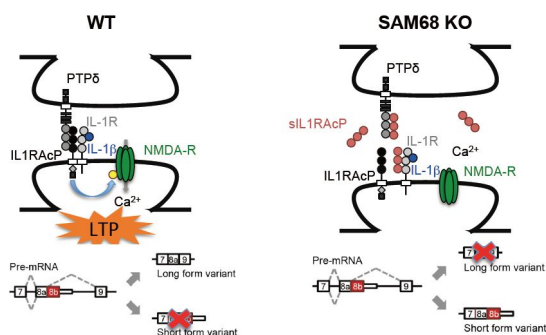
る STAR ファミリーの標的因子の同定
 これまで時空間的に選択的スプライシングを制御するメカニズム、特にスプライシング因子についてはほとんど明らかにされていなかったが、最近申請者はそのキーファクターとして SAM68, SLM といった RNA 結合タンパク質 STAR ファミリーを同定した (Iijima et al., 2011 & 2014)。SAM68/SLM1 のさらなる機能解明のため、標的 pre-mRNA 群を次世代シーケンシング (NGS) と exon array によって同定した。

4. 研究成果

(1) 神経系における時空間的スプライシング調節因子 SAM68/SLM1 のスプライシングプログラム の解読と機能の解明

1 SAM68 特異的な mRNA 非翻訳領域の多様性の制御

SAM68/SLM の支配する時空間的スプライシングプログラムの全容解明のため、一昨年度に exon array をベースに RNA-seq を組み合わせたトランスクリプトーム解析によって、これら RNA 結合タンパク質の標的 RNA の網羅的検索を行った。その結果、SAM68 に特異的なスプライシングイベント全体的な傾向として 3' UTR を含んだ exon が強く変動し、SAM68 欠損マウスでは mRNA の 3'UTR の長さ、あるいはタンパク質レベルで C 末端側の長さの異なったアイソフォームができる傾向があることがわかった。そのなかで、シナプス形成因子である Ig ドメイン型膜タンパク質 IL1RAcP は 3'-end プロセッシング異常により分泌型フォームとなってしまうことで、SAM68 欠損マウス培養神経細胞において IL1RAcP 依存的なシナプス集積能の低下や IL1 シグナルに依存的な神経可塑性に異常をきたすことを明らかにした (投稿中, 図表 1 参照)。



[図表 1] SAM68 ノックアウトマウス脳における IL1RAcP のスプライシング異常と神経機能障害のモデル

脳における IL1RAcP は膜型接着因子であり、プレシナプス側の接着因子 PTPδ との相互作用で興奮性シナプス形成を誘導する。また IL-1 および IL1 受容体との相互作用により NMDA 受容体依存的なシナプス可塑性に関わる。SAM68 ノックアウトマウスでは 3'UTR exon のスプライシング選択の異常により atypical な分泌型産物となり、IL1RAcP に依存的なシナプス誘導能とシナプス可塑性が阻

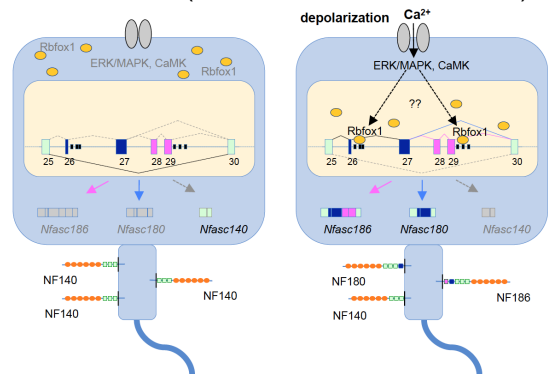
害される。

2 SAM68/SLM1 スプライシングによる神経細胞タイプ特異的な神経回路の制御

SAM68 と SLM1 は小脳で発現が豊富で、特にプルキンエ細胞に強く発現する。申請者らはこれまで SAM68/SLM1 の小脳プルキンエ細胞の軸索起始部 (AIS) に投射する抑制性シナプスの形成不全を見つけてきた。本研究で exon array と RNA-seq の結果から、その原因の一つが Ankyrin-G のスプライシング異常にあることを見いだした。しかしながら、このエキソン挿入の意義は理解されておらず、現在 CRISPER/Cas9 システムによってこの Ankyrin-G 遺伝子中のエキソンの定常的ノックインとノックアウトの作成を試みている。

(2) 新たな神経活動依存的スプライシング制御メカニズムの発見

Neurexin AS4 の選択的スプライシング変化が神経活動により誘導されることを明らかにし、このキーファクターとして RNA 結合タンパク質 SAM68 を同定してきた (Iijima et al., 2011)。さらに本研究では、小脳顆粒細胞において神経活動依存的なスプライシング制御を受ける新たな興味深い RNA 分子として Neurofascin (Nfasc) を同定した。脱分極刺激による神経活動亢進によって成熟神経細胞に特異的なアイソフォーム Nfasc186 が誘導されることを発見し、さらにこの制御因子として RNA 結合タンパク質 Rbfox1 を同定した。Rbfox1 はカルシウム流入によって神経細胞内の局在が変化し、核内に強く集積することで Nfasc186 の生成が亢進されることを明らかにした (Suzuki et al., 2017, 図表 2)。



[図表 2] Rbfox1 による Neurofascin pre-mRNA の神経活動依存的なスプライシング制御

Nfasc186 は成熟神経細胞に存在するアイソフォームであるが、小脳顆粒細胞にはほとんど存在しない。しかしながら、脱分極刺激による神経活動の亢進によって exon26-29 が挿入され Nfasc186 が誘導される。Rbfox1 はこの制御因子であり、カルシウム流入とその下流の Erk/MAPK シグナルを介して Rbfox1 が核内へ移行し凝集することによってこのスプライシング変化が引き起こされる。

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5件)

- 1) Yuji Sato, Satoko Suzuki, Yoko Iijima, and Takatoshi Iijima. Neuroigin-induced presynaptic differentiation through SLM2-mediated splicing modifications of Neurexin in cerebellar cultures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. S0006-291X(17)31868-5. (2017) doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.097. (T.I. is a corresponding author) (査読有)
- 2) Satoko Suzuki, Noriko Ayukawa, Chisa Okada, Masami Tanaka, Susumu Takekoshi, Yoko Iijima, and Takatoshi Iijima. Spatio-temporal and dynamic regulation of neurofascin alternative splicing in mouse cerebellar neurons. *Scientific Reports* 7:11405 (2017) doi: 10.1038/s41598-017-11319-5. (T.I. is a corresponding author) (査読有)
- 3) Yoko Iijima, Katharina Behr, Takatoshi Iijima, Barbara Biemanns, Josef Bischofberger and Peter Scheiffele. Distinct Defects in Synaptic Differentiation of Neocortical Neurons in Response to Prenatal Valproate Exposure. *Scientific Reports* 6:27400 (2016) doi: 10.1038/srep27400. (査読有)
- 4) Takatoshi Iijima, Chiharu Hidaka and Yoko Iijima. Update Article: Spatio-temporal regulations and functions of neuronal alternative RNA splicing in developing and adult brains. *Neuroscience Research*. 109:1-8 (2016) doi: 10.1016/j.neures.2016.01.010. (T.I. is a corresponding author) (査読有)
- 5) Yoko Hanno-Iijima, Masami Tanaka and Takatoshi Iijima. Activity-dependent bidirectional regulation of GAD expression in a homeostatic fashion is mediated by BDNF-dependent and independent pathways. *PLoS ONE* 10(8): e0134296 (2015) doi: 10.1371/journal.pone.0134296. (T.I. is a corresponding author) (査読有)

〔学会発表〕(計12件)

- 1) Takatoshi Iijima. Molecular mechanism and function of alternative pre-mRNA splicing on neuronal cell adhesion molecules regulated by STAR family proteins. *ConBio2017*, 兵庫(神戸) 2017.12.06-09.
- 2) Takatoshi Iijima, Yoko Iijima, Masami Tanaka, Satoko Suzuki, Noriko Ayukawa, Peter Scheiffele. Molecular

mechanism and function of alternative pre-mRNA splicing on neuronal cell adhesion molecules regulated by STAR family proteins.第60回日本神経化学学会大会, 宮城(仙台) 2017.09.07-09.

- 3) Yuji Sato, Satoko Suzuki, Yoko Iijima and Takatoshi Iijima. Alternative splicing of Neurexin plays a crucial role in Neuroigin-induced presynaptic differentiation on cerebellar GABAergic neurons in vitro. 第60回日本神経化学学会大会, 宮城(仙台) 2017.09.07-09.
- 4) Yoko Iijima, Masami Tanaka, Satoko Suzuki, Noriko Ayukawa, Peter Scheiffele and Takatoshi Iijima. Molecular mechanism of alternative pre-mRNA splicing on neuronal cell adhesion molecules regulated by STAR family proteins. 第40回日本神経科学学会大会, 千葉(幕張) 2017.07.20-22.
- 5) Yuji Sato, Satoko Suzuki, Yoko Iijima and Takatoshi Iijima. Alternative splicing of Neurexin plays a crucial role in Neuroigin-induced presynaptic differentiation on cerebellar GABAergic neurons in vitro. 第40回日本神経科学学会大会, 千葉(幕張) 2017.07.20-22.
- 6) Chiharu Hidaka, Noriko Ayukawa, Satoko Suzuki, Yoko Hanno-Iijima, Peter Scheiffele and Takatoshi Iijima. Molecular mechanism of alternative pre-mRNA splicing on neuronal cell adhesion molecules regulated by STAR family proteins. 第39回日本分子生物学会年会, 神奈川(横浜) 2016.11.30-12.02
- 7) Satoko Suzuki, Noriko Ayukawa, Chiharu Hidaka, Yoko Iijima and Takatoshi Iijima. Dynamic regulation of alternative splicing on a polymorphic immunoglobulin superfamily molecule Neurofascin in adult brains. 第39回日本分子生物学会年会, 神奈川(横浜) 2016.11.30-12.02
- 8) 飯島崇利 「神経系におけるスプライス多様性の破綻と精神発達疾患」第38回日本神経化学学会 福岡県(福岡市) 2016.9.10.
- 9) Chiharu Hidaka, Satoko Suzuki, Noriko Ayukawa, Yoko Iijima and Takatoshi Iijima. Dynamic regulation of alternative splicing on a polymorphic immunoglobulin superfamily molecule Neurofascin in adult brains. 第59回日本神経化学学会 福岡県(福岡市) 2016.9.10.
- 10) Chiharu Hidaka, Noriko Ayukawa, Satoko Suzuki, Yoko Hanno-Iijima, Peter Scheiffele and Takatoshi Iijima. Molecular mechanism of alternative

- pre-mRNA splicing on neuronal cell adhesion molecules regulated by STAR family proteins. 第 39 回日本神経科学大会 神奈川 (横浜) 2016.7.20-7.22
- 11) Satoko Suzuki, Noriko Ayukawa, Chiharu Hidaka, Yoko Iijima and Takatoshi Iijima. Dynamic regulation of alternative splicing on a polymorphic immunoglobulin superfamily molecule Neurofascin in adult brains. 第 39 回日本神経科学大会 神奈川 (横浜) 2016.7.20-7.22
- 12) 飯島崇利「神経系 RNA 結合タンパク質による神経接着因子の時空間的な選択的スプライシング制御」日本分子生物学会・生化学会合同大会 (BMB2015) 兵庫県 (神戸市) 2015.12.01-04

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 崇利 (IIJIMA, Takatoshi)
東海大学・創造科学技術研究機構・准教授
研究者番号：90383702

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

Peter Scheiffele (SCHEIFFELE, Peter)
Dept. of Zellbiologie, Biozentrum,
Universität Basel・Professor

Ulrich Muller (ULLICH, Muller)
Dorris Neuroscience Center, The Scripps
Research Institute, USA・Professor

Chunha, R. Shane (CHUNHA, Shane)
Department of Integrative Biology and
Pharmacology, UT Health, Houston, Texas,
USA・Professor

大塚 正人 (OHTSUKA, Masato)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：90372945

吉田 知之 (YOSHIDA, Tomoyuki)
富山大学・大学院医薬研究科・准教授
研究者番号：90372367

田中 正視 (TANAKA, Masami)
京都大学・T-CiRA・博士研究員
研究者番号：50706182

竹腰 進 (TAKEKOSHI, Susumu)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：70216878