

令和 2 年 7 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：16KK0158

研究課題名（和文）Sparcl1/Hevinスプライシング変異体による発達期シナプス形成の制御機構（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Analysis of synaptic connectivity regulated by Sparcl1/Hevin variants during brain development(Fostering Joint International Research)

研究代表者

鶴田 文憲 (TSURUTA, Fuminori)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：30571450

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円

渡航期間： 10ヶ月

研究成果の概要（和文）：新生児期の脳は、時期領域特異的に精密なRNA代謝が行われている。近年、このプロセスが破綻すると発達障害につながることを示唆されている。これまでに我々は、脱ユビキチン化酵素USP15の機能が破綻すると、スプライソソームの機能低下につながり、グローバルなスプライシングエラーを引き起こすことを見出してきた。本課題では、USP15破綻によって産生されるSparcl1変異体の解析を行い、Sparcl1異常と小胞体ストレスの関連性を発見した。USP15やSparcl1は自閉症の責任遺伝子としても報告されていることから、本研究成果は、RNA代謝のみならず発達障害のメカニズム解明にもつながると期待している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題で検証を行ったUSP15とSparcl1は、双方とも自閉症の責任遺伝子として報告されている。その一方で、これら遺伝子の異常がなぜ自閉症につながるのか明らかではなかった。本研究課題では、これら遺伝子の異常が、小胞体ストレスの誘導につながることを新たに発見した。小胞体ストレスと発達障害の関連はほとんど解析が進んでいないことから、本研究成果は、発達障害研究に対する新しい視点を提供できるのではないかと期待している。

研究成果の概要（英文）：RNA metabolism is regulated in timing- and region-specific manners. Recently, it has been reported that a defect in this process leads to developmental disorders. So far, we have found that loss of USP15 causes an abnormal spliceosomal function, leading to global splicing errors. In this study, we have focused on the Sparcl1 mutant produced by USP15 deficient brain and analyzed a link between Sparcl1 abnormality and ER stress. Since USP15 and Sparcl1 act as responsible genes for autism, we expect that our data provide a clue for understanding that underlie not only RNA metabolism but also developmental disorders.

研究分野：神経科学、分子生物学

キーワード：Sparcl1/Hevin USP15 neurons astrocytes microglia

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、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

発達過程の脳では、時期領域特異的に正確な RNA 代謝が行われている。このプロセスは、複雑な神経回路を構築する上で、重要な役割を担う。実際、RNA 代謝のプロセスが破綻すると自閉症など発達障害の発症リスク亢進につながるということが知られている。

本課題を開始するにあたり、我々は自閉症責任遺伝子である脱ユビキチン化酵素 USP15 が、スプライソソームの制御に関与することを見出していた。USP15 は、様々な細胞内シグナリングを制御することで炎症やストレス応答を調節することが知られている。まず、USP15 の標的タンパク質をスクリーニングし、USP15 は Sart3 を足場として、U6 スプライソソームの制御因子 TUT1 を脱ユビキチン化することを発見した。このことから USP15 は、TUT1 や Sart3 と協調して、RNA スプライシングの制御に関わるのではないかと考えた。そこで Affymetrix exon array でグローバルなスプライシング変化を解析したところ、RNA プロセッシングに異常をきたす候補因子を複数同定することに成功した。これら候補因子の中から、我々は、アストロサイト分泌タンパク質 Sparcl1/Hevin 遺伝子(以下 Sparcl1) に着目した。Sparcl1 は主として細胞外マトリックスを構成するタンパク質で、シナプス形成や細胞遊走に関与することが示唆されている。また Sparcl1 の遺伝子変異は自閉症の発症リスク亢進にもつながることから、Sparcl1 は USP15-TUT1 カスケードの下流に位置するタンパク質で、USP15 異常と発達障害発症の間をつなぐ有力な候補因子になることが推測できた。

2. 研究の目的

USP15 欠損によって産生される Sparcl1 スプライシング変異体が、発達期における脳構築にどのような影響を与えるか解明する。

3. 研究の方法

我々は、USP15 の機能欠損が TUT1 の脱ユビキチン化異常を引き起こし、グローバルなスプライシングエラーを誘発することを見出した。本課題では、USP15 KO マウス脳から同定した Sparcl1 変異体に着目し、この Sparcl1 変異体が USP15 欠損によって見られる神経系の異常と関連性があるか以下の方法で検証を行った。特に、USP15 欠損によって生じるストレス応答などが Sparcl1 変異体で観察される現象に関連付けられるか、詳細に観察を行った。

(1) USP15-TUT1 によるスプライシング制御の機能解析

これまで申請者は、USP15 が TUT1 を SART3 と協調して脱ユビキチン化することを見出してきた。その一方で、TUT1 の脱ユビキチン化がどのようにしてスプライシング制御に関わるか明らかにしていなかった。本課題では、USP15 による TUT1 の脱ユビキチン化がスプライソソーム制御に対してどのような影響を与えるのか、培養細胞を用いて、分子生物学的に解析した。

(2) スプライシングエラーを起こしている Sparcl1 変異体の機能解析

これまで申請者は、Exon array の結果から、Sparcl1 の C 末端領域に異常があることを見出していた。本課題では、3' RACE と RT-PCR を組み合わせ、Exon array で異常を示した領域近傍を USP15 KO 脳からクローニングし、DNA 配列を同定した。また得られた変異体の発現プラスミドを構築し、初代アストロサイトや初代神経細胞に導入し、細胞内動態を観察した。

(3) Sparcl1 変異体の生理機能の解析

アストロサイトから分泌された Sparcl1 はシナプス形成を促進する働きがある。このことから、スプライシングエラーによって産生された Sparcl1 は、シナプス形成能に異常をきたすのではないかと考えた。これを検証するため、in vitro の初代培養系を用いた評価系構築を試みた。またシナプス形成に与える影響以外に未知の機能が存在しないか、検証を行った。

4. 研究成果

(1) USP15-TUT1 によるスプライシング制御の機能解析

USP15 がどのようにして TUT1 の機能制御に関わるか、分子生物学的に解析した。通常、TUT1 は核小体に局在することから、USP15 の脱ユビキチン化が TUT1 の核局在を制御するか検証した。その結果、USP15 の過剰発現で TUT1 が核小体から核質へと移行することが示唆された。一方、USP15 KO MEF や USP15 shRNA によるノックダウン実験では TUT1 の局在に大きな変化は見られなかった、このことから、USP15 による TUT1 の細胞内局在の制御は、十分ではあるが必要ではないことが示唆された。このことは、USP15 以外の因子も TUT1 の局在制御に関わっていることが推測できる。次に、TUT1 はスプライソソーム構成因子である U6-snRNA の 3'側にウリジンを付加して機能調節することから、この TUT1 による修飾が U6-snRNA の安定化に寄与するのではないかと考えた。そこで TUT1 をノックダウンした細胞の U6-snRNA 量を測定したところ、コントロールと比べて優位に減少していた。以上の結果から、USP15 による TUT1 の脱ユビキチン化は、TUT1 の核内局在を変化させ、U6-snRNA の安定化に寄与することが示唆された。

(2) スプライシングエラーを起こしている Sparcl1 変異体の機能解析

Exon array の結果から、USP15 KO 脳では、Sparcl1 の C 末端側にスプライシング変異が入っていることが示唆されていた。そこでどのように配列が変化しているか、3'RACE 法を用いた手法で解析したところ、Sparcl1 の C 末端側に位置する EF hand を欠損した変異体 (Sparcl1 ΔEF) とミトコンドリア呼吸鎖複合体の一つ Ndufa11 と融合した変異体を同定した。

(3) Sparcl1 変異体の生理機能の解析

次に、これら Sparcl1 変異体がシナプス形成に関わるか、通常の培養細胞にこれら変異体を発現させ、細胞外に分泌された Sparcl1 を精製し、これを初代神経細胞に添加してシナプス形成能を測定する実験系を計画した。この実験系を構築し、Sparcl1 変異体の機能解析を試みようとしたところ、予想に反して、これら Sparcl1 変異体は細胞外に分泌されず、多くが小胞体に蓄積してしまうことがわかった。先行研究から、Sparcl1 の EF hand を欠損した組換えタンパク質では、正常な折りたたみ構造を取らなくなることが報告されており、今回見出した Sparcl1 変異体は小胞体でミスフォールドし、正常に分泌されなくなる可能性が考えられた。そこでこれら小胞体に蓄積したこれら変異体が小胞体ストレスを誘導するか検証したところ、小胞体ストレスマーカーである BiP の発現が有意に上昇していた。また USP15 KO の脳を観察したところ、過剰発現系と同様、BiP の発現亢進が認められた。以上の結果から、USP15 異常によるスプライシングエラーによって産生された Sparcl1 変異体は、小胞体に蓄積し、小胞体ストレスを誘発することが示唆された。

近年、小胞体ストレスが様々な発達障害に関係することが示唆されている。USP15 並びに Sparcl1 も発達障害の責任遺伝子として知られていることから、今回見出した現象が、小胞体ストレスと発達障害をつなぐ新しいメカニズムの一端になるのではないかと期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okajima T, Tsuruta F.	4. 巻 13
2. 論文標題 Microglial dynamics during brain development.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neural Regen Res.	6. 最初と最後の頁 222-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.226386.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kim J, Tsuruta F, Okajima T, Yano S, Sato B, Chiba T.	4. 巻 494
2. 論文標題 KLHL7 promotes TUT1 ubiquitination associated with nucleolar integrity: Implications for retinitis pigmentosa.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 220-226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.10.049.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuruta F, Okajima T, Yano S, Chiba T.	4. 巻 123
2. 論文標題 Quantification of Endosome and Lysosome Motilities in Cultured Neurons Using Fluorescent Probes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Vis Exp.	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) 10.3791/55488.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda T, Kigoshi-Tansho Y, Naganuma T, Kazaana A, Okajima T, Tsuruta F, Chiba T.	4. 巻 22
2. 論文標題 CACUL1/CAC1 attenuates p53 activity through PML post-translational modification.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 863-869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2016.11.125.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Fuminori Tsuruta
2. 発表標題 Regulation of RNA splicing associated with environmental stimulation in the postnatal brain
3. 学会等名 Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fuminori Tsuruta
2. 発表標題 Microglia dynamics regulated by neuronal micronuclei during brain development
3. 学会等名 Bilateral Symposium on Life Science College of Life Science, National Taiwan University (NTU) Biological Sciences, University of Tsukuba (UT) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fuminori Tsuruta
2. 発表標題 Regulation of RNA splicing associated with environmental stimulation in the postnatal brain
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鶴田文憲
2. 発表標題 USP15はTUT1脱ユビキチン化を介してRNAスプライシングを制御する
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	エログル チャラ (EROGLU Cagla)	デューク大学医学部・Cell Biology・Associate Professor	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	パスカ セルジユ (PASCA Sergiu)	スタンフォード大学医学部・Psychiatry and Behavioral Sciences・Assistant Professor	