

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17064

研究課題名（和文）認知機能形成に関与する遺伝子Sez6の選択的スプライシング制御の役割

研究課題名（英文）Research on the role of Sez6 splicing variants in neural network formation and plasticity

研究代表者

日高 千晴（Hidaka, Chiharu）

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・助教

研究者番号：10783673

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、脳に特異的に発現する膜タンパク質 Sez6のスプライスバリエントが神経回路形成過程においてどのような役割を担うのかについて検証を行った。具体的には各Sez6スプライスバリエントの時空間的な発現の変動解析と各Sez6スプライスバリエントを単独で発現するコンストラクトの開発を実施した。その結果、Sez6スプライスバリエントには脳領域間に発現特異性が見られること、神経回路形成過程においても各Sez6スプライスバリエントには発現特性が存在すること、刺激に対するSez6スプライスバリエントの発現応答は神経回路の発達に伴い変化することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知機能をはじめとした高度脳機能の機能発現には神経細胞間で形成される神経回路網が極めて重要である。したがってこの認知機能の機能発現機構の形成・維持の機序を詳細に明らかにしていくことは、超高齢化社会に向けて社会全体が大きく舵を切っていくことがほぼ確実視されている今日の日本においては特に重要なテーマである。本研究課題が神経回路形成の機序の本質的な理解の足掛かりとなることで、将来的には高次脳機能の発現の仕組みを理解する新たな視座をの提供を目指していきたい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated whether seizure-related gene 6 (Sez6) expression is temporally and spatially regulated by alternative splicing processes. Sez6, a transmembrane protein specifically localized on neuronal dendrites, is responsible for dendritic branching and synapse formation. However, its exact role in neural network formation remains unclear. Our study revealed that Sez6 splicing patterns were modulated in a brain area-specific manner. In particular, the striatum showed a characteristic splicing pattern of recessive isoforms. Moreover, neuronal activation by convulsant drug stimulation increased the levels of recessive isoforms like that of the dominant isoform in cultured neurons. Additionally, we produced expression vectors of each Sez6 splicing isoform and confirmed their expression. Future work should investigate whether each of the Sez6 isoforms affects neural network formation and maintenance when overexpressed in neurons.

研究分野：神経科学

キーワード：Sez6 スプライスバリエント 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

Seizure related gene 6 (Sez6)は神経細胞の樹状突起形態形成や認知機能の神経回路形成に関与することが示唆されている脳に特異的に発現する膜タンパク質である(Gunnarsen JM et al., Neuron, 2007)。さらに、この Sez6 は選択的スプライシングにより2種類の膜型スプライスバリエントと1種類の分泌型スプライスバリエントを生成することが知られている(Shimizu-Nishikawa K et al., BBRC., 1995, 図1)。生き物を構成する細胞は限られたゲノム上の遺伝子からより多くのタンパク質の多様性を獲得する仕組みとして選択的スプライシングを利用している。近年、この機構を利用して脳を構成する神経細胞は神経回路の可塑性を生み出していることが分かってきた(Brossier MR et al., J Neurosci Res., 2015)。しかしながら、脳に特異的に発現するタンパク質群が選択的スプライシングにより生み出す各スプライスバリエントの生理学的な意義についてはまだよくわかっていないことが多く、脳内タンパク質 Sez6 も同様である。

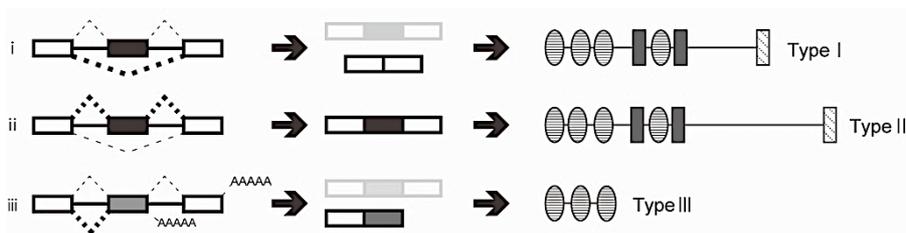


図1 各 Sez6 スプライスバリエントの模式図, i・iiは膜型スプライスバリエント, iiiは分泌型スプライスバリエント

2. 研究の目的

本研究は生理学意義がまだよく明らかとなっていない Sez6 の3種類のスプライスバリエントに着目し、各 Sez6 スプライスバリエントの時空間的な発現の変動解析と形態学的な影響を検証するための各 Sez6 スプライスバリエント発現ベクターを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

Sez6 スプライスバリエントの時空間的な発現を解析するため、胎生期と成体のマウス脳組織を用いて1段階 RT-qPCR 法で定量解析を行なった。また、各 Sez6 スプライスバリエントが神経細胞の形態形成の過程における役割を検証するために各 Sez6 スプライスバリエントを単独で発現する発現ベクターの構築を行なった。

4. 研究成果

① 各 Sez6 スプライスバリエントの発現を胎生期と成体期で比較検証を行った。それぞれのマウス大脳皮質サンプルから抽出した total RNA を用いて1段階 RT-PCR 法で発現レベルを検討した。その結果、2種類の膜型 Sez6 スプライスバリエントは成体期に高い発現特異性を示したのに対して分泌型 Sez6 は胎生期に高い発現特異性を持つことを見出した(図2)。

次に② 各 Sez6 スプライスバリエントの発現を成体マウス脳の領域間で比較検証した。①と同様に成体

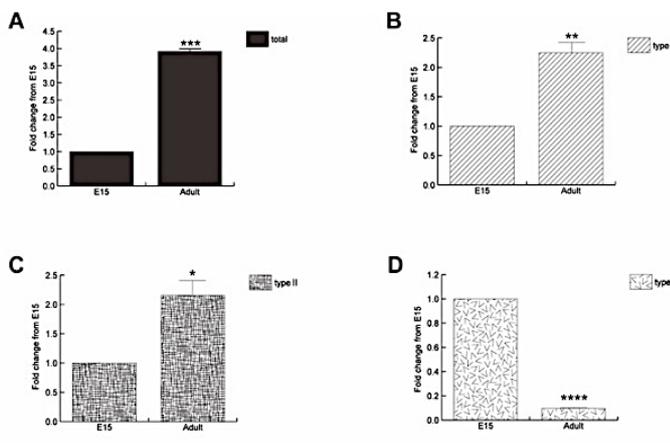


図2 胎生期と成体期の比較結果, *は有意差があることを示す。

マウスの脳領域から total RNA を抽出し、1 段階 RT-PCR 法で領域間の発現レベルを比較検討した。今回は前頭前皮質(PFC)・帯状回(CC)・線条体(CPu)・海馬(HIP)・扁桃体(Amg)の 5 つの脳領域間比較を実施した。その結果、3 種類の Sez6 スプライスバリエント全てが帯状回で高く発現する傾向が見られた。さらに 2 種類の膜型 Sez6 スプライスバリエントのうちマイナースプライスバリエントのみ、帯状回よりも線条体で有意に高い発現分布を示す結果が得られた(図 3)。さらに Sez6 はてんかん誘発剤 pentylenetetrazole (PTZ)の投与により遺伝子発現が上昇することが知られている(Shimizu-Nishikawa K et al., Brain Res Mol Brain Res., 1995)。しかしながら各 Sez6 スプライスバリエントの発現へは PTZ 投与がどのような影響を与えるのかについての報告は現在のところまだなかった。そこで本研究課題で初代培養神経細胞を用いて③PTZ 投与による Sez6 スプライスバリエントの発現への影響を検証した。PTZ 投与後の初代培養神経細胞から total RNA を抽出する方法により得た解析用サンプルを用いて 1 段階 RT-PCR 法で解析を行なった。その結果、PTZ 投与により各 Sez6 スプライスバリエントは全て発現誘導が惹起されることが分かった。しかしながら、神経細胞の成熟に伴いマイナースプライスバリエントの発現はより高濃度の PTZ 濃度の投与によって惹起されることを見出した。

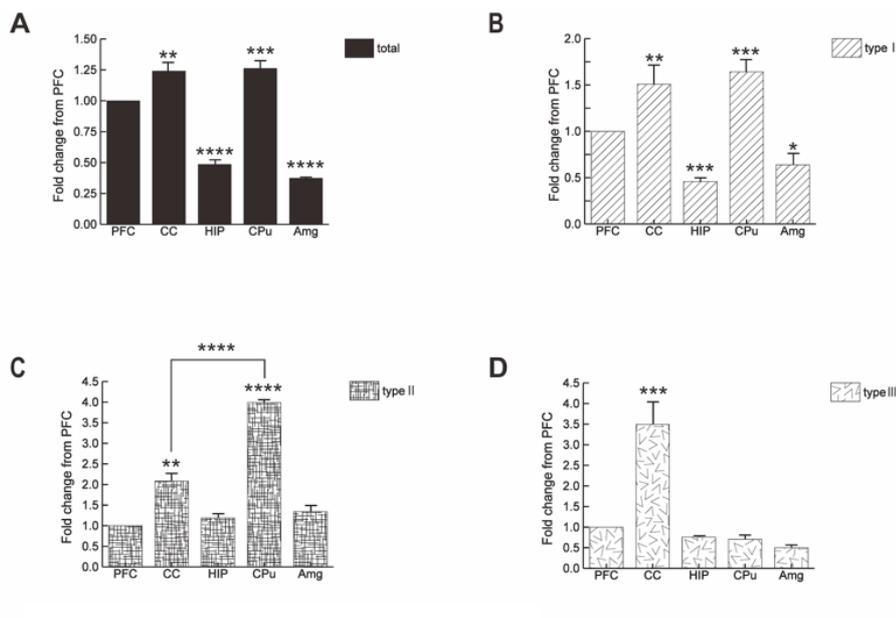


図 3 マウス脳領域間での比較結果, *は有意差があることを示す。

一方、各 Sez6 スプライスバリエント単独発現ベクター構築のために、各 Sez6 スプライスバリエントの人工合成遺伝子を作成し、ベクターの構築を行なった(図 4)。ベクターの構築は完成したが、神経細胞の形態形成への影響を検証することがまだできていないため、今後実施していく予定である。

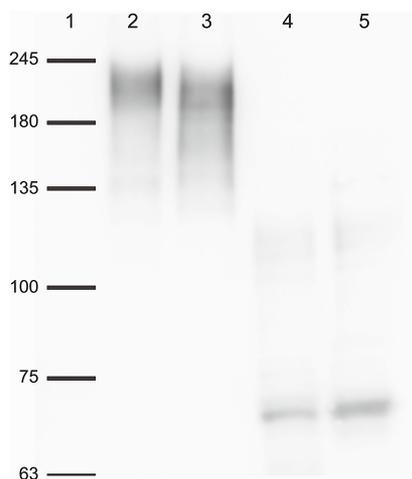


図 4 各 Sez6 スプライスバリエントの細胞質フラクション (レーン 2, 3, 4) と Type III の培養上清フラクション (レーン 5) を泳動した結果のウェスタンブロット画像, レーン 1; サイズマーカー, レーン 2; Type I, レーン 3; Type II, レーン 4 と 5; Type III

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hidaka Chiharu, Mitsui Shinichi, Osako Yoiij, Takahashi Kou, Tanaka Kenjiro, Yuri Kazunari	4. 巻 636
2. 論文標題 Differential brain expression pattern of Sez6 alternative splicing isoform with deleted transmembrane domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 128 ~ 132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.10.103	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 日高 千晴、三井 真一、大迫 洋治、高橋 弘、田中 健二郎、由利 和也
2. 発表標題 樹状突起形成に関するSez6スプライスバリエントの脳内分布
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------