

中枢神経系における生命情報の多様性の制御メカニズムと機能解明

Mechanisms and functions underlying molecular diversity in central nervous system

(日本神経化学会推薦)

代表研究者	東海大学	飯島 崇利	Tokai University	Takatoshi IJIMA
協同研究者	バーゼル大学	Peter Scheiffele	The University of Basel	Peter SCHIFFELE
協同研究者	東海大学	鈴木 暁子	Tokai University	Satoko SUZUKI
協同研究者	東海大学	飯島 陽子	Tokai University	Yoko IJIMA
協同研究者	東海大学	日高 千晴	Tokai University	Chiharu HIDAKA
協同研究者	東海大学	田中 正視	Tokai University	Masami TANAKA

The vertebrate central nervous system (CNS) is the most complicated but well-organized system. Neuronal cell development is controlled by a highly organized sequence of developmental events that consist of proliferation, differentiation, migration, and maturation. However it is still questionable and mysterious how huge diversity of neuronal cell types and complexity of neural circuits are established by quite limited number of genes (<25,000 genes in human).

Alternative RNA splicing through the selective exclusion or inclusion of pre-mRNA sequences is a powerful system for transcriptomic and proteomic diversity. The resulting molecular repertoires are thought to be essential for generating biological complexity in mammalian systems. Splicing regulation is likely prominent in the vertebrate CNS. Therefore, neuronal alternative splicing events may contribute to each step of this developmental sequence, which is expected to contribute greatly to the complexity and specificity of neural circuits. The aim of my work is to understand molecular mechanisms underlying alternative pre-mRNA splicing in neurons, in particular its regulation by cell-type specific factors and neuronal activity.

To characterize neural alternative splicing programs, I currently characterized many substrate RNAs controlled by neural splicing factors SAM68 and SLM that we identified in my postdoctoral works. I am then analyzing the functional relevance of identified activity-regulated splicing isoforms using biochemical, cell biological and physiological approaches. Importantly de-regulation of neuronal splicing events leads to neurological disorders. Therefore, my work will contribute to further understanding and identifying treatment strategies for these diseases.

研究目的

1. 神経系における生命情報の多様化のメカニズムおよびその機能解明

ヒト成体脳は約 1000 億個にも及ぶ神経細胞のネットワークからなり、どの組織よりも最も複雑な臓器である。複雑な脳構造の構築と高次機能の発現には膨大な情報量を必要とすることが予想されるが、これに対してヒト遺伝子の総数は僅か2-3万個程度に過ぎない。このような限られた遺伝子数のなかでどのように哺乳類の生命高次現象がプログラムさ

れているのかは未だに大きな謎となっている。選択的スプライシングは単一の遺伝子から複数の遺伝子産物を生み出し生命情報を多様化させる重要な仕組みである。脳は選択的スプライシングの最も盛んな臓器であり、高等動物における複雑な組織構造と機能発現に強く寄与していることが予想される。そこで申請者らは、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、これまでに興味深いファクターとして、RNA 結合タンパク質 SAM68 を同定してきた。SAM68 は、中枢神経系で

主要なシナプス形成因子であり自閉症の原因遺伝子として知られる *Neurexin* の選択的スプライシングを神経活動依存的に制御することを明らかにした (Iijima et al., Cell. 2011)。さらに、*SAM68* には二つのファミリー分子 *SLM1* と *SLM2* があり、これらは特定の神経細胞群に局限して発現し神経細胞種に特異的な *Neurexin* のスプライシング制御を行っていることを明らかにしてきた (Iijima et al., J. Cell Biol. 2014)。そこで今後のメインは、*SAM68/SLM* による選択的スプライシングを中心とし、時空間的選択的スプライシングプログラムの制御機構と、そのコードする生命情報の多様性と神経系での機能的役割を理解することを目指した。

2. 広汎性発達障害における RNA 制御異常の解明

近年 RNA レベルでの生命情報発現の多様化のコントロールの破綻が多くの疾患の発症や病態と関連していることが明らかになりつつあり、とくに多いのは神経・精神疾患であることから、スプライシング異常などに起因する RNA 情報発現変化によっておこる精神・神経疾患の分子病態に注目している。最近、申請者らは *in vitro* 系自閉症モデル (Iijima et al., Sci. Rep., 2016, in press) を用いた独自のアプローチにより、広汎性発達障害におけるトランスクリプトームレベルでの異常について調べてきた。エキソンアレイによる網羅的トランスクリプトーム解析によって複数の遺伝子や特定のスプライシングバリエーションの特徴的な発現変動を見いだしており、これらと疾患との関連性を検討している。そこで第二に、時空間的 RNA 情報制御の破綻が神経機能に与える影響を調べ、広汎性発達障害の発症や分子病態との関連性を明らかにすることを目指す。また、自閉症の分子病態はもとより、現在のモデルでの RNA 制御異常により生成された特異的な遺伝子産物を同定することによって、バイオマーカーによる確定的診断方法や新アプローチによる治療法の確立に貢献することを目的とした。

研究経過

1. 神経系スプライシング因子 *SAM68/SLM1* の標的 RNA 分子の網羅的同定と機能解析

本研究では *SLM* による組織・細胞種特異的および *SAM68* による神経活動に依存的なスプライシング活動の 2 つの機構に注目し、これらのスプライシング因子標的 RNA の網羅的検索を行った。アジレン

ト社の exon microarray を使って野生型と *SAM68/SLM1* ダブルノックアウトマウス間でエキソンレベルでの発現比較を行った。その結果、300 個以上のエキソンで有意な変動 ($FC > 1.5$; $p = 0.05$) が認められた。その中には神経疾患に関わる遺伝子の一部をコードするエキソンが多く含まれており、RT-qPCR によりノックアウトマウスと野生型とのスプライシング比率を詳しく比較したところ、特に神経・精神疾患との関連性が示されている *IL1rap* (精神遅滞), *Ank3* (自閉症、統合失調症、知的障害), *Pcdh15* (自閉症、統合失調症、Usher syndrome) などが劇的なアイソフォーム変化を示した。全体的に、*SAM68* ノックアウトマウスでは 3'UTR 部位を含むエキソンの選択的スプライシング比率が変化している傾向が非常に強く、遺伝子産物の C 末端側の長さが通常とは異なったアイソフォームが多く出現していることが分かった。これにより、*SAM68* ノックアウトマウスにおいて神経系では本来膜タンパク質であるはずの細胞接着因子が分泌型タンパク質に変化してしまうなど劇的な生化学的異常所見が示された。1, *in vitro* 自閉症モデルをもちいた網羅的トランスクリプトーム解析

近年、生命情報の多様化メカニズムの破綻が複数の神経・精神疾患の発症に密接に関係していることがあきらかになりつつある。最近当研究室とバーゼル大学との共同研究で *in vitro* 自閉症モデルを確立し (Iijima et al., Sci. Rep., 2016, in press)、このモデルを用いて広汎性発達障害における遺伝子発現変動およびスプライシング変化の有無を検討した。その結果、特定の抑制性神経細胞の発現するタンパク質をコードする遺伝子発現が有意に低下していること、興味深いことに神経ペプチドを含めた複数の分泌性因子の顕著な減少が見られる等、*in vitro* レベルの解析により非常に明確な自閉症リスクファクターの薬理効果を明らかにすることができた。さらに興味深いことに、有意に変動した遺伝子群の中でヒト精神疾患との関連性が指摘されている、または遺伝子改変動物で精神疾患様の行動異常が報告されている遺伝子数は、Down: 12(8) / 62 genes, Up: 2 (1) / 78 genes (自閉症スペクトラム関連の遺伝子数)であり、精神疾患に関連した遺伝子が、強く濃縮されている傾向がある。また、多くはないが一部には発現変化とともにスプライシング変化を伴う分子が存在することも分かった。現在はこれらの情報に基づいて、*in vivo* で

の解析を行い、自閉症の発症や病態との関連性を調査している。

考察

1. 神経系における生命情報の多様性について

選択的スプライシングは比較的早くから知られた概念であり、その中心メカニズムは多くの研究者によって解明されてきた。特定のスプライシングアイソフォーム間の生化学的・機能的違いなども分子によっては複数のグループによって詳細な研究がなされており、Neurexinはその典型例である (Boucard et al., 2003; Chih et al., 2006; Aoto et al., 2013)。しかしながら、本研究のように選択的スプライシングを制御する特異的なメカニズムについて注目している研究は意外にも少ない。近年の研究において、シナプスタンパク質をコードする複数の pre-mRNA が時空間的な選択的スプライシング制御を受け、シナプス接着の特異性や可塑性に強く関与する可能性が示唆されてきたものの (Xie & Black, 2001)、細胞間ネットワークの多様性・特異性を構成する要素として選択的スプライシングに目を向けている例はさらに少ない。全体的に、エピジェネティクス変化も含めた遺伝子情報発現の多様化と高次生命現象との相関関係をクリアに証明するような報告はまだ乏しく、とくに哺乳類のような高等動物では非常に少ない。

近年採択者は神経系における選択的スプライシングにおいて、特に興味深いスプライシング因子群とその制御メカニズムを同定し、これまでに大きなツールやヒントを得てきた。申請者は neurexin の選択的スプライシングの制御因子として RNA 結合タンパク質 STAR ファミリー (SAM68, SLM1 および SLM2) を同定し、SAM68 は神経活動依存的なスプライシング、また SLM1 と SLM2 は特定の神経細胞に限局した特異的スプライシングを制御することを明らかにした (Iijima et al., 2011 & 2014)。さらに、本課題においては、これら SAM68/SLM によるスプライシングプログラムの同定を、ノックアウト動物を用いて網羅的なトランスクリプトーム解析によって明らかにしてきた。今回エキソマイクロアレイの使用によって SAM68/SLM の新規標的 RNA だけでなく、典型的なスプライシングパターン等を知ることができた。今後これらの情報をもとに、神経系における選択的スプライシング制御がどのように高次の神経機能に寄与するのか知ることによって、より

具体的に細胞機能における分子多様性の普遍的な生理意義の一端を解き明かすことができると信じる。

2. 神経系における RNA 制御学の研究状況と精神疾患との因果関係

RNA 研究のなかでも non-coding RNA 関連の一部の研究は、幅広くさまざまな研究分野で注目され、めざましい進展を遂げているにも関わらず、全般的に神経科学領域での RNA 制御の研究は今一歩進んでいない。しかしながら、医学的・臨床学的な観点においては、pre-mRNA スプライシングや RNA 編集などの異常が自閉症、統合失調症などの神経発達疾患や ALS やパーキンソン病などの神経変性疾患をはじめとした多くの精神・神経疾患を引き起こすことが明らかになりつつあり (Licatalosi & Darnell, 2006)、精神活動をはじめとした高等動物の高次的な生命活動における RNA 制御の役割について注目され始めている。

興味深いことに、申請者の研究対象であるスプライシング因子 SAM68/SLM の複数の新規標的 RNA は、精神疾患の発症や病態と密接な関係をもつタンパク質をコードしており、疾患との関連性を解明するための重要なヒントを多分に含んでいるのに加え、最近採択者ら独自のアプローチで検討してきた *in vitro* 自閉症モデルで、転写後レベルで興味深い遺伝子発現やスプライシング変動があることを掴んだ (飯島ら、未発表データ)。これらを足がかりとして、神経機能異常の分子メカニズムを紐解いていくことができれば、将来的にはヒトでの ASD の症状との関連性を明らかにし、バイオマーカーによる確定的診断方法の確立や治療の可能性に繋がると信じる。

参考文献

1. Aoto, J., Martinelli, D.C., Malenka, R.C., Tabuchi, K., Sudhof, T.C., 2013. Presynaptic neurexin-3 alternative splicing trans-synaptically controls postsynaptic AMPA receptor trafficking. *Cell* 154, 75-88.
2. Boucard, A.A., Chubykin, A.A., Comoletti, D., Taylor, P., Sudhof, T.C., 2005. A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron* 48, 229-236.
3. Chih, B., Gollan, L., Scheiffele, P., 2006. Alternative splicing controls selective

trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex. *Neuron* 51, 171-178.

4. Iijima, T., Wu, K., Witte, H., Hanno-Iijima, Y., Glatter, T., Richard, S., Scheiffele, P., 2011. SAM68 regulates neuronal activity-dependent alternative splicing of neurexin-1. *Cell* 147, 1601-1614.
5. Iijima, T., Iijima, Y., Witte, H., Scheiffele, P., 2014. Neuronal cell type-specific alternative splicing is regulated by the KH domain protein SLM1. *The Journal of cell biology* 204, 331-342.
6. Li, Q., Lee, J.A., and Black, D.L. (2007). Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nat Rev Neurosci.* 8: 819-831.
7. Licatalosi, D.D., Darnell, R.B., 2006. Splicing regulation in neurologic disease. *Neuron* 52, 93-101.

研究の発表

口頭発表

1. 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」 BMB2015 (2015.12.01, 神戸)

誌上発表

1. 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* (2016, in press)
2. Takatoshi Iijima, Chiharu Hidaka and Yoko Iijima. Spatio-temporal regulations and functions of neuronal alternative RNA splicing in developing and adult brains. *Neuroscience Research* (2016, in press) (T.I. is a corresponding author)
3. Yoko Hanno-Iijima, Masami Tanaka and Takatoshi Iijima. Activity-dependent bidirectional regulation of GAD isoform expression in a homeostatic fashion is mediated by BDNF-dependent and independent pathways. *PLoS ONE* 10(8): e0134296 (2015) (T.I. is a corresponding author)