

環境刺激による発達脳 RNA スプライシング制御

筑波大学 生命環境系 生物科学専攻
鶴田 文憲

1. 背景

発生過程の脳は、神経幹細胞から分裂した神経系前駆細胞が、脳内の適切な位置へと移動し、器官としての基本構造を形成していく。一方、出生後は、様々な環境刺激が特定の神経細胞を活性化し、突起伸長やシナプス形成を誘導する。それゆえ、胎児期での脳構築は、遺伝的プログラムによる調節が中心となるが、新生児期では環境刺激も神経回路網の形成に関与していく。興味深いことに、神経細胞が決まった時期に特定の刺激を受容できないと、生涯にわたり関連回路の機能が失われる。この特定の時期は臨界期として知られ、出生後の刺激がいかに重要かをあらわしている。

これまでのトランスクリプトーム解析やプロテオーム解析の結果から、ヒトの脳では、約 20,000-30,000 程度と見積られる総遺伝子のうち、約 15,000 弱の遺伝子が発現しており、このうち 1,500 弱の遺伝子が他の組織と比べて脳で優位に発現している (1)。それ故、複雑な脳を構築するためには、限られた遺伝子数から多様なタンパク質を効率よく産生する必要がある。近年、これら多様性を産出するプロセスとして、RNA スプライシングが注目されている。特に発生時の中枢神経系では、他と比較した際、非常に高頻度で RNA スプライシングが起こることが知られている (2)。また出生後は、多彩な環境刺激が様々な神経細胞を活性化し、神経活動依存的な RNA スプライシングが引き起こされる。これまでに RNA スプライシングは、5 つの U-snRNAs (U1, U2, U4, U5, U6) と 100 を超えるタンパク質群による一連のカスケード反応として制御され、リン酸化をはじめとする可逆的な翻訳後修飾によって巧妙に制御されることが明らかとなっている。中でも近年、分解を伴わないユビキチン化/脱ユビキチン化による可逆的反応が RNA スプライシングカスケードの調節に関与することが示唆され (3)、新しいスプライシングカスケードの制御機構として注目されつつある。

これまでに申請者は、脱ユビキチン化酵素 USP15 の機能解析を行う過程で、USP15 がスプライソソーム制御因子 U6-snRNA のヌクレオチド転移酵素 TUT1 を脱ユビキチン化し、U6-snRNA の安定化に寄与することを見出してきた (投稿中)。また USP15 欠損によってグローバルな RNA スプライシングが変動すること、さらにスプライシング標的候補の一つとして、USP15 KO 脳から分泌因子 Sparc11 の変異体を見出すことに成功した。USP15 と Sparc11 がともに自閉症責任遺伝子であることから、申請者は USP15 から Sparc11 変異体産生に至るプロセスが、発達過程の神経回路網構築に関与するのではないかと考えた。そこで本課題では、脳内 USP15 が新生児期の環境刺激に対してどのように応答するか明らかにすること、また Exon array 解析で得られた Sparc11 変異体が細胞に与える影響を明らかにし、発達過程における環境刺激が USP15-Sparc11 をどのように制御し、脳構築に影響を与えるか解明していくことを目的とした。

2. 方法

・組織ならびに細胞の免疫染色

胎生 18 日の妊娠マウス (C57BL/6) を暗箱に入れて出産させ、生後 2 週間まで光が当たらない環境下で飼育した。その後、野生型マウスならびに光刺激を与えていないマウスを還流固定し、脳を取り出した後、30% スクロース/PBS で置換し、クライオスタットで凍結浮遊切片を作成した。これらサンプルを各種抗体で免疫組織染色を行い、得られた標本を共焦点レーザー顕微鏡ならびに蛍光顕微鏡で観察した。同様に、クローニングした全長 Sparc11 cDNA を哺乳動物細胞の発現ベクターに挿入し、これら Sparc11 発現プラスミドを新生仔ラット (P1) から調整した初代大脳皮質神経細胞や初代大脳皮質アストロサイト、または HEK293 細胞に導入して、細胞内における発現パターンや機能について免疫細胞染色で解析した。

・3' RACE 法を用いた Sparc11 変異体の同定

Sparc11 の 3' 領域を同定するため、USP15KO マウスの脳から Isogen II を用いて total RNA を精製し、Sparc11 の Exon 5 を認識するプライマーとアダプターを付加した oligo-dT プライマーで Sparc11 3' 末端を増幅し、その後、この増幅断片を用いて、Exon 9 ならびにアダプター部分に相当する領域を認識するプライマーで、目的断片を再増幅した。その後、目的断片をクローニングベクターに挿入し、挿入断片の塩基配列をサンガー法で解析した。

・ウェスタンブロッティング法

野生型ならびに変異型の Sparc11 発現プラスミドを HEK293 細胞ならびに初代大脳皮質アストロサイトに導入し、2 日間培養した。その後、培養上清を分取し、細胞抽出液と共に電気泳動し、ウェスタンブロッティ

ング法で Sparc11 の細胞内ならびに分泌量を解析した。

3. 結果

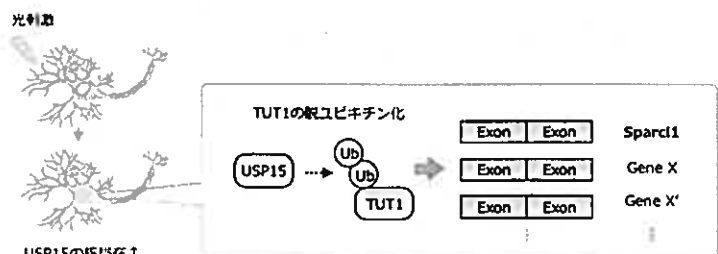
まず USP15 が新生仔脳のどの領域で発現しているか検証するため、野生型マウス脳 (P15) を用いて免疫組織染色を行ったところ、USP15 は大脳皮質第 5 層に強く発現していることがわかった。一方、USP15 が発現している神経細胞は第 5 層のマーカーである CTIP2 とは、部分的かぶるものの 100%一致せず、また介在神経細胞のマーカーである Parvalbumin (PV) 発現細胞とも異なった発現パターンを示した。このことから、USP15 が発現している大脳皮質第 5 層の神経細胞は CTIP2 や PV 陽性細胞とは異なった神経細胞集団である可能性が示唆された。次に USP15 の発現が新生仔期の環境刺激で変動するか検証した。本課題では、新生仔が受ける環境刺激として光刺激に着目した。新生仔マウスは、生後約 10 日程度まで目を閉じており十分な光刺激を受けることができないが、10 日過ぎから徐々に目が開き始める。この時、これまで遮断されていた光刺激を受容し、一次視覚野に至るまでの神経細胞が活性化される。そこで本課題では、大脳皮質一次視覚野における神経細胞の USP15 発現パターンを組織染色で観察した。その結果、光刺激を当てていない新生仔マウスの USP15 は多くが細胞質に存在していたが、通常的环境下 (光刺激を当てた状況) で飼育したマウスの USP15 は神経細胞の核内にも蓄積していた。以上の結果から、USP15 は新生仔期における光刺激依存的に核内に蓄積することが示唆された。

これまでに申請者は、USP15 が核内に局在するヌクレオチド転移酵素 TUT1 を脱ユビキチン化し、U6-snRNA の安定化に寄与すること、また USP15 欠損によって引き起こされるスプライシングエラーの標的因子として、Sparc11 を同定してきた。Sparc11 はアストロサイトから分泌されるシナプス形成促進因子で、神経細胞でも発現することが報告されている (4) (5)。申請者は、USP15 が環境刺激依存的に核内に蓄積し、Sparc11 をはじめとする標的因子のスプライシング調節に寄与するのではないかと考えた。まず、Sparc11 が発現している神経細胞に USP15 が発現しているか検証したところ、Sparc11 が発現していた大脳皮質第 5 層の神経細胞では、ほぼ全ての細胞で USP15 が発現していた。以上の結果から、USP15 欠損によって産生された Sparc11 変異体は USP15 依存的な RNA スプライシング変動の可能性が示唆された。次に Sparc11 のどの領域のスプライシングが変化しているか、Exon array データを用いて詳細に解析した結果、3' 側が欠落している可能性が推測できた。そこで USP15KO 脳から Sparc11 の 3' 側の遺伝子配列を 3' RACE 法で解析した結果、C 末端に位置する EF hand が欠損した変異体を新たに見出した。先行研究から、Sparc11 の EF hand は正常な折りたたみ構造をとる上で重要なドメインであることが示唆されており (6)、EF hand を欠損した Sparc11 変異体は正常な構造を取れず、細胞外に分泌されないのではないかと考えた。

そこで、USP15 変異体が細胞外に分泌されないか、まず培養細胞 HEK293 細胞を用いてウェスタンブロット法で解析を行った。その結果、野生型 Sparc11 を発現させた細胞は細胞外に効率よく分泌されていたが、Sparc11 変異体は全く細胞外に分泌されていなかった。次に初代アストロサイトにも同様に検証したところ、アストロサイトでも Sparc11 変異体は細胞外へ分泌されなかった。このことから、EF hand を欠損した変異体は細胞外に分泌されることが示唆された。次に変異型 Sparc11 が分泌されず、細胞内のどこに蓄積しているか、Sparc11 を初代神経細胞ならびにアストロサイトで発現させ、免疫染色で確認した。その結果、野生型 Sparc11 は小胞様のシグナルが数多く観察されたが、変異型 Sparc11 では主として核近傍に蓄積しているものが多く観察された。このことから、EF hand を欠損した Sparc11 は小胞体やゴルジ体に蓄積してしまい、正常な分泌が行われなくなるのではないかと考えた。最後に、USP15KO マウス脳で Sparc11 が蓄積しているか観察したところ、USP15 が発現している大脳皮質第 5 層の神経細胞で Sparc11 の蓄積が野生型と比べ優位に増加していた。このことから、USP15 が存在しないと、Sparc11 の変異体が産生され、これが核内への蓄積につながることを示唆された。

4. 考察

本研究課題では、USP15 が光刺激依存的に視覚野での神経細胞の核内に蓄積すること、さらに USP15 の下流で調節される新しいスプライシング標的因子として Sparc11 を見出した (右図)。また本課題で見出した Sparc11 変異体は、正常な構造を取れず小胞体の中で蓄積し、神経細胞に何らかのストレスを与えてしまう可能性が考えられた。USP15 による RNA スプライシング制御は核内で機能していることから、



新生児期における環境刺激が USP15 の核内蓄積を引き起こし、その結果、RNA スプライシング調節に変化が生じることが考えられた。またこの機構に異常が生じると、Sparc11 をはじめとする様々な遺伝子のスプライシングエラーが起こり、結果として小胞体やゴルジ体に様々なタンパク質が蓄積してしまうことが推測できた。USP15 や Sparc11 は発達障害の責任遺伝子としても知られていることから、本研究課題で見出した現象は、環境刺激による時期特異的な RNA スプライシング制御がどのようにして調節されているのか、新しいメカニズムを提唱するものであると考えている。

5. 参考文献

1. <https://www.proteinatlas.org/humanproteome/tissue/brain>
2. Variation in alternative splicing across human tissues. Yeo G, Holste D, Kreiman G, Burge CB. *Genome Biol.* 2004 5(10):R74.
3. The Prp19 complex and the Usp4Sart3 deubiquitinating enzyme control reversible ubiquitination at the spliceosome. Song EJ, Werner SL, Neubauer J, Stegmeier F, Aspden J, Rio D, Harper JW, Elledge SJ, Kirschner MW, Rape M. *Genes Dev.* 2010 24(13):1434-47.
4. Astrocytes Assemble Thalamocortical Synapses by Bridging NRX1 α and NL1 via Hevin. Singh SK, Stogsdill JA, Pulimood NS, Dingsdale H, Kim YH, Pilaz LJ, Kim IH, Manhaes AC, Rodrigues WS Jr, Pamukcu A, Enustun E, Ertuz Z, Scheiffele P, Soderling SH, Silver DL, Ji RR, Medina AE, Eroglu C. *Cell.* 2016 164(1-2):183-196.
5. Astrocytes refine cortical connectivity at dendritic spines. Risher WC, Patel S, Kim IH, Uezu A, Bhagat S, Wilton DK, Pilaz LJ, Singh Alvarado J, Calhan OY, Silver DL, Stevens B, Calakos N, Soderling SH, Eroglu C. *Elife.* 2014 17:3.
6. SCI/hevin. An extracellular calcium-modulated protein that binds collagen I. Hambrock HO, Nitsche DP, Hansen U, Bruckner P, Paulsson M, Maurer P, Hartmann U. *J Biol Chem.* 2003 278(13):11351-8.