

The molecular mechanism of the alternative splicing regulation of the actin-binding scaffold proteins in neural development and circuit formation

北川宏信
Kitagawa, H.

脳神経系の発達において、選択的スプライシングは複雑かつ緻密な神経回路のネットワーク形成に不可欠であり、組織・細胞や発達時期によって厳密にコントロールされている。このスプライシング機構の破綻は様々な脳発達異常や神経疾患の発症に関与しているため、その制御メカニズムを解明することは重要な課題である。神経系で選択的スプライシングが盛んなタンパク質であるイオンチャネルや細胞接着分子に関して数多くの研究が蓄積されているが、神経細胞の形態形成を直接担う細胞骨格制御分子に関する研究については萌芽的段階である。アクチン足場蛋白質 *afadin* は選択的スプライシング制御により、長いバリエント (*l-afadin*) と短いバリエント (*s-afadin*) を生成し、神経細胞の軸索分岐に対してそれぞれ正と負の制御をすることが明らかにされている。発現パターンに着目すると、*l-afadin* は組織広範に発現している一方で、*s-afadin* は脳・神経細胞特異的に発現している。また、大脳皮質の培養神経細胞において、*l-afadin* は培養初期から普遍的に発現しているが、*s-afadin* は培養3日目から発現がみられることを見出している。このように、*s-afadin* は組織特異的かつ発達時期特異的な発現を示すが、この時空間的な発現パターンがどのように制御されるのか、また神経回路の形成に果たす役割は不明である。そこで、我々は *s-afadin* の発現及びスプライシング制御に関連する因子と制御メカニズムを解明し、神経発達や回路形成における機能的意義を解明する目的に研究を進めている。

平成30年度の研究では、大脳皮質神経細胞の初代分散培養系をモデルとし、神経損傷後の修復過程における *l-/s-afadin* の発現パターンを解析した。その結果、*l-/s-afadin* の発現はともに、神経損傷に伴う軸索切断が起こると一旦発現がリセットされ、その後の修復過程で、正常な神経発達過程とは異なる時期特異的な発現パターン（発現量・タイミング）を示した。これは、中枢神経系における神経損傷後の神経回路が部分的にしか修復できないことの要因の一つである可能性が考えられ、完全修復のためには、軸索形態を制御する *l-/s-afadin* の発現バランス・タイミングを制御する必要があることを示唆している。さらに、神経細胞間の細胞間接着を物理的に亢進させると *s-afadin* の発現が早期に誘導されたことから、細胞間接着という神経修復のための新たなメカニズムが提唱された。最後に、*s-afadin* の選択的スプライシング制御因子を探索するために、RNA結合タンパク質に焦点を当て、*in silico* スクリーニングと RT-PCR の詳細な解析から候補遺伝子を10個に絞り込むことができた。今後は、これらの発現ベクターを Neuro2a 細胞に遺伝子導入し、Western blot 法や RT-PCR 法で *s-afadin* の発現変化を検出することで、候補遺伝子の中から *s-afadin* の発現制御を担うキーファクターを同定し、培養神経細胞を用いて神経発達・修復過程における機能を解明していく。さらに生体マウスを用いて、*in vivo* 大脳皮質神経回路構築における候補遺伝子の役割についても調べていく。

発表論文等 List of Publications

- I-1 Daiki Ohama, Takahiko Matsuda, and Izumi Oinuma: Differential regional and subcellular localization patterns of afadin splice variants in the mouse central nervous system. *Brain Res.* 1;1692:74-86. doi: 10.1016/j.brainres.2018.05.004. (2018)
- I-2 岩田彩、松田孝彦、生沼泉：軸索分岐制御因子 afadin のアイソフォームの脳神経系での発現の時空間的差異の検証．第 64 回年度日本生化学会大会近畿支部例会一般口頭発表およびポスター発表（平成 29 年 5 月、大阪大学豊中キャンパス）
- I-3 名村有紗、松田孝彦、生沼泉：細胞骨格制御因子 afadin の神経特異的スプライスバリエントの産生機構解明の試み．第 64 回年度日本生化学会大会近畿支部例会一般口頭発表およびポスター発表（平成 29 年 5 月、大阪大学豊中キャンパス）
- I-4 大浜大揮、生沼泉：軸索形態制御因子 afadin の 2 つのアイソフォームの大脳皮質神経回路構築における生理機能の解明．第 64 回年度日本生化学会大会近畿支部例会一般口頭発表およびポスター発表（平成 29 年 5 月、大阪大学豊中キャンパス）
- I-5 生沼泉、大浜大揮：神経回路構築における afadin の選択的スプライシングバリエントの発現タイミングの制御とその意義．脳構築における発生時計と場の連携第 2 回領域会議 口頭発表およびポスター発表（平成 29 年 7 月、神戸ニチイ学館）
- I-6 名村有紗、松田孝彦、生沼泉：神経細胞の形態形成を担う afadin の選択的スプライシングを制御する因子の探索．第 57 回生命科学夏の学校 ポスター発表（平成 29 年 9 月、滋賀県白浜荘）
- I-7 大浜大揮、生沼泉：大脳皮質神経回路構築におけるアクチン足場蛋白質 afadin の 2 つのアイソフォームの発現時期と機能の検証．第 57 回生命科学夏の学校 ポスター発表（平成 29 年 9 月、滋賀県白浜荘）
- I-8 名村有紗、松田孝彦、生沼泉：アクチン足場タンパク質 afadin の 2 つのスプライスバリエントの発現差異の解析．生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 ポスター発表（平成 29 年 12 月、神戸国際展示場）
- I-9 大浜大揮、生沼泉：マウス大脳皮質 2/3 層神経細胞の発達における長短 2 つの afadin アイソフォームの機能差異．生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 ポスター発表および一般口頭発表（平成 29 年 12 月、神戸国際展示場）
- I-10 大浜大揮、生沼泉：Spatio-temporal production of alternative splicing variants of an actin-binding scaffold protein afadin is required for callosal circuit formation. *International Young Scientists Workshop on Neural Development and Stem Cells.* ポスター発表（平成 29 年 12 月、関西セミナーハウス）
- II-1 廣瀬富美子：Dephosphorylation of lamin A at the end of mitosis is regulated by SUMOylation. 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 ポスター発表（平成 29 年 12 月、神戸国際展示場）
- II-2 長栄良平、廣瀬富美子：Analysis of SUMO interacting motif in the lamin A polypeptide. *Leading Program International Symposium 2017.* ポスター発表（平成 29 年 12 月、光都 CAST）

- II-3 廣瀬富美子 : Dephosphorylation of lamin A at the end of mitosis is regulated by RepoMan/PP1. Leading program evaluation conference. ポスター発表 (平成 30 年 3 月、光都 CAST)
- II-4 河合淳史、廣瀬富美子 : Assembly of heterochromatin under the nuclear membrane is determined at the end of mitosis. Leading program evaluation conference. ポスター発表 (平成 30 年 3 月、光都 CAST)
- II-5 河合淳史、廣瀬富美子 : Assembly of heterochromatin under the nuclear membrane is determined at the end of mitosis. ポスター発表 第 41 回分子生物学会年会 (平成 30 年 11 月、パシフィコ横浜)

科学研究費補助金等

1. 科学研究費助成事業 (基盤 C) (平成 29-31 年度)
 - 研究課題 低分子量 G 蛋白質 R-Ras によるガイダンス因子シグナル統合の分子機序の解明
 - 研究代表者 生沼 泉
2. 科学研究費助成事業 (新学術領域研究) (平成 29-30 年度)
 - 研究課題 神経回路構築におけるアクチン足場蛋白質の選択的スプライシングの時空間制御機構
 - 研究代表者 生沼 泉
3. 研究助成金 公益財団法人ノバルティス科学振興財団研究奨励金 (平成 29 年度)
 - 研究課題 分化後神経細胞への直接的遺伝子治療法確立のための基盤技術開発
 - 研究代表者 生沼 泉
4. 研究助成金 兵庫県立大学特別研究助成金 若手研究者研究支援 (平成 29 年度)
 - 研究課題 神経伸長因子の人為的賦活化による中枢神経繊維再生への挑戦
 - 研究代表者 生沼 泉
5. 研究助成金 公益財団法人 ひょうご科学技術協会学術研究助成 (平成 29 年度)
 - 研究課題 神経再生医療基盤技術としての、分化後神経細胞での遺伝子置換技術の確立
 - 研究代表者 生沼 泉
6. 研究助成金 公益財団法人 武田科学振興財団薬学系研究奨励 (平成 28-29 年度)
 - 研究課題 低分子量 G 蛋白質 R-Ras によるガイダンスシグナル統合のメカニズムの解明
 - 研究代表者 生沼 泉
7. 研究助成金 公益財団法人 双葉電子記念財団自然科学研究助成 (平成 29 年度)
 - 研究課題 分化後神経細胞への直接的遺伝子治療法確立のための基盤技術開発
 - 研究代表者 生沼 泉 G.L Snider

8. 研究助成金 公益財団法人 加藤記念バイオサイエンス振興財団研究助成（平成 29-30 年度）
研究課題 分化後神経細胞における遺伝子置換技術の開発
研究代表者 生沼 泉
9. 科学研究費助成事業（基盤 C）（平成 27-29 年度）
研究課題 分裂期染色体上に存在する lamin A 相互作用因子の同定
研究代表者 廣瀬 富美子
10. 科学研究費助成事業（基盤 C）（平成 30-32 年度）
研究課題 G1 期における核ラミナとヘテロクロマチンの相互作用の解析
研究代表者 廣瀬 富美子
11. 研究助成金 公益財団法人 日本科学協会 笹川科学研究助成（平成 30 年度）
研究課題 哺乳類中枢神経回路の配線原理に基づいた損傷脳領域の機能的回復への挑戦
研究代表者 北川 宏信
12. 研究助成金 兵庫県立大学特別研究助成金 若手研究者研究支援（平成 30 年度）
研究課題 損傷脳機能の革新的な治療戦略につながる神経回路配線の時空間制御メカニズムの解明
研究代表者 北川 宏信
13. 研究助成金 公益財団法人兵庫県立大学科学技術公園財団 教育研究助成（平成 30 年度）
研究課題 中枢神経回路の配線構築における時空間制御メカニズムに基づいた損傷脳機能の画期的回復法の開発
研究代表者 北川 宏信