

# 神経ネットワークと可塑性を支配するダイナミックな スプライシング制御—メカニズムの理解から創薬に向けて

飯島 崇利

選択的スプライシングは、神経回路構築に重要なシナプス結合の特異性や神経可塑性を築く生命情報多様性の獲得に重要な仕組みである。神経系では複数のスプライシング調節因子の発現や活性、相互作用によりさまざまな様式で時空間的にスプライシングが制御されており、生命情報の多様性獲得に寄与している。本稿ではこの時空間的な選択的スプライシングの仕組みとして、神経活動依存的制御、神経細胞タイプ特異的制御、および3'末端側RNAプロセッシング制御の三つのスプライシング調節を挙げ、特にこれを制御するキーファクターとなるスプライシング調節因子の最近の知見を中心に紹介する。また、本稿ではこのようなスプライシング制御を標的とした新たな創薬アプローチについても考えていきたい。

## 1. はじめに

通常の成人の脳は、約1000億個に及ぶ神経細胞からなるといわれる。脳の機能的ネットワーク構築の鍵は、解剖学的に素子の単位であるシナプスの形成と機能維持にある。神経ネットワーク形成は複雑だが、発達過程で非常に精密な配線がなされる。この配線に必須な要素は、一つは脳発達期にそれぞれの神経細胞が決められたパートナーを探し当てて特異的回路を形成する「特異性」であり、もう一つは神経活動の強弱によって情報伝達効率を調節する「可塑性」の二つに集約される。これらは神経系における高度な遺伝的プログラムと特異的な発現制御によって支配されると考えられるが、2000年前後のヒトゲノムプロジェクトの結果から、タンパク質をコードする我々ヒ

トの遺伝子数が3万個にも満たないレベルであることがわかり、当初10万個以上と考えられていた予想を大幅に下回った。このような限られた遺伝子数でどのように神経ネットワークがプログラムされているのか、すなわち神経細胞の新生から細胞移動、軸索ガイダンス、シナプス形成に至るまでの発達過程のさまざまなステップがいかにして正確に遺伝的にプログラムされているのか、また、生涯イベントである学習や経験がどのように遺伝的プログラムを変革させ、神経ネットワークの変化を誘導していくのであろうか？近年のハイスループット解析やシングルセル技術の進歩により、神経細胞の複雑な遺伝プログラムが詳細にプロファイルされ、年々確実に理解が深まりつつあるが、いまだに多くのブラックボックスが残されている。

これまで著者は複雑かつ精密な神経回路構築に重要な神経細胞の多様性、シナプス結合の特異性や神経可塑性を築くトランスクリプトームレベルの分子基盤として本特集のテーマである「選択的スプライシング機能」に注目してきた。神経系では複数のスプライシング調節因子の発現や活性、相互作用によりさまざまな様式で時空間的にスプライシングが制御されており、生命情報の多様性獲得に寄与している。本稿ではこの時空間的な選択的スプライシングの仕組みとして、神経活動依存的制御、神経細胞タイプ特異的制御、および3'末端側RNAプロセッシング制御の三つのスプライシング調節について、特にこれを制御するキーファクターとなるスプライシング調節因子の最近の知見を

東海大学医学部医学科基礎医学系分子生命科学領域脳神経医学分野（〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋143）

**Neuronal alternative splicing: A regulatory mechanism underlying brain network and plasticity**

**Takatoshi Iijima** (Department of Molecular Life Science, Division of Basic Medical Science and Molecular Medicine, School of Medicine, Tokai University, 143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940852

© 2022 公益社団法人日本生化学会

中心に紹介する。また、本稿の最後ではこのようなスプライシング制御を標的とした新たな創薬アプローチについても考えていきたい。

## 2. 神経活動依存的な選択的スプライシング制御

神経細胞では脳の活動変化に応じてダイナミックにスプライシングパターンが変化する。NMDA受容体やL型Ca<sup>2+</sup>チャネルからのCa<sup>2+</sup>流入によって、シナプスタンパク質をコードする複数のpre-mRNAの選択的スプライシング変化が起こることが発見され<sup>1,2)</sup>、これが成熟脳でのシナプス機能に重要な役割を果たしていることが古くより示唆されてきた<sup>3)</sup>。この神経活動に依存した選択的スプライシングの分子メカニズムや機能が近年ようやく具体的に理解されつつある。そこで、著者らの研究を中心としてこれまで報告された三つの制御機構について述べたい。

### 1) CaRREおよびUAGG配列に依存的な選択的スプライシング制御と適応的な神経可塑性の調節

選択的スプライシングを受けるエクソン部位と近傍のイントロン内にはスプライシングに関わるリプレッサーやエンハンサー配列が複数存在するが、これまで神経活動依存的に働くものとして、Ca<sup>2+</sup>-カルモジュリンキナーゼIV (CaMKIV) 経路の制御下で作用するシスRNA配列が発見されてきた。Blackらはこのようなエレメントとして大コンダクタンスカルシウム活性化カリウムチャネル (BKチャネル) においてCa<sup>2+</sup>感受性ドメインをコードするstress-axis regulated (STREX) エクソンの近傍のイントロン部位などから2種類のCaRRE配列 (CaMKIV-responsive RNA element) を同定した<sup>4)</sup>。またこれとは別に、GrabowskiらはNMDA型グルタミン酸受容体GluN1 (NR1) においてシナプス膜移行エレメントをコードするCIエクソン

部位からCa<sup>2+</sup>依存的な選択的スプライシングのサイレンサー配列としてUAGG配列を同定した<sup>5)</sup>。これらの配列をスプライシングレポーターへ導入するとCaMKIV依存的なスプライシング変化が誘導されること、またCa<sup>2+</sup>依存的にスプライシング変化が引き起こされることが知られるGABA受容体、synGAP, SNAP25などをコードするいくつかのpre-mRNAのスプライシング部位にもこの配列がみられたことから、CaRREおよびUAGG配列はCaMKIV依存的なスプライシングにおけるコンセンサス配列であることが強く示唆された<sup>3)</sup>。

CaMKIVがどのようにCaRRE配列やUAGG配列に作用してスプライシングを制御するのだろうか？ これらのシス配列に結合するトランス側のRNA結合タンパク質群の解析が行われ、CaRRE配列に結合し脱分極に依存したSTREXエクソンのスキッピングに関わる分子としてhnRNPLが同定されている<sup>6,7)</sup> (図1)。

このような神経活動によるスプライシングアイソフォーム変化が神経機能にどのような影響を及ぼすのだろうか？ これまでの発見をまとめると、その多くが神経細胞の適応的变化として起こる傾向が強い。BKチャネルはSTREXエクソンの挿入によってCa<sup>2+</sup>感受性が亢進されることから、脱分極後に起こる細胞内へのK<sup>+</sup>の再取り込みによる過分極過程に重要な役割を果たす<sup>2)</sup>。またNR1のCIエクソンの挿入は培養大脳皮質細胞を用いた実験においてシナプス膜表面へのNMDA受容体の移行を促進することが示されている<sup>8)</sup>。これらのことから、BKチャネルとNR1における神経活動依存的なスプライシングアイソフォームの変化は脳の適応的变化として起こるシナプス活動の最適化 (ホメオスタティックな可塑的变化) に寄与すると考えられた<sup>1,3,9)</sup>。

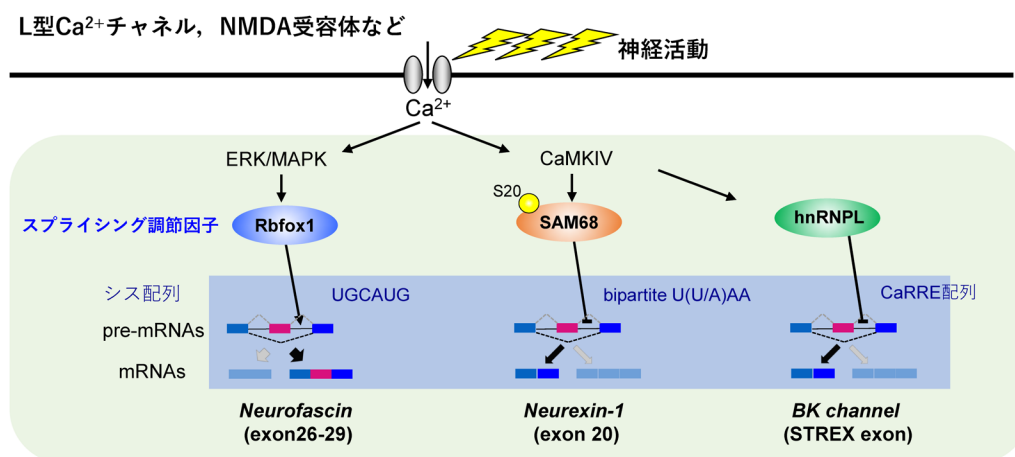
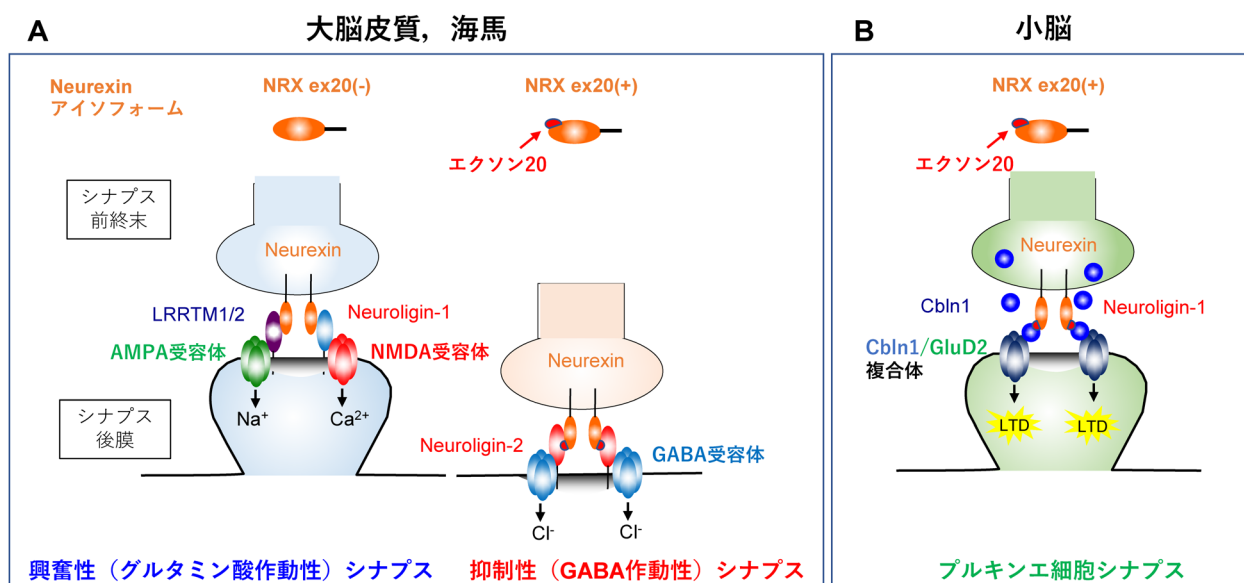


図1 神経活動依存的な選択的スプライシング調節因子と標的RNA

L型Ca<sup>2+</sup>チャネルやNMDA受容体からのCa<sup>2+</sup>流入により、CaMKIV経路あるいはERK/MAPK経路の二経路を介して複数のスプライシング調節因子が活性化される。hnRNPL, hnRNPA1, SAM68などはCaMKIV経路を介して活性化され、これらに対してRbfox1はERK/MAPK経路によって活性化される。このように、これらのスプライシング調節因子はその標的RNA配列を持つ特定のpre-mRNA群の選択的スプライシングを神経活動依存的に制御する。



**図2** 各脳領域における Neurexin ファミリーのスプライシングアイソフォーム依存的なシナプス構築  
 (A) Neurexin タンパク質 (NRX) の exon20 の有無は受容体との相互作用を決定する。大脳皮質の興奮性ニューロンにおいては exon20 がスキップされたアイソフォームを発現し、LRRTM や Neuroligin-1 といった受容体との相互作用を介して NMDA 受容体や AMPA 受容体などのグルタミン酸受容体を集積させ、興奮性シナプスの構築に関わる。これに対して抑制性ニューロンでは exon20 が挿入されたアイソフォームを発現して Neuroligin-2 との相互作用を介して GABA 受容体を集積させ抑制性シナプスを構築し、興奮性と抑制性のシナプス伝達制御 (E/I バランス) の仕組みの基盤となっている。(B) 小脳では、NRX は exon20 が挿入されたアイソフォームが Cbln1/GluD2 複合体と結合してプルキンエ細胞シナプスを形成する。また小脳学習の基本的メカニズムである長期抑圧 (LTD) の誘導に寄与する。

## 2) SAM68 によるシナプスオーガナイザーの選択的スプライシング制御とシナプス伝達調節

しかしながら、上記の CaRRE や UAGG 配列は  $\text{Ca}^{2+}$ -CaMKIV 経路に依存的に選択的スプライシングを受ける pre-mRNA の一部にしかみられない。このことから、CaRRE や UAGG 配列依存的な制御とは独立した他の未知のメカニズムが複数存在することが推定された。その後、著者らは上記のメカニズムとは異なる新しい CaMKIV 依存的制御として、シナプス誘導因子である Neurexin 遺伝子 (*Nrxn*) の選択的スプライシングのメカニズムを同定した。著者らは、この *Nrxn* の exon20 が高カリウム処理による脱分極刺激でスキップされることを明らかにし、その選択的スプライシングを制御する分子として SAM68 を同定した<sup>10)</sup> (図1)。SAM68 は神経活動によって細胞内局在および発現量は変化しておらず、その代わり神経活動依存下で CaMKIV によりリン酸化されていた。このことから、神経活動によって CaMK を介して SAM68 が活性化され選択的スプライシングの変化を誘導していることが示された。

Neurexin タンパク質 (NRX) はシナプス前終末に局在し、シナプス後膜上の受容体との相互作用を介してシナプス形成を誘導する。受容体には Neuroligin ファミリー、LRRTM ファミリー、Cbln1-GluD2 複合体などこれまで多くの受容体が同定されており、どの受容体に強く結合するかを選択性、親和性は 90 bp の exon20 の挿入の有無で決定される<sup>11, 12)</sup>。重要なことに、この exon20 が挿入されるかスキップされるかは神経細胞タイプで厳密に決まっている

(詳細は3-1) 項で後述)。興奮性ニューロンでは exon20 がスキップされた NRX exon20(-)、抑制性ニューロンではこれが挿入された NRX exon20(+) となっており、興奮性と抑制性のシナプス特性を大きく分ける非常に重要な仕組みとなっている (図2A)。

神経活動依存的な *Nrxn* のスプライシング変化は、そのような受容体結合をダイナミックにスイッチさせ、シナプスの形態的および機能的変化を引き起こすと考えられる。実際に、抑制性ニューロンと同じく NRX exon20(+) を発現する小脳顆粒細胞では、脱分極刺激によって NRX に依存したシナプス形成に変化を引き起こすことを明らかにした<sup>10)</sup>。小脳において、NRX は Cbln1 と GluD2 と呼ばれる受容体との相互作用を介してプルキンエ細胞とのシナプス形成を果たす<sup>13-15)</sup> (図2B)。また、Cbln1 と GluD2 は成熟した平行線維-プルキンエ細胞間シナプスに起こる長期抑圧 (LTD) と呼ばれるシナプスの可塑的变化に必須な分子であり、顆粒細胞での神経活動依存的な *Nrxn* のスプライシングアイソフォーム変化により引き起こされる GluD2 から他の受容体へのスイッチングは小脳皮質の機能的シナプス数を負に制御し、やはり上記の BK チャネルなどと同様にホメオスタティックな可塑性の制御に寄与している可能性が考えられる<sup>16)</sup>。

## 3) Rbfox1 による軸索構成分子の選択的スプライシング制御と神経発火の調節

さらに近年、著者らは SAM68 の次に中枢神経系で活



動依存的に働く新規のスプライシング調節因子として Rbfox1 を同定した<sup>17)</sup>。Rbfox1 によるスプライシング変化も  $\text{Ca}^{2+}$  流入によって誘導されるが、これまで発見された上記のスプライシング制御はすべて CaMK 経路を介していたのに対し、Rbfox1 の場合は ERK-MAPK 経路を介しており、活動依存的スプライシング制御の複雑さや多様性が示された (図1)。

興味深いことに、Rbfox1 の主な標的スプライシング基質は、軸索構成分子をコードする pre-mRNA 群にエンリッチする傾向が強い<sup>18)</sup>。神経細胞は樹状突起上の多数のシナプスからの入力を受けるのに対し、出力は1本の軸索のみである。その根元に位置する軸索起始部 (axon initial segment: AIS) は活動電位を発生させる唯一の情報出力部位であり、軸索ではここに多くの機能的タンパク質が密に集積する。実際に Rbfox1 のノックアウトマウスでは神経発火に異常を持つことから<sup>19)</sup>、Rbfox1 のスプライシング活動が AIS 機能に強く関わる事が推測されてきた。

AIS は長年にわたり固定的インフラ構造と思われてきたが、近年では経験や加齢、病態によって可塑的に変化する (AIS 可塑性) ことが知られ<sup>20, 21)</sup>、最近著者らは AIS の可塑的变化の過程で、Rbfox1 が主要な AIS 構成分子である接着因子 Neurofascin の選択的スプライシングを行っていることを発見した<sup>17)</sup>。上記のように、Rbfox1 は複数の AIS 構成分子の選択的スプライシングに関わっていることから、Neurofascin だけでなく AIS 可塑性の過程で多くのスプライシング変化をもたらしっていると予想された<sup>16)</sup>。実にごく最近、著者らは Rbfox1 が AIS 可塑性において特定 AIS 構成分子の微小エクソンのスプライシング変化を強く引き起こすことを発見しており (Suzuki ら未発表データ、投稿準備中)、この詳細な仕組みについて現在解析を進めている。AIS 可塑性もまた適応的な変化と考えられており、AIS が環境に応じて柔軟に変化することで脳機能を積極的に調節すると予想される。しかしながら、脳の適応的な回路再編についてはまだ多くのことが知られておらず、このような分子基盤の解明が適応脳の理解に大きな貢献をもたらすかもしれない。

### 3. 細胞タイプ特異的な制御

脳組織の神経ネットワークは多くの神経細胞タイプによって構成される。神経細胞はそのサブクラスごとにユニークな形態的・機能的特性を呈するが、神経細胞タイプに特異的なスプライシングによる生命情報の多様化は、個々のタイプの神経機能をさらに複雑化させる。神経細胞タイプに特異的なスプライシングプログラムは、複数のスプライシング調節因子がそれぞれ特徴的な時空間的発現パターンをとり、また一部では相互作用しあうことにより創出される。

#### 1) シナプスオーガナイザーの細胞タイプ特異的なスプライシング制御による興奮性/抑制性シナプス特性の区分化

これまで著者らは、脳組織で特徴的な発現パターンを示す興味深いスプライシング調節因子として SLM1 と SLM2 (Sam-like molecule1, 2) を同定してきた<sup>22)</sup>。SLM1 と SLM2 は、SAM68 と同じ KH 型 RNA 結合ドメインを持つ STAR ファミリータンパク質に属する<sup>23)</sup> (図3A)。しかし、非常に高いアミノ酸配列の相同性にもかかわらず、標的とするスプライシング基質や活性には大きな違いがあることがわかってきた<sup>22, 24, 25)</sup>。Neurexin は SAM68, SLM1, SLM2 に共通したスプライシング基質であり、いずれも exon20 近傍のイントロン領域にある AU リッチ領域に結合し exon20 のスキッピングを誘導する<sup>10)</sup> (図3B)。しかし前節で述べたように、SAM68 は神経活動亢進時以外の定常状態ではほとんど *Nrxn* に対するスプライシング活性はなく、通常は SLM2 がドミナントに支配していることがわかった<sup>26, 27)</sup> (図3C)。しかも、SLM2 は Neurexin 以外にはスプライシング基質をほとんど持たないという非常にユニークな特性を持っていた<sup>24)</sup>。前節で、興奮性ニューロンでは exon20 のスキップされた NRX exon20(-)、抑制性ニューロンでは挿入された NRX exon20(+) がドミナントに発現しており、興奮性と抑制性のシナプス特性を分ける仕組みであることを述べたが (図2A)、このニューロンタイプにおける NRX のスプライシングパターンの違いは、SLM2 の脳組織における特異的な発現パターンによってほぼ築かれる。実に、SLM2 は海馬や大脳皮質では興奮性ニューロンで選択的に発現し、抑制性ニューロンタイプではほとんど発現していない<sup>28)</sup> (図3C)。この SLM2 の特異的な発現パターンと強いスプライシング活性が、*Nrxn* exon20 のスキッピングを介して興奮性と抑制性のシナプス特性を区分する仕組みの分子基盤になっていたのである。

#### 2) 抑制性ニューロンサブタイプ間におけるスプライシングプログラムの多様性

抑制性ニューロンタイプはニューロン全体の20%程度であるが、興奮性ニューロンタイプよりも形態、機能ともはるかに多様性に富んでいる。SLM2 は抑制性ニューロンタイプではほとんど発現していないものの、発生後期に誕生するごく一部の抑制性ニューロンのサブタイプでは強く発現していることがわかり、最近著者らはこの細胞集団によって「興奮性によく似たシナプス特性を持つ抑制性シナプス」が作られていることを発見した<sup>29)</sup>。このように、SLM2 の非常に複雑な発現パターンによって、抑制性ニューロンタイプ間でもさらなる多様化が起こっている。また、前述の Rbfox1 においても、他のニューロン群に比べ発生前期に誕生する抑制性ニューロンサブタイプで有意に高い発現をしており、このようなスプライシング調節因子群の特徴的な発現形式が、抑制性ニューロンサブタイプ間のシナプス特性の違いを築いていることが明らかにされて

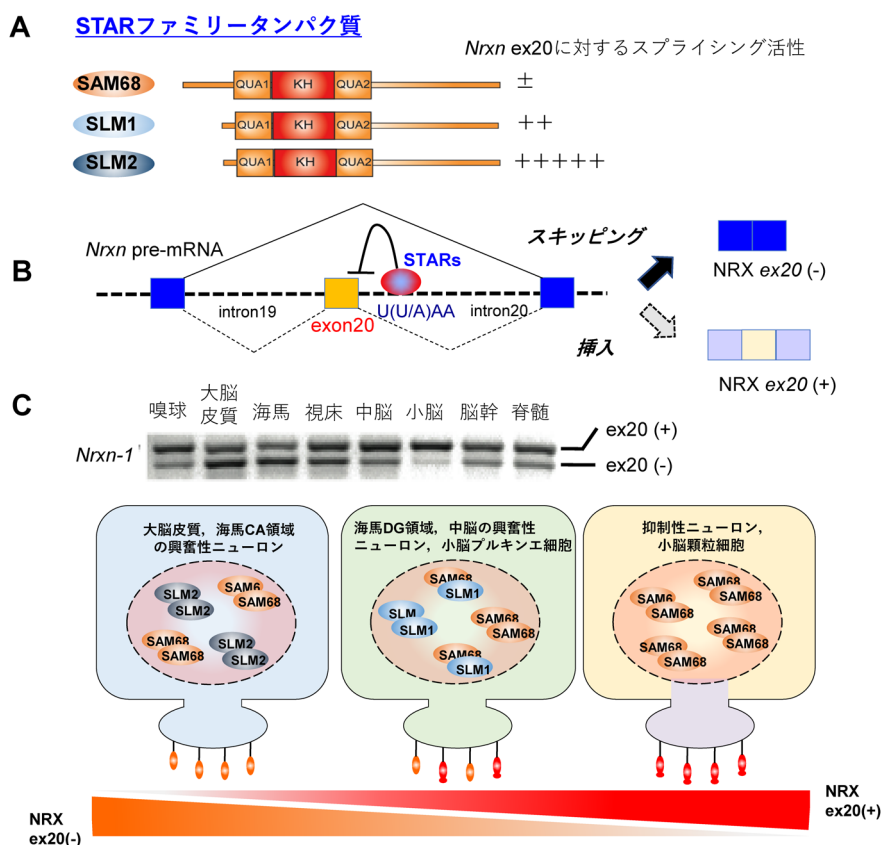


図3 STARファミリー (SAM68, SLM1, SLM2) による Neurexin 遺伝子 (*Nrxn*) exon20 の空間的な選択的スプライシング制御

(A) STARファミリータンパク質の一次構造。これらはKH型RNA結合ドメインを共通に持つ。互いに高い相同性を有するが、Neurexin exon20に対するスプライシング活性は大きく異なる。SAM68は通常ほとんど活性を持たないのに対し、SLM2は強い活性を持ち、Neurexinアイソフォームの割合を独占的に規定している。(B) STARファミリーによるexon20のスプライシング制御の仕組み。いずれもexon20近傍のイントロン領域にあるAUリッチ領域に結合し、exon20のスキッピングを誘導する。(C) STARファミリーの発現レベルとパターンによる組織領域および神経細胞タイプに特異的なNeurexin exon20のスプライシング制御。SAM68は広汎に発現するのに対し、SLM1とSLM2はそれぞれ細胞タイプに特異的な発現を示す。スプライシング活性の高いSLM2の発現が*Nrxn*のアイソフォームの割合をほぼ決定する。実際にSLM2の発現が高い前脳領域ではNRX exon20(-)がドミナントとなり、一方でSLM2がほとんど発現しない小脳などの後脳域ではこのアイソフォームはほとんど存在しない。

きた<sup>30)</sup>。このように、細胞タイプ特異的なスプライシング選択は、神経細胞タイプの特性をさらに多様化させ個々の細胞集団の形態的・機能的アイデンティティの構成に非常に重要な働きをしており、それらの神経細胞にユニークなシナプス特性など、微細な構造や機能のレベルの多様性に寄与していることが解明されつつある。実際に、神経細胞タイプ間でのトランスクリプトーム比較から、エクソンレベルでの明確な違いが示され<sup>31, 32)</sup>、シングルセル技術のさらなる高解像度化に伴い、今後スプライシングプログラムに基づいた神経細胞サブクラスごとの詳細な分類も可能になるだろう。

#### 4. 3'末端側RNAプロセッシング制御

##### 1) 時空間的なALE選択プログラム

上記でふれた*Nrxn*のexon20などはカセット型エクソンであり、タンパク質の一部の機能ドメインに変化をもたら

すケースである。しかしながら、mRNAの多様性はこのような選択的スプライシングだけでなく、本来除去されるはずのイントロン配列の一部がエクソンとして挿入され、その配列の3'末端側がそのままポリA化されることによって生み出されるケースもある。つまり完全長のmRNAがでずにスプライシングが途中終結し3'末端側が短縮したアイソフォームができる。

スプライシング異常によって出現することもあるが、実に多くの遺伝子に途中終結したmRNAアイソフォームがある割合で生理的に存在し、単一遺伝子から3'末端側の長さの異なる複数の機能的なmRNAアイソフォームが生じている。このような3'末端側が短縮し安定して生み出される遺伝子産物を、本稿ではALE (alternative last exon) アイソフォームと呼ぶことにする。mRNAが3'末端側で極端に短くなった場合、タンパク質レベルではC末端側の欠けたアイソフォームができる。C末端部の欠失は機能喪失を招くことがあるが、遺伝子によっては、短いALEアイソ

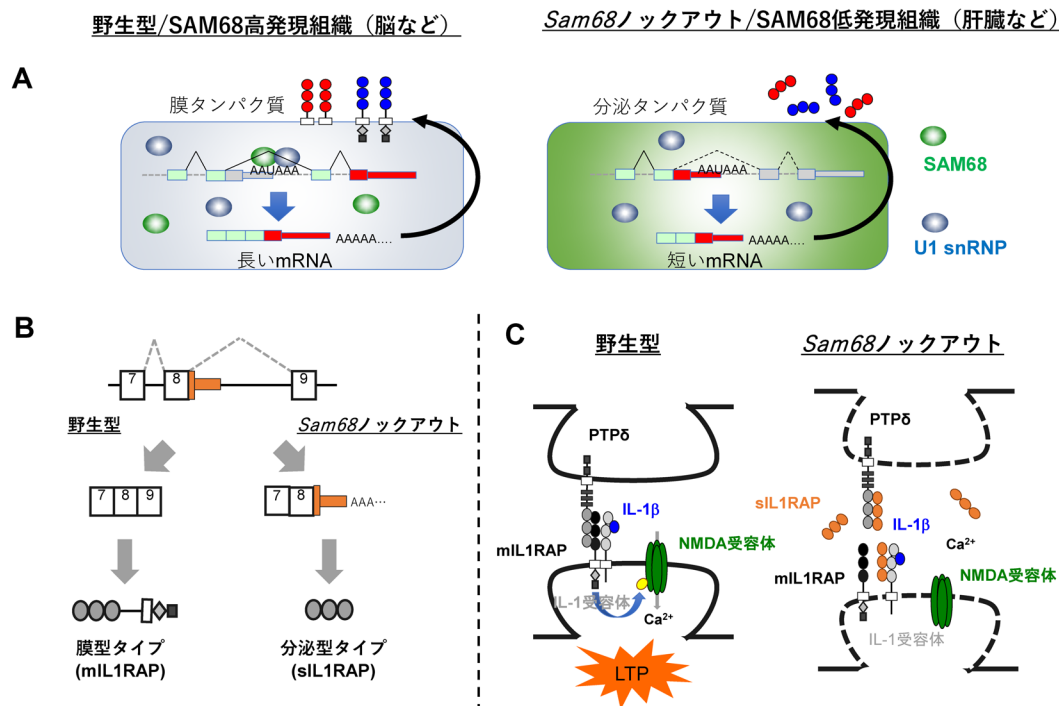
フォームが特殊な機能を持つものもあり、時にはドミナントネガティブな性質を持つアイソフォームを導くこともある(後述)。重要なことに、このようなALE選択と機能は組織臓器によって異なる。このことから、ALE選択は各組織領域において明確な生物学的意義を持ち、それぞれで異なるユニークな制御によって時空間的にプログラムされていると考えられる<sup>33)</sup>。

## 2) U1 snRNPによる異常ALE制御の防止機能

また、がんのような病態時に異常なALEアイソフォーム出現が起こるという報告があり<sup>34)</sup>、これは生理的ALE制御の破綻が病態と密接な関係を持つことを意味している。しかし、異常なイントロン切断とポリA化については、生体内にこれを防ぐ普遍的な仕組みが備わっている。スプライソソームであるU1 snRNPはそのファクターである。U1 snRNPは、スプライシングのイントロン除去における最初の段階である5'スプライス部位へのスプライソソームの集積に関わる普遍的機能が知られるが、5'スプライス部位だけでなくイントロンのあらゆる箇所に結合してイントロンの異常な中途切断とポリA化を防ぎ、トランスクリプトームレベルでの品質管理を行っている<sup>35)</sup>。

## 3) SAM68の組織特異的なALE選択によるシナプス形成と可塑性の制御

では、ALE選択の生理的意義は何か？ 組織領域でどのようなALE選択が行われているのだろうか？ 最近著者らは、組織特異的なALEの空間的プログラムの仕組みを明らかにしてきた。前述のSAM68が神経活動依存的なファクターであることに加え、神経系のALE制御のファクターであることを見だし、組織特異的なALE制御の新しいメカニズムを解明した<sup>25)</sup>。まず神経系でのSAM68のスプライシング基質を網羅的にスクリーニングしたところ、3'非翻訳領域(3'UTR)をコードするエクソンが多く変動していることが観察された。ALEの大部分のパートはストップコドンの後に続く3'UTRである。詳しく調べていくと、*Sam68*ノックアウトマウス脳ではALE選択が変化しmRNAの3'末端側が短いアイソフォームが多く出現することがわかった。この異常は膜タンパク質をコードするmRNAによくみられ、この場合短縮化によってC末端の膜貫通ドメインが欠如し、膜タンパク質が分泌型タンパク質に変化しているケースが複数みられた(図4A)。この中で興味深いものとして、著者らは膜型シナプス接着因子IL-1 accessory protein (IL1RAP)でのALE異常にフォーカスした。*Sam68*欠損マウス脳ではIL1RAPの異常なALE選



**図4** *Sam68*ノックアウトマウスにおける神経系ALE選択の異常とIL1RAP依存的なシナプス機能の障害  
(A) *Sam68*ノックアウトマウス脳において、膜タンパク質をコードするmRNAのALE選択が変化し、本来膜貫通タンパク質であるものが分泌型に変換される異常が起こる。SAM68はcrypticなポリA部位に結合しており、U1 snRNPとの協調作用により、スプライシングの途中終結によってmRNAの3'末端側で短縮される異常を防止している。一方で、SAM68を発現しない肝臓などの組織ではIL1RAPは分泌型が生理的に存在しており、臓器間でのALEアイソフォームの機能的な違いが示唆される。(B) *Sam68*ノックアウトマウス脳におけるIL1RAP mRNAのALE選択の異常を示す。exon8下流のイントロン部位の一部が取り込まれ、そこがポリA化されて途中終結が起こり、膜貫通ドメインが欠如して分泌されてしまう。(C) ALEアイソフォームの変化によるシナプス機能障害。上記のALE選択異常によりアイソフォーム変化が起き、神経系膜タンパク質としてのIL1RAPの二つの機能(PTPδを介した興奮性シナプス形成およびIL-1依存的なNMDA受容体を介した可塑的Ca<sup>2+</sup>流入)が障害される。



損によってmRNAが短縮し、神経系では本来膜タンパク質であるはずのIL1RAPがC末端部の欠如によって非典型的な分泌型アイソフォームに変わっていた(図4B)。この変化は膜型IL1RAPタンパク質の減少を引き起こすのに加えて、出現した分泌型IL1RAPが残りの膜タンパク質と競合し、ドミナントネガティブ効果を持ってシナプス機能が障害されることを明らかにした(図4C)。

ところで、SAM68非発現組織においてIL1RAPのALE選択はどのようになっているのであろうか？ SAM68の発現は組織特異的であり脳や精巣では強い発現が認められるのに対し、肝臓などではみられない。肝臓におけるIL1RAPのALEアイソフォームについて調べたところ、肝臓ではほとんどが分泌型であり、SAM68非発現組織ではこの分泌型が生理的アイソフォームとして存在していた。このことから、SAM68が臓器特異的なALE制御のファクターとして機能し、各臓器でそれぞれのALEアイソフォームが異なった機能を持って働くことも示唆された(図4A)。

著者らの発見と同時期に、SAM68によるALE制御の詳しい分子メカニズムも調べられており、SAM68がイントロン上のポリA付加部位近傍に結合し、上記で述べたスプライソームU1 snRNPと協調作用によってmRNAの短縮化を防いでいることが報告された<sup>36)</sup>(図4A)。しかしながら、ALE選択の時空間的な調節の詳しいメカニズムはようやく解明され始めたばかりであり、トランスクリプトームの多様性のメカニズム研究の中で、今後多くの進展がみられそうな領域である。

## 5. おわりに—神経系スプライシング制御を標的とした創薬の可能性

スプライシングを標的とした近年の創薬開発には目覚ましいものがある。特にアンチセンス核酸(ASO)であるスピラザなどは難病である脊髄性筋萎縮症(SMA)の発症防止に著しい効果をあげた。このような有効性から、スプライシング調節により脳活動を有効的かつ長期的にコントロールし、発達障害・精神疾患の治療につなげていくことなども将来的に可能かもしれない。

脳の恒常的維持は、興奮性と抑制性ニューロンの活動バランス(E/Iバランス)が重要な要素であり、このバランスの乱れは発達障害・精神疾患に共通した病態である。てんかんはもちろんのこと、統合失調症、躁うつ病、自閉症では興奮性優位となり、その原因はシナプス伝達の過剰な亢進もしくは抑制性機能の低下にある。神経・精神疾患や睡眠障害などでE/Iバランスを整えるために用いる現在の手段は、イオンチャネルやモノアミントランスポーター、GPCRなどの拮抗薬や作動薬による神経伝達調節である。しかし、将来的にシナプスを構造から変えるような手段が確立されれば、E/Iバランスの長期的改善が期待できる。そういった点から、本稿であげた中枢神経系の普遍的シナ

プスオーガナイザー Neurexinのスプライシング調節は非常に興味深い。Neurexinは興奮性シナプスではグルタミン酸受容体、抑制性シナプスではGABA受容体のシナプス集積を適切に制御することによって、興奮性、抑制性シナプスの機能的仕分けを行う(図2A)。Neurexinの重要性は遺伝子変異や多型が複数の精神疾患・発達障害と関連することからも明らかである。前述のように、この仕分けはNeurexin遺伝子のわずか1か所の選択的スプライシング部位の制御であり、このexon20の特異的スキッピングの人工調節は、シナプスを構造から変革させ脳の活動バランスを調節する有効手段となりうるかもしれない。

スプライシング阻害による治療の有効性が認められるのはまだASOのみであるが、特異的RNP複合体をトラップしスプライシング調整を阻害するデコイRNAなどの開発も進んでいる<sup>37)</sup>。RNP複合体は通常多くの標的RNA基質を持つが、SLM2はNeurexin以外の基質をほとんど持たないユニークな因子であり<sup>24)</sup>、その特異性は創薬標的としてふさわしい。

現在のところ核酸医薬は非常に高額な医療であり、一般レベルでの浸透にはまだまだ課題が残されているが、今後もASOもしくは低分子化合物などによるスプライシング調節を標的とした治療戦略はさらなる発展を遂げ、新たな医療に築いていくに違いない。

## 謝辞

執筆にあたり、まずこのような機会をお与えいただいた富山大学の甲斐田大輔先生と吉田知之先生に感謝申し上げます。また、本研究はバーゼル大学時代から始めたもので、スプライシング研究のきっかけを与えていただいたPeter Scheiffele先生にあらためて感謝したいと思います。

## 文 献

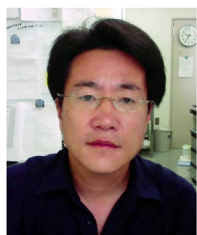
- 1) Razanau, A. & Xie, J. (2013) Emerging mechanisms and consequences of calcium regulation of alternative splicing in neurons and endocrine cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 4527–4536.
- 2) Xie, J. (2008) Control of alternative pre-mRNA splicing by Ca(++) signals. *Biochim. Biophys. Acta*, **1779**, 438–452.
- 3) Li, Q., Lee, J.A., & Black, D.L. (2007) Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 819–831.
- 4) Xie, J. & Black, D.L. (2001) A CaMK IV responsive RNA element mediates depolarization-induced alternative splicing of ion channels. *Nature*, **410**, 936–939.
- 5) An, P. & Grabowski, P.J. (2007) Exon silencing by UAGG motifs in response to neuronal excitation. *PLoS Biol.*, **5**, e36.
- 6) Yu, J., Hai, Y., Liu, G., Fang, T., Kung, S.K., & Xie, J. (2009) The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L is an essential component in the Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase IV-regulated alternative splicing through cytidine-adenosine repeats. *J. Biol. Chem.*, **284**, 1505–1513.
- 7) Liu, G., Razanau, A., Hai, Y., Yu, J., Sohail, M., Lobo, V.G., Chu, J., Kung, S.K., & Xie, J. (2012) A conserved serine of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP L) mediates depolarization-regulated alternative splicing of potassium channels. *J. Biol. Chem.*, **287**, 22709–22716.

- 8) Mu, Y., Otsuka, T., Horton, A.C., Scott, D.B., & Ehlers, M.D. (2003) Activity-dependent mRNA splicing controls ER export and synaptic delivery of NMDA receptors. *Neuron*, **40**, 581–594.
- 9) Perez-Otano, I. & Ehlers, M.D. (2005) Homeostatic plasticity and NMDA receptor trafficking. *Trends Neurosci.*, **28**, 229–238.
- 10) 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.
- 11) Baudouin, S. & Scheiffele, P. (2010) SnapShot: Neuroligin-neurexin complexes. *Cell*, **141**, 908–908.e1., 908.e1.
- 12) Sudhof, T.C. (2017) Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell*, **171**, 745–769.
- 13) Matsuda, K., Miura, E., Miyazaki, T., Kakegawa, W., Emi, K., Narumi, S., Fukazawa, Y., Ito-Ishida, A., Kondo, T., Shigemoto, R., et al. (2010) Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor delta2, a bidirectional synapse organizer. *Science*, **328**, 363–368.
- 14) Uemura, T., Lee, S.J., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., Sakimura, K., & Mishina, M. (2010) Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum. *Cell*, **141**, 1068–1079.
- 15) Matsuda, K. & Yuzaki, M. (2011) Cbln family proteins promote synapse formation by regulating distinct neurexin signaling pathways in various brain regions. *Eur. J. Neurosci.*, **33**, 1447–1461.
- 16) Iijima, T. & Yoshimura, T. (2019) A Perspective on the Role of Dynamic Alternative RNA Splicing in the Development, Specification, and Function of Axon Initial Segment. *Front. Mol. Neurosci.*, **12**, 295.
- 17) Suzuki, S., Ayukawa, N., Okada, C., Tanaka, M., Takekoshi, S., Iijima, Y., & Iijima, T. (2017) Spatio-temporal and dynamic regulation of neurofascin alternative splicing in mouse cerebellar neurons. *Sci. Rep.*, **7**, 11405.
- 18) Jacko, M., Weyn-Vanhentenryck, S.M., Smerdon, J.W., Yan, R., Feng, H., Williams, D.J., Pai, J., Xu, K., Wichterle, H., & Zhang, C. (2018) Rbfox Splicing Factors Promote Neuronal Maturation and Axon Initial Segment Assembly. *Neuron*, **97**, 853–868.e6.
- 19) Gehman, L.T., Stoilov, P., Maguire, J., Damianov, A., Lin, C.H., Shiue, L., Ares, M. Jr., Mody, I., & Black, D.L. (2011) The splicing regulator Rbfox1 (A2BP1) controls neuronal excitation in the mammalian brain. *Nat. Genet.*, **43**, 706–711.
- 20) Kuba, H., Oichi, Y., & Ohmori, H. (2010) Presynaptic activity regulates Na(+) channel distribution at the axon initial segment. *Nature*, **465**, 1075–1078.
- 21) Grubb, M.S. & Burrone, J. (2010) Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature*, **465**, 1070–1074.
- 22) Iijima, T., Iijima, Y., Witte, H., & Scheiffele, P. (2014) Neuronal cell type-specific alternative splicing is regulated by the KH domain protein SLM1. *J. Cell Biol.*, **204**, 331–342.
- 23) Di Fruscio, M., Chen, T., & Richard, S. (1999) Characterization of Sam68-like mammalian proteins SLM-1 and SLM-2: SLM-1 is a Src substrate during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2710–2715.
- 24) Traunmuller, L., Gomez, A.M., Nguyen, T.M., & Scheiffele, P. (2016) Control of neuronal synapse specification by a highly dedicated alternative splicing program. *Science*, **352**, 982–986.
- 25) Iijima, Y., Tanaka, M., Suzuki, S., Hauser, D., Tanaka, M., Okada, C., Ito, M., Ayukawa, N., Sato, Y., Ohtsuka, M., et al. (2019) SAM68-Specific Splicing Is Required for Proper Selection of Alternative 3' UTR Isoforms in the Nervous System. *iScience*, **22**, 318–335.
- 26) Ehrmann, I., Dalglish, C., Liu, Y., Danilenko, M., Crosier, M., Overman, L., Arthur, H.M., Lindsay, S., Clowry, G.J., Venables, J.P., et al. (2013) The tissue-specific RNA binding protein T-STAR controls regional splicing patterns of neurexin pre-mRNAs in the brain. *PLoS Genet.*, **9**, e1003474.
- 27) Traunmuller, L., Bornmann, C., & Scheiffele, P. (2014) Alternative splicing coupled nonsense-mediated decay generates neuronal cell type-specific expression of SLM proteins. *J. Neurosci.*, **34**, 16755–16761.
- 28) Nguyen, T.M., Schreiner, D., Xiao, L., Traunmuller, L., Bornmann, C., & Scheiffele, P. (2016) An alternative splicing switch shapes neurexin repertoires in principal neurons versus interneurons in the mouse hippocampus. *eLife*, **5**, e22757.
- 29) Sato, Y., Iijima, Y., Darwish, M., Sato, T., & Iijima, T. (2021). *Neurochem. Res.*
- 30) Wamsley, B., Jaglin, X.H., Favuzzi, E., Quattrocchio, G., Nigro, M.J., Yusuf, N., Khodadadi-Jamayran, A., Rudy, B., & Fishell, G. (2018) Rbfox1 Mediates Cell-type-Specific Splicing in Cortical Interneurons. *Neuron*, **100**, 846–859.e7.
- 31) Furlanis, E., Traunmuller, L., Fucile, G., & Scheiffele, P. (2019) Landscape of ribosome-engaged transcript isoforms reveals extensive neuronal-cell-class-specific alternative splicing programs. *Nat. Neurosci.*, **22**, 1709–1717.
- 32) Feng, H., Moakley, D.F., Chen, S., McKenzie, M.G., Menon, V., & Zhang, C. (2021) Complexity and graded regulation of neuronal cell-type-specific alternative splicing revealed by single-cell RNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2013056118.
- 33) Di Giammartino, D.C., Nishida, K., & Manley, J.L. (2011) Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation. *Mol. Cell*, **43**, 853–866.
- 34) Mayr, C. & Bartel, D.P. (2009) Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell*, **138**, 673–684.
- 35) Kaida, D., Berg, M.G., Younis, I., Kasim, M., Singh, L.N., Wan, L., & Dreyfuss, G. (2010) U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature*, **468**, 664–668.
- 36) Naro, C., Pellegrini, L., Jolly, A., Farini, D., Cesari, E., Bielli, P., de la Grange, P., & Sette, C. (2019) Functional Interaction between U1snRNP and Sam68 Insures Proper 3' End Pre-mRNA Processing during Germ Cell Differentiation. *Cell Rep.*, **26**, 2929–2941.e5.
- 37) Denichenko, P., Mogilevsky, M., Clery, A., Welte, T., Biran, J., Shimshon, O., Barnabas, G.D., Danan-Gotthold, M., Kumar, S., Yavin, E., et al. (2019) Specific inhibition of splicing factor activity by decoy RNA oligonucleotides. *Nat. Commun.*, **10**, 1590.



## 著者寸描

## ●飯島 崇利 (いじま たかし)



東海大学医学部医学科基礎医学系分子生命科学領域 准教授。医学博士（大阪大学）。

■略歴 1998年東邦大学理学部生物学科卒業。2000年大阪大学大学院医学研究科修士課程医科学専攻修了。04年同大学院医学系研究科博士課程機能形態学専攻修了。04～09年慶應義塾大学医学部生理学教室助教。09～13年バーゼル大学バイオ

センター神経生物学部門博士研究員。14～18年東海大学創造科学技術研究機構医学部門特任准教授。19年～現在東海大学医学部基礎医学系分子生命科学領域准教授。

■研究テーマと抱負 神経系における生命情報多様性獲得メカニズムと機能の解明，および脳発達障害の分子病態の解明と治療開発。

■ウェブサイト <https://www.ijimalab.org>

<https://researchmap.jp/08058729330>

■趣味 地理歴史を学ぶ（歴史は幕末から近代史関係が特に好き）。自然の中をジョギングする（学生時代は中長距離で活躍したが，レースに出るほどの体力はなし）。飲酒（ビール，ハイボール，赤ワインなど）しながらダラダラ本（小説）を読むかネットする。