

5. お わ り に

本稿では、現在までに明らかにされているヘテロクロマチンとRNAサイレンシングの関わりについて、特にモデル生物での最近の報告を中心に紹介した。分裂酵母や植物で最初に明らかにされたRNAを介したクロマチン構造変換の過程が、線虫やショウジョウバエの生殖細胞系列におけるトランスポゾンの抑制に寄与しているという最近の報告はとても興味深い。これらの生物種で確認されたH3K9meの蓄積が、どの程度転写レベルの抑制につながっているのか、今後の解析によって解明されると考えられる。またPiwiによるトランスポゾンの抑制は哺乳類動物の生殖細胞系列でも起きており、実際PiwiによってDNAメチル化が引き起こされることが報告されている¹⁵⁾。哺乳類でもRNAサイレンシングとDNAメチル化とH3K9meに機能的な共役が存在しているのかどうか、今後の解析によって解明されると期待される。

- 1) Grewal, S.I. (2010) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **20**, 134–141.
- 2) Moazed, D. (2009) *Nature*, **457**, 413–420.
- 3) Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., & Grewal, S.I. (2001) *Science*, **292**, 110–113.
- 4) Goto, D. & Nakayama, J. (2012) *Develop. Growth Differ.*, **54**, 129–141.
- 5) Sadaie, M., Iida, T., Urano, T., & Nakayama, J. (2004) *EMBO J.*, **23**, 3825–3835.
- 6) Cam, H.P., Sugiyama, T., Chen, E.S., Chen, X., FitzGerald, P. C., & Grewal, S.I. (2005) *Nat. Genet.*, **37**, 809–819.
- 7) Zofall, M., Yamanaka, S., Reyes-Turcu, F.E., Zhang, K., Rubin, C., & Grewal, S.I. (2012) *Science*, **335**, 96–100.
- 8) Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T., & Nishimura, T. (2012) *Plant Cell Physiol.*, **53**, 766–784.
- 9) Du, J., Zhong, X., Bernatavichute, Y.V., Stroud, H., Feng, S., Caro, E., Vashisht, A.A., Terragni, J., Chin, H.G., Tu, A., Hetzel, J., Wohlschlegel, J.A., Pradhan, S., Patel, D.J., & Jacobsen, S.E. (2012) *Cell*, **151**, 167–180.
- 10) Gu, S.G., Pak, J., Guang, S., Maniar, J.M., Kennedy, S., & Fire, A. (2012) *Nat. Genet.*, **44**, 157–164.
- 11) Ashe, A., Sapetschnig, A., Weick, E.-M., Mitchell, J., Bagijn, M.P., Cording, A.C., Doebley, A.-L., Goldstein, L.D., Lehrbach, N.J., Pen, J.L., Pintacuda, G., Sakaguchi, A., Sarkies, P., Ahmed, S., & Miska, E.A. (2012) *Cell*, **150**, 88–99.
- 12) Shirayama, M., Seth, M., Lee, H.-C., Gu, W., Ishidate, T., Conte, D., Jr., & Mello, C.C. (2012) *Cell*, **150**, 65–77.
- 13) Brower-Toland, B., Findley, S.D., Jiang, L., Liu, L., Yin, H., Dus, M., Zhou, P., Elgin, S.C., & Lin, H. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 2300–2311.
- 14) Sienski, G., Donertas, D., & Brennecke, J. (2012) *Cell*, **151**, 964–980.
- 15) Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D., & Aravin, A.A. (2011) *Nat.*

Rev. Mol. Cell. Biol., **12**, 246–258.

中山 潤一

(名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科)

Heterochromatin assembly and RNA silencing

Jun-ichi Nakayama (Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University, 1 Yamanohata, Mizuho, Nagoya, Aichi 467-8501, Japan)

神経活動依存的な選択的スプライシング機構とその役割

1. は じ め に

選択的スプライシングは一つの遺伝子から機能的に異なった多様な遺伝子産物を生み出すための非常にパワフルな仕組みである。哺乳類の中樞神経系では非常に多くの分子がこの選択的スプライシングによる制御を受けており、複雑かつ精密な神経ネットワーク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シナプス可塑性などに寄与していることが示唆されている。特に神経活動による選択的スプライシングの制御はヒトをはじめとした高等動物の高度な神経・精神活動に重要な役割を担うと考えられる。本稿では神経活動に依存的な選択的スプライシングのメカニズムに焦点を置き、これを制御するRNAエレメントやRNA結合タンパク質群の最近の知見を中心に、著者の研究成果を含めて紹介していきたい。

2. Ca²⁺シグナルによる神経活動依存的な選択的スプライシング

成熟した神経系では神経活動により引き起こされるCa²⁺流入が特定の細胞内シグナルを活性化させることで神経細胞間の情報伝達効率をコントロールする。特に記憶・学習が長期に持続するためには、神経活動に応じた新規の遺伝子発現とタンパク質の合成による特定のシナプスの形態的かつ機能的変化が必須であることが知られてきた。さらに近年ではNMDA (N-メチル-D-アスパラギン酸) 受容体やL型Ca²⁺チャネルからのCa²⁺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り、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示唆されてきた^{1,2)}。その中でよく研究されているものとしてはBK (big potas-

sium) チャンネルの α サブユニットや NR1 (1 型 NMDA 受容体) などのイオンチャンネル類がある。BK チャンネルの STREX と呼ばれるエクソンはこのチャンネルの Ca^{2+} 感受性を制御する。培養神経細胞を高 K^+ 処理などにより脱分極刺激すると、 Ca^{2+} 流入に依存して STREX エクソンの挿入が抑制 (スキッピング) されることが知られてきた³⁾。また NR1 のエクソン 5 とエクソン 21 (CI エクソン) も同様の機序によってスキッピングが引き起こされる⁴⁾。また最近著者は新たに Neurexin と呼ばれるシナプス形成因子のエクソン 20 の選択的スプライシングが小脳顆粒細胞において Ca^{2+} 依存的に制御されていることを明らかにした⁵⁾。これらの Ca^{2+} 流入に依存したスプライシング制御は CaMKIV (Ca^{2+} /カルモデュリンキナーゼ IV) の活性化を介して起こることが示されている^{3,5)}。

3. 神経活動依存的な選択的スプライシングの分子メカニズム

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が少しずつ具体的になりつつある。以下に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 (図 1 参照)。

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

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。これまで Ca^{2+} -CaMKIV 経路の制御下で作用するいくつかの RNA エLEMENT が発見されてきた (図 1)。Black らはこの RNA ELEMENT として BK チャンネルの 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³⁾。またこれとは別に Grabowski らは NR1 の CI エクソン部位から Ca^{2+} 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 配列を同定してきた⁴⁾。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³⁾、また Ca^{2+} 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 (γ -アミノ酪酸) 受容体, synGAP, SNAP25 など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見られることから¹⁾、CaRRE および UAGG 配列は CaMKIV 依存的スプライシングにおけるコンセンサスな ELEMENT であることが強く示唆されている。

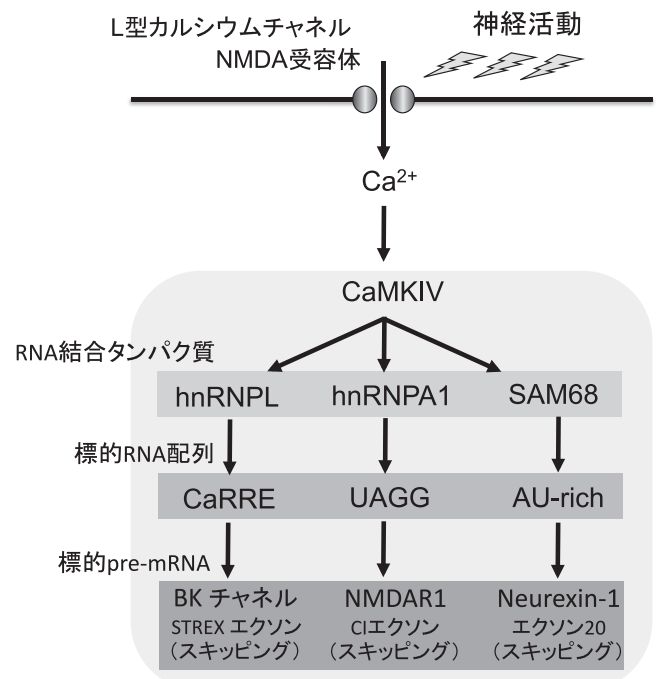


図 1 Ca^{2+} -CaMKIV 経路を介した神経活動依存的な選択的スプライシング

CaMKIV は hnRNPL, hnRNPA1, SAM68 など複数の RNA 結合タンパク質を活性化する。これらの RNA 結合タンパク質はその標的 RNA 配列をもつ特定の 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ことが示唆される。

では 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しているのだろうか。そこでこれらの RNA 配列に結合する RNA 結合タンパク質群の解析が行われてきた。UAGG 配列に結合し脱分極に依存した NMDA 受容体のエクソン 21 のスキッピングに関わる分子としては hnRNPA1⁴⁾、また 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は hnRNPL がある^{6,7)} (図 1)。最近では hnRNPL が CaMKIV による直接のリン酸化によって活性化され、これに依存的なスプライシング制御に寄与することが示唆された⁷⁾。

2) SAM68 に依存的なスプライシング制御

しかしながら、上記の CaRRE や UAGG 配列は 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 の一部にしか見られないことから、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る。ごく最近著者はその一つとして上記のメカニズムとは異なる新しい

CaMKIV 依存的スプライシングのメカニズムを同定してきた。著者らは *in vitro* のスプライシングレポーターアッセイによるスクリーニングにより Neurexin-1 の AS4 部位 (選択的スプライシング部位 4) の選択的スプライシング制御に関わる分子として SAM68 を同定した (図 1, 図 2 A)⁵⁾。SAM68 は Neurexin-1 AS4 部位のイントロン 20 にある AU リッチ領域に結合しエクソン 20 のスキッピングを誘導していることがわかった (図 1)。SAM68 ノックアウトマウスでは小脳をはじめとした複数の脳領域でエクソン 20 をもたないアイソフォーム *Nrxn-1* 4 (-) が著しく減少し、逆にエクソン 20 をもつアイソフォーム *Nrxn-1* 4 (+) が増加していることから、SAM68 が神経系において

Neurexin-1 の選択的スプライシングに関与していることが確かめられた (図 2B)⁵⁾。さらに神経活動依存的スプライシングの変化を、SAM68 ノックアウトマウスの小脳で調べたところ、高 K^+ 処理による脱分極刺激で誘導される Neurexin-1 の選択的スプライシングの変化が起こらなかった (図 2C)⁵⁾。加えて SAM68 の細胞内局在および発現量は神経活動によって大きく変化しないこと、SAM68 が神経活動依存的に (おそらくは CaMKIV によって) リン酸化されることから、SAM68 が神経活動によって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唆された⁵⁾。

4. 神経活動依存的な選択的スプライシングの役割

神経活動によるスプライシングアイソフォームの変化が神経機能に具体的にどのような影響を及ぼすのだろうか? BK チャネルは STREX エクソンの挿入によって Ca^{2+} 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^+ の再取り込みによる過分極過程に重要な役割を果たす²⁾。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⁸⁾。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シナプス活動の安定化 (ホメオスタティックな可塑的变化) に寄与していると考えられている^{1,2,9)}。

Neurexin はシナプス前終末に局在し、シナプス後膜上と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¹⁰⁾。受容体には Neuroligin ファミリー、LRRTM ファミリー、Cbln1-GluD2 複合体など複数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はエクソン 20 の挿入の有無に大きく依存する (図 3A)^{11~13)}。Neurexin の受容体はそれぞれ異なったシナプスタンパク質と相互作用し機能的に違いのあることが知られており¹¹⁾、Neurexin とこれら受容体との結合のスイッチングはシナプスの形態的および機能的変化を引き起こすことが考えられる¹⁴⁾。このことから Neurexin AS4 における選択的スプライシング変化はシナプス結合の特異性やシナプス可塑性に大きな影響を与えることが示唆される。小脳において 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 Neurexin 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 Neuroligin などの他の受容

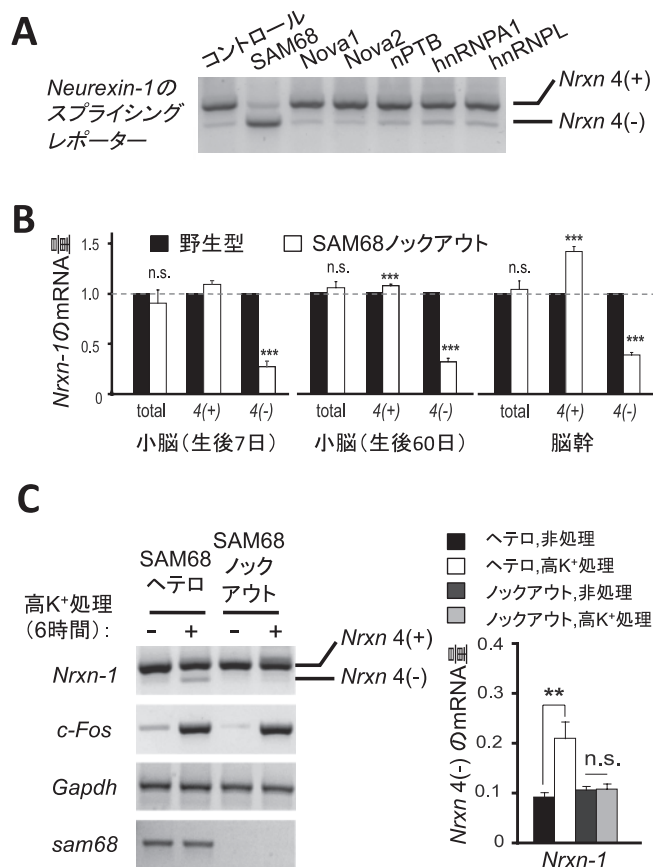


図 2 SAM68 による Neurexin-1 の選択的スプライシング制御 (A) *in vitro* スプライシングレポーターアッセイによる RNA 結合タンパク質群のスクリーニング。SAM68 は HEK293 細胞に発現させた Neurexin-1 AS4 のスプライシングレポーターのエクソン 20 のスキッピングを強く誘導した。 (B) 定量的 RT-PCR 法による野生型と SAM68 ノックアウトマウスの小脳と脳幹における Neurexin-1 AS4 の選択的スプライシングの比較。

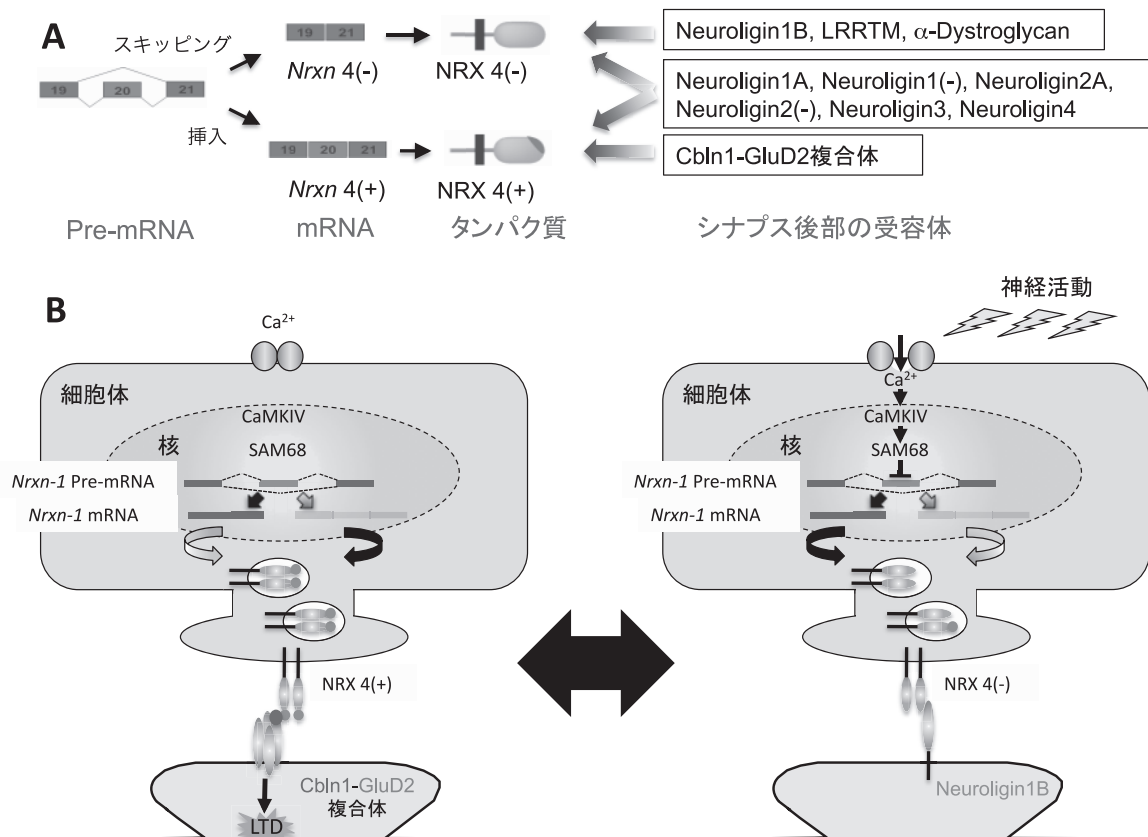


図3 神経活動依存的な Neuroligin-1 の選択的スプライシング変化とシナプス機能の制御

(A) Neuroligin のシナプス後膜上の受容体とその結合様式。Neuroligin-1 AS4 において、エクソン 20 が欠如したアイソフォーム NRX 4(-) は Neuroligin1B や LRRTM など強い親和性を示すのに対し^{11,12)}、Cbln1-GluD2 複合体は、エクソン 20 が挿入された NRX 4(+) に特異的に結合する¹³⁾。(B) 神経活動依存的な Neuroligin-1 の選択的スプライシング変化とシナプス後膜部の受容体の相互作用を介したシナプス制御モデル。小脳顆粒細胞において、神経活動により Ca^{2+} -CaMKIV 経路によって活性化された SAM68 は、エクソン 20 の挿入を抑制し NRX 4(-) を生み出す。これに伴って Cbln1-GluD2 複合体から Neuroligin1B などへの受容体のスイッチングが起こり、長期抑圧 (LTD) などの可塑性の誘導効率に変化が引き起こされることが予想される。

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、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 (図 3B)⁵⁾。

5. おわりに

このように Ca^{2+} -CaMKIV 経路を介して神経活動依存的な選択的スプライシング制御を受ける pre-mRNA は複数同定されてきたが^{81,2)}、神経系全体でどの程度の pre-mRNA がこの制御を受けているのか、この制御の破綻によっていったい何が起きるのか、その全貌はまだ明らかでない。

著者らは神経活動依存的な選択的スプライシングのキーファクターとして SAM68 を同定した⁵⁾。しかしながら神

経系において SAM68 の標的分子とその機能についてはまだ多くが未解明である。神経活動依存的な選択的スプライシング機構から生み出される分子多様性と高等動物の高度な神経・精神活動との関係をより詳しく理解する上で、今後 Neuroligin-1 の他にどのような pre-mRNA が SAM68 あるいはこれに類似した RNA 結合タンパク質による制御を受けているのか、これらのタンパク質のノックアウト動物でどのような表現型が見られるのかを知ることは非常に興味深い。重要なことに、神経・精神疾患の患者には多くのスプライシング異常が見られることが知られており¹⁵⁾、神経細胞における選択的スプライシング制御の破綻への理解が自閉症や統合失調症をはじめとした疾患の原因解明につながることも期待される。

- 1) Li, Q., Lee, J.A., & Black, D.L. (2007) *Ann. Rev. Neurosci.*, 8, 819–831.
- 2) Xie, J.Y. (2008) *Biochem. Biophys. Acta*, 1779, 438–452.
- 3) Xie, J.T. & Black, D.L. (2001) *Nature*, 410, 936–939.
- 4) An, P. & Grabowski, P.J. (2007) *PLoS Biol.*, 5, e36.
- 5) Iijima, T., Wu, K., Witte, H., Hanno-Iijima, Y., Glatter, T., Richard, S., & Scheiffele, P. (2011) *Cell*, 147, 1601–1614.
- 6) Yu, J.K., Hai, Y., Liu, G.D., Fang, T.L., Kung, S.K.P., & Xie, J.Y. (2009) *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) *J. Biol. Chem.*, 287, 22709–22716.
- 8) Mu, Y., Otsuka, T., Horton, A.C., Scott, D.B., & Ehlers, M.D. (2003) *Neuron*, 40, 581–594.
- 9) Perez-Otano, I. & Ehlers, M.D. (2005) *Trends Neurosci.*, 28, 229–238.
- 10) Dean, C., Scholl, F.G., Choih, J., DeMaria, S., Berger, J., Isacoff, E., & Scheiffele, P. (2003) *Nat. Neurosci.*, 6, 708–716.
- 11) Baudouin, S. & Scheiffele, P. (2010) *Cell*, 141, 908.
- 12) Ko, J., Fuccillo, M.V., Malenka, R.C., & Sudhof, T.C. (2009) *Neuron*, 64, 791–798.
- 13) Uemura, T., Lee, S.J., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., Sakimura, K., & Mishina, M. (2010) *Cell*, 141, 1068–1079.
- 14) Krueger, D.D., Tuffy, L.P., Papadopoulos, T., & Brose, N. (2012) *Curr. Opin. Neurobiol.*, 22, 1–11.
- 15) Licatalosi, D.D. & Darnell, R.B. (2006) *Neuron*, 52, 93–101.

飯島 崇利

(スイス・バーゼル大学バイオセンター

神経生物学部門)

Mechanisms and functions underlying neuronal activity-dependent alternative pre-mRNA splicing

Takatoshi Iijima (Department of Cell and Neurobiology, Biozentrum, University of Basel, Klingenbergstrasse 50/70, CH-4056, Basel, Switzerland)

腎尿細管におけるマグネシウム輸送の分子制御

1. はじめに

マグネシウムは生体内で4番目に多く存在する陽イオンであり、その約60%はカルシウムとともに骨に貯蔵され、血清中には1%しか存在しない。細胞内に分布するマグネシウムは、エネルギーを必要とする300種類以上の酵素の補助因子として働いており、生理機能の維持において重要な役割を果たす。マグネシウムの一日に必要な摂取量は300 mg程度(成人)であるが、現代の日本人の平均摂取

量は約250 mgで不足しがちなミネラルといえる。慢性的なマグネシウム不足は、骨粗鬆症、心疾患、糖尿病などの生活習慣病のリスクを増大させることが示唆されている。生体内のマグネシウムバランスは、腎臓での再吸収機構によって厳密に調節されているが、腎臓に発現するマグネシウム輸送体の遺伝子変異や免疫抑制剤の投与などにより、マグネシウムバランスが崩れる。しかし、マグネシウムホメオスタシスの異常機構は不明であった。本稿では、腎尿細管のマグネシウム再吸収機構に関する最近の話題について、著者らの研究成果を含めて紹介する。

2. 傍細胞経路を介したマグネシウム輸送

糸球体でろ過されたマグネシウムイオンは、約70%がヘンレの太い上行脚で再吸収される¹⁾。この部位では、傍細胞経路を介してマグネシウムが再吸収され、その輸送は上皮膜電位勾配によって調節される(図1)。傍細胞経路を介したマグネシウム輸送を担うタンパク質は、タイトジャンクション(密着結合)に分布するクロードイン-16である。タイトジャンクションは、物質が自由に透過しないようにバリアーとして働くと考えられていたが、イオン選択的なポアを形成することが明らかになってきた。ヒトクロードイン-16タンパク質は、305個のアミノ酸からなる4回膜貫通型の構造を有する。タイトジャンクションには、クロードインの他に、足場タンパク質のZO-1やZO-2、シグナル伝達因子などが存在する。高カルシウム尿症と腎石灰化を伴う家族性低マグネシウム血症(FHHNC)の患者において、20種類以上のクロードイン-16の変異体が報告された²⁻⁴⁾が、低マグネシウム血症の発症機構は不明であった。

我々は、FLAGタグを融合したクロードイン-16をイスラエル腎尿細管由来のMDCK細胞に発現させ、クロードイン-16変異体の機能解析を行った⁵⁾。クロードイン-16はZO-1とともにタイトジャンクションに分布し、管腔から血管への⁴⁵Ca²⁺透過性を増加したことから、二価カチオンに対するチャネルとして働くことが示唆された。高濃度のマグネシウム存在下では⁴⁵Ca²⁺の輸送が阻害されたことから、カルシウムとマグネシウムが競合的に輸送されると考えられる。クロードイン-16のPDZ結合モチーフの欠失体と点変異体は、タイトジャンクションから解離して細胞質に分布した。クロードイン-16の免疫沈降により、野生型はZO-1と結合するが、変異体はZO-1と結合しないことが明らかになった。さらに、変異体を発現した細胞では、非発現細胞と同程度まで二価カチオンの輸送量が低下した。我々の