

選択的スプライシングを制御する遺伝子および制御される遺伝子の探索

●黒柳 秀人¹⁾ ◆福原 武志²⁾

1) 東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学研究所 2) 東京医科歯科大学・難治疾患研究所

〈研究の目的と進め方〉

選択的スプライシングは、真核生物の多くの遺伝子で検出され、ひとつの遺伝子から多様なタンパク質を造り出す機構として、生物の進化、複雑化、多様性の鍵となる機構であると考えられる。しかしながら、組織特異的あるいは刺激依存的な選択的スプライシングの制御機構の詳細は明らかになっていない。そこで、申請者らは、モデル生物として線虫を用い、i) 組織特異的選択的スプライシングを観察するためのミニ・ジーン・カセットを構築し、各種組織特異的プロモーターによる遺伝子導入線虫を作製して、選択的スプライシング発現プロファイリングを行う、ii) 上記モニター用線虫に突然変異を誘導して選択的スプライシング異常の変異体をスクリーニングし遺伝子同定を行う、および、iii) 選択的スプライシングに異常があることが知られている変異体についてプロテオーム解析を行い、これらの変異体で存在量が野生型株に比べ有意に変動するタンパク質を網羅的に同定して選択的スプライシングとの関連を明らかにすること、を通じて、生体における選択的スプライシングの制御機構を解明することを目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

i) 選択的スプライシング解析用ミニ・ジーンの作製：egl-15遺伝子のエクソン4から6のゲノム配列を基に、エクソン5A、5Bに、GFP（緑色蛍光タンパク質）やRFP（赤色蛍光タンパク質）のcDNAを連結または挿入した人工エクソンによるミニ・ジーン・カセットを作製する。GFPとRFPの位置を入れ替えたもの組として作製する。egl-15ミニ・ジーン発現コンストラクトを導入した遺伝子導入線虫を作製し、内在性のegl-15が発現する下皮細胞（5B型）、腸細胞（5B型）、陰門筋細胞（5A型）における選択的スプライシングを蛍光タンパク質の発現パターンで確認する。また、RT-PCRによってもスプライシングのパターンを確認する。エクソンやイントロンに欠失や点変異を入れたコンストラクトも作製する。他の遺伝子で選択的スプライシングを受けるエクソンについても随時、同様に作製する。

ii) 組織ごとのミニ・ジーン発現パターンのプロファイリング：i) で作製した予期されたおりの選択的スプライシングパターンを示すミニ・ジーン・カセットを用いて、内在性egl-15が発現していない組織を含む各種組織特異的プロモーターや熱ショック誘導プロモーター等につないだ発現コンストラクトを作製、遺伝子導入する。組織・細胞ごとのGFPおよびRFPの発現量を共焦点顕微鏡を用いて定量化し、比率をプロファイルする。エクソン選択のパターンについて組織・細胞別、発生段階別のプロファイリングを行う。変異を入れたミニ・ジーン・コンストラクトの結果からシ要素を決定する。

iii) 変異体におけるミニ・ジーン発現パターンのプロファイリング：ii) で得られた組織ごとのエクソン選択性プロファイルがよく視覚化された遺伝子導入線虫を用い、mec-8変異体等、既存のRNAプロセッシング異常の変異

体における発現パターンのプロファイリングも行う。変異体の存在しない関連遺伝子についてはRNAiを行って発現パターンをプロファイリングする。

iv) 選択的スプライシング異常の変異体のスクリーニング：iii) で用いたプロファイリング用遺伝子導入線虫に変異原を用いて突然変異を誘導し、GFP/RFPの発現パターンの変化を指標として変異体のスクリーニングを行う。得られた変異体の原因遺伝子をSNPsを用いて染色体上にマッピングし、遺伝子導入によるレスキュー実験と変異探索を行って、原因遺伝子を同定する。

v) プロテオーム解析による変動タンパク質の同定：mec-8、smu-1、smu-2の各変異体について、総タンパク質を抽出して蛍光標識後2次元電気泳動し、各タンパク質の量を野生型株と比較する。野生型株と比べタンパク質量が有意に変動しているものを網羅的にサンプリングし、トリプシン処理後にTOF-MS解析を行って各タンパク質の同定を行う。必要に応じて、総タンパク質を分画した上で2次元電気泳動によるタンパク量比較を行う。

vi) 候補タンパク質のmRNAのスプライシングパターンの解析：v) で同定された量が変動するタンパク質について、定量的RT-PCRによって野生型と変異体のmRNA量を比較するとともにmRNAの配列を解析してエクソンのパターンを決定し、タンパク質の量の変化がスプライシングパターンの変化によるか発現量の変化によるものかを峻別してカタログを作成する。

〈研究期間の成果〉

i) 選択的スプライシング解析用ミニ・ジーンの作製：線虫の線維芽細胞成長因子受容体をコードするegl-15遺伝子の相互排他的エクソン5Aおよび5Bの発現をモニターするためのミニ・ジーンを次のように作製した：エクソン4から5Bおよび5Aを含むゲノムDNA断片を増幅しGFPおよびRFPのcDNAをエクソン5Aおよび5Bに挿入した。上記で作製したミニ・ジーンを普遍的発現プロモーターで全身に発現させたところ、それぞれの組織はGFP、RFPのどちらかあるいは双方を発現していた。RT-PCRによってミニ・ジーン由来のmRNAのスプライシング・パターンを解析したところ、エクソン5Aまたは5Bが選択されており、目的どおりGFPまたはRFPの発現とエクソンの選択性が対応付けられることが確認された。

ii) 組織ごとのミニ・ジーン発現パターンのプロファイリング：上記で組織によってGFPとRFPのどちらが優勢に発現するかが異なることが判明した。そこで各種の組織特異的プロモーターを用いて同じミニ・ジーンを発現させたところ、普遍的プロモーターのときと同様、筋肉系はエクソン5A、神経系・上皮系はエクソン5Bという組織特異的エクソン選択性の違いが確認され、このegl-15レポーターは組織特異性を示すことが判明した。

iii) 変異体におけるミニ・ジーン発現パターンのプロファイリング：次項の変異体のスクリーニングにより多数の変異体株が得られることが確認されたため、既存の変異体との交配は行う必要がないと判断した。

iv) 選択的スプライシング異常の変異体のスクリーニング：組織特異性を制御するトランスの因子を探索するために、体壁筋特異的myo-3プロモータ制御下でエクソン5A-RFPを優勢に発現するレポーター線虫にEMSで突然変異を誘導し、GFPの発現が強まることを指標に、ワーム・ソーターを使用して、体壁筋におけるエクソン選択性が変化する変異体の単離を試みた。その結果、およそ5万ゲノムのスクリーニングにより約30株の独立の変異体を得られた。これらの変異体の表現型の分類、染色体マッピングおよび相補性試験の結果、少なくとも4つの遺伝子座が存在することが判明した。

上記で得られた変異体について、snip-SNPs法によるマッピングを進めて、これまでに3つの遺伝子座について遺伝子を同定した。うち1つは新規のRNA結合タンパク質をコードし、alternative-splicing-defective-1 (asd-1)と命名した。asd-1が線虫の他の既知のRNA結合タンパク質の1つと高い配列相同性を有していることから、これらの二重変異体を作製したところ、体壁筋におけるegl-15レポーターの発現は完全にエクソン5B優位となることがわかった。また、これらのRNA結合タンパク質はイントロン4上に見出されたシス・エレメントに試験管内で特異的に結合することも確認された。さらに、二重変異体では、内在性のegl-15遺伝子のエクソン選択性もレポーター同様にエクソン5B優位に変化していることが見出された。これらのことから、ASD-1とそのファミリーのRNA結合タンパク質が協調してegl-15レポーターおよび内在性のegl-15の相互排他的エクソンの選択性を制御していることが確認された。

v) プロテオーム解析による変動タンパク質の同定：vi) 候補タンパク質のmRNAのスプライシングパターンの解析：上記で得られたasd-1変異体については、egl-15が内在性の標的遺伝子であることが確認された。他の標的についてはプロテオーム解析の前にRNAの比較によるdifferentially expressed gene (DEG)のスクリーニングを進めている。

〈国内外での成果の位置づけ〉

さまざまな多細胞生物において個々の遺伝子の選択的スプライシングについては多数の報告がある。線虫においても、ESTデータベースを基に選択的スプライシングを示す遺伝子のデータベースをカリフォルニア大学サンタクルズ校のグループが作成している。しかし、生体における選択的スプライシング・パターンを個々の細胞の解像度で実験的にプロファイリングする試みや選択的スプライシングの制御機構を標的とする変異体スクリーニング、標的遺伝子の実験的な網羅的探索の試みはなされていない。

近年は網羅的エクソン境界プローブ・アレイによるスプライシング・パターン解析が可能となり、さまざまな組織や細胞株でさまざまな遺伝子からさまざまなアイソフォームのmRNAが産生されていることが明らかとなった。しかしながら、アレイによる解析では、生体内での選択的スプライシング・パターンを細胞レベルの解像度で観察することは困難であり、また、シス・エレメントやトランスの因子を新たに実験的に探索することも困難であると考えられる。

本研究では、生体内のエクソン選択性のレポーターを開発したことで、生体内での選択性制御に関わるシス・エレメントやトランス因子を実験的に同定することができ、得られた因子が実際に内在性の遺伝子の選択的スプライシングを制御していることを実証できた。したがっ

て、今後もこの方法を適用することで、さまざまな遺伝子の選択的スプライシング制御機構を解明できるものと期待される。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

レポーター系を立ち上げることで、そして、発現プロファイリングにより発現の規則性を見出すこと、シス・エレメントを同定すること、変異体を単離すること、遺伝子を同定すること、得られたトランス因子とシス・エレメントの関係を明らかにすること、内在性の遺伝子の制御について解析すること、という一連の計画に沿って、egl-15をモデルとしたレポーター系によって研究を進め、asd-1遺伝子の同定という成果を挙げる事ができた。すなわち、個々の計画していた実験系が基本的に想定したとおりに遂行可能であることを実証できた。

変異体のスクリーニングについては、当初、普遍的プロモータによって全身にGFPかRFPを発現する親株に変異をかけたが、実体顕微鏡やワーム・ソーターによるスクリーニングでは個々の組織における発現パターンの変化を見出しにくかったと考えられ、期待された変異体を得ることができなかった。そこで、今年度は、各種組織特異的プロモータを用意し、特定の組織における選択性を指標にしたスクリーニングに挑戦し、体壁筋でのレポーター発現線虫から予想以上に多くの変異体を得ることができた。

4遺伝子座についてSNPsマッピングを行い、うち3遺伝子座について2ヶ月間で遺伝子同定にまで至った。しかし、マッピングによって数百kb (候補遺伝子100程度)の範囲まで絞り込んだ時点で、遺伝子機能予測を基にさらに候補遺伝子を絞り込んで変異の探索を行って原因遺伝子の同定に至っており、幸運なケースであったといえる。実際に、残る1遺伝子座にはさらに多くの個体のSNP解析を行ったにも関わらずほとんど遺伝子座の絞込みができておらず、目的遺伝子の染色体上の位置やレポーター遺伝子との位置関係によっては、変異体の原因遺伝子の同定に今後も困難が予想される。

体壁筋におけるエクソン選択性の変異体のスクリーニングにおいては、1次スクリーニングで、重複も含めて数百の候補を単離した。それらの中には、表現型が確認できたにも関わらず致命的または不稔であったために結果的に株化できなかったものが多数あった。これらの中には1遺伝子座の変異でエクソン選択性が完全に逆転したものも多く含まれており、これらの原因遺伝子のクロニングがegl-15遺伝子のエクソン選択性の制御機構のさらなる解明につながると期待される。しかし、ホモで致死となる変異体の確立やマッピング、遺伝子同定、遺伝学的解析にはasd-1の場合より格段に多くの手間と実験的な困難があると想定される。

〈今後の課題〉

多数ある選択的スプライシングの例の中で、相互排他的エクソンによるものは、線虫でもヒトでもそれほど多くはない。そこで、データベース等を基に、相互排他的エクソンをもつ遺伝子について、egl-15と同様のミニ・ジーンを作製と発現パターンの解析を、網羅的に行って、線虫さらには後生動物における選択的スプライシングの全容の解明を目指す。相互排他性に組織特異性や時期特異性など何らかの制御が見られる遺伝子については、egl-15の場合と同様にその制御機構の解析 (シス・エレメントの同定、トランス因子の変異体の単離)を行っていく。

先行して扱ったegl-15遺伝子エクソン5についても、未だ遺伝子クローニングで来ていない変異体株が残されており、マッピング方法を工夫して組織特異性の制御機構を明らかにする必要がある。また、体壁筋以外の組織における発現の特異性の制御機構も同様に解析を必要とする。egl-15の発現制御における機能解析を行ってきたasd-1遺伝子についても、egl-15以外の内在性標的遺伝子の探索やファミリー遺伝子との協調機構、機能分担について解明を進めていく。

egl-15に見られるような相互排他的エクソンとは異なる、カセット・エクソンやイントロンの保持等の制御機構、あるいは選択的ポリA付加部位の使い分けについても、同様のレポーター系が構築可能か、検討を行う。これらの線虫遺伝子を材料とした選択的スプライシング機構の網羅的解析によって、脊椎動物等の高等動物との共通性や独自性が明らかとなり、選択的スプライシングの進化的意義が明らかになることを期待している。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

現在、上述の研究成果について投稿準備中