

ヒトゲノム配列解析による RNA スプライシングと RNA 代謝機構の研究

●大野 欽司 ◆Kaiping Gao ◆松浦 徹 ◆増田 章男 ◆佐橋 健太郎

名古屋大学大学院医学系研究科神経遺伝情報

<研究の目的と進め方>

本研究の目的は、ヒトゲノム上に annotation をされた全 transcriptome の *in silico* 解析と培養細胞を用いた *in vitro* 解析により各 splicing *cis*-element 内、及び、各 *cis*-elements 相互の塩基配列の法則を解明することである。さらに、各 *cis*-element 内、及び、*cis*-elements 間の法則を明らかにすることにより splicing 異常を起こす遺伝子変異を予測する精度の高い汎用アルゴリズムを構築することである。

U1 snRNA が結合をする splice donor sites における遺伝子変異が splicing 異常を起こすことが従来より数多く報告されてきているが、現在でも見落とされている変異が多く存在する (personal observations)。昨年度は、splice donor sites における塩基間相互の関係を明らかにし、splicing 変異を効率よく予測するアルゴリズムの構築を行った (論文 1)。

ヒトを含む高等動物の branch point コンセンサス配列は degenerative であるが、degeneracy が全く存在しない yeast の branch point 配列に基づいて予測アルゴリズムが作られている。小数の自経例の検討によるとこのアルゴリズムは不正確である。また、branch point の遺伝子変異がいくつか報告されており、報告によっては変異が branch point に存在することが証明されているが、変異により lariat formation ができなくなることを証明した報告は我々が知る限り存在しない。これは major branch point が使えない場合には minor branch point が使われるためと思われる。これらの変異では branch point の破壊自体が原因ではなく branch point と偶然に overlap をする intronic splicing enhancer を破壊している可能性がある。yeast からの類推のみに基づき、実験的な根拠のない現在の branch point コンセンサス配列が間違った病態研究につながっている可能性があり、本研究では、全 transcriptome 解析・lariat RT-PCR 法・ribonuclease protection assay 法によりヒトにおける branch point コンセンサス配列の決定を試みる。

Exon +1 位変異による aberrant splicing は従来 2 例しか報告されておらず見逃されている例が多いと想定される。従来ほとんど研究が行われていない U2AF65、及び、U2AF35 が結合をする intron 3' 末端と exon 5' 末端の塩基間相互の関係を明らかにし、AG-dependent splice sites と AG-independent splice sites の判別アルゴリズムを構築する。これらの解析結果に基づき、exon +1 位を含む exon 5' 末端領域の遺伝子変異の中で、splicing 異常を起こすものを検出するためのアルゴリズムを構築する。

これらの解析を組み合わせるにより疾患関連遺伝子変異が splicing 異常を起こす機構の解明と、splicing 異常を惹き起こす遺伝子変異を予測する汎用アルゴリズムの構築を試みる。

<2007 年度の研究の当初計画>

1. ヒト branch point コンセンサス塩基配列の決定

ヒトにおける branch point コンセンサス配列を実験結果に基づいて決定を行うために house keeping genes を対象に 100 ヶ所の branch points を lariat RT-PCR により同定を目指す。House keeping genes は各種細胞において高発現であり、intron が短く、alternative splicing を受ける exon が少ないために本研究の対象遺伝子として最適であると考えられる。Lariat RT-PCR が実際の branch point を反映していることを、ribonuclease protection assay 法により確認する。これらの結果を training dataset として、branch point 予測アルゴリズムを構築する。ヒト全ゲノムを対象にこの予測アルゴリズムによる branch points の予測を行い、予測結果の検定を lariat RT-PCR により複数の遺伝子の複数の introns を用いて行う。本研究により「ヒトには branch point コンセンサス配列が存在しない」または「ヒトにおける branch points は degeneracy が高くコンセンサス配列による予測が困難である」という結論が得られる可能性がある。しかし、現在のコンセンサス配列が間違っていることを示す価値は高いと思われる。

2. Aberrant splicing を惹起するエクソン 5' 末端遺伝子変異の予測アルゴリズムの構築

Spliceosome の構築に intron 3' 末端の AG が必要な AG-dependent splice sites と不必要な AG-independent splice sites が存在する。AG-dependent splice sites においては、intron 3' 末端の AG に加えて exon 5' 末端の G が U2AF35 の結合に重要であり、exon 5' 末端の G の遺伝子変異が aberrant splicing の原因になるという仮説を立て実証を行う。FECH と GHI では exon 5' 末端の G の変異が exon skipping を起こすが、LPL と HEXA では起こさない。それぞれの遺伝子の mini gene を作成し、各種 mutagenesis を行い exon skipping を調べることにより exon 5' 末端遺伝子変異が aberrant splicing を惹起するのに必要な *cis*-elements の配列要素を決定する。

<2007 年度の成果>

1. ヒト branch point コンセンサス塩基配列の決定

ヒト 20 種類の house keeping genes の 52 の introns を対象に 367 個の lariat clones を解析した。367 個の clones のうち branch point に misincorporated nucleotides を認めたものは 181 clones で、これらを用いて解析を行った。残りの 186 個のクローンは lariat RT-PCR において branch point がスキップをした可能性を否定できなかった。Branch points の塩基は、92.3% A、3.3% C、1.7% G、2.8% U であった。解析の結果、ヒトの branch point コンセンサス配列は yUnAy であることが判明した。Branch points の 83% は -34 位から -21 位に存在した。Polypyrimidine tract は branch point の下流 4 から 24 塩基に存在した。ヒトの branch

point コンセンサス配列は、予想されるよりも degenerative であり、branch point は他の splicing cis-element(s) と同時に認識をされている可能性が高いと思われた。

2. Aberrant splicing を惹起するエクソン 5' 末端遺伝子変異の予測アルゴリズムの構築

exon 5' 末端の G の変異が exon skipping を起こす *GHI* 遺伝子において polypyrimidine tract を延長させても exon skipping の補正効果はなかった。一方、遺伝子変異が exon skipping を起こさない *LPL* 遺伝子においては polypyrimidine tract を短縮させることにより exon skipping が誘発された。現在、さらに各種 constructs を作成し予測アルゴリズムの構築を行っている。

<国内外での成果の位置づけ>

ヒト branch point コンセンサス塩基配列の決定プロジェクトでは、*in vitro* 実験結果に基づくコンセンサス配列を示すことができた。内外の splicing 研究者に本プロジェクトの成果を説明したところ、「分子生物学の教科書の記述を変える研究」との評価を受けている。また、mammalian branch point sequence の degeneracy が高いことは、個別の遺伝子の研究から各研究者が想像をしており、本研究はその論理的な根拠を与えているとの評価を得ている。現在、論文を投稿し、revised version の採否の返事を待っている。

Exon 5' 末端の点変異が splicing 異常を起こし得ることは、疾患関連遺伝子変異の研究者の多くが予想さえしていない病態であり、その予測アルゴリズムの構築はヒト疾患関連遺伝子変異研究において重要なテーマになると期待をされる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ヒト branch point コンセンサス塩基配列を決定プロジェクトの最終目的は、ヒト branch point を予測することであった。しかし、branch point sequence の degeneracy が予想以上に高くアルゴリズムの構築は困難であった。

Exon 5' 末端の点変異の splicing への影響の研究は、各種ミニ遺伝子の構築に予想以上の時間が掛かっている。

<今後の課題>

昨年度に行った 5' splice site の研究、本年度行った branch point 研究、さらに、現在精力的に進めている exon 5' 末端の点変異研究の知識を融合することにより、ヒトにおける splicing cis-elements の splicing signal 強度の統合的な指標を算出するアルゴリズムを構築したい。さらに、exonic splicing enhancer などの splicing cis-elements の解析ツールとの統合を目指し、splicing 制御の正常と病態を網羅的に解析するツールの開発を目指したい。

<成果公表リスト>

1) 論文

1. 0801291427

Sahashi K, Masuda A, Matsuura T, Shinmi J, Zhang Z, akeshima Y, Matsuo M, Sobue G, Ohno K. In vitro and in silico analysis reveals an efficient algorithm to predict the splicing consequences of mutations at the 5' splice sites. Nucleic Acids Research, 35, 5995-6003 (2007).

2. 0801291432

Ichihara M, Murakumo Y, Masuda A, Matsuura T, Asai N,

Jijiwa M, Ishida M, Shinmi J, Yatsuya H, Qiao S, Takahashi M, Ohno K. Thermodynamic instability of siRNA duplex is a prerequisite for dependable prediction of siRNA activities. Nucleic Acids Research, 35, e123 (2007).

3. 0801291434

Saito T, Amakusa, Y, Kimura T, Yahara O, Aizawa H, Ikeda Y, Day JW, Ranum LPW, Ohno K, Matsuura T. Myotonic dystrophy type 2 in Japan: ancestral origin distinct from Caucasian families. Neurogenetics, in press(2008).

2) データベース/ソフトウェア

なし