

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2008～2013

課題番号：20112004

研究課題名(和文)タンパク質の多様性の鍵となるスプライシング暗号解読

研究課題名(英文)Deciphering Splicing Codes for Proteome Diversity.

研究代表者

黒柳 秀人(KUROYANAGI, Hidehito)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：30323702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 72,600,000円、(間接経費) 21,780,000円

研究成果の概要(和文)：mRNA前駆体の選択的スプライシングは、ひとつの遺伝子から多様なタンパク質を造り出す重要な遺伝子発現制御機構である。本研究では、各種の選択的スプライシング制御因子の変異体線虫を利用して、各制御因子の標的遺伝子を網羅的に同定し、それらの塩基配列を基に蛍光スプライシングレポーターを作製して生体内での選択性のパターンを明らかにするとともに、選択的スプライシングを制御するシスエレメントの同定を行って、線虫の個体レベルでの選択的スプライシング制御機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Alternative processing of precursor messenger RNAs (pre-mRNAs) is a major source of protein diversity and plays crucial roles in development, differentiation and diseases in higher eukaryotes. We have been utilizing multi-chromatic fluorescence alternative processing reporter system to visualize tissue-specific and/or developmental alternative processing patterns in living worms and isolated mutants defective in alternative processing regulation. Here we performed transcriptome analysis of the mutant worms, identified many novel target events for the regulators, analyzed their expression patterns in vivo and predicted and experimentally identified cis-elements for the regulators to reveal the "splicing code" in living organisms.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：mRNA前駆体 選択的スプライシング 線虫 蛍光レポーター シスエレメント 大規模シーケンシング 組織特異性

1. 研究開始当初の背景

mRNA 前駆体の選択的スプライシングは、ひとつの遺伝子から多様なタンパク質を造り出す機構であり、2 万数千個程度しかない遺伝子からタンパク質発現の時間的・空間的多様性を生み出すための最も重要な機構であると考えられている。ヒトでは実際に多くの遺伝子が発生段階依存的・組織特異的な選択的スプライシングを受けることが示されており、多細胞生物の複雑化、多様化は、転写と並んで選択的スプライシングレベルでの遺伝子発現制御の多様化によって可能になったと考えられる。

研究開始当初までの網羅的解析により、ヒトではタンパク質遺伝子の 3 分の 2 (現在では 90% 以上) が複数の mRNA アイソフォームを持つことが明らかとなっていた。生体内の各細胞においてこのようなさまざまな遺伝子の選択的スプライシングをそれぞれに秩序立てて制御する機構は「スプライシング暗号」と総称されるが、選択的スプライシングの制御因子の数よりも標的遺伝子の数が圧倒的に多いという事実から、スプライシング暗号には制御因子の共通性や協調性に伴う何らかの規則性が存在することが想定される。

スプライシング制御機構の解明には、主に培養細胞やその抽出液が用いられ、選択的エクソンや隣接するイントロンに存在するシスエレメントとそれに結合する制御因子によってそれぞれ正または負に制御され、そのバランスによって選択的エクソンの最終的な運命が決定する、という基本的なモデルが受け入れられていた。しかし、多細胞生物の生体レベルでの解析の困難さゆえに、このモデルの生体での検証や、選択的スプライシングの時間的、空間的制御に必要な制御因子とシスエレメントの同定は遅れていた。

代表者らは、蛍光タンパク質遺伝子を用いて生体における選択的スプライシングパターンを細胞レベルで可視化できる選択的スプライシングレポーター作製法を開発した。そして、線虫をモデル生物として用いることで、生体内で各細胞における選択性をプロファイリングできること、選択性制御に必要なシスエレメントを同定できること、制御因子の変異体を単離して遺伝子を同定できることを示していた。さらに、2 種類の制御因子が隣り合うシスエレメントに協働的に結合することにより、組織特異的な選択的スプライシングが精巧に制御される例や、イントロン除去の順序が選択的スプライシング制御に深く関わることを明らかにした。これらの過程で、選択的スプライシングの制御には複数のシスエレメントと複数の制御因子が関与する例が多いこと、ひとつの制御因子がエクソン使用を促進する場合も抑制する場合もあることを見出し、スプライシング暗号解読のためには、個々の制御因子の性質をひとつずつ体系的に明らかにしたうえで、制御

因子間の相互作用による互いの機能への影響を体系的に明らかにする必要があるとの認識に至った。

2. 研究の目的

本研究では、代表者らが研究開始当初までに得ていた各種の選択的スプライシング制御因子の変異体線虫を利用して、(1)各制御因子の標的遺伝子を網羅的に探索、同定すること、(2)同定した標的遺伝子の塩基配列を基に選択的スプライシングを制御するシスエレメントの配列を予測し、選択的スプライシングレポーター作製法を利用して、発現する組織や発生段階依存性を生体レベルで明らかにし、予測されたシスエレメントの改変実験により機能を実験的に検証することを通じて、多細胞生物の個体においてタンパク質多様性の鍵となるスプライシング暗号の解読に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RNA-seq 法によるスプライシング制御因子の標的エクソンの網羅的探索

異なる線虫株のトランスクリプトームを定量的に比較解析する方法をとって、線虫を L1 期で同調させ、全 RNA を抽出後ポリ A(+) RNA 精製を 2 度繰り返してから化学的に断片化し、ランダムプライマーで逆転写し、第二鎖を合成して大規模シーケンスすることで、比較的条件を揃えて解析が行えることを確認した。また、スプライシング異常により生じた mRNA が品質管理機構によって分解され検出されにくくなるのを防ぐため、品質管理機構に必須の *smg-2* 遺伝子とスプライシング制御因子の二重変異体が生存可能なものについては作製、使用した。東京大学の鈴木稔准教授 (現教授) と共同で、野生型の他、*asd-1*; *fox-1* 二重変異体、*asd-2* 変異体、*smg-2* 変異体、*smg-2 unc-75* 二重変異体など制御因子変異体株の mRNA のシーケンスを行った。得られたシーケンスタグを線虫ゲノム配列に対してマッピングし、遺伝子当たりおよび各エクソン当たりのタグの頻度を計数した他、エクソン-エクソン境界当たりのタグを計数した。得られたタグ頻度データを基に、各エクソンやエクソン-エクソン境界上のタグの遺伝子全体に対する相対的出現頻度が野生型と比較して増加しているもの、あるいは減少しているものを点数化する方法を開発し、制御因子の標的エクソンの候補リストを作成した。リストで上位となった事象について、野生型と変異体におけるスプライシングパターンの差異を RT-PCR 法で検証した。

(2) 選択的スプライシングレポーター作製法とシスエレメントの実験的検証

(1)で確認された各制御因子の標的事象を、制御因子によって促進されるものと抑制されるものに分類し、それぞれの事象群について、標的スプライス部位の上流イントロン、下流イントロン、エクソンの配列に濃縮する

配列を生物情報学的に探索して、シスエレメントの候補配列とした。

代表者がこれまでに培った知見や改良した蛍光タンパク質カセットを利用して、それぞれの標的エクソンのスプライシングパターンをモニターするためのレポーターミニ遺伝子を作製し、トランスジェニック線虫を作製して選択的スプライシングレポーター線虫を作製した。蛍光顕微鏡を用いて生体内での蛍光タンパク質の発現パターンを確認した。また、レポーターミニ遺伝子の予測されたシスエレメントに塩基置換や挿入変異を導入して、予測シスエレメントが実際に生体でどの組織での選択的スプライシング制御に必須であるか実験的に検証した。

試験管内 RNA-タンパク質結合試験：制御因子の組換えタンパク質と放射性同位元素標識 RNA プローブを用いて、紫外線架橋実験およびゲルシフト実験により、制御因子がシスエレメントに直接かつ配列特異的に結合するか検証した。

4. 研究成果

液胞型 ATPase の V_0 複合体 α サブユニット遺伝子 *unc-32* の 2 組の相互排他的エクソンが組織特異的に制御されることを明らかにし、エクソン 7a が神経系特異的に選択されるための制御因子として RBFOX ファミリースプライシング制御因子 ASD-1, FOX-1 と神経系特異的な CELF ファミリー RNA 結合タンパク質 UNC-75 を同定した (*PLoS Genet*, 2013)。

野生型および *unc-75* 変異体の線虫株のトランスクリプトーム解析を行い、UNC-75 の標的となる合計 24 の選択的スプライシング事象を同定し、生物情報学的解析とレポーター作製により、上流イントロンの (G/U)UGUUGUG が選択的エクソンの抑制に、下流イントロンの同配列が選択的エクソンのスプライシング促進に必要な UNC-75 による神経系特異的スプライシング制御のシスエレメントであることを同定した (*Nucleic Acids Res*, 2013)。これらの成果は、CELF ファミリーによる神経系特異的スプライシング制御機構の解明に貢献した。

同様の手法で、RBFOX ファミリーの二重変異体でスプライシングパターンが変化する 38 の選択的スプライシング事象を同定し、標的遺伝子の選択性が様々な組織特異性を示すこと、シスエレメントとして (U)GCAUG を同定し、シスエレメントの位置依存的に RBFOX ファミリーがスプライシングの促進と抑制の双方向の機能を持つことを明らかにした (投稿準備中)。

武藤裕班員との共同研究で、FGF 受容体遺伝子 *egl-15* の筋特異的選択的スプライシングが RBFOX ファミリーの ASD-1 と筋特異的スプライシング制御因子 SUP-12 により協働的に制御される機構を構造生物学的に明らかにした。さらに、同様のシスエレメントの配置を持つ遺伝子を探索し、*cle-1* 遺伝子のエク

ソン 16 が同様に RBFOX ファミリーと SUP-12 により制御されていることを見出した (投稿中)。

線虫の 2 種類のコフィリンをコードする *unc-60* 遺伝子の筋組織特異的な選択的プロセシングの制御因子として ASD-2 と SUP-12 を同定し、それぞれのシスエレメントも同定して、筋組織における *unc-60* mRNA 前駆体のプロセシングパターン決定機構を明らかにした (*PLoS Genet*, 2012; *Worm*, 2013)。

さまざまな遺伝子から効率的にスプライシングレポーターミニ遺伝子を作製し、制御因子変異体のスクリーニングやシスエレメントの同定を行うための詳細な方法論を確立した (*Nat Protoc*, 2010)。

線虫で相互排他的エクソンを持つと予測された全 55 事象について、L1 期と成虫期で RT-PCR により実験的に検証し、これらのうち実際に 27 遺伝子中の 29 組のエクソン群が相互排他的に選択されていることを明らかにし、この生物の相互排他的選択的スプライシングの特徴を明らかにした (*Worm*, 2014)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Kuroyanagi H, Takei S, Suzuki Y. Comprehensive analysis of mutually exclusive alternative splicing in *C. elegans*. **Worm**. 3: e28459, 2014. (査読有)
2. 木村まり子, 黒柳秀人. New Technology 選択的スプライシング可視化システム. **Medical Science Digest** 39: 502-503, 2013. (査読無)
3. Hidehito Kuroyanagi. Switch-like regulation of tissue-specific alternative pre-mRNA processing patterns revealed by customized fluorescence reporters. **Worm** 2: e23834, 2013. (査読有) doi: 10.4161/worm.23834.
4. Kuroyanagi H, Watanabe Y, Hagiwara M. CELF family RNA-binding protein UNC-75 regulates two sets of mutually exclusive exons of the *unc-32* gene in neuron-specific manners in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS Genetics**. 9: e1003337, 2013. (査読有) DOI: 10.1371/journal.pgen.1003337.
5. Kuroyanagi H, Watanabe Y, Suzuki Y, Hagiwara M. Position-dependent and neuron-specific splicing regulation by the CELF family RNA-binding protein UNC-75 in *Caenorhabditis elegans*. **Nucleic Acids Research**. 41: 4015-4025, 2013. (査読有) doi: 10.1093/nar/gkt097.
6. Iwasa H, Maimaiti S, Kuroyanagi H, Kawano S, Inami T, Ikeda M, Nakagawa K, Hata Y. Yes-associated protein homolog, YAP-1, is involved in the thermotolerance and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Cell Research**. 319: 931-945,

2013. (査読有)
doi: 10.1016/j.yexcr.2013.01.020.
7. Iwasa H, Kuroyanagi H, Maimaiti S, Ikeda M, Nakagawa K, Hata Y. Characterization of RSF-1, the *Caenorhabditis elegans* homolog of the Ras-association domain family protein 1. **Experimental Cell Research**. 319: 1–11, 2013. (査読有) doi: 10.1016/j.yexcr.2012.10.008.
8. Ohno G, Ono K, Togo M, Watanabe Y, Ono S, Hagiwara M, Kuroyanagi H. Muscle-Specific Splicing Factors ASD-2 and SUP-12 Cooperatively Switch Alternative Pre-mRNA Processing Patterns of the ADF/Cofilin Gene in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS Genetics**. 8: e1002991, 2012. (査読有)
doi: 10.1371/journal.pgen.1002991.
9. Kuroyanagi H, Ohno G, Sakane H, Maruoka H, Hagiwara M. Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation *in vivo* using fluorescence reporters in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Nat. Protoc.** 5, 1495-1517 (2010). (査読有)
doi: 10.1038/nprot.2010.107.
10. Kuroyanagi H. Fox-1 family of RNA-binding proteins. **Cell. Mol. Life Sci.** 66, 3895-3907 (2009). (査読有)
doi: 10.1007/s00018-009-0120-5.

[学会発表](計17件)

1. 黒柳秀人. mRNA 前駆体の選択的プロセッシングパターンを可視化して解析する. 日本農芸化学会中部支部第169回例会若手シンポジウム、岐阜大学 サテライトキャンパス、岐阜市、2013年11月9日.
2. 武井理美. 線虫 *rp* 遺伝子の選択的スプライシング制御機構の解析. 東京地区線虫勉強会、東京大学浅野キャンパス、東京都文京区、2013年9月28日.
3. 黒柳秀人. 蛍光タンパク質レポーターを用いた mRNA 前駆体の転写後プロセッシング制御機構の遺伝学的解析. 日本遺伝学会第85回大会、慶應義塾大学 日吉キャンパス、横浜市、2013年9月19-21日.
4. 武井理美, 黒柳秀人. 線虫 *rp* 遺伝子の選択的スプライシング制御機構の解析. 第15回日本RNA学会年会、松山市、2013年7月24-26日.
5. Takei, S., & KUROYANAGI, H. Ribosomal Protein L1 regulates alternative splicing of its own pre-mRNA. 19th International *C. elegans* Meeting. 米国カリフォルニア州ロサンゼルス市、2013年6月26-30日.
6. Genta Ohno, Kanako Ono, Marina Togo, Yohei Watanabe, Shoichiro Ono, Masatoshi Hagiwara, Hidehito Kuroyanagi. Muscle-Specific Splicing Factors ASD-2 and SUP-12 Cooperatively Switch Alternative Pre-mRNA Processing Patterns of the ADF/Cofilin Gene in *C. elegans*. Cold Spring Harbor Asia conferences on RNA Biology. 中国蘇州市、2012年10月8-12日.
7. 黒柳秀人, 都甲麻理奈, 渡辺要平, 萩原正敏. 普遍的に発現する RNA ポリメラーゼ II 会合タンパク質 LST-3 は mRNA 前駆体の転写と選択的スプライシングを制御する. 第14回日本RNA学会年会、東北大学、2012年7月18-20日.
8. Genta Ohno, Kanako Ono, Yohei Watanabe, Marina Togo, Shoichiro Ono, Masatoshi Hagiwara, Hidehito Kuroyanagi. ASD-2 and SUP-12 cooperatively regulate muscle-specific alternative splicing of the ADF/cofilin gene in *C. elegans*. NTU-JST Joint Meeting on RNA & Biofunctions - Asia Studies, 台北、台湾、2011年11月.
9. KUROYANAGI, H., & Hagiwara, M. FOX-1 family and UNC-75 regulate neuron-specific alternative splicing of the *unc-32* gene. 18th International *C. elegans* Meeting. 米国カリフォルニア州ロサンゼルス市、2011年6月22-26日.
10. Ohno, G., Ono, S., Hagiwara, M., & KUROYANAGI, H. ASD-2 and SUP-12 regulate the muscle-specific alternative splicing of actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin. 4th East Asia *C. elegans* Meeting. 2010年7月11-14日. 東京都渋谷区.
11. Reborá, K., Zníber, I., Guignard, L., Ohno, G., KUROYANAGI, H., Fontrodona, L., Ceron, J., & Schwartz, S. J.. Quantitative screen for alternative splicing regulation factors *in vivo*. 2010年7月11-14日. 東京都渋谷区.
12. 黒柳秀人. Regulation of Tissue-Specific Alternative Splicing in *C. elegans*. The 19th CDB Meeting "RNA Sciences in Cell and Developmental Biology". 2010年5月10-12日. 理化学研究所、神戸市.
13. 大野源太, 斧正一郎, 萩原正敏, 黒柳秀人. 選択的スプライシングが線虫の筋肉異常を回復する. 第32回日本分子生物学会年会. 2009年12月. 横浜市.
14. 黒柳秀人. 生体における選択的スプライシングの可視化と制御機構の解析. 第82回日本生化学会. 2009年10月. 神戸市.
15. Kuroyanagi H, Hagiwara M, Fox-1 family and CELF family RNA-binding proteins regulate neuron-specific alternative splicing in *C. elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on EUKARYOTIC mRNA PROCESSING, 2009年8月, Cold Spring Harbor, NY, USA.
16. REBORÁ, K. G. M., ZNÍBER, I., OHNO, G., KUROYANAGI, H., FONTRODONA, L., CERON, J., Jr, S. S., & DUPUY, D. Quantitative screen for alternative splicing regulation factors *in vivo*. 17th International *C. elegans* Meeting. 米国カリフォルニア州ロサンゼルス市、2009年6月24-28日.
17. KUROYANAGI, H., Kikuchi, Y., & Hagiwara, M. Auto-regulation of *asd-1*, a Fox-1 family alternative splicing regulator. 17th International *C. elegans* Meeting. 米国カリフォ

ルニア州ロサンゼルス市、2009年6月24-28日。

〔図書〕(計 4件)

1. Kuroyanagi H, Takeuchi A, Nojima T, Hagiwara M. Chapter 28: Single cell detection of splicing events with fluorescent splicing reporters. In Alternative pre-mRNA Splicing: Theory and Protocols (Stamm S, Smith C, and Lührmann R, Eds.), pp 298-309, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2012).
2. 大野源太, 黒柳秀人. 選択的スプライシングの分子機構と生命現象. 実験医学 増刊号「拡大・進展を続けるRNA研究の最先端」28, 1591-1596 (2010).
3. 黒柳秀人. みにれびゅー「選択的pre-mRNA スプライシング制御機構解明への新たなアプローチ」. 生化学 82, 402-411 (2010).
4. 黒柳秀人. 選択的スプライシングの可視化と制御機構解明への応用. 蛋白質 核酸 酵素 増刊「mRNA プログラム」 54, 2044-2048 (2009).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/end/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

黒柳 秀人 (KUROYANAGI, Hidehito)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：30323702