

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500269
 研究課題名（和文） 中枢神経系におけるプロテオームの多様化創出と部位特異的発現制御メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Decipher the mechanism to generate proteome diversity with area specificity in mammalian central nervous system

研究代表者
 武内 章英（TAKEUCHI AKIHIDE）
 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
 研究者番号：90436618

研究成果の概要：

中枢神経系におけるプロテオームの多様性創出と部位特異的発現制御メカニズムの解明のために、モデル遺伝子として線維芽細胞増殖因子受容体2、Fibroblast Growth Factor-Receptor2(FGFR2)遺伝子を用いて以下の解析を行った。FGFR2は選択的スプライシング制御により、哺乳類の発生段階で組織特異的に構造と機能を変えることが知られており、この構造と機能の切り替えが、哺乳類の発生においてきわめて重要なことがこれまで示されている。マウスの発生過程での神経系を含む全身でのスプライシング・パターンの検討、スプライシング制御に関与する遺伝子構造（シス配列）の同定、遺伝子構造（シス配列）に結合するトランス因子（RNA結合タンパク質）の同定、スプライシング制御メカニズムと制御ルールの解明を行った。まずFGFR2のスプライシング・レポーターシステムの開発を行い、世界で初めて内在性の組織特異的な相互排他的選択的スプライシング制御をきれいに反映する実験系の開発に成功した。

このレポーター系を用いて、FGFR2の選択的スプライシング制御に重要な2つの遺伝子構造（シス配列、UGCAUG配列およびISE/ISS-3配列）を同定できた。さらに、このシス配列に結合するRNA結合タンパク質として、FoxおよびESRPを同定した。

この2つの因子がFGFR2のpre-mRNAのシス配列に結合することにより、選択されやすさに優劣のある2つの相互排他的エクソンの認識を変化させて、スイッチを切り替えるように1つのエクソンのみの選択を可能にしていることを見出した。さらに、この2つのエクソンの組織特異的な制御は、進化的に保存されたメカニズムとして、全身性に発現するRNA結合タンパク質と組織特異的に発現するRNA結合タンパク質の組み合わせによりなされていることが分かり、スプライシング制御の暗号を解読する上で重要な発見となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経科学一般

キーワード：(1)選択的スプライシング制御 (2)相互排他的スプライシング制御 (3)組織特異的スプライシング制御 (4)スプライシング・レポーター (5)スプライシング・レポーターマウス (6)Fibroblast Growth Factor Receptor2 (7)RNA 結合タンパク質 (8)スプライス・サイト認識

1. 研究開始当初の背景

ゲノムプロジェクトの成果から、哺乳類の全遺伝子数は約 23000 個程度と、当初の予想の 10 万個よりはるかに少ないことが分かった。遺伝学のモデル動物として使われるショウジョウバエの全遺伝子数が約 14000 個、同じく体長が 1 ミリ足らずの線虫のそれが約 20000 個と、高度で複雑な機能を持つ人間の遺伝子数とほとんど差のないことも同時に明らかとなった。人間などの哺乳類の個体発生および臓器や細胞の機能の発現には、設計図である遺伝子からパーツとなるタンパク質が作られることが必須であるが、23000 個程度の遺伝子数で、いったいどのようにこの複雑な哺乳類の発生および生体の活動の全体を調節しているのだろうか？この疑問に答えるために、遺伝子のバリエーションを増やすメカニズムに着目し、遺伝子の転写後調節機構（選択的スプライシング制御）がプロテオームの多様性創出と部位特異的発現制御をどのように生み出すか検討を行った。

2. 研究の目的

選択的スプライシングの欠損がヒトにおいて重大な神経障害や重篤な疾患をおこすことから、スプライシング調節によるタンパク質の多様性創造メカニズムが、発生や生体機能の調節機構の重要性が明らかになりつつあるが (Caceres J.F. and Kornblihtt A.R., *Trends Genetics* Vol. 18 No. 4, p186-193, 2002)、どのような分子やメカニズムによりそれが調節されているのかは、まだほとんど分かっていない。個体や脳の発生や生命活動の中で、どのような調節分子の相互作用により選択的スプライシングが制御されているかを解き明かすことにより、哺乳類の発生過程や神経系の発生および臓器や細胞ごとの機能発現において、スプライシングを介して 1 つの遺伝子から多様なタンパク質が目的にあった形で部位特異的に発現する機構の解明を目指し、さらに現在まだブラックボックスの多い中枢神経を含む哺乳類の発生の分子メカニズムのブレイクスルーとなることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 実際のマウスの発生段階でのスプライシング制御のモニターを行うために、スプライシングのレポーター実験系を作成し、生体内でのスプライシング制御ダイナミズムのデータを集めるとともに、スプライシングを制御すると推定される分子のスクリーニングと機能解析を行った。具体的には、数種類の蛍光物質をコードする遺伝子を用いて、スプライシングの違いにより発色パターンが異なるようなレポーター遺伝子ベクターを作成することにより、実際のスプライシング制御の様子を単一の細胞ごとに可視化できるスプライシング・レポーター系を樹立した。この選択的スプライシングのレポーター遺伝子ベクターからトランスジェニック・マウスを作成し、マウスの発生過程でのスプライシング・パターンの解析を行った。

(2) 作成したスプライシング・レポーターへの変異導入と、それによるスプライシング・パターンの変化を見ることにより、どのような遺伝子構造（シス配列）がマウスの発生過程での組織得的スプライシング制御に重要なかを同定した。さらに同定したシス配列に結合するトランス因子（RNA 結合タンパク質）を同定することにより、遺伝子構造（スプライシング調節のシス配列）と調節分子がどのように組織特異的な選択的スプライシング制御に関わっているか、その分子メカニズムの解析を行った。

(3) (2) で同定した、選択的スプライシング制御因子の発現パターンを詳細に調べ、(1) で作成したスプライシング・レポータートランスジェニック・マウスでのレポーターの組織得的なエクソンの発現パターンと比較することにより、同定した因子のうちどの因子が実際に *in vivo* で組織特異的な選択的スプライシング制御に関わっているかを明らかにし、さらにその因子がどのような分子メカニズムにより選択的スプライシング制御を行っているかを解析した。

4. 研究成果

(1) 世界で初めて、*in vivo*での組織特異的な相互排他的選択的スプライシング制御の正確な反映（可視化）に成功し、FGFR2のマウスの発生過程でのスプライシング制御の実態解明に重要な知見をもたらした。

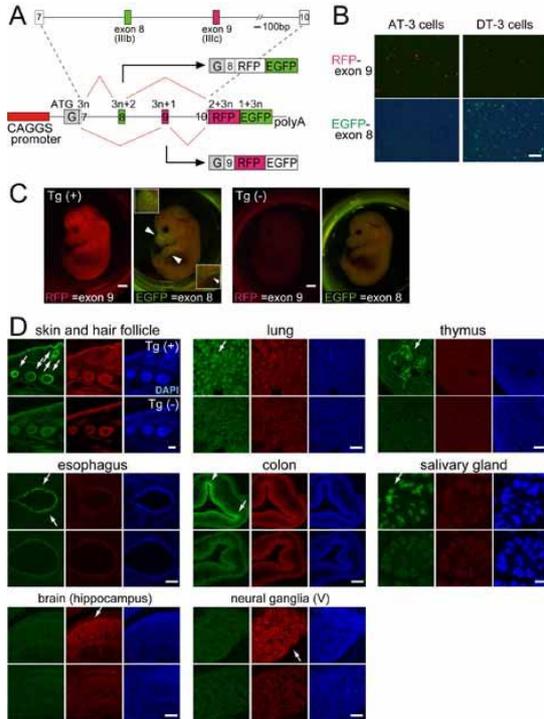


図1、我々の開発した、スプライシング・レポーター系の構造 (A)、分化度の異なる細胞株での発現パターン (B)、マウスの発生過程での全身での発現パターン (C, D)。

(2) (1)で作成したレポーターを用いて、FGFR2の組織特異的な選択的スプライシング制御に必要な2つの遺伝子構造（シス配列、UGCAUG配列およびISE/ISS-3配列）を同定できた。さらに、このシス・エレメントに結合するRNA結合タンパク質として、FoxおよびESRPを同定した。

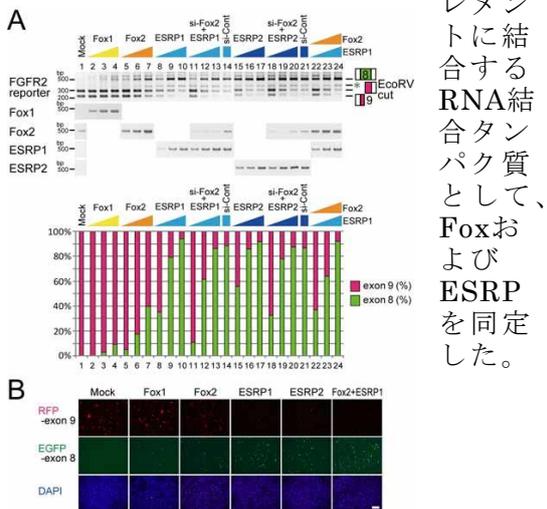


図2、RNA結合タンパク質、FoxおよびESRPにより、組織得的なスプライシング・パターンが完全に切り替わることを確認した (A, B)。

(3) RNA結合タンパク質、FoxおよびESRPが、マウスの発生過程で、組織特異的なエクソンの発現パターン変化と一致して誘導されていることを確認した。

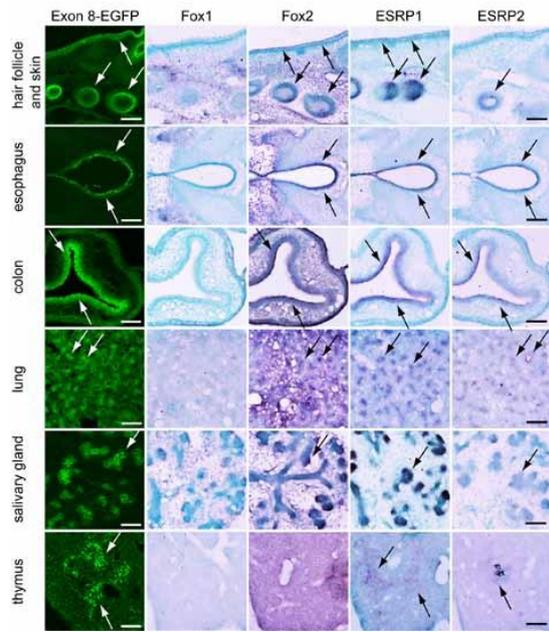
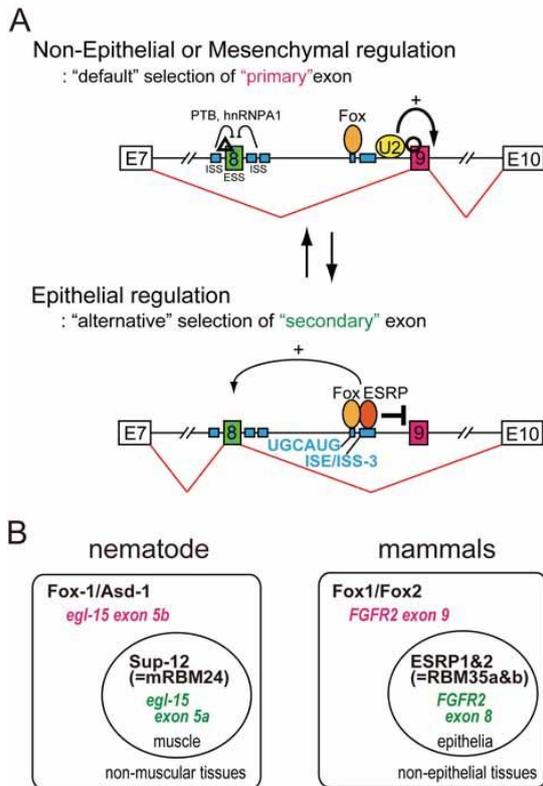


図3、マウスの発生過程における、FGFR2の上皮特異的なエクソン(exon 8-GFP)、間葉系特異的なエクソン(exon 9-RFP)の発現パターンと、Fox1, Fox2, ESRP1, ESRP2の発現パターン。Exon 8-GFPとFox2, ESRP1, ESRP2の発現がほぼ完全に一致したことから、(2)の実験も合わせて、Fox2, ESRP1, ESRP2がマウスの発生過程でのFGFR2の組織特異的な選択的スプライシング制御因子であると考えられた。

我々の一連の研究から、2種類のRNA結合タンパク質により、どのようなメカニズムにより2つのエクソンのうちの1つだけが選択され、そして切り替わるのかを説明することができ、「王手飛車」モデルと名付けて学会および論文に発表した (図4, A)。

また、組織特異的な選択的スプライシング制御には、種の進化上保存されたメカニズムが存在することを見出し、これにより複雑に見えていた「スプライシング暗号」にルールを見つけることができた。(図4, B)。



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 1件)

Splicing Reporter Mice Revealed the Evolutionally Conserved Switching Mechanism of Tissue-Specific Alternative Exon Selection.

Akihide Takeuchi, Motoyasu Hosokawa, Takayuki Nojima, Masatoshi Hagiwara

PLoS One (accepted on May 11, 2010)

[学会発表] (計 4件)

1) 武内章英、細川 元靖、萩原 正敏
Fibroblast Growth Factor Receptor をモデルとした、哺乳類における相互排他的エクソン選択機構の解析

第11回 RNA ミーティング

平成20年 7/27-29

新潟市朱鷺メッセ

2) Akihide TAKEUCHI, Motoyasu Hosokawa, Masatoshi Hagiwara

Visualization of Alternative Splicing of Fibroblast Growth Factor Receptor 2

Revealed the Mutually Exclusive Regulatory Mechanism

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Eukaryotic mRNA Processing

平成20年 8/18-22

Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.

3) 武内章英、細川 元靖、萩原 正敏

スプライシング・レポーターシステムを用いた、哺乳類における相互排他的エクソン選択機構の解明

RNA フロンティア・ミーティング 2009

平成20年 9/26-28

湘南国際村 IPC 生産性国際交流センター

4) 武内章英、細川 元靖、萩原 正敏

スプライシング・レポーターにより明らかになった、哺乳類における組織特異的な相互排他的エクソン選択機構(「王手飛車」制御メカニズム)

第32回 日本分子生物学会年会

平成20年 12/9-12

パシフィコ横浜

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.tmd.ac.jp/mri/mri-end/research_pg2.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武内 章英 (TAKEUCHI AKIHIDE)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号: 90436618

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

萩原 正敏 (MASATOSHI HAGIWARA)

東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学研究所

教授

研究者番号: 10208423

黒柳 秀人 (HIDEHITO KUROYANAGI)

東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学研究所

准教授

研究者番号: 30323702