

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月16日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510204

研究課題名（和文） U1 に依存しない新規スプライシング機構の解明

研究課題名（英文） Mechanism of U1 snRNP-independent splicing

研究代表者

井上邦夫（INOUE KUNIO）

神戸大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40252415

研究成果の概要（和文）：

mRNA 前駆体におけるスプライシング初期過程において、U1 snRNP は 5' スプライス部位の認識に不可欠とされているが、私達はヒト F1 γ 遺伝子の第 9 イントロンが U1 に依存しないスプライシングを受けることを見出している。本研究では、F1 γ 遺伝子における U1 非依存型スプライシングが、Fox 蛋白質による選択的スプライシング制御に必要なことを明らかにした。また、U1 snRNP 機能を阻害した試験管内実験系において、制御シス配列領域の同定を行い、このスプライシング機構の解明を進めている。

研究成果の概要（英文）：

Many eukaryotic genes are interrupted by introns that are removed from primary transcripts by RNA splicing. U1 snRNP plays a crucial role in the 5' splice site recognition during splicing. Recently, we found the first example of naturally-occurring U1-independent U2-type splicing in humans. Our present study showed that a tissue-specific splicing regulator, Fox-1, failed to induce hF1 γ exon 9 skipping if the 5' splice site of intron 9 was mutated to the U1-dependent type, suggesting that U1-independent splicing contributes to the regulation of alternative splicing of a class of pre-mRNAs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム発現、スプライシング、イントロン、スプライス部位、U1 snRNP、熱ストレス

1. 研究開始当初の背景

真核生物の多くの遺伝子がイントロンと呼

ばれる介在配列によって分断化されている。このため、mRNA 前駆体におけるスプライシングは、ゲノム情報発現に必須の過程である。

この反応では、長大な一次転写産物中から正しい組み合わせのスプライス部位を識別し、正確にイントロン除去・エキソン連結を行う必要がある。一方で、スプライシング様式を巧妙に変化させる選択的スプライシングによって、限られた数の遺伝子から多様かつ時空間特異的な蛋白質発現が可能となっている。さらに、ヒト遺伝性疾患における変異のうち、少なくとも 15 パーセントがスプライシング異常を引き起こすと推定されている。しかし、偽スプライス部位と正しいスプライス部位の選別機構や、スプライス部位の組み合わせの決定機構については多くの謎が残っているのが現状である。

スプライシングは、5 種類の核内低分子 RNA (一般的な GT-AG 型イントロンの場合、U1, U2, U4, U5, U6 snRNA) と 300 種にも及ぶ蛋白質の会合・解離を伴うダイナミックな反応である。スプライシング反応に必要なシス配列は、イントロン末端の 5' スプライス部位と 3' スプライス部位、および、3' スプライス部位上流のブランチ部位とピリミジン配列である。スプライシング装置であるスプライソソームの形成初期段階には、U1 snRNP が RNA の相補対合によって 5' スプライス部位に会合するとともに、U2AF などの相互作用を介して U2 snRNP がブランチ部位に会合する (マイナーな AT-AC 型イントロンの場合には、U11 と U12 が U1 と U2 を代替)。このように、U1 や U2 はスプライス部位の初期認識段階 (あるいはエキソン領域の認識) に不可欠な因子である。しかし、U1 snRNP はその後の過程でスプライソソームから解離し、RNA 切断・再結合の触媒活性を有する活性型スプライソソーム中には含まれない。Sharp のグループは、ショウジョウバエ *fushi-tarazu* (*ftz*) 遺伝子の場合、通常のスプライス部位配列を持つにもかかわらず、U1 snRNP を除去した核抽出液を用いた *in vitro* 系においてもスプライシング反応が阻害されないことを示している (Crispino et al, RNA, 1996)。しかしながら、このような U1 snRNP に依存しないスプライシングの分子機構は全く解明されておらず、生理的な意義についても不明であった。

2. 研究の目的

私達は、ヒトミトコンドリア ATP 合成酵素 γ サブユニット (以下 F1 γ と呼ぶ) mRNA 前駆体の第 9 イントロンにおいて、U1 snRNP に依存しないスプライシングが行われていることを見出している。人工的な基質を除けば、これは、哺乳類の遺伝子としてははじめての知見であり、哺乳類のゲノム情報発現過程を理解する上で U1 snRNP に依存しないスプライシング機構を理解することは不可欠と考

えられた。そこで、本研究では、(1) F1 γ 遺伝子をモデルとして U1 snRNP に依存しない新規スプライシング反応の分子メカニズムを明らかにする、(2) U1 非依存的にスプライシングされる遺伝子群を探索し、この機構の一般性を検証するとともに、(3) U1 非依存的スプライシングの生理的な役割に光を当て、ゲノム情報発現における意義を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト F1 γ 遺伝子のエキソン 8 からエキソン 10 迄のゲノム配列を含むミニ遺伝子をヒト培養細胞である HeLa 細胞にトランスフェクションにより導入・発現させる実験系を用いた。私達は、ヒト F1 γ mRNA 前駆体から、通常は第 9 エキソンを含む mRNA が生成されるが、Fox-1 蛋白質がイントロン 8 に結合することによって下流の第 9 イントロンのスプライシングを抑制し、結果としてエキソン 9 をスキップする筋肉型スプライシングが誘導されることを明らかにしている (図 1; Jin et al, EMBO J, 2003, Fukumura et al., Nucleic Acids Res., 2007)。そこで、ヒト F1 γ 遺伝子イントロン 9 の 5' スプライス部位について U1 snRNA と高い相補性を有する保存配列に置換した変異体を作成し、選択的スプライシング制御における効果を検討した。

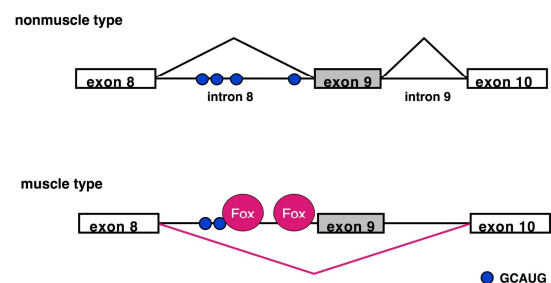


図 1. ヒト F1 γ 遺伝子における選択的スプライシング
Fox-1 蛋白質はエキソン 9 をスキップする筋肉型スプライシングを誘導する。

また、HeLa 細胞の核抽出液を用いた *in vitro* 実験系において、U1 snRNA に対するアンチセンス DNA を添加して U1 snRNP 機能を阻害した *in vitro* 実験系を構築し、さまざまな欠失変異や置換変異を導入したヒト F1 γ mRNA 前駆体を基質として用い、スプライシング解析を行った。さらに、同定したシス配列領域に結合する蛋白質の同定を進めた。さらに、同様の実験系で、ヒートショック遺伝子の mRNA 前駆体を用いたスプライシン

グ解析も行った。

4. 研究成果

(1) ヒト F1 γ 遺伝子の第9イントロンには U1 snRNP が結合せず、U1 snRNP に依存しないスプライシングが行われている。これに対し、5' スプライス部位の配列を保存配列に置換すると通常の U1 依存型のスプライシングが行われるようになった。

選択的スプライシング制御因子 Fox-1 蛋白質は、F1 γ mRNA 前駆体において、第9イントロンの抑制によってエキソン9のスキッピング誘導を行う。これに対して、第9イントロンを U1 依存型に置換した場合には Fox-1 蛋白質による誘導が行われなくなった (図2)。また、イントロン9の5' スプライス部位配列に相補的な配列を持つサプレッサー U1 snRNA を強制発現した場合にも、Fox-1 蛋白質による制御が阻害された。これらのことから、ヒト F1 γ 遺伝子における U1 snRNP に依存しないスプライシングは、Fox-1 蛋白質による選択的スプライシング制御に必須なことが明らかとなった。

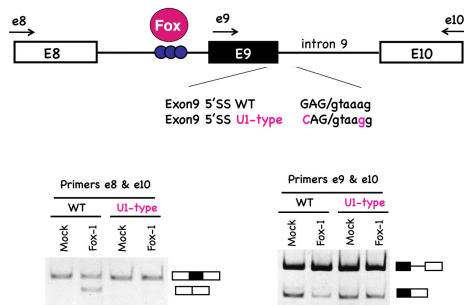


図2. ヒト F1 γ 遺伝子の選択的スプライシングにおける U1 snRNP 非依存型スプライシングの役割

イントロン9の5'スプライス部位をU1依存型部位に置換すると、Fox-1蛋白質によるエキソン9のスキッピング誘導が行われなくなった。

(2) U1 snRNP に依存しないスプライシングの分子機構を明らかにする目的で、U1 snRNP 機能を阻害した *in vitro* 実験系を構築して、さまざまな領域を改変したヒト F1 γ mRNA 前駆体を基質として U1 snRNP に依存しないスプライシング機構に必要な制御シス配列領域の同定を行った。さらに、この制御配列領域に相互作用する RNA 結合タンパク質を制御候補因子として同定し、培養細胞においてこの因子の RNA 干渉法 (RNAi) によるノックダウン実験を行うことにより U1 非依存的なスプライシングへの関与の検証を進めてい

るところである。

(3) 熱ストレス条件下では、一般に、U1 snRNP の機能阻害によって RNA スプライシングの抑制が起こることが報告されている。これに対し、いくつかのヒートショック遺伝子においては効率よいスプライシングが起こることから、これらの遺伝子では U1 snRNP に依存しないスプライシングが起こっているのではないかとの作業仮説 (図3) のもとに解析を進めてきたが、現時点でこの仮説を直接的に支持する結果は得られていない。

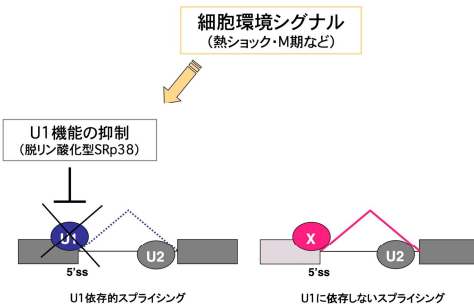


図3. U1 snRNP に依存しないスプライシングは熱ストレスによるスプライシング抑制の回避機構として働くか?

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2件)

- 1) Fukumura, K., and Inoue, K. (2009) Role and mechanism of U1-independent pre-mRNA splicing in the regulation of alternative splicing. *RNA Biol.* 6, 395-398.
- 2) Fukumura, K., Taniguchi, I., Sakamoto, H., Ohno, M., and Inoue, K. (2009) U1-independent pre-mRNA splicing contributes to the regulation of alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 37, 1907-1914.

[学会発表] (計2件)

- 1) 河村有砂, 山田 智子, 福村 和宏, 鈴木 仁, Vu, Luyen Thi, 塚原 俊文, 坂本 博, 井上 邦夫. 熱ストレスに応答した選択的スプライシング制御機構の解析. 第34回

日本分子生物学会年会 (2011年12月13日-12月16日 パシフィコ横浜)

- 2) Inoue, K. U1-independent splicing and the splicing regulation. 第32回日本分子生物学会・ワークショップ「多様性を生む RNA プログラム」招待講演 (2009年12月9日-12月12日 パシフィコ横浜)

[図書] (計1件)

- 1) 福村和宏、井上邦夫 (2009) エキソン認識と選択的mRNAスプライシング制御の分子メカニズム。蛋白質核酸酵素・増刊号 (共立出版) 59, 356-357

[その他]

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-rena/>

<http://www.edu.kobe-u.ac.jp/fsci-biol/staff/kunio.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 邦夫 (INOUE KUNIO)
神戸大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：40252415

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者