

自己評価報告書

平成 23 年 3 月 31 日現在

機関番号：12602

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

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 leading to diversity of proteome

研究代表者

黒柳 秀人 (KUROYANAGI HIDEHITO)

東京医科歯科大学・大学院疾患生命科学部・准教授

研究者番号：30323702

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：mRNA 前駆体、プロセシング、スプライシング、線虫、レポーター、選択的スプライシング、組織特異性、トランスクリプトーム解析

1. 研究計画の概要

mRNA 前駆体の選択的スプライシングは、タンパク質の時間的・空間的多様性を生み出すための最も重要な機構である。さまざまな遺伝子の選択的スプライシングを細胞特異的、発生段階依存的に制御する機構は「スプライシング暗号」と総称されるが、その実体解明はあまり進んでいない。研究代表者らは、これまでに、線虫をモデルとして、選択的スプライシング・パターンを生体内で可視化するための選択的スプライシング・レポーター作製法を開発して、選択的スプライシング・パターンのプロファイリング、制御因子変異体の単離、シスエレメントの同定を行ってきた。

本計画研究では、これまでに研究代表者らが得た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探索・同定すること、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・検証すること、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、標的エクソンとシスエレメントあるいはシスエレメント間の相対的位置関係や距離、制御因子のコピー数などをパラメータとして体系的な改変実験を行って、複数の制御因子によるスプライシング制御の協調性や拮抗作用などの規則性を明らかにすること、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する。

2. 研究の進捗状況

(1) RNA-seq 法

・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の検討を行い、株間や個体ごとの成長速度のばらつきの影響を最小限にするために、餌のない環境で孵化させて L1 幼虫期で同調させる方法に統一した。

・シーケンスのための前処理として、全 RNA を抽出後ポリ A(+) RNA を精製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てライブラリを調製した。

・東京大学の鈴木穰准教授と共同で、野生型その他、*asd-1*;*fox-1* 二重変異体、*asd-2* 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。

・鈴木准教授の協力により、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。

・上記で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模索し、制御因子の標的エクソンの候補リストを作成した。

・上記のリストで有望な標的エクソン候補が比較的多く予測された ASD-1/FOX-1 について、野生型と二重変異体におけるスプライシング・パターンを RT-PCR 法で検証し、これまでに、約 20 個程度の新規の標的エクソンを同定した。

(2) CLIP-seq 法

・本法では、線虫生体内で紫外線照射により内在性のスプライシング制御因子と結合している標的 RNA を架橋した後に、制御因子

と特異的に結合する RNA を免疫沈降により濃縮して、大規模シーケンシングにより同定する予定であったが、内在性の制御因子を免疫沈降できる抗体がうまく作製できないものが多く、これまでにシーケンスにまで至った因子はない。

・作製したウサギ抗 ASD-2 抗体は内在性の ASD-2 を免疫沈降できたが、ASD-2 は RNA との紫外線架橋の効率が悪いことが明らかとなり、CLIP-seq 法には向かない因子であると結論した。

3. 現在までの達成度

□おおむね順調に進展している。

(理由)これまでの研究期間の主要な目標は、選択的スプライシング制御因子の変異体を利用して、制御因子の標的エクソンを網羅的に探索する手法を確立することであったが、これまでに、RNA-seq 法の結果を利用することで効率的に標的エクソンを見出せるようになっており、上述の Fox-1 ファミリー以外に未発表の制御因子の標的エクソンも順次同定できているため。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 標的エクソンを制御するシスエレメントの予測: 制御因子 (RNA 結合タンパク質) は特定の RNA 配列を認識し特異的に結合して機能すると考えられることから、標的遺伝子群の mRNA 前駆体の配列を基に生物情報学的に多重配列整列やモチーフ発見等を用いて比較して、シスエレメントの予測を試みる。同属の 3 種の線虫における配列や位置の保存性、変異体における発現プロファイル変化の共通性にも着目する。

(2) 標的候補遺伝子群の選択性レポーター線虫の作製とシスエレメントの実験的検証: 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できるレポーター線虫を作製し、生体内での発現パターンを確認する。また、レポーターを制御因子変異体に導入して、内在性遺伝子同様の選択性異常を示すことを確認する。そして、予測したシスエレメントに変異を導入した変異型レポーターを作製して、予測シスエレメントが実際に生体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する。

(3) 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する。

(4) 制御因子によるスプライシング制御の規則性の検証: 上記までで得られた各制御因子

の標的エクソンとシスエレメント、変異体における発現プロファイル変化のリストを基に、標的エクソンとシスエレメントの相対的位置関係や距離、スプライス部位の配列、予測 2 次構造などをパラメータとして RNA map を作成する。さらに、RNA map から重要と予測されるパラメータを少しずつ改変した変異型ミニジーンを作製し、選択的スプライシング・レポーターの発現への影響を定量的に解析して、制御因子によるスプライシング制御の規則性を体系的、実験的に検証する。

生体内の多くの遺伝子のスプライシング制御では、申請者がこれまでに示してきたように、比較的幅広い組織で発現する Fox-1 ファミリー (ASD-1 と FOX-1) などの因子と組織特異的に発現する ASD-2, SUP-12 などの因子が協調して作用することで遺伝子特異性や組織特異性が発揮されていると考えられる。これまでに検証した Fox-1 ファミリーの標的エクソンのなかには、Fox-1 ファミリー変異の影響を強く受けるもの、中程度のもの、余り影響を受けないものがあり、主たる制御因子と従属的な因子の役割分担など複数の因子間の協調性に何らかの規則性が存在することを示唆している。そこで、現在先行して解析している Fox-1 ファミリーの制御因子 ASD-1, FOX-1 に加えて、ASD-2, SUP-12 などでも同様の解析を並行して進めることで、さまざまな組織特異的選択的スプライシング制御機構ネットワークの全容解明を目指す。

5. 代表的な研究成果

(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)

Hidehito Kuroyanagi, Genta Ohno, Hiroaki Sakane, Hiroyuki Maruoka & Masatoshi Hagiwara (2010). Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation *in vivo* using fluorescence reporters in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Nature Protocols** 5: 1495-1517. (査読有)

[学会発表](計6件)

[図書](計4件)

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 2009年12月号増刊「mRNA プログラム」(共立出版) 稲田利文・大野睦人編