

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19510203
 研究課題名（和文） 生体内選択的スプライシング可視化技術によるスプライシング制御機構の解析
 研究課題名（英文） Elucidation of alternative splicing regulation mechanisms by utilizing *in vivo* visualization system.
 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

研究成果の概要：研究代表者らが開発した、蛍光タンパク質を利用した生体内選択的スプライシング可視化線虫作製技術を応用して、線虫 *C. elegans* の *egl-15* 遺伝子の筋特異的選択的スプライシングおよび *let-2* 遺伝子の発生段階依存的選択的スプライシングの可視化に成功し、生体における制御機構を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：選択的スプライシング、蛍光タンパク質、レポーター、線虫、シス・エレメント

1. 研究開始当初の背景

ヒトを初めとする多くの生物のゲノムプロジェクトの成果から、たとえば哺乳類の全タンパク質遺伝子数が約2万数千個程度と、当初予想された数よりはるかに少ないことが分かってきている。一方で、ゲノムには microRNA など遺伝子発現制御の多様性を可能にすると思われる non-coding RNA が多数コードされていることが明らかとなってきた。したがって、多細胞生物の生体における転写時や転写後のさまざまなレベルの遺伝子発現制御の実態を個々の細胞レベルの解像度で解析し、ゲノムの塩基配列に刻まれている発現制御の分子機構を明らかにしていくことが、高等生物の発生や細胞の分化に伴う遺伝子発

現制御の動的質的变化や多細胞生物の進化を理解する上で重要になってくると考えられる。

選択的スプライシングは、真核生物の多くの遺伝子で見られる、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る。実際に、多くの遺伝子で組織特異的や発生時期依存的に制御された選択的スプライシングが観察されること、選択的スプライシングにより機能が異なるタンパク質が産生されることから、選択的スプライシングが生物の複雑化、多様化を可能にする重要な機構であると考えられる。しかし、ヒトでは2万数千程度の遺伝子から10万種類以上のタンパク質が産生されており、近年の網羅的解析によりヒトではタンパク質をコードする遺伝子の3分の2

が何らかの mRNA アイソフォームを持つことが明らかとなった。このことは、選択的スプライシングの制御に関わり得る RNA 結合モチーフを持つ遺伝子の数よりも実際に制御を受けている標的遺伝子の数が圧倒的に多いことを意味しており、多くの標的遺伝子における選択的スプライシングの制御機構に共通性や協調性などの規則が存在することを予言している。このように生体内の各細胞においてさまざまな遺伝子の選択的スプライシングを秩序立てて制御する機構は“cellular codes”と総称されるが、その分子の実体の解明がこれからの課題である(Nat Rev Mol Cell Biol 6: 386, 2005)。

従来、真核生物の選択的スプライシングの制御機構については、試験管内におけるモデル遺伝子の mRNA 前駆体のスプライシングを細胞核抽出液を用いて生化学的に解析する手法や、培養細胞に遺伝子導入してモデル遺伝子ミニ・ジーンのスプライシング・パターンを解析するのが主流であり、生体における組織特異性についての解析は遅れている。しかしながら、選択的スプライシングが特殊な遺伝子に限られたものではなく、広範な組織、広範な遺伝子にさまざまな型の選択的スプライシングが見られることから、より普遍的な規則を見出すための方法論、生体における制御機構を明らかにするための方法論が待たれていた。

我々は以前までに、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モニターできるトランスジェニック線虫を作製することで、各組織・細胞における選択性を生体内でプロファイルできること、選択性の制御に必要なシス・エレメントを同定できること、選択性を制御するトランス因子の変異体を単離し原因遺伝子を同定できることを示した (Kuroyanagi et al, nature methods, 2006)。本研究課題は、この成果を発展させ、より広範に選択的スプライシングの制御機構の解明を目指したものである。

2. 研究の目的

選択的スプライシングの制御機構は、1つの標的遺伝子に複数のシス・エレメントが存在し、一方で1種類の RNA 結合タンパク質(トランス因子)が多数の標的遺伝子のシス・エレメントに結合することによって、複雑な制御を可能にしていると想定される。そこで、本研究課題では、我々のこれまでの研究成果である生体内選択的スプライシング可視化技術を適用する対象を拡大し、線虫で選択的スプライシングが見られるさまざまな内在性遺伝子群を基に、(1)約 20 遺伝子が存在す

る相互排他的エクソン型の選択的スプライシングについてレポーター線虫を網羅的に作製し選択性のプロファイリングを行うこと、ii) 多数存在するカセット・エクソン型の選択的スプライシングのうち発現特異性を示す遺伝子についてレポーター線虫を作製し、選択性のプロファイリングを行うこと、(2)選択的スプライシング異常の変異体をスクリーニングし原因遺伝子を同定すること、(3)選択性を制御するシス・エレメントを同定すること、を網羅的に行い、このモデル多細胞生物の生体における選択的スプライシングの制御機構の実験的解明、言い換えれば“cellular codes”の可視化と分子の実体の解明を行って、多細胞生物における遺伝子発現の時間的空間的制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)相互排他的エクソンの発現パターンの網羅的プロファイリング：我々がこれまでに開発した生体内選択的スプライシング可視化技術を改良・応用して、より多くのモデル遺伝子を基にレポーター線虫を作製し、選択的スプライシング・パターンのプロファイリングを行う。線虫では約 20 種類の遺伝子で相互排他的選択的エクソンが見られるが、この型には相互排他性を実現するために厳密な制御機構が存在する可能性が高く、優先的・網羅的にレポーター線虫を作製する。相互排他的エクソンによる選択的スプライシングの発現パターンを網羅的に解析するために、レポーター・ミニ・ジーンを網羅的に作製し、トランスジェニック線虫を作製する。

(2)スプライシング変異体の単離と原因遺伝子の同定：(1)で得られた組織または発生段階依存性を示す選択的スプライシング・レポーターを用いて、蛍光タンパク質の発現の選択性に異常を示す変異体を単離し、一塩基多型(SNP)を利用した遺伝子のマッピングにより原因遺伝子の同定を行う。

(3)選択性を制御するシス・エレメントの同定：同属の複数の種におけるゲノム配列の保存性から発現制御に必須のシス・エレメントを予測し、欠失や点置換を導入したミニ・ジーンを作製してトランスジェニック線虫を作製し、選択的スプライシングに与える影響を解析して、シス・エレメントを実験的に同定する。

(4)原因遺伝子産物とシス・エレメントの関係の解析：(1)で同定した制御因子が RNA 結合タンパク質であれば、(3)で同定したシス・エレメントに直接結合するか、放射性同位元素標識した RNA と組換えタンパク質を用い

て試験管内で確認する。

4. 研究成果

(1) 組織特異的な *egl-15* 遺伝子の選択的スプライシングの制御機構

背景：*egl-15* は線虫で唯一の FGF 受容体をコードする遺伝子で、相互排他的なエクソン 5A と 5B の使い分けによって、線虫に 2 種類存在する FGF (EGL-17 および LET-756) とのリガンド結合特異性が規定され、EGL-17/EGL-15A と LET-756/EGL-15B は異なった機能を発揮する。

本研究で作製した *egl-15* 選択的スプライシング・レポーターでは、筋組織は 5A 型 (RFP) を、上皮系や神経系などそれ以外の組織は 5B 型 (GFP) を主に発現し、組織特異的の選択性を示した (図 1)。

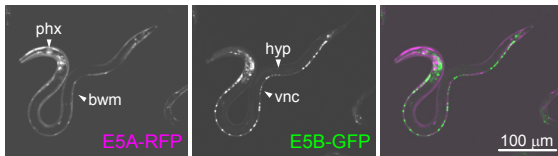


図 1. *egl-15* 選択的スプライシング・レポーター線虫

制御因子の同定：上述の組織特異性の制御機構を解明するために、変異体のスクリーニングを行い、筋における選択性がエクソン 5A 型から 5B 型に変化した変異体を多数得た。そして、遺伝子マッピングとクローニングの結果、Fox-1 ファミリーに属する RNA 結合タンパク質 ASD-1 (Alternative-Splicing-Defective-1) および FOX-1 と、筋組織特異的 RNA 結合タンパク質 SUP-12 の 3 種類が制御因子を同定した。さらに、これらのスプライシング変異体は、*egl-15(5A)* 特異的変異体や *egl-17* 変異体と同じ表現型 (性筋芽細胞の移動異常による陰門筋の形成不全と産卵障害) を示したことから、これらの RNA 結合タンパク質による組織特異的選択的スプライシング制御によって内在性 EGL-15 のリガンド特異性が規定されていること確認された。

シス・エレメントの同定：組織特異的に制御されるエクソン 5A の上流のイントロン 4 に、線虫類に保存された 2 つの配列 UGCAUG と GUGUG が存在することから、ミニ・ジーンに対応する配列にそれぞれ変異を導入したところ、スプライシング変異体同様に筋におけるエクソン 5A 選択性に異常を示し、いずれも組織特異性に必要なシス・エレメントと同定された (図 2)。さらに、試験管内で ASD-1/FOX-1 と SUP-12 は UGCAUG と GUGUG にそれぞれ特異的に結合することを

確認した。

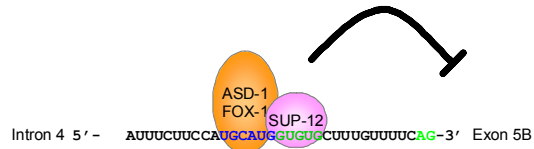


図 2. Fox-1 ファミリーと SUP-12 による協調的制御

egl-15 選択的スプライシング制御のモデル：筋では、ASD-1/FOX-1 と SUP-12 が協調してイントロン 4 に結合してエクソン 5B を抑制し、下流のエクソン 5A が選択される (図 3 左)。制御因子の変異体では抑制が不十分で、エクソン 5B が選択される (図 3 右)。

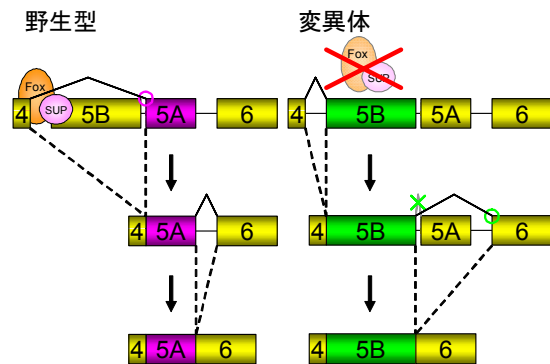


図 3. Fox-1 ファミリーと SUP-12 による協調的制御

この研究成果の意義：これらの制御因子の発現を解析すると、筋組織でのみ 3 者が共通して発現しており (図 4)、腸や神経には ASD-1/FOX-1 の発現はあるものの *egl-15* の制御には不十分であることが分かった。この研究は、複数の RNA 結合タンパク質と複数のシス・エレメントの組み合わせが揃うことによって選択的スプライシング制御の標的遺伝子とその組織特異性が厳密に決まることを示す好例となった。

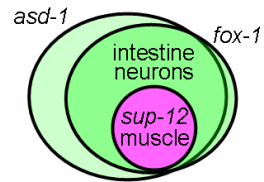


図 4. Fox-1 ファミリーと SUP-12 の組織発現

*この研究成果は Nature Methods, 2006 および Mol Cell Biol, 2007 に発表した。

(2) 発生段階依存的な *let-2* 遺伝子の選択的スプライシングの制御機構

let-2 遺伝子は基底膜を構成するコラーゲン IV の $\alpha 2$ 鎖をコードし、エクソン 9 と 10 は相互排他的で発生段階依存的に制御される。すなわち、胚期には 9 型のみが発現し、発生が進むに連れて徐々に切り替わり、成虫期は 10

型のみが発現する。

本研究で作製した *let-2* 選択的スプライシング・レポーターでは、胚では 9 型 (GFP) のみを発現しているが、発生段階依存性を再現して徐々に色が変わり、成虫では 10 型 (RFP) のみを発現した (図 5 上)。

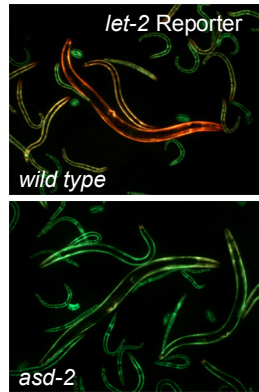


図 5. *let-2* 選択的スプライシング・レポーター線虫 (上) と *asd-2* 変異体 (下)

制御因子の同定：上述の *let-2* レポーターが成虫になっても胚型 (GFP) が優勢の発現を示す変異体を単離し (図 5 下)、遺伝子マッピングの結果、制御因子として STAR ファミリー RNA 結合タンパク質 ASD-2 (Alternative-Splicing- Defective-2) を同定して命名した。

シス・エレメントの同定：*let-2* レポーター・ミニ・ジーンの変更により、イントロン 10 上の CUAAC リピートが胚型から成虫型への発生段階依存的な切り替えに必要なシス・エレメントであることを見出し、さらに、ASD-2 とこの CUAAC リピートの試験管内での特異的な結合を確認した。

プロセッシング中間体の同定：*let-2* 遺伝子のエクソン 8 から 11 に着目すると、mRNA 前駆体からエクソン 9 型または 10 型の成熟 mRNA ができるには、図 6 のように、選択的エクソンの上流と下流のイントロンが除かれる 2 度のスプライシングを必要とする。そこで、1 つのイントロンのみが除去された 4 種類の「プロセッシング中間体」の量を、放射性同位元素を利用した RT-PCR で定量し、野生型と *asd-2* 変異体で比較した。その結果、胚期ではエクソン 9 から 11 へスプライシングした中間体のみが検出されること、野生型では成虫期にエクソン 10 から 11 へスプライシングした中間体に切り替わること、*asd-2* 変異体では、成虫期でも、胚型の中間体が主要であること

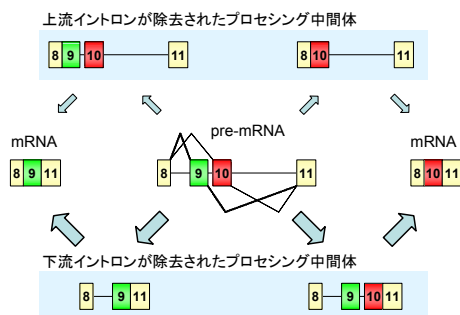


図 6. *let-2* 選択的プロセッシングの途中段階

がわかった。

制御のモデル：*let-2* の相互排他的選択的スプライシングでは、選択的エクソンの下流のイントロンが先行して除去される。胚ではエクソン 9 と 11 の間でスプライシングが起こり (図 7 左)、成虫期では、ASD-2 のはたらきによりイントロン 10 の除去が促進される (図 7 右)。

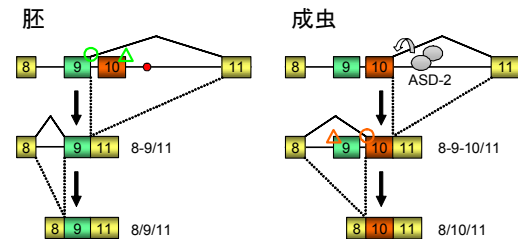


図 7. *let-2* 選択的スプライシング制御のモデル

研究成果の意義：この研究は、スプライシング部位の相対的な強弱や制御因子によるスプライシングの促進機構が連動してイントロン除去の順序を制御することによりスプライシング・パターンの厳密な切り替えが実現していることを、遺伝学的な実験系で、内在性の遺伝子を用いて初めて明確に示したもので、mRNA プロセッシングの運命決定過程の解析に道を拓くものである。

*この研究成果は Genes Dev, 2008 に発表し、同年 3 月号の Nat Rev Genet. および Nat Rev Mol Cell Biol. にそれぞれ RESEARCH HIGHLIGHTS として紹介された。

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 Ohno G, Hagiwara M, & Kuroyanagi H. “STAR family RNA-binding protein ASD-2 regulates developmental switching of mutually exclusive alternative splicing *in vivo*.” Genes & Development (査読有) 22: 279-285, 2008.
- ② Kuroyanagi, H, Ohno, G, Mitani, S & Hagiwara M. “Fox-1 family and SUP-12 coordinately regulate tissue-specific alternative splicing *in vivo*.” Molecular and Cellular Biology (査読有) 27: 8612-8621, 2007.

[学会発表] (計 15 件)

- ① Hidehito KUROYANAGI. “Alternative splicing reporters offer a path to splicing codes” ナショナルバイオリソースプロジェクト

エクト (NBRP) 線虫、シンポジウム
「Nematode: an ideal model organism for functional genomics」 東京都、2008年11月.

- ② Hidehito KUROYANAGI. “A transgenic reporter system reveals expression profiles and regulation mechanisms of alternative splicing *in vivo*.” UK-Japan Frontiers of Science Symposium. October, 2008.
- ③ Hidehito KUROYANAGI. “Visualization of alternative splicing patterns *in vivo* reveals regulation mechanisms.” 第10回日本RNA学会年会 RNA ミーティング10周年記念セッション ”Ambitious Young Scientists Looking toward the Next Decade”, 札幌市、2008年7月.
- ④ 黒柳秀人、萩原正敏 「線虫 *unc-32* 遺伝子の選択的スプライシング制御機構の解析」第10回RNA ミーティング、札幌市、2008年7月.
- ⑤ Hidehito Kuroyanagi & Masatoshi Hagiwara. “Alternative splicing regulation of the *C. elegans unc-32* gene.” Gordon Research Conference, Post-Transcriptional Gene Regulation, The Biology Of, Waterville, ME, United States, June-July, 2008.
- ⑥ 大野源太、斧正一郎、萩原正敏、黒柳秀人 「線虫 *unc-60* 遺伝子の筋肉特異的な選択的スプライシング制御機構の解析」RNA フロンティアミーティング2008、京都市、2008年6月.
- ⑦ Hidehito Kuroyanagi, Genta Ohno & Masatoshi Hagiwara. “A transgenic reporter system reveals expression profiles and regulation mechanisms of alternative splicing *in vivo*.” BMB2007 (日本分子生物学会・日本生化学会大会合同大会)ワークショップ、横浜市、2007年12月.
- ⑧ Hidehito Kuroyanagi, Shohei Mitani & Masatoshi Hagiwara. “TWO FAMILIES OF RNA-BINDING PROTEINS CO-OPERATIVELY REGULATE TISSUE-SPECIFIC ALTERNATIVE SPLICING IN *C. ELEGANS*.” Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “Eukaryotic mRNA processing”, NY, USA, August, 2007.
- ⑨ Genta Ohno, Masatoshi Hagiwara & Hidehito Kuroyanagi. “COURSE OF PROCESSING AND SWITCHING MECHANISM OF DEVELOPMENTALLY-REGULATED ALTERNATIVE SPLICING *IN VIVO*.” Cold

Spring Harbor Laboratory Meeting
“Eukaryotic mRNA processing”, NY, USA, August, 2007.

- ⑩ 黒柳秀人、菊池優理子、萩原正敏 「線虫 Fox-1 ファミリーRNA 結合タンパク質遺伝子 *asd-1* は選択的スプライシングによる負の自己制御を受ける」RNA 若手研究者の会2007、神戸市、2007年9月.
- ⑪ 大野源太、黒柳秀人、萩原正敏 「発生段階依存的な相互排他的エクソンの選択性制御機構の解明」RNA 若手研究者の会2007、神戸市、2007年9月.
- ⑫ 黒柳秀人、萩原正敏 「ASD-1/FOX-1 と SUP-12 は協調して線虫生体内組織特異的な選択的スプライシングを制御する」第9回RNA ミーティング、名古屋市、2007年7月.
- ⑬ 大野源太、黒柳秀人、萩原正敏 「相互排他的エクソンの発生段階依存的な選択性制御機構の解明」第9回RNA ミーティング、名古屋市、2007年7月.
- ⑭ Hidehito Kuroyanagi, Genta Ohno, Shohei Mitani & Masatoshi Hagiwara. “Hetero-dimerization of ASD-1/FOX-1 and SUP-12 regulates tissue-specific alternative splicing *in vivo*.” 16th International *C. elegans* Meeting, Los Angeles, CA, USA. June-July, 2007.
- ⑮ Hidehito KUROYANAGI and Masatoshi HAGIWARA. “A transgenic reporter system reveals expression profiles and regulation mechanisms of alternative splicing *in vivo*.” 第59回日本細胞生物学会大会・第40回日本発生物学会合同大会 ミニ・シンポジウム ”Frontiers in RNA biology”, 福岡市、2007年5月.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)
名称: A Transgenic Reporter System That Reveals Expression Profiles and Regulation Mechanisms Of Alternative Splicing In Living Organisms.
発明者: Kuroyanagi, H. & Hagiwara, M.
権利者: 株式会社キノファーマ
種類: 米国特許
番号: 60/847,409
出願年月日: 2007年9月26日
国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ

<http://www.tmd.ac.jp/mri/mri-end/index.html>

東京医科歯科大学難治疾患研究所・2008年優秀論文賞（論文①、Ohno, et al.）2009年2月
東京医科歯科大学難治疾患研究所・2007年優秀論文賞（論文②、Kuroyanagi, et al.）2008年2月

ゲノムひろば「ゲノム研究勢ぞろい」展示「体の部分によって遺伝子の情報は使われ方が違う！？～光らせて見てみよう～」2008年10月、名古屋市

Molecular and Cellular Biology 第28巻第14号 表紙 2008年7月発刊

Nature Reviews Molecular Cell Biology Vol. 9: p188 RESEARCH HIGHLIGHTS、TECHNOLOGY WATCH
「COLOUR-CHANGING WORMS」2008年3月号

Nature Reviews Genetics Vol. 9: p159、RESEARCH HIGHLIGHTS、TECHNOLOGY
「Colour-changing worms」2008年3月号

Genes & Development 第22巻第3号 表紙
2008年2月1日発刊

Genes & Development 第22巻第3号:
pp279-285、PERSPECTIVE 「The search for alternative splicing regulators: new approaches

offer a path to a splicing code」2008年2月1日発刊

毎日新聞 「たんぱく作り分け 遺伝子の暗号特定 東京医科歯科大が手法開発」2008年1月30日朝刊2面掲載

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・大学院疾患生命科学研究所・准教授
研究者番号：30323702

(2)研究分担者

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
(平成19年度)

(3)連携研究者

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
(平成20年度)