

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 6 月 8 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510205

研究課題名（和文） ゲノム解析と実験的検証から探る極小イントロンの存在意義と
そのスプライシング機構

研究課題名（英文） Bioinformatic and molecular biological study on ultra-short introns

研究代表者

嶋田 誠（SHIMADA MAKOTO）

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講師

研究者番号：00528044

研究成果の概要（和文）：遺伝子配列中、タンパク質に翻訳されない部分（イントロン）の長さを集計すると、ほとんどの真核生物では最頻値周辺に分布の集中（クラスタ）があり、イントロンは、クラスタ以短では存在しないと考えられていた。本研究では、ヒトにおいてクラスタ以短にもイントロン（ultra-short intron）が存在することを明らかにした。ultra-short intron は近縁種間で保存され、ヒトへの進化の過程でそれぞれ独立に派生したことが分かった。これらの特徴を検討することで、複数の生成機構があることが推察された。

研究成果の概要（英文）：The conspicuous cluster with a steep peak in length distribution have been found in the most eukaryotes; however, there is no information about introns shorter than the cluster. We identified pre-mRNA introns shorter than the cluster, termed ultra-short introns.

We selected 23 of the ultra-short introns based on conservation status in closely related species. Using bioinformatics and molecular biological approaches, we demonstrated that the ultra-short introns are *bona fide* introns and the ultra-short introns independently appeared in closely related lineages to human. Our analyses on the features of the ultra-short introns suggest that the ultra-short introns are spliced by distinct multiple splicing mechanisms that are modified from the known conventional splicing mechanism.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	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：ゲノム進化・再編、イントロン長、pre-mRNA splicing、ヒトゲノム、データベース、

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、選択的スプライシングが哺乳類のほとんどの遺伝子で起こっていることが明らかにされた時期であり、少数の遺伝子から多様な産物を生み出す構造的基盤とし

て、エクソン-イントロン構造の重要性が広く認識されていた。エクソン-イントロン構造の進化に関しては、エクソン-イントロン構造が出現するのは真核生物出現のかなり早い段階であること、および脊椎動物へ至る

系統において、体制が複雑になるに伴い、長いイントロンが含まれるようになること、さらに、真核生物の様々な系統でイントロンの数や長さにおける進化が独立して進行していること、が知られていた。

ところで、真核生物の代表的な様々な系統において、各種のゲノム内のイントロン長の分布を調べると、少なくとも長短2種類の成分(クラスタ)から成り立っていることから、それぞれ別個のスプライシング機構が存在していると考えられるようになっていた。さらに、短いイントロン・クラスタは限定された範囲(ヒトの場合 65 - 130 塩基長)に密集し、尖度の大きい最頻値が形成され、それ以外で激減することから、短いイントロンをスプライシングする機構は最適イントロン長に対し強い指向性を有するとともに、短いイントロン・クラスタより短いとスプライシングができないと考えられていた。

2. 研究の目的

我々は、短いイントロン・クラスタでイントロン数が激減するという知見をさらに精査することで、スプライシングに関わる巨大分子の空間的ふるまいを探る糸口をつかむことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト遺伝子データベース H-InvDB におけるイントロン長の網羅的取得：
ヒトの全 mRNA 配列に注釈を付けることにより構築した遺伝子データベースである H-InvDB より、全遺伝子の注釈情報をダウンロードし、全エクソン端ゲノム位置を抽出することでイントロン長を計算した。

(2) データ精査：

① 以下のような条件でデータをふるい分けし、イントロン長分布を得た。

(条件1) イントロン長 947 塩基長以下であること、(条件2) イントロン両端の配列が GT-AG であること、(条件3) 実在する mRNA 配列に基づいた H-InvDB transcript (HIT) であること。

② 次いで、イントロン長 85 塩基長以下につき、注釈付作業における誤マッピングのためエクソン-イントロン接合部位での挿入を取り除くために、当該イントロンの両脇エクソン配列(30 塩基対ずつ)部分を結合させた配列を query とし、ヒトの転写物データベースを target に BLAST 検索を行った。

③ さらに、近縁種間で配列および長さにおいて保存されているイントロンに絞り込むため、同上のエクソン結合配列を query に、ヒト以外の代表転写物データベースを target にした BLAST 検索と、イントロンと両脇のエクソン部位(30 塩基対ずつ)を query に、ヒト以外の代表遺伝子データベースを target にした BLAST 検索をそれぞれ行い、両方に含まれるイントロン-エクソン結合部位を進化的に保存していると判断した。

(3) 特徴抽出：

絞られた保存的短イントロン(85 塩基長以下)につき、以下の特徴を抽出した。

① イントロン配列における塩基組成：65 塩基長以下、および 66~85 塩基長を 25 個ずつの階級に分けて、各階級内での平均塩基組成を比較した。

② ホスト遺伝子における特徴抽出：保存的短イントロンをもつ遺伝子と全遺伝子との間で、どのような遺伝子特性が異なるか HEAT を用いて検出した。

(4) 分子生物学的スプライシング実験：

① 3つの対象イントロン

転写物	イントロン位置	HUGO 遺伝子記号	塩基長
HIT000192494	第 7	<i>HNRNPHI</i>	56
HIT000009363	第 12	<i>NDOR1</i>	49
HIT000008845	第 6	<i>ESRP2</i>	43

② 実験操作

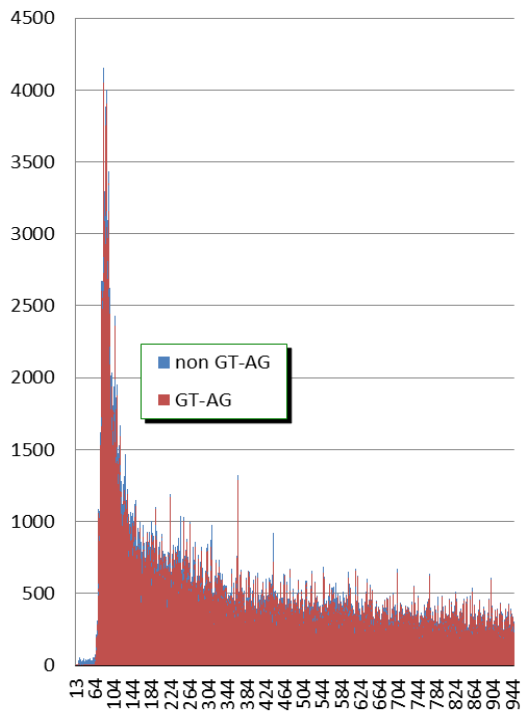
(i) ヒト培養細胞内でのスプライシングの確認：ミニ遺伝子をそれぞれ作成し、数種類のヒト由来培養細胞にトランスフェクションさせ、全 RNA から RT-PCR によりスプライシング産物を確認した。

(ii) *In vitro* スプライシング解析：pre-mRNA を標識し、*HeLa* 細胞核抽出液を用いて、*in vitro* 条件下でスプライシングさせ、制限酵素処理および精製処理後に標識 RNA を確認した。

4. 研究成果

(1) イントロン長分布(図 1)：

各転写物において、annotationに基づいてそれぞれのイントロンをばらばらにして、転写物とイントロンのペアを作成し、イントロンの短い順に転写物—イントロン・ペアを集計したところ、図1のようになった。つまり、イントロン長が65塩基長から83塩基長付近のピークへ急激に転写物数が増加した(図1)。また、イントロン数が長くなるに従い65塩基長を境に、GT-AGルールに従うイントロンの割合、およびイントロンあたりのマップされた転写物数が激増することから、この65塩基長を「閾値」"threshold"、とよび、それ以下を「超短域」"ultra-short range"、それ以上~85塩基長までを「短域」"short range"、と呼ぶことにした。



イントロン長

図1 イントロン長ごとのヒト転写物数

(2) 保存性(投稿中):

①超短域にあるイントロン(超短イントロン)のうち、23個が近縁種にも保存されていることがヒト以外の転写物および遺伝子それぞれのデータベースをtargetにしたBLAST検索により確認された。

②3つの対象イントロンの配列について、比較ゲノム解析を行ったところ、超短イントロンはヒトに至る系統において、元々は長いイントロンがあった位置に、これらの超短イントロンが不連続的に出現する形で派生したことが分かった。

(3) 超短イントロンの特徴(投稿中):

①イントロン配列における塩基組成: 短いイントロンほどGC含量が一般に高くなることは知られていたが、今回その傾向が超短域まで及んでいることを示した。

②宿主遺伝子における特徴抽出: 短域および超短域ともに、これらのイントロンをもつ遺伝子はそのプロモータ領域にTFAP2AやSP1といった、特定の転写因子結合配列を有する傾向が見られた(図2)。

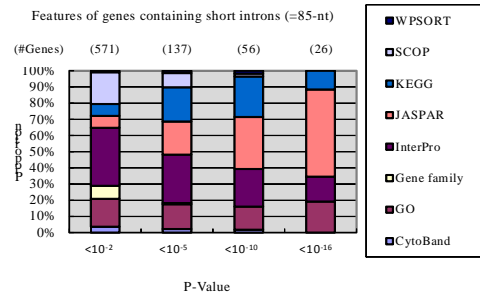


図2 短イントロン含有遺伝子の特徴

右側がより顕著な特徴。JASPAR(転写因子 DB登録遺伝子)の割合が増加。

(4) 細胞内および in vitro 実験(印刷中): 少なくとも3つの超短イントロンはヒト培養細胞内、および in vitro 条件下でスプライシングが起きていることが確認できた。

また、これら超短イントロンには G-rich 配列が含まれていることがあり、それらを他の塩基で置き換えて観察したところ、それぞれ、スプライシングを促進あるいは抑制する効果が観察された。イントロンが極端に短いこととの関連が今後の興味深い課題である。

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)

- ① Sasaki-Haraguchi N, Shimada MK, Taniguchi I, Ohno M, Mayeda A: **Mechanistic insights into human pre-mRNA splicing of human ultra-short introns: potential unusual mechanism identifies G-rich introns.** *Biochem Biophys Res Commun* (2012) *in press*. [査読有]

[学会発表] (計10件)

- ① Shimada MK, Sasaki-Haraguchi N, Mayeda A: Characterization of Evolutionary Conserved Unusually Short Human Introns.

- Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE2011), Jul. 26-30, 2011, Kyoto, Japan. P1-128.
- ② Shimada MK, Sasaki-Haraguchi N, Mayeda A: Identification and Characterization of Unusually Small Introns, Termed Micro-introns, in the Human Genomes. The 16th Annual Meeting of the RNA Society and The RNA Society of Japan 13th Annual Meeting, Jun 14-18, 2011, Kyoto, Japan. Program & Abstracts (Oral Abstracts) #41
- ③ Shimada MK, Haraguchi N, Mayeda A: Human transcript database search showed existence of extremely short introns. The Conference of the International Society for Biocuration (Biocuration 2010), Oct. 11-14, 2010, Odaiba, Tokyo, Japan. Abstract Book (P15-7) p. 104. Nature Precedings <<http://dx.doi.org/10.1038/npre.2010.5115.1>>
- ④ Shimada MK, Uchiyama I, Mayeda A: Different mechanisms to splice micro-introns in Eukaryotes. Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE2010), Jul. 4-8, 2010, Lyon, France. P-S22-40.
- ⑤ 嶋田 誠、内山 郁夫、前田 明: Evolution of spliceosomal proteins: High conservation and low modification, but drastic change in parasitic genome (スプライソソーム・タンパク質の進化: 高保存・低変異なシステム、ただし寄生性ゲノムにおける劇的な変更)、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7-10日、神戸、Program p.232 (1P-1155).
- ⑥ 嶋田 誠、内山 郁夫、前田 明: RNA スプライシング機構の進化: スプライシング因子保存性についての網羅的解析、第12回日本進化学会大会、2010年8月2-5日、東京、プログラム・要旨集 p.106, 口頭発表 OP4-7.
- ⑦ 嶋田 誠、前田 明: Are Spliceosomal Proteins Required to Splice Extremely Small Introns, termed Micro-introns, in non-metazoa? (非後生動物の極端に短いイントロン(極小イントロン)でもスプライソソームタンパク質が使われているのか?)、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9-12日、横浜、Program p.102 (3W15-3) & p.334 (3P-0031).
- ⑧ 原口 典子、嶋田 誠、前田 明: Widely Distributed Pre-mRNA Micro-Introns in the Human Genome: Are They Spliced in the Conventional Pathways? 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月9-12日、横

浜、Program p.366 (3P0294).

- ⑨ 嶋田 誠、原口 典子、前田 明: イントロン長の集計によるスプライシング機構多様性の推定、日本遺伝学会第81回大会、2009年9月16-18日、松本、プログラム・予稿集 p.110, Gene & Genetic Systems 84 (6):456.
- ⑩ 嶋田 誠、前田 明: 標準的なスプライシング複合体で遂行されるスプライシング反応系の中に新たな分子機構が存在する可能性を探る、第11回日本進化学会大会、2009年9月2-4日、札幌、プログラム・要旨集 p.118.

[その他]

ホームページ等

<http://tinyurl.com/shimada-mk>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 誠 (SHIMADA MAKOTO)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講師

研究者番号: 00528044

(2) 研究分担者

— (—)

研究者番号:

—

(3) 連携研究者

前田 明 (MAYEDA AKILA)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号: 50212204

(4) 研究協力者:

佐々木(原口) 典子 (SASAKI-HARAGUCHI NORIKO)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・博士研究員

研究者番号: 90546649