

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860793

研究課題名(和文) スプライシングオーダー解析による組織特異的な選択的スプライシング機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a mechanism of tissue-specific alternative splicing by using analysis of splicing order.

研究代表者

堀 友博 (HORI, Tomohiro)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90456525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚線維芽細胞においてOXCT1遺伝子におけるスプライシングオーダーを決定した。各々のイントロンのスプライシングの効率はある程度決まっていることが明確になった。スプライシングはある規則性をもって行われているが、一部においては不規則な、すなわち、複数の異なる順序を経て最終的なmRNAが完成していることも示唆された。この不規則性は、選択的スプライシングのメカニズムに大きく寄与している可能性があると考えられた。さらに成熟SCOT RNAのみられない肝臓由来細胞で検討しその差異の比較から選択的スプライシングの分子基盤のさらなる解明を試み、他の遺伝子においても同様の解析方法を応用し検討している。

研究成果の概要(英文)：Our strategy was to use RT-PCR of hnRNA to detect the presence or absence of spliced exon clusters in RNA intermediates (SECRIs) comprising sequential exons. The splice donor site mutation c.1248+5g>a (IVS13) of the OXCT1 gene resulted predominantly in skipping of exons 12 and 13 in skin fibroblasts from a patient with succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase (SCOT) deficiency. We compared hnRNA intermediates between controls' and the patient's fibroblasts derived from skin, kidney and liver. In controls, intron 11 was the last intron to be spliced and the removal of intron 12 was also rather slow and occurred after the removal of intron 13 in a major pathway. The mutation in the patient's cells resulted in retention of intron 13, thus causing the retention of introns 12 and 11. Now, we have been conducting studies about splicing order in fibroblasts derived from hepatocyte and the gene responsible for mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase deficiency.

研究分野：小児科学

キーワード：スプライシングオーダー 選択的スプライシング 遺伝学

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の機能発現において RNA プロセッシングは非常に重要である。RNA ポリメラーゼ II の転写した RNA (前駆体 RNA) からイントロン部分が正確に切り出され、エクソンとエクソンが結合する。この反応がスプライシングである。現在の概念では、転写と同時進行で RNA のプロセッシングが進み、スプライシングも必ずしもイントロン 1 から順番におきるわけではないことが示唆されている。スプライシングが起こる過程で重要な領域には、5' スプライス部位、3' スプライス部位、ブランチ部位がある。それぞれの部位には、U1-snRNP、SF1、U2AF65、U2AF35 などスプライシングに必須の因子群が結合する。このほか、エクソンやイントロン上にはエクソンを正しく認識させスプライシングを促進する領域として exonic splicing enhancer や intronic splicing enhancer と呼ばれる領域が存在することが知られており、また、スプライシングを抑制するような exonic splicing silencer や intronic splicing silencer などの配列も知られている。これらの領域の異常によるスプライシング異常については多くの報告がある。しかし上述のように、転写とスプライシングが同時進行するなかで、どのイントロンがそのような順番でスプライシングされ (このスプライシングの順序を「スプライシングオーダー」と呼ぶ)、それが変異によって、また臓器組織の種類によってどのようにかわるのかについての知見はほとんどないのが現状である。しかし臓器組織特異的な選択的スプライシングの存在は知られており、この2つを有機的に結びつける事は、遺伝子発現の多様性、その破綻による疾患理解の為に必要な事と考えた。

我々は、皮膚線維芽細胞から抽出した核内 hn RNA を用いてスプライシングオーダーを解析する手法を報告した (文献①)。この手法を利用し、さまざまなスプライシング異常のメカニズムの解明を試みた。また、皮膚線維芽細胞以外の臓器由来細胞での解析や、組織特異的な選択的スプライシングを起こすとされる遺伝子での解析を行うこととした。これらの研究によりもたらされる結果は、組織特異的な選択的スプライシングのメカニズムの解明や、さらには臨床診断、治療応用などに関しても、意義のある結果が得られると考えた。

2. 研究の目的

我々は以前、サクシニル-CoA:3-ケト酸 CoA トランスフェラーゼ (SCOT) 欠損症の 1 例において、イントロン 13 の 5' スプライス部位の 1 塩基置換で、その上流のエクソン 12 と 13 が同時にスキップすることを見いだした。本症例のように、5' スプライス部位の 1 塩基置換が原因で連続した 2 つのエクソンがスキップしたという報告はこれまでも散見されるが、そのメカニズムは明らかではな

った。

SCOT 欠損症の原因遺伝子 *OXCT1* においてスプライシングオーダーを解析し、本患者におけるスプライシング異常のメカニズムを突き止め、さらに、様々な臓器由来細胞での解析や、組織特異的な選択的スプライシングを起こすとされるその他の遺伝子での解析を行うことで、スプライシングオーダー解析という手法からスプライシングのメカニズムについての新しい知見を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

皮膚線維芽細胞より核を単離後、核内 hnRNA を抽出する。分離した核内 hn RNA には、様々な状態の RNA 中間体が混在していると考えられる。この中間体を spliced exon cluster in RNA intermediate (SECRI) と呼ぶ。(図 1)

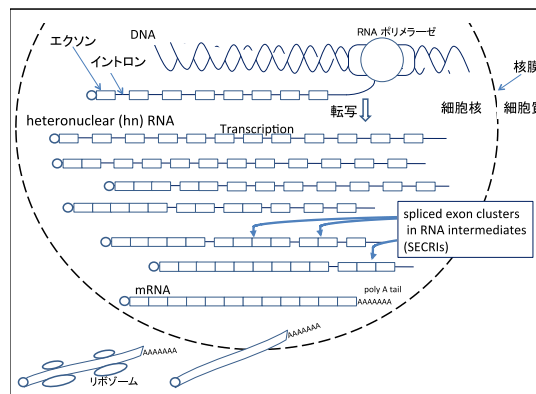


図 1 スプライシングの過程と SECRI

分離した核内 hn RNA を、遺伝子特異的アンチセンスプライマーを組み合わせる cDNA 合成を行う。cDNA 合成したものを、インスリン受容体遺伝子のイントロン上に設定した種々のプライマーの組み合わせで PCR を行い、電気泳動で SECRI を検出する。検出した SECRI はダイレクトシーケンスで塩基配列を確認する。各 SECRI の存在の有無からスプライシングオーダーを推定する。(図 2)

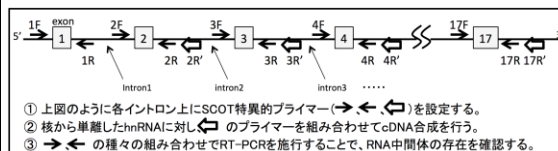


図 2 プライマー設定方法

また、細胞培養液にアクチノマイシン D を添加することで転写を抑制したのち、0, 5, 10, 20, 40, 60 分と経時的に ISOGEN キットで総 RNA を抽出し、SECRI の解析を行う。

さらに、皮膚線維芽細胞のみでなく、腎臓由来細胞、成熟 SCOT RNA のみられない肝臓由来細胞など種々の細胞において、*OXCT1* 遺伝子のスプライシングオーダーを決定することで、組織間のスプライシングオーダーの差異を確認する。

4. 研究成果

OXCT1 遺伝子のスプライシングオーダーを推定するために、健常者コントロール皮膚線維芽細胞において、エクソン 1 上にセンスプライマーをおき、イントロン 2 からイントロン 16 にアンチセンスプライマーを組み合わせ、また、*OXCT1* の最終エクソンであるエクソン 17 上にアンチセンスプライマーをおき、イントロン 1 からイントロン 15 にセンスプライマーを組み合わせて、すべての組み合わせにおいて SECRI の存在の有無を確認した。その結果、イントロン 11 がスプライシングされた SECRI は検出されず、イントロン 11 が最後にスプライシングされることが示唆された。(図 3A③; 模式図は検出された SECRI を示す。以下同様。) さらに、エクソン 1 や 17 以外が関与している SECRI についても検出し、同じくイントロン 11 がスプライシングされた SECRI は検出されず、イントロン 11 が最後にスプライシングされることが示唆された。(図 3C)

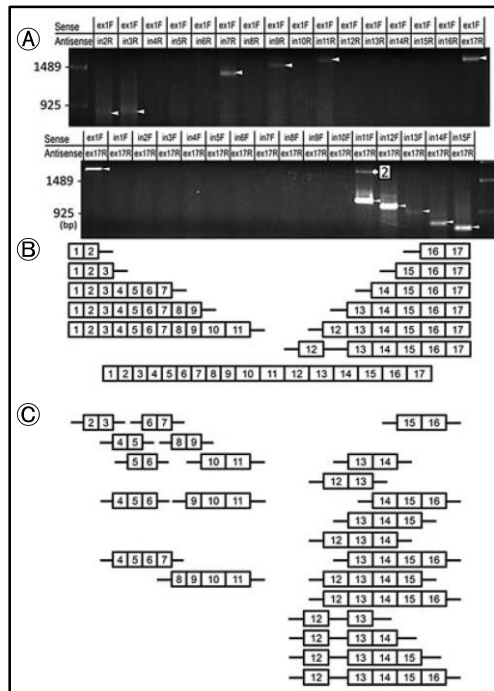


図 3 コントロールの SECRI 検出結果

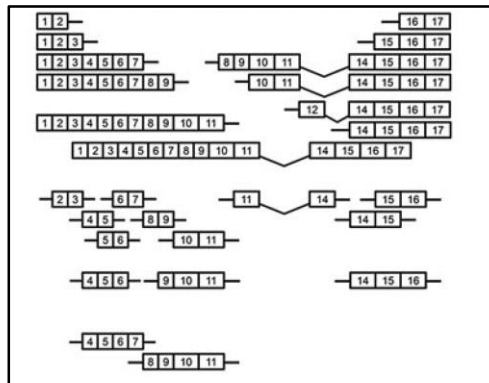


図 4 患者の SECRI 検出結果

一方、前述のイントロン 13 の 5' スプライス部位の 1 塩基置換でその上流のエクソン 12 と 13 の 2 エクソンが同時にスキップした患者の皮膚線維芽細胞でも同様の解析を行ったところ、コントロールとは異なる結果となり、スプライシングの乱れが見られた。(図 4)

コントロールと本患者の皮膚線維芽細胞を用いて *OXCT1* 遺伝子のエクソン 11 からエクソン 14 付近のイントロンのスプライシングに関する経時変化の解析を行った結果を図 5, 6 に示す。まず、コントロールにおいて、イントロン 11 とエクソン 13 上にプライマーを置いた組み合わせで、イントロン 12 が残存した中間体はアクチノマイシン D 添加 60 分後では認めず、イントロン 12 がスプライシングされた SECRI は 60 分後でも残存していたことから (図 5A)、イントロン 12 の後でイントロン 11 がスプライシングされる経路が主であることが示唆された。また、エクソン 12 とイントロン 13 上にプライマーを置いた組み合わせで、イントロン 12 がスプライシングされた状態の SECRI に比しイントロン 12 が残存した中間体をより明瞭に認めた (図 5B)。さらに、イントロン 12 とエクソン 14 上にプライマーを置いた組み合わせで、イントロン 13 がスプライシングされた状態の SECRI を 0 分から 40 分後で明瞭に認めた (図 5C)。これらの点から、イントロン 13 の後でイントロン 12 がスプライシングされる経路が主であることが示唆された。すなわち、この場合における主なスプライシングオーダーは、イントロン 13、12、11 の順であることが推定された。

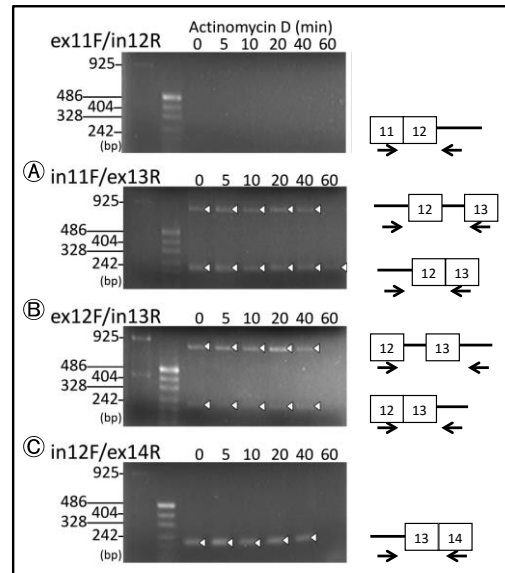


図 5 コントロールにおけるエクソン 11 から 14 付近のスプライシング経時変化の解析

一方、患者においては、イントロン 11、イントロン 12、変異の存在するイントロン 13 のいずれも 60 分までスプライシングされず残るといった結果であった。(図 6)

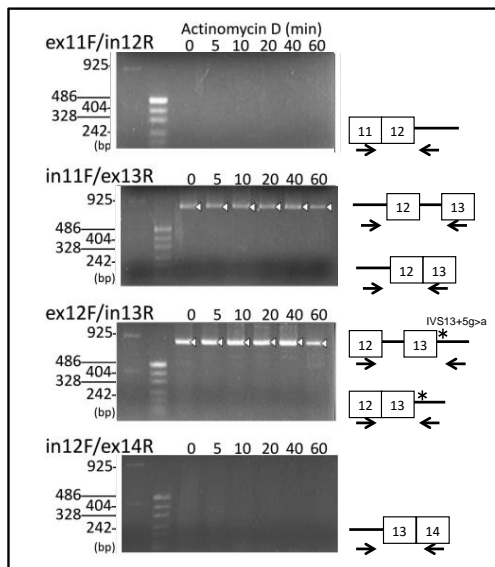


図6 患者におけるエクソン11から14付近のスプライシング経時変化の解析

正常細胞と2エクソンをスキップした症例におけるスプライシングオーダーを比較し、この2エクソンスキップのメカニズムは、変異のあるイントロン13がスプライシングされずに残存すると、イントロン12、イントロン11も除去されず、いわゆる“splicing paralysis”の状態となり、最終的に、「イントロン11-エクソン12-イントロン12-エクソン13-変異のあるイントロン13」の全体がスキップすることで、2エクソンスキップが起こることが解明された。

さらに、各々のイントロンについて、そのスプライシングの効率（スプライシングのされ易さ）はある程度決まっていることが実験結果から明確になった。この結果から、スプライシングオーダーは、ある規則性をもって行われているが、一方、一部においては不規則な、すなわち、複数の異なる順序を経て最終的なmRNAが完成していることも実験結果から示唆された。この「不規則性」は、一つの遺伝子から複数のタンパク質を作り出す選択的スプライシングのメカニズムに大きく寄与している可能性があると考えられた。

今後の研究の推進方策として、現在、OXCT1に関しては、成熟SCOT RNAのみられない肝臓由来細胞で同様の実験を行い、その差異の比較から選択的スプライシングの分子基盤のさらなる解明を試みている。また、SCOT欠損症と同様にケトン体代謝異常症の一つであるβケトチオラーゼ欠損症の原因遺伝子においても同様の解析を始め、OXCT1と同様に、ある「規則性」と一部の「不規則性」をもってスプライシングが行われていることが判明しつつある。

〈文献〉

①Hori T *et al.* Hum. Mutat. 34:473-480 (2013)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

① Hori T, Yamaguchi S, Shinkaku H, Horikawa R, Shigematsu Y, Takayanagi M, Fukao T. Inborn errors of ketone body utilization. *Pediatr Int.* 査読有り 2015. 57:41-48. DOI: 10.1111/ped.12585.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 友博 (HORI, Tomohiro)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90456525