

研究報告書

「mRNA選択的プロセッシングを制御する細胞暗号の解明」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：黒柳 秀人

1. 研究のねらい

ヒトを含む多細胞生物の形態の複雑さや機能の巧妙さは、多様な細胞がそれぞれ複雑で巧妙な遺伝子発現を行うことで実現している。しかし、遺伝子の数自体は、ヒトが単細胞生物に比べて桁違いに多いわけではなく、多細胞生物の複雑さや巧妙さは、ひとつの遺伝子転写産物からでも細胞の種類や発生段階に依存して多様な成熟 mRNA を産生できる「mRNA 前駆体の選択的プロセッシング」によって可能になったと考えられる。mRNA の多様性が空間的・時間的に制御されている実態が近年明らかになってきたのに対し、さまざまな遺伝子の mRNA 前駆体が細胞の種類や発生段階に応じてそれぞれ特異的・選択的にプロセッシングされるための制御機構の実体は解明されておらず、「細胞暗号 (cellular codes)」と呼ばれている。

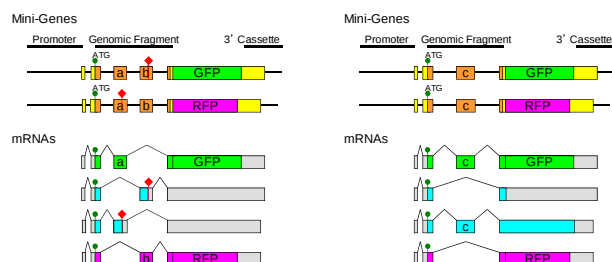
本研究課題では、研究者らが開発した生体内選択的スプライシング可視化技術を応用して、mRNA 前駆体の選択的プロセッシングの制御因子と制御に必要な塩基配列の同定、プロセッシングの順序の解明を行い、mRNA 前駆体の選択的プロセッシングのための「細胞暗号」の実体を実験的に明らかにすることを目的とした。

2. 研究成果

本研究では、モデル生物である線虫の組織特異的あるいは発生段階依存的に選択的プロセッシングを受ける遺伝子群をモデルとして、さまざまなタイプの選択的プロセッシングの選択性パターンを生体内で可視化するための mRNA プロセッシングレポーターミニ遺伝子の作製を試み、より簡便で成功率の高いミニ遺伝子作製方法の開発を行った。さらに、これらのモデル遺伝子レポーターのうち組織特異的あるいは発生段階依存的選択性を示すものについて、遺伝学的な解析により制御因子やシスエレメントの同定を行い、プロセッシング制御機構を明らかにした。

2-1. 蛍光スプライシングレポーターミニ遺伝子の作製法の開発

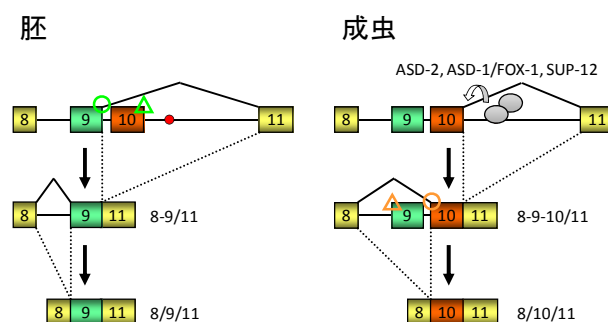
複数の蛍光タンパク質 cDNA を用いて選択的スプライシングパターンを反映して異なる蛍光タンパク質が発現するレポーターミニ遺伝子を相同組換えにより効率よく作るためのミニ遺伝子のデザイン方法、構築方法を工夫、整理、実践し、論文としてまとめた(論文2、右図)。また、特に線虫を用いて蛍光選択的スプライシングレポーター動物を作製し、変異体をスクリーニングするための戦略、方法、遺伝子マッピング方法についても、同論文に詳細を掲載した。



図左、排他的エクソン a/b の使い分けを可視化するためのミニ遺伝子ペア。図右、カセットエクソン c の包含と排除を可視化するためのミニ遺伝子ペア。

2-2. コラーゲン遺伝子 *let-2* の発生段階依存的な相互排他的選択的エクソンの制御機構の解明

線虫のタイプIVコラーゲン $\alpha 2$ 鎖をコードする *let-2* 遺伝子の胚型(エクソン9型)と成虫型(エクソン10型)の相互排他的選択的スプライシングの切替えを可視化するためのレポーターミニ遺伝子を緑色蛍光タンパク質(GFP)と赤色蛍光タンパク質(RFP)を用いて作製し、発生段階依存的な選択的スプライシングの可視化に成功した(論文1)。また、この発生段階依存的なスプライシングの切替えは筋組織特異的に起こることを示した(論文2)。そして、遺伝学的な解析により、この発生段階依存的な制御には、スプライシング制御因子 ASD-2, ASD-1, FOX-1, SUP-12 が必要であること、シスエレメントとしてイントロン10にある CUAAC リピート、UGCAUG 配列、UG リピートが必要であることを見出した。さらに、一部のイントロンのみが除去された mRNA 前駆体プロセッシングの途中段階の RNA を野生型およびスプライシング制御因子変異体で同定、定量することで、イントロン除去の順序を明らかにし、*let-2* 遺伝子の発生段階依存的なスプライシング制御機構のモデルを示した(右図)。



2-3. アクチン結合タンパク質コフィリンをコードする *unc-60* 遺伝子の筋組織特異的選択的プロセッシング機構の解明

線虫のコフィリンをコードする *unc-60* 遺伝子は、1つの遺伝子から UNC-60A と UNC-60B の2つのアイソフォームを産生する。これらの mRNA はエクソン1のみを共有し、UNC-60A のためのエクソン2Aから5Aの下流に UNC-60B のためのエクソン2Bから5Bが配置した遺伝子構造となっており、筋組織は UNC-60B アイソフォームを、他の組織は UNC-60A アイソフォームを発現する組織特異的な選択的プロセッシングを受けることが知られている。本研究では、この筋組織特異的な *unc-60* 遺伝子の選択的プロセッシングパターンの可視化に成功し、筋組織においてはエクソン1とエクソン2Aの間のイントロンの除去が抑制されていること、このイントロンの除去の制御が UNC-60A 型か UNC-60B 型かの運命決定段階であることを示した。そして、このイントロンのスプライシングの抑制に ASD-2 および SUP-12 が協働して関わっていること、これらのシスエレメントが同イントロン上に存在していること明らかにした。

2-3. V-ATPaseの α サブユニットをコードする *unc-32* 遺伝子の神経系特異的選択的スプライシング制御機構の解明

線虫の *unc-32* 遺伝子には2組の相互排他的エクソン(4a/4b/4c, 7a/7b)があることが知られており、本研究で蛍光レポーターを作製したところ、4aは腸、4bは神経系、4cは咽頭に主に発現する組織特異性を、7aは神経系に、7bはその他の組織に発現する組織特異性を示すことが明らかとなった。さらに、エクソン7aが神経系特異的に選択されるための制御因子として、ASD-1, FOX-1と神経系特異的な RNA 結合タンパク質 UNC-75 を同定し、これらの因子が作用するシスエレメントを特定した。また、UNC-75 が神経系特異的なエクソン4aの選択性にも

必須であることを示した。

3. 今後の展開

本研究により、線虫のようにゲノムサイズが小さく、イントロンの平均長が哺乳類に比べてかなり短いモデル生物であっても、選択的 mRNA プロセシングの制御にはイントロンにある複数のシスエレメントに複数の制御因子が結合することが必要なことが一般的であることが明らかとなった。このことは、制御因子をさまざまに組み合わせることで、さまざまな遺伝子をさまざまな特異性で制御できる可能性を示している。今後も同様の方法で制御因子とそのシスエレメントが明らかになっていくことで、選択的プロセシング制御の細胞暗号の実体ともいえる役者が出揃うことが期待される。

一方、少数の個別のモデル遺伝子の解析で得られた制御因子の発現パターンやそのシスエレメントの配列からを他の多くの遺伝子の選択的プロセシングパターンを予測できるような規則性を導くことの困難さも明らかとなった。規則性の一般化を困難にする要因として、個々のシスエレメントの配列が必ずしも明確なコンセンサスを持たないこと、複数の制御因子が同時に存在して初めて協働的結合や組織特異性を示す場合があることが挙げられる。今後は、より多くの遺伝子の選択性プロファイルや制御因子を網羅的に解析して例数を増やしていくことで、線虫における、さらには他の生物にも当てはまる普遍的な細胞暗号の解明につなげていくことが期待される。

本研究で行ったモデル生物を用いた生体内選択的プロセシングパターンの可視化と順遺伝学的な解析手法は、mRNA 前駆体に直接結合する制御因子以外にも、シグナル伝達機構やエピジェネティックな制御機構など、培養細胞を用いた生化学的解析では同定が困難な間接的なプロセシング制御因子を同定できる可能性を持っている。今後の解析の進展により、生体における遺伝子発現制御機構解明のための予期せぬ新たな手がかりが得られることが期待される。

4. 自己評価

本研究では、さまざまなタイプの選択的プロセシングを受ける個々のモデル遺伝子について、選択性プロファイルの生体内可視化に成功し、さらに、遺伝学的な解析により新規の進化的に保存された選択的プロセシング制御因子やそのシスエレメントを実験的に同定して、mRNA 前駆体の選択的プロセシングの運命決定過程を明らかにすることができた。このことは、生体内における選択的プロセシング制御機構解明の手段としての蛍光レポーター系やモデル生物の有用性を示しており、今後もさまざまなモデル遺伝子を制御する因子やエレメントの解明につながっていくことが期待できる。一方で、プロセシング制御機構の規則性を一般化するための道筋、プロセシング制御因子やシスエレメントが進化的に保存されていることの生物学的意義、個々の制御因子が一群の標的遺伝子をまとめて制御することの生物学的意義を探るための新たな方法論の開発については今後の展開に委ねることとなった。

5. 研究総括の見解

本研究では、細胞の種類や発生段階に応じて、mRNA 前駆体がそれぞれ特異的・選択的に

プロセッシングされるための制御機構の実態解明を目指した。モデル生物として線虫を用い、当研究者らが開発した生体内選択的スプライシング可視化技術を応用した。遺伝学的な解析を組み合わせた結果、進化的に保存された選択的プロセッシング制御因子やそのシスエレメントを実験的に同定することに成功し、コラーゲン遺伝子 *let-2* の発生段階依存的な相互排他的選択的エクソンの制御機構を解明するなど、いくつかの mRNA 前駆体の選択的プロセッシングの運命決定過程を明らかにしたことは評価に値する。この方法により、さらに多くの制御因子やシスエレメントを明らかにし、mRNA 選択的プロセッシング制御に関する役者が出揃うことを期待している。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Genta Ohno, Masatoshi Hagiwara, Hidehito Kuroyanagi. STAR family RNA-binding protein ASD-2 regulates developmental switching of mutually exclusive alternative splicing in vivo. **Genes & Development**. (2008) 22: 360-374.
2. Hidehito Kuroyanagi, Genta Ohno, Hiroaki Sakane, Hiroyuki Maruoka & Masatoshi Hagiwara. Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation *in vivo* using fluorescence reporters in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Nature Protocols** (2010) 5: 1495-1516.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

学会発表・招待講演

1. Hidehito KUROYANAGI. Alternative splicing reporters offer a path to splicing codes. 文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクト線虫シンポジウム—Nematode: An Ideal Model Organism for Functional Genomics—(2008.11.5, 東京).
2. Hidehito Kuroyanagi, Masatoshi Hagiwara. Fox-1 family and CELF family RNA-binding proteins regulate neuron-specific alternative splicing in *C. elegans*. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on EUKARYOTIC mRNA PROCESSING (2009.8.18-22).
3. Hidehito Kuroyanagi. Tissue-specific alternative splicing regulation in *C. elegans*. GENE REGULATION PROGRAMME SEMINAR, ICREA and Centre de Regulacio Genomica, Barcelona, Spain (2009.12.16).
4. 黒柳秀人. 蛍光レポーター線虫の作製と遺伝学的解析. 文部科学省 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 細胞光計測・制御のための新規バイオ技術創成クラスター 第2回シンポジウム(2010.3.10、横浜).
5. Hidehito KUROYANAGI. Regulation of Tissue-Specific Alternative Splicing in *C. elegans*. The 19th CDB Meeting“RNA Sciences in Cell and Developmental Biology” (2010.5.10-12, Kobe).

受賞

平成 21 年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞(2009 年 4 月)

総説等

1. KUROYANAGI, H. Fox-1 family of RNA-binding proteins. Cell. Mol. Life Sci. (2009) 66: 3895-3907.
2. 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」、54: 2044-2048.
3. 黒柳秀人. 選択的pre-mRNAスプライシング制御機構解明への新たなアプローチ. 生化学 2010 年 5 月号、82: 402-411.
4. 大野源太、黒柳秀人. 選択的スプライシングの分子機構と生命現象. 実験医学増刊 Vol.28 No.10 拡大・進展を続けるRNA研究の最先端 (2010.6).