JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	DMD における新規スプライシング機構の証明
Author(s)	鈴木，仁
Citation	科学研究費補助金研究成果報告書: 1-4
Issue Date	2012-05-28
Type	Research Paper
Text version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/10119/10599
Rights	
Description	研究種目：若手研究（B），研究期間：2010～2011，課題番号：22710192，研究者番号：00447690，研究分野：分子生物学，科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

様式Ｃ－１９

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　５月２８日現在

機関番号：13302
研究種目：若手研究（Ｂ）
研究期間：2010～2011
課題番号：22710192
研究課題名（和文）　DMD における新規スプライシング機構の証明

研究課題名（英文）　Evidences of a novel splicing mechanism in DMD gene

研究代表者
鈴木　仁（SUZUKI HITOSHI）
北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリアルテクノロジーセンター・助教
研究者番号：00447690

研究成果の概要（和文）：
スプライシングでは、通常 mRNA とラリアット型のイントロン RNA が生成する。本研究では、生体内のイントロン RNA に末端連結型が存在する可能性について検証した。これまでの結果、末端連結型はイントロンや生体組織に依存せず、普遍的に検出される可能性が示唆された。また、生体由来の total RNA を処理した RNase R 耐性 RNA には、予測されたイントロン RNA が含まれるだけではなく、第１エキソン領域の未知の RNA が多量に存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：
Lariat intron is a by-product generated by pre-mRNA splicing. In this study, I investigated a possibility that an ends-connecting intron could be produced *in vivo*. The results suggested that the ends-connecting introns were widely detected. There was likely to be no tissue dependence or intron dependence. Besides, it was suggested that RNase R-resistant RNA contained not only intron RNAs, but also many unknown RNAs located in the first exon regions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：　分子生物学
科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学
キーワード：RNA、スプライシング、疾患関連遺伝子、エキソンスキップ治療

１．研究開始当初の背景

デュシェンヌ型筋ジストロフィーを含めた難病治療に有効な方法として、エキソンスキップ療法が考えられている。デュシェンヌ型筋ジストロフィーでは、DMD遺伝子(Dystrophin)に未成熟終止コドンを生ずる遺伝的な変異や欠失などが起こり、タンパク質が欠損する。エキソンスキップ治療は、モルフォリノオリゴなどのアンチセンス医薬により、特定のエキソンのスプライシングを抑制してインフレームに復原し、正常型に近いmRNAとタンパク質の発現を誘導する手法である。正常に近いタンパク質が発現することで病態の改善が図られると考えらており、実際にヒトやモデル

犬において病態の改善が確認されている。また、国際共同治験も行われている。エキソンスキップ治療とアンチセンス医薬の開発には、スプライシング研究の基礎的な知見が必要不可欠である。

pre-mRNAスプライシングは、その発見から現在に至るまで、一貫して2段階型スプライシングモデルが提唱されている。このモデルでは、第1段階の反応で5'スプライスサイトの切断とラリアット型の中間体が形成され、第2段階で3'スプライスサイトの切断とエキソン同士の連結が行われる。つまり、このモデルでは、mRNAとその副産物としてラリアット型のイントロンRNAが生成することになる。

こうした研究は、HeLa細胞の核抽出液を用いた*in vitro*スプライシングや細胞内の過剰発現系が用いられた。解析対象となるイントロンも、1kb未満から長くとも3～4kbのもの、あるいは中央を取り除いた人工的なイントロンであった。従って、DMDのような巨大な遺伝子やイントロンのスプライシングを検証することは極めて難しい。

私は、DMD遺伝子のイントロンなど、各個別のイントロンRNAを解析する研究を行ってきた。生体由来のtotal RNAに含まれるイントロンRNAに関して、ラリアットイントロン検出用RT-PCR法や、RNase Rによるイントロン RNA調製法を行った。特に、RNase Rを用いた解析法は私達がこれまでに確立した手法である。詳細は、「３．研究の方法」に記述する。生体由来のtotal RNAを用いた上記の解析から、イントロンRNA由来と考えられる様々な未知の産物が検出された。本研究では、従来のブランチ型とは全く異なる末端連結型のイントロンRNA由来産物について検討を行った。これは、イントロンの5'末端がブランチ部位ではなく直接3'末端と連結しており、新規スプライシング機構の存在を示唆する。

２．研究の目的

本研究の目的は、我々の発見した末端連結型イントロンを生じる新たなスプライシング仮説の証拠を積み重ねることである。現在、ラリアット型のイントロンを生じるスプライシングモデルが広く受け入れられている。そのため、より慎重な解析が必要となる。具体的には、以下の３点について解明することを目的とする。

(1) 末端連結型のスプライシング機構の普遍性について、組織依存性やイントロン依存性を検証する。

(2) 末端連結型が検出されるイントロンについて、*in vitro*スプライシングにより検証する。

(3) イントロンRNAを含むと予測されるRNase R耐性RNAのゲノムワイドな検証を行う。

３．研究の方法

生体組織由来の total RNA に含まれるイントロン RNA を検出するため、ラリアットイントロン検出用 RT-PCR 法を行った（図 1）。逆転写酵素は、ブランチ部位を乗り越えて cDNA を生成する。プライマー（赤矢印・青矢印）は、ゲノム上で反対向きである。Pre-mRNA や、誤って混入したゲノム DNA は増幅されずに、

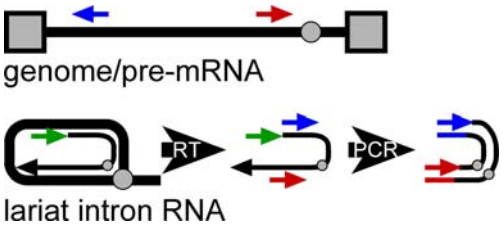

図1　ラリアットイントロン検出用RT-PCR。

イントロン RNA のみが増幅される。PCR には Nested PCR を行い、非特異産物の増幅を抑える。この方法は、通常の RT-PCR と同じように、total RNA の種類やプライマーの配列を変えることで、各個別のイントロン RNA を検出することができる。

一方、RNase R によるイントロン RNA 調製法には骨格筋の total RNA を用いた。RNase R は､RNA の３次構造による影響を受けにくく、効率的に RNA を分解する 3'-5' エキソリボヌクレアーゼである。ただし、イントロン RNA のブランチ部位を乗り越えられないため、イントロン RNA の環状部分を分解することはできない。RNase R で total RNA を処理して得られた RNase R 耐性 RNA には、多くのイント

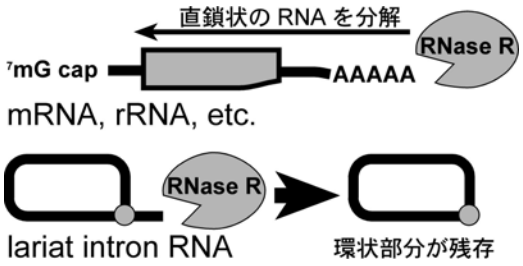

図2　RNase RによるイントロンRNA調製法。

ロン RNA が含まれると考えられる。ゲノムワイドにイントロン RNA を検証するため、RNase R 耐性 RNA を用いたタイリングアレイ解析を行った。

４．研究成果

まず、末端連結型のイントロン RNA の普遍性について検証した。DMD 遺伝子では、検証した 13 個のイントロン中、9 個のイントロンで末端連結型の産物を検出した。そのうち、第 31、35、及び 58 イントロンについて、DMD 遺伝子の発現する脳や腎臓でイントロン RNA の存在を検証した。その結果、第 31 と第 58 イントロンは骨格筋以外の組織でも末端連結型が検出された。第 35 イントロンについては、ラリアット型の産物が検出された。また、ハウスキーピング遺伝子である ENO1 の第 4 イントロンと HSP90AB1 の第 1 イントロンについても検証した。これらは、過去に HEK 細胞由来の total RNA からラリアット型イントロンが検出されている。上記の組織では、これらのイントロンでも末端連結型が検出された。限られたイントロンではあるが、末端連結型イントロンを生じるスプライシングは、組織やイントロンに関わらず、普遍的に起こると考えられる。

次に、DMD 遺伝子のイントロン（第 31、35、58）について、ミニ遺伝子を作製した。*in vitro* スプライシングの後、イントロン断片を増幅して配列を確認した。その結果、いずれも典型的なラリアット型が生成していた（図 3）。*in vitro* スプライシング反応には HeLa 細胞の核抽出液を用いるため、生体内での反応を完全には反映していない可能性が示唆された。

図3　イントロンRNAの解析。

RNase R 耐性 RNA を用いたタイリングアレイ解析からは、主に 2 つの点が観察された。その典型的な例として、CLDND1 遺伝子における結果を図 4 に示した。最下部は、CLDND1 mRNA のゲノム構造を示す。太線のエキソン部分には、total RNA に含まれる mRNA 由来のシグナルが検出された。RNase R 耐性 RNA のシグナルに注目すると、最終イントロン領域に RNase R 耐性 RNA におけるシグナルの増加が観察できた。図 4 上段に示すように、RNase R 耐性 RNA と total RNA の比を取ると明確になる。これは、イントロン性 RNA の蓄積を示すと考えれられる。一方、より顕著なシグナルが第 1 エキソン領域に検出された。第 1 エキソンを除き、他のエキソン上のシグナルは著しく減少した。RNase R は RNA を 3’側から分解するため、第 1 エキソンに向かって徐々にシグナルが増加する可能性もある。しかし、第 2 エキソンのシグナルは顕著に減少しており、分解方向の問題ではないと考えられる。CLDND1 ようなパターンを示す遺伝子は、第 3、21、22、及び X 染色体で少なくとも 80 個確認された。これには DMD の選択的プロモーター領域も含まれている。さらに、それらの第 1 エキソン領域に注目すると、エキソンの周辺でシグナルが蓄積し、エキソン内部ではむしろ減少するというものが多く観察された。第 1 エキソン領域に特殊な RNA が RNase R 耐性 RNA として存在することが示唆された。

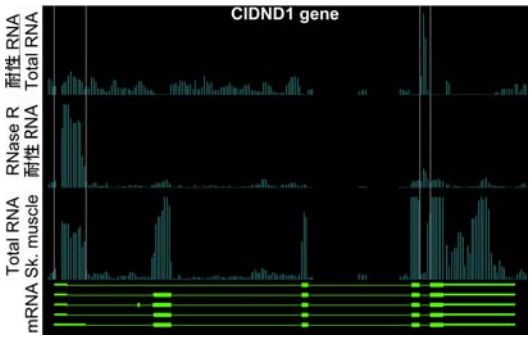

図4　RNase R耐性RNAのタイリングアレイ。

本来目的としたイントロン性 RNA に由来すると考えられるシグナルは顕著ではなく、末端連結型とラリアット型を見分けることは困難であった。一方で、第 1 エキソン領域の非常に興味深い RNA の存在を検出した。これは、転写開始からスプライシングまでに、未知のメカニズムが存在する可能性を示唆する。

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 5 件）

① Kameyama, T., Suzuki, H., and Mayeda, A. (2012) Re-splicing of mature mRNA in cancer cells promotes activation of

distant weak alternative splice sites. *Nucleic Acids Res.* in press. Refereed

② Suzuki, H., Takeuchi, M., Sugiyama, A., Alam, A.H.M.K., Vu, T.L., Sekiyama, Y., Dam, C.H., Ohki, S., and Tsukahara, T. (2012) Alternative splicing produces structural and functional changes in CUGBP2. *BMC Biochem.* in press. Refereed

③ Sekiyama, Y., Suzuki, H., and Tsukahara, T. (2012) Functional gene expression analysis of tissue-specific isoforms of Mef2c. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32: 129-139. Refereed

④ Suzuki, H., Osaki, K., Sano, K., Alam, A.H.M.K., Nakamura, Y., Ishigaki, Y., Kawahara, K., and Tsukahara, T. (2011) Comprehensive Analysis of Alternative Splicings and Functionality in Neuronal Differentiation of P19 cells. *PLoS One* 6: e16880. Refereed

⑤ Alam, A.H.M.K., Suzuki, H., and Tsukahara, T. (2010) Retinoic acid treatment and cell aggregation independently regulate alternative splicing in P19 cells during neural differentiation. *Cell. Biol. Int.* 34: 631-643. Refereed

〔学会発表〕(計１件)

① 鈴木　仁、P19 細胞の神経分化における選択的スプライシングの網羅的解析と経路網探索、第１２回日本ＲＮＡ学会年会、2010 年 7 月 28 日、東京

〔その他〕

ホームページ等

http://www.jaist.ac.jp/profiles/zenken.php?profile_id=487&table=paper

６．研究組織

(1)研究代表者

鈴木　仁（SUZUKI HITOSHI）

北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリアルテクノロジーセンター・助教

研究者番号：00447690

(2)研究分担者

該当無し　　（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者

該当無し　　（　　）

研究者番号：