

Title	神経特異的なスプライシング因子、NSSR1および2の機能解析
Author(s)	松下, 竜介
Citation	
Issue Date	2005-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/3172
Rights	
Description	Supervisor: 塚原 俊文, 材料科学研究科, 修士

神経特異的なスプライシング因子、NSSR1 および 2 の機能解析

松下 竜介（塚原研究室）

【目的】 高等生物において、DNA から RNA に転写され、スプライシングが行われ、成熟型の mRNA が作られる際、単にエキソンを並んでいる順番につなぎ合わせて mRNA ができるのではなく、エキソンを組み合わせ、謂わば、編集を行うことによって、多様な mRNA を作る機構が存在する。このスプライシングを選択的スプライシング(Alternative Splicing)と呼び、このことは一つの遺伝子から多様な蛋白質を作る生命の工夫の一つである。

脳・神経系に特異的に発現する遺伝子の多くは選択的スプライシングをするが、この事実は複雑な神経の機能を実現することに選択的スプライシングが寄与しているからと考えられる。しかしながら、脳・神経における選択的スプライシングの機構は明らかになっていない。この脳・神経特異的に発現する蛋白質に NSSR1 および 2 がある。本研究では、脳・神経におけるスプライシングの制御機構解明のため、NSSR1,2 の機能の解析を行った。

【実験・結果】 まず始めに、構造から機能を推定するために蛋白質の二次構造予測ツールである PSIPRED を用いて、NSSR1 の全長の二次構造を予測した。その結果、NSSR1 の RRM(RNA recognition motif)の二次構造は B/a/B/B/a/B 構造を持ち、それに加えて、RRM の長さは 100 残基程度であった。これらの結果は、他の RRM(U2AF65,hnRNP D0 RBD 1 and 2,mushashi 1 RBD 1)の構造と類似している。NSSR2 と NSSR1 の RRM は全く同じ配列なので、NSSR2 に関しても同じことが言える。これらのことは、NSSRs RRM が実際に RNA 結合機能を有していることを示唆している。

次に、NSSR1,2 が pre-mRNA と相互作用して、スプライシングに関与するのであれば、他の snRNP や SR 蛋白質と複合体を形成しながら、スプライシングを行う可能性が高いと推定される。そのため、蛋白質-蛋白質間の相互作用についての実験を行った。まず、全長の NSSR1 又は 2 を bait とした Yeast による two-hybrid screening を行った。その結果、NSSR2 に関しては 90 のクローンが陽性を示した。その中でも 11 及び 17 クローンと多く陽性を示していて、さらにスプライシングに深く関わっていることがすでに確認されている tra2B 及び SRp30c に焦点を当て、哺乳類細胞内における NSSRs との相互作用についての実験を行った。

myc で標識した tra2B と FLAG で標識した NSSR1,2 をそれぞれ COS7 細胞に強制発現させ、細胞を lysate にした後に、anti-myc 抗体で immunoprecipitation を行った。その後に、anti-FLAG 抗体を用いて Western Blotting を行った。その結果、anti-myc 抗体で immunoprecipitation された沈降物に、anti-FLAG 抗体によって認識された蛋白質のバンドが確認され、分子量も正しいことから tra2B と NSSR1,2 が共沈していたことが示された。この結果は tra2B と NSSRs が相互作用していることを強く示唆する。SRp30c についても同様の実験を行い、NSSRs との相互作用が示唆された。これらの結果は、NSSR 蛋白質が、pre-mRNA splicing を調節するために tra2B 及び SRp30c と協調することを示唆している。ただし、NSSR1 と tra2B との相互作用については、NSSR2 と tra2B や NSSRs と SRp30c などの相互作用と比べて弱いようであった。このことは NSSR1 と 2 の機能の違いを表しているのかもしれない。

最後に、NSSR1 がどの器官に発現しているかを明らかにするために、anti-NSSR1 抗体を用いて、Western Blotting を行った。抗体の非特異的反応によるバンドと区別するための Negative control として NSSR 遺伝子の knock out mouse を使い、Wild type mouse の lysate と比較した。その結果、NSSR1 は、眼に強く、脳全体に弱く発現していることが分かった。

【Key Words】 Alternative Splicing, SR protein, NSSR1,2