

してこれが二つの精細胞へと移行していることが示唆された (図4)。生殖核でいわば見せしめのようにその中のトランスポゾン配列に由来する siRNA を合成し、その siRNA を次世代につながる精核に移動させ、そこで RNA サイレncing の機構でトランスポゾンが飛ばないように作用していると考えられるのである<sup>15)</sup>。

## 最 後 に

結果として広く RNA サイレncing の系が活性化されるなどして、植物が常時、ストレスに対する臨戦態勢をしつようになっている気がする。今後、複数の環境変化などが加わった際の、植物の応答の研究などから未知の姿がさらに出てくることを期待している。

本研究は、渡邊研究室に所属した多くの卒業生、大学院生の実験結果をもとに流れを紹介した。彼らに感謝したい。

- 1) Brodersen, P., Sakvarelidze-Achard, L., Bruun-Rasmussen, M., Dunoyer, P., Yamamoto, Y. Y., Sieburth, L., & Voinnet, O. (2008) *Science*, **320**, 1185–1190.
- 2) Grimson, A., Srivastava, M., Fahey, B., Woodcroft, B.J., Chiang, H.R., King, N., Degnan, B.M., Rokhsar, D.S., & Bartel, D.P. (2008) *Nature*, **455**, 1193–1198.
- 3) Voinnet, O. (2009) *Cell*, **136**, 669–687.
- 4) Kurihara, Y. & Watanabe, Y. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12753–12758.
- 5) Kurihara, Y., Yuasa, T., & Watanabe, Y. (2006) *RNA*, **12**, 206–212.
- 6) Fujioka, Y., Utsumi, M., Ohba, Y., & Watanabe, Y. (2007) *Plant Cell Physiol.*, **48**, 1243–1253.
- 7) Vaucheret, H. (2008) *Trend Plant Sci.*, **13**, 350–358.
- 8) Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., & Watanabe, Y. (2008) *Plant Cell Physiol.*, **49**, 493–500.
- 9) Parker, R. & Sheth, U. (2007) *Mol. Cell*, **25**, 635–646.
- 10) Iwasaki, S., Takeda, A., Motose, H., & Watanabe, Y. (2007) *FEBS Lett.*, **581**, 2455–2459.
- 11) Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M., & Carrington, J.C. (2005) *Cell*, **121**, 207–221.
- 12) Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R., & Watanabe, Y. (2009) *FEBS Lett.*, **583**, 1261–1266.
- 13) Kawakami, S., Watanabe, Y., & Beachy, R.N. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 6291–6296.
- 14) Tagami, Y., Inaba, N., Kutsuna, N., Kurihara, Y., & Watanabe, Y. (2007) *DNA Research*, **14**, 227–233.
- 15) Slotkin, R.K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdzic, M., Becker, J., Feijo, J.A., & Martienssen, R.A. (2009) *Cell*, **136**, 461–472.

渡邊 雄一郎

(東京大学大学院総合文化研究科)

Spatiotemporal regulation of small RNA function in plants  
Yuichiro Watanabe (Department of Life Sciences, University of Tokyo, Komaba 3-8-1, Meguro, Tokyo 153-8902, Japan)

## 選択的 pre-mRNA スプライシング制御機構解明の新たなアプローチ

### はじめに

多細胞生物は、その複雑な形態や巧妙な機能を実現するために、組織・細胞の種類や発生段階に応じて多様なタンパク質を産生している。しかし、ゲノムプロジェクトにより、タンパク質をコードする遺伝子の数は、たとえばヒトで約2万数千個程度と、当初予想された数よりはるかに少なく、タンパク質の多様性実現のためには、一つの転写産物からでも多様な mRNA を産生できる mRNA 前駆体 (pre-mRNA) の選択的スプライシングが主要な役割を担っていると考えられるようになった。実際に、近年の mRNA の網羅的解析により、後述のように多くのタンパク質遺伝子にスプライスバリエントが存在し細胞の種類や発生段階に応じて特異的に発現していることが示され、選択的スプライシングは多細胞生物にとって重要な遺伝子発現制御機構であることが明らかとなった。

多くの遺伝子の pre-mRNA が生体においてそれぞれ細胞特異的なパターンで選択的スプライシングを受けるという事実、それぞれの細胞に特異的に存在する制御因子群が pre-mRNA 上の何らかの配列情報 (シスエレメント) を手がかりにスプライシングパターンを決定していることを示唆する。しかし、生体の各細胞におけるスプライシング制御機構の実体は解明されておらず、「細胞暗号 (cellular codes)」と呼ばれる。この「細胞暗号」の解読、すなわち、組織・細胞特異的なスプライシング制御因子群やシスエレメントの同定と、それらの作用によって pre-mRNA の運命が特異的に決定する分子機構と規則性の理解が、ゲノム情報が明らかにされた今日における遺伝子発現制御機構解明の重要な課題である。

本稿では、今世紀に入って急速に発展したグローバルな解析方法、すなわち、マイクロアレイや比較ゲノムによる

選択的スプライシングバリエントや制御エレメントの探索について触れた後、最近筆者らや他のグループから報告された蛍光タンパク質による選択的スプライシングパターンの生体内での可視化方法と、それを利用して筆者らが明らかにした選択的スプライシング制御機構を概説する。

## 1. 序 論

### 1-1. 選択的スプライシングの分類

図 1A に、pre-mRNA 選択的スプライシングの基本 5 類型の模式図を示す。図中のカセットエクソン型は、さまざまな多細胞生物で 5 類型のうち最も高頻度に見られる。相互排他的エクソン型は、頻度が低いが、相互排他性を実現するための精緻な制御が存在すると考えられ、後述のように制御機構の解析に適する。実際の mRNA では、これらの基本 5 類型のほか、第 1 エクソンの開始点すなわち転写の制御に依存する選択的プロモーターや選択的ポリ A 付加部位との組み合わせにより、さらに複雑な選択的スプライシングパターンを示す遺伝子が多数存在する。

### 1-2. 選択的スプライシング制御機構の概要

スプライシングの分子機構の研究では、主に培養細胞の核抽出液を用いた試験管内での pre-mRNA スプライシング反応系によって、構成的スプライシングの反応機構や選択的スプライシングの制御機構が解析されている。また、選択的スプライシング制御機構の研究では、モデル遺伝子から作製したミニ遺伝子をトランスフェクションにより培養細胞に導入し、RT-PCR 法によってスプライシングパターンを解析する手法も併せて用いられ、選択的スプライシングの制御に必要なシスエレメントや細胞内で選択的スプライシングパターンを修飾する制御因子が探索された<sup>1)</sup>。

これらの主に培養細胞を用いた解析で、シスエレメントとして、エクソンまたはイントロン上においてエクソンの mRNA への包含を促進するもの (ESE, exonic splicing enhancer および ISE, intronic splicing enhancer) と抑制するもの (ESS, exonic splicing silencer および ISS, intronic splicing silencer) が同定された。そして、制御因子として、主に ESE に結合する SR (Ser-Arg) タンパク質群や ESS や ISS に結合する hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein) タンパク質群が同定され、普遍的に発現するこれらの制御因子による正負の活性の総和によってエクソンが包含されるか否かが決定されるというエクソン選択性制御の基本的なモデルができあがった (図 1B)。

しかしながら、核抽出液で試験管内スプライシングが起る細胞や基質となる pre-mRNA の種類が限られているた

めに細胞特異的選択的スプライシングを試験管内で再現することは難しく、組織特異的制御因子の同定は遅れている。さらに、今日では、後述のように非常に多くの遺伝子が何らかの特異的な選択的スプライシング制御を受けること、培養細胞では、生体における内在性の遺伝子の制御機構を必ずしも反映していないことから、生体内での選択的スプライシング制御の全貌を解析するには、よりグローバルな手法や生体での選択的スプライシング制御を反映した実験系の開発が待たれていた。

## 2. 選択的スプライシングの網羅的解析

### 2-1. スプライスバリエントの網羅的探索

従来から行われていた発現タグ (EST, expressed sequence tag) 解析で得られる cDNA の部分配列同士を比較することで、スプライスバリエントが見つかる。様々な組織、細胞株での EST 解析が進むに従って、新たなバリエントが次々に見つかってきた。近年では、cDNA の全長配列の網羅的な解読とゲノムプロジェクトが進み、選択的スプライシングに特化したデータベースも国内外で作成されて、選択的スプライシングを受ける遺伝子の数は上方修正が繰り返された<sup>2)</sup>。

さらに、図 2A のようにスプライシングパターンの違いを検出できる選択的スプライシングマイクロアレイが作製され、哺乳類の多くの遺伝子で選択的スプライシングが組織特異的に制御されていることが明らかになった<sup>3)</sup>。現在では、ヒトのタンパク質遺伝子の 70% 以上がなんらかのバリエントを持つとされている。

最近の次世代シーケンサーの発達により、今後も発現量の低いバリエントが見つかることが予想され、選択的スプライシングを受ける遺伝子の割合はさらに増えるものと予想される。ごく最近、実際に次世代シーケンサーでスプライシングの解析を行った例が報告されているので参照されたい<sup>4-6)</sup>。

### 2-2. シスエレメントの網羅的探索

前項の mRNA の網羅的解析による組織特異的選択的エクソンの同定と近年の様々な種でのゲノムプロジェクトの成果から、バイオインフォマティクス解析により、選択的スプライシングを受けるエクソンの周辺に濃縮している配列や進化的に保存されている短い配列が多数報告され、選択的スプライシングのシスエレメントの候補と考えられている。たとえば、Conboy らは、脳特異的な 27 個の選択的エクソンの周辺で進化的に保存されている 6 塩基の配列を探索して、UGCAUG を選択的エクソンの下流のイントロ

ンに最も濃縮した配列として抽出し、さまざまな脊椎動物種で選択的エクソンとの相対的な位置関係も含めて保存されていることを示した<sup>7)</sup>。

培養細胞を用いて実験的に ESS 配列を網羅的に探索する試みもなされた。たとえば、Burge らは、図 2B のように、ランダムな 10 塩基のライブラリーを挿入した試験エクソンを持つレポーターミニ遺伝子を培養細胞にトランスフェクションし、試験エクソンがスキップされてレポーターの緑色蛍光タンパク質 (GFP) が発現する細胞をクローン化することで、133 種類の ESS を実験的に同定した。さらに、クラスター解析によりこれらを 7 種類のモチーフに分類し、これらの ESS モチーフの探索が偽エクソンや選択的エクソンのより正確な予測に有用であることを報告した<sup>8)</sup>。

このように、シスエレメントの候補配列は近年多数報告されている。しかし、上述のようなバイオインフォマティクス解析は保存されている配列の抽出にとどまり、予測されたシスエレメントが実際に選択性の制御に関わっているか否かの解析には何らかの実験的な解析手段が不可欠である。また、インフォマティクスやスクリーニングで得られた配列に結合する制御因子の同定には、やはり次節のような実験的な解析が必要である。

### 2-3. 制御因子同定の試み

ゲノムプロジェクトにより、一つの種に存在する RNA 結合モチーフを持つタンパク質を網羅的に予測できるようになった。潜在的にスプライシングやプロセシングに関与し得る予想遺伝子の数は、哺乳類やショウジョウバエ、線虫では数百種類を数える。しかし、スプライシング制御因子の候補がこれら有限の RNA 結合タンパク質群に絞られたことから、次のような RNA 結合タンパク質の側からのアプローチが試みられるようになった。

組換えタンパク質を用い SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) 法により RNA 結合タンパク質の標的配列を試験管内で濃縮することで、結合する RNA のコンセンサス配列の同定が試みられた。たとえば、井上らは、脊椎動物の Fox-1 ファミリー (線虫 *feminizing gene on X chromosome (fox)-1* 遺伝子の相同遺伝子) RNA 結合タンパク質が先述の (U)GCAUG 配列に特異的に結合することを見出し、実際に Fox-1 ファミリーが (U)GCAUG 配列を介してミトコンドリア ATP 合成酵素 F1 $\gamma$  サブユニット遺伝子などの筋特異的選択的スプライシングを制御することを示した<sup>9)</sup>。しかし、RNA 結合タンパク質の結合配列は必ずしも Fox-1 ファミリーのように特異的でな

く、SELEX 法の結果から標的遺伝子を予測するのは難しいのが実情である。

一方、RNA 干渉 (RNAi) を利用して特定の遺伝子のノックダウンによる機能解析が網羅的に行えるようになり、選択的スプライシングに影響を与える因子のスクリーニングが行われた。Graveley らは、ショウジョウバエの培養細胞である S2 株に対して 250 個の RNA 結合モチーフを持つタンパク質遺伝子の RNAi を行い、S2 細胞で発現している三つの遺伝子の計 19 個の選択的エクソンのスプライシングパターンを RT-PCR により解析して、新規のものも含め 47 個のスプライシングに影響する因子を同定した<sup>10)</sup>。しかし、RNAi によって解析できる標的遺伝子やスプライシング制御因子はその細胞株に発現しているものに限られることから、生体で機能する制御因子の同定には必ずしも直結しない。

哺乳類でさまざまな先駆的な解析によって例外的によく解析されている組織特異的選択的スプライシング制御因子は、脳特異的制御因子 Nova である<sup>11)</sup>が、詳細は割愛する。

### 3. 複数の蛍光タンパク質を利用した選択的スプライシングレポーターの開発

近年になって、筆者らを含む複数のグループにより、複数の蛍光タンパク質を用いて選択的スプライシングのパターンを可視化するレポーターミニ遺伝子作製法が開発され、培養細胞やマウス、線虫などの動物個体で生きたままスプライシングパターンを可視化した例が報告された。これらのミニ遺伝子に共通の特徴は、選択的スプライシングパターンに応じて複数の異なる蛍光タンパク質が発現するように工夫してレポーターミニ遺伝子が構築されていることである。従来の単色のスプライシングレポーターが各細胞における転写量等の差異を考慮せず特定のバリエーション mRNA の最終的な産生量をモニターしていたのに対し、複数の蛍光タンパク質を用いる方法では、一方の蛍光タンパク質の発現が内部対照として機能し、蛍光タンパク質間で発現量を比較することによって、各細胞におけるスプライシングパターンをプロファイリングできる。

複数の蛍光タンパク質による選択的スプライシングレポーターミニ遺伝子は、次のように大きく単一コンストラクト型と複数コンストラクト混合型に分けられる。

図 3A には、相互排他的エクソンの使い分けを可視化するために筆者らが線虫で用いている典型的な 2 コンストラクト混合型ミニ遺伝子の模式図を示す。それぞれのミニ遺伝子は相互排他的エクソン a または b を使ったときのみ

それぞれ GFP または赤色蛍光タンパク質 (RFP) を発現するようにデザインされており、これらのミニ遺伝子を同じプロモーター制御下で同時に発現させることで、各細胞でのスプライシングバリエーションの比率を、GFP/RFP の比という形で可視化することができる。他の型の選択的スプライシングについても、同様に、GFP/RFP の発現がそれぞれ特定のスプライシングパターンを反映するように工夫することで、レポーターミニ遺伝子を構築できる。筆者らは、三つの蛍光タンパク質を利用して3種類のスプライスバリエーションの発現をモニターすることに成功している (未発表)。

Carstens らは、哺乳類の線維芽細胞成長因子 (FGF) 受容体 *FGFR2* 遺伝子を基に図 3A と同様の1組のレポーターミニ遺伝子を作製して培養細胞にトランスフェクションし、相互排他的エクソン IIIb と IIIc の細胞株特異的な選択性を GFP/RFP の発現で可視化できることを示した<sup>12)</sup>。さらに、これらのミニ遺伝子の安定発現株にスプライシング制御因子を共発現させてフローサイトメトリーで解析することで、制御因子がミニ遺伝子のスプライシングに与える影響を解析できることを示した。

一方、単一コンストラクト型では、一つのミニ遺伝子に複数の蛍光タンパク質 cDNA を工夫して挿入することで、複数のスプライシングパターンをモニターすることを可能にしている。Cooper らは、図 3B のように、カセットエクソンの包含またはスキップに応じて二つの蛍光タンパク質が相互排他的に発現する単一コンストラクト型レポーターミニ遺伝子を構築し、制御因子の共発現により選択的スプライシングパターンが影響を受ける様子をフローサイトメトリーで解析できることを示した<sup>13)</sup>。このような単一コンストラクト型の長所は、トランスフェクションなどで培養細胞へ導入する際に、各細胞に導入されるミニ遺伝子のコピー数や発現量の差によらず、各細胞における二つの蛍光タンパク質の発現量の比がそのままスプライシングパターンを反映することにある。最近、Black らは、スプライシングの異常で前頭側頭葉型痴呆症 (FTDP-17, frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17) が引き起こされる微小管結合タンパク質タウ (*MAPT*) 遺伝子のエクソン 10 の包含とスキップを図 3B と似た構造のミニ遺伝子で可視化し、米国食品医薬品局 (FDA) に認可された医薬品のライブラリーなどを用いてハイスループットスクリーニングを行い、強心ステロイド類がレポーターおよび内在性の *MAPT* エクソン 10 のスプライシングに影響を与えることを報告して<sup>14)</sup>、選択的スプライシングの制御

が医薬品の標的になりうることを示した。

初めてマウス個体で組織特異的選択的スプライシングを可視化したのは Garcia-Blanco らである<sup>15)</sup>。彼らは前述の *FGFR2* 遺伝子のエクソン IIIb の組織特異的サイレンシングを可視化するために、図 3C のような1組のレポーターミニ遺伝子を構築しそれぞれ *ROSA26* 遺伝子座に相同組換えにより導入した。一方のミニ遺伝子からは、エクソン IIIb がサイレンシングを受けた場合のみ GFP が発現する。もう一方からは、常に RFP が発現する。これらのレポーターを同時に持つヘテロマウスを作製することで、各組織のエクソンのサイレンシングの起こりやすさを GFP/RFP の比率として可視化することに成功して、組織によってサイレンシング活性が異なること、エクソン IIIb 周辺の ISS が生体でも機能していることを示した。

#### 4. スプライシング制御機構への遺伝学的アプローチ

筆者らは、透明で生きてそのまま観察が可能な線虫をモデル生物として用い選択的スプライシングパターンを可視化した。線虫は、各種の遺伝学的解析法が揃っていることに加え、哺乳類同様にさまざまなパターンの選択的スプライシングが見られるにもかかわらず、イントロンの長さが哺乳類よりもずっと短く、生体内での選択的スプライシング制御機構の解析に適した生物であると考えられたからである。生体内でのスプライシングパターンの可視化の結果、組織特異性や発生段階依存性のプロファイリングにとどまらず、スプライシング制御因子の変異体の単離や、変異体を利用した生体におけるイントロン除去の順序の解析を行って、生体における選択的スプライシングについての新たな知見を得ることに成功している。以下ではこれまでの解析例を紹介する。

##### 4-1. 受容体のリガンド特異性を制御する組織特異的選択的スプライシング

*egl-15* は線虫で唯一の FGF 受容体をコードする遺伝子で、相互排他的なエクソン 5A と 5B の使い分けによって、線虫に2種類存在する FGF (EGL-17 および LET-756) とのリガンド結合特異性が規定され、EGL-17/EGL-15 (5A) シグナルと LET-756/EGL-15 (5B) シグナルは異なった機能を発揮することが、変異体を用いた遺伝学的解析により明らかにされていた<sup>16)</sup>。

筆者らが *egl-15* 遺伝子エクソン 5 の選択的スプライシングレポーター線虫を作製したところ、筋組織はエクソン 5A 型を、上皮系や神経系などそれ以外の組織はエクソン 5B 型を主に発現し、組織特異的選択性を示した (図 4A)<sup>17)</sup>。

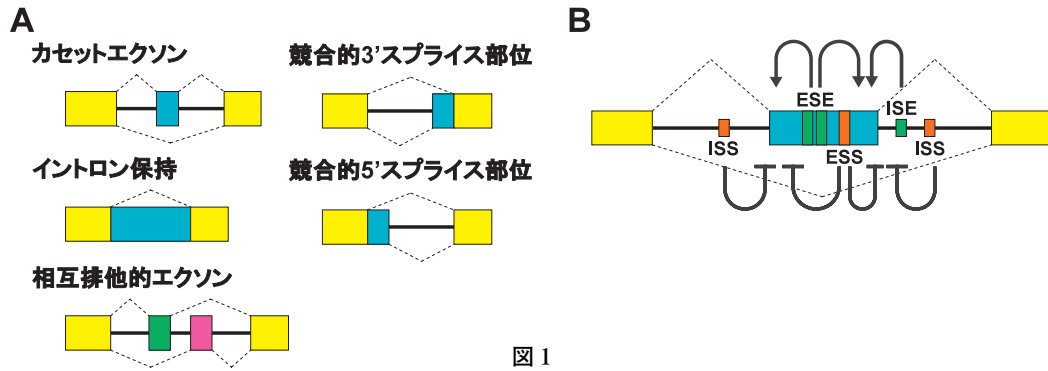


図 1

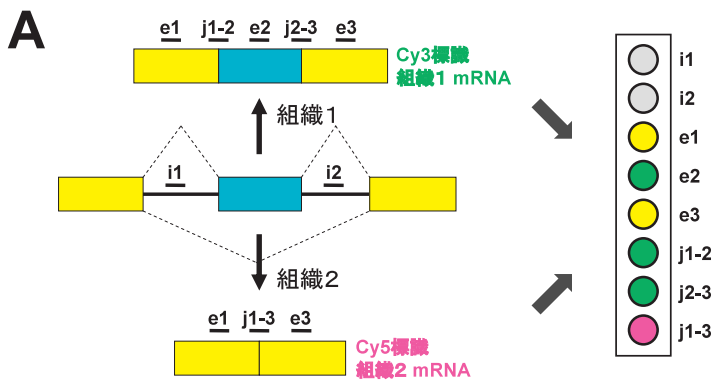


図 2

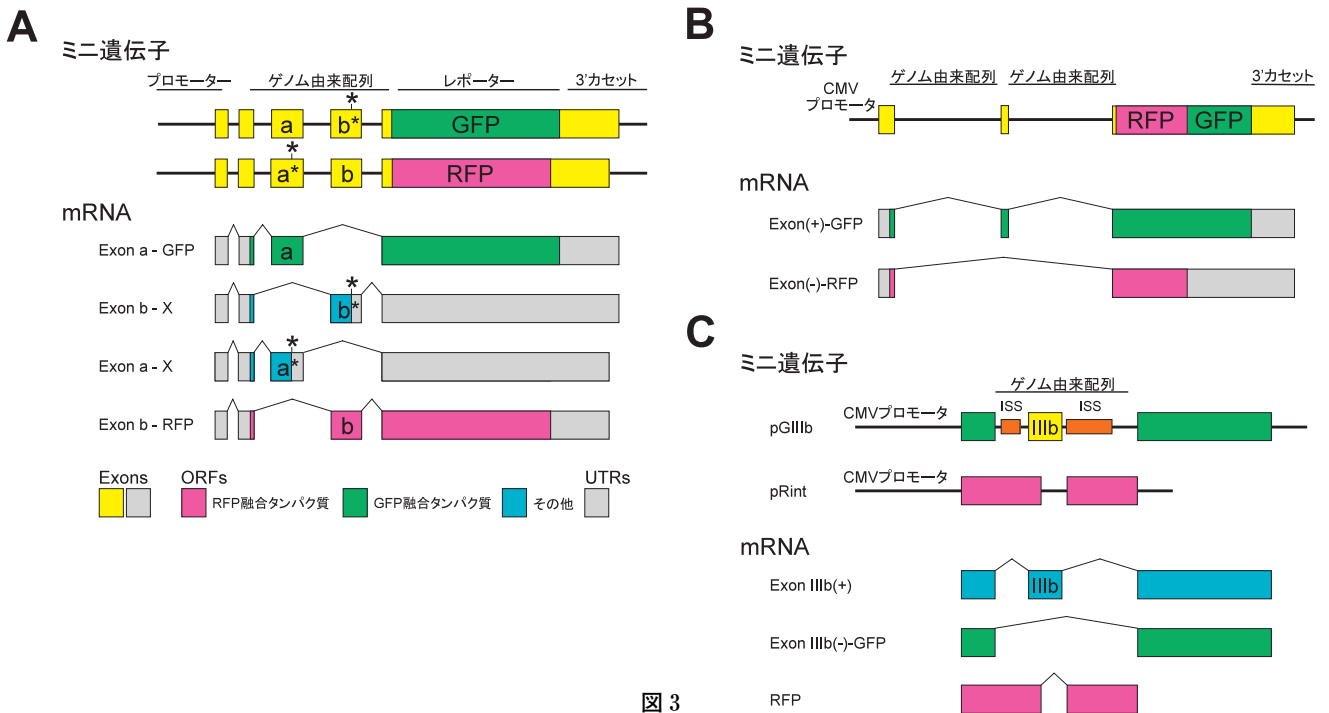


図 3

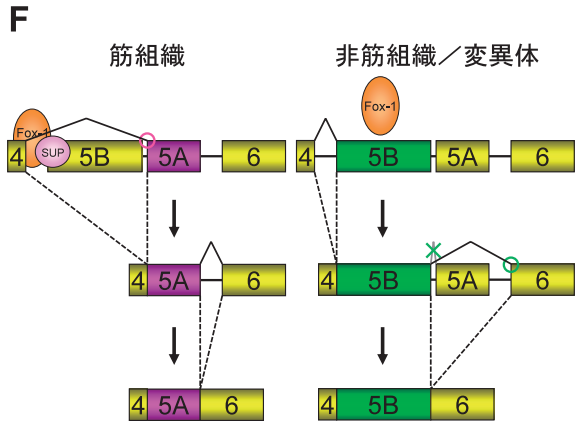
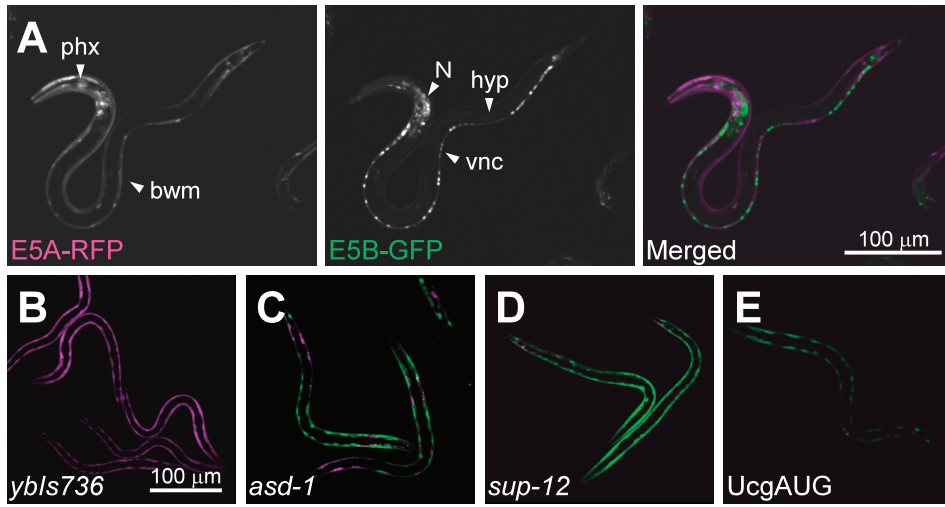


図 4

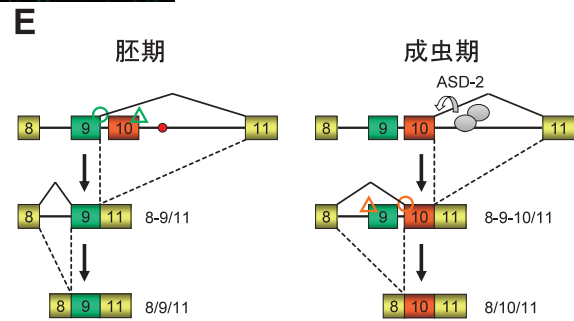
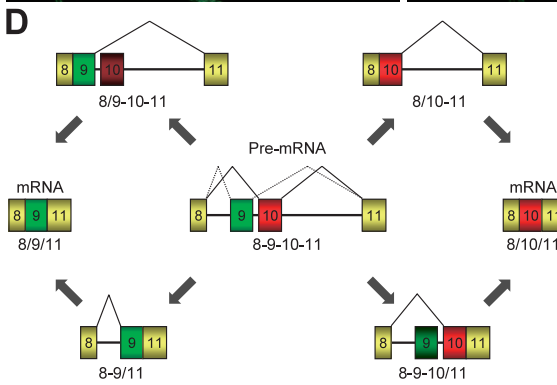
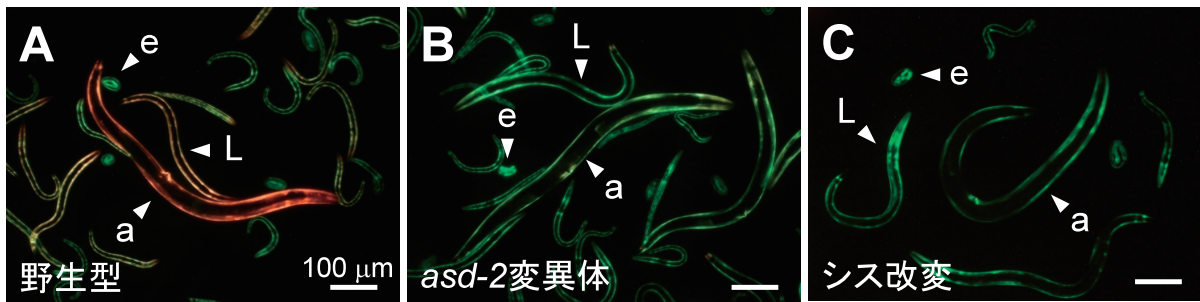


図 5

図1 pre-mRNAの選択的スプライシングの分類と制御機構の概要

- A. pre-mRNAの選択的スプライシングパターンの分類。箱はエクソンを示す。黄色は構成的エクソン。選択的なエクソンまたは領域に色を付けてある。
- B. 選択的スプライシングを制御するシスエレメント。矢印はスプライス部位の活性化を、Tで終わる線は抑制を表す。詳細は本文参照。

図2 選択的スプライシングの網羅的解析法の例

- A. 選択的スプライシングマイクロアレイの実験デザイン例。エクソン (e1, e2, e3), インترون (i1, i2) およびエクソン境界部 (j1-2, j2-3, j1-3) をそれぞれ特異的に認識するプローブセットを用意し、比較したい組織の mRNA を別々の蛍光プローブで標識してハイブリダイゼーションを行う。スプライシングパターンが二つの試料間で異なれば、複数のプローブの蛍光強度比が連動して変化する。
- B. ESSの実験的・網羅的な同定に用いられたレポーターミニ遺伝子の模式図。GFPのcDNAを二つのエクソン(緑色の箱)に分割し、ランダムな10塩基(オレンジ色の部分)を人工的な試験エクソン(水色の箱)に挿入してある。挿入されたのが中立な配列なら試験エクソンが包含されてGFPは発現しないが、ESS活性のある配列が挿入されたミニ遺伝子では試験エクソンがスキップされてGFPが発現する。

図3 二つの蛍光タンパク質による選択的スプライシングレポーターミニ遺伝子の構築法と生成される mRNA のスプライシングパターンの模式図

箱はエクソンを表し、ミニ遺伝子と mRNA の間で位置を対応させている。色を付けたところは予測される翻訳領域。

- A. 2コンストラクト混合型レポーターミニ遺伝子の例。解析したい遺伝子断片(選択的エクソンの上流の構成的エクソンから下流の構成的エクソンまで)の下流にGFPまたはRFPのcDNAを翻訳の読み枠を合わせて連結し、各コンストラクトでエクソンaまたはbのいずれかに終止コドン(\*)を導入する。すると、各ミニ遺伝子から産生され得る二つの mRNA のうち、それぞれ一方の mRNA だけ、蛍光タンパク質との融合タンパク質(この図の例ではExon a-GFPとExon b-RFP)が発現する。したがって、この図の場合では、GFP融合タンパク質の発現はエクソンaの選択を、RFP融合タンパク質の発現はエクソンbの選択を示すこととなる。
- B. 単一コンストラクト型レポーターミニ遺伝子の例。RFP(DsRed)のORFが読み枠を1塩基ずらしても終止コドンが出現しないことを利用して、RFPとGFPのcDNAを取って読み枠をずらして連結してある。この例では、長さが3の倍数でないカセットエクソンの包含かスキップかによってそれぞれGFPまたはRFPの読み枠に合うようにミニ遺伝子が構築されている。
- C. マウス個体での選択的スプライシングの可視化に用いられたミニ遺伝子。pGIIIbでは、GFPのcDNAに構成的イントロンを挿入して二つのエクソンに分割し、そのイントロンにさらにエクソンIIIbとその周辺のISSを含む領域を挿入してあり、エクソンIIIbがサイレンシングを受けたときのみGFPが発現する。pRintでは、RFPのcDNAに構成的イントロンを挿入してあり、常にRFPが発現する。これら二つのコンストラクトを同じプロモーター制御下で発現させる。

図4 Fox-1ファミリーとSUP-12による *egl-15* 遺伝子の組織特異的選択的スプライシングの制御

A-E. *egl-15* 選択的スプライシングレポーター線虫の共焦点顕微鏡観察像。(文献17より改変)

- A. *egl-15* レポーターを広範な組織で発現する線虫。Exon 5A-RFP(左)、exon 5B-GFP(中)、および両者に疑似カラーを付けて重ね合わせた像(右)。咽頭筋(phx)や体壁筋(bwm)などの筋組織は主にエクソン5Aの選択を示すRFPを、頭部の神経節(N)や腹側神経束(vnc)などの神経系や下皮(hyp)などその他の組織はエクソン5Bの選択を示すGFPを主に発現する。
- B. 変異体スクリーニングに用いた体壁筋における *egl-15* レポーター発現株 *ybls 736*。組織特異的プロモーターにより体壁筋で exon 5A-RFPが優勢に発現している。
- C. *asd-1* 変異体。
- D. *sup-12* 変異体。
- E. インترون4のUGCAUG配列をUCGAUGに置換した改変型 *egl-15* レポーター線虫。
- F. Fox-1ファミリーとSUP-12による *egl-15* 遺伝子制御のモデル。詳細は本文参照。

図5 ASD-2による *let-2* 遺伝子の発生段階依存的選択的スプライシングの制御(文献20より改変)

A-C. *let-2* 選択的スプライシングレポーター線虫の実体顕微鏡観察像。eは胚期、Lは幼虫期、aは成虫期の虫を示す。

- A. *let-2* レポーター線虫。胚期はexon 9-GFPを主に発現して緑色だが、成長に伴って次第に色が変わり、幼虫期には黄色、成虫期にはexon 10-RFPを主に発現して赤色になる。
- B. *asd-2* 変異体。
- C. インترون10のCTAACTCTAACをCTATCTCAAACに置換した改変型 *let-2* レポーター線虫。成虫期になっても緑色のままである。
- D. *let-2* 遺伝子の相互排他的選択的スプライシングの進行過程のモデル。pre-mRNAからエクソン9型および10型の2種類の成熟 mRNA が生成するには理論上四つの経路があり4種類のプロセシング中間体が存在する。
- E. ASD-2による *let-2* 遺伝子制御のモデル。詳細は本文参照。



組織特異性の制御機構を解明するために、スプライシングレポーターの組織特異的選択性に異常を示す変異体のスクリーニングを行ったところ、筋における選択性がエクソン5A型から5B型へと変化して色が変わった変異体が多数得られた(図4B-D)。そして、遺伝子マッピングの結果、比較的広範の組織に発現するFox-1ファミリーRNA結合タンパク質ASD-1(alternative-splicing-defective-1,筆者が命名)およびFOX-1と筋特異的RNA結合タンパク質SUP-12(suppressor-12)が*egl-15*の選択的スプライシングの筋組織特異性を制御していることを見出した<sup>17,18)</sup>。

筋特異性の制御に必要なシスエレメントの同定も、レポーターミニ遺伝子を用いて行った。全ゲノムの塩基配列が明らかにされている3種の線虫*C. elegans*, *C. briggsae*, *C. remanei*で、相互排他的なエクソン5Aと5Bの構造が保存されている。そして、非筋型のエクソン5Bの上流のイントロン4に二つの配列UGCAUGとGUGUGが保存されていたことから、ミニ遺伝子の対応する配列にそれぞれ変異を導入し、トランスジェニック線虫を作製した。その結果、スプライシング変異体同様に筋におけるエクソン選択性に異常を示して5A型から5B型に変化した(図4E)ことから、これらの配列が*egl-15*の組織特異性の制御に必要なシスエレメントであると同定された。さらに、試験管内での結合試験により、Fox-1ファミリーとSUP-12がUGCAUGとGUGUGにそれぞれ特異的に結合すること、両タンパク質が同時に存在することによって協調的に標的RNAに結合することを確認した。

*egl-15*の組織特異的選択的スプライシングの制御は図4Fのようにまとめられる。筋組織では、Fox-1ファミリーとSUP-12が協調してイントロン4に結合してエクソン5B選択を抑制し、その結果、下流のエクソン5Aが選択される(図4F左)。非筋組織や制御因子変異体ではこの抑制が不十分で、エクソン5Bが選択されるが、この場合、エクソン5Bとエクソン5Aの間は14塩基と短くイントロンとして除去できないため直後のエクソン5Aは選択されず、さらに下流のエクソン6へとスプライシングが起こる(図4F右)。

この研究は、複数のRNA結合タンパク質と複数のシスエレメントの組み合わせによって選択的スプライシングの標的遺伝子とその組織特異性が厳密に制御されることを示す好例となった。さらに、これらのスプライシング制御因子変異体は、*egl-15*(5A)特異的変異体やEGL-15(5A)特異的リガンドであるEGL-17の変異体と同じ表現型(性筋芽細胞の移動異常による陰門筋の形成不全とそれによる

産卵障害=Egl, egg-laying defective)を示したことから、内在性EGL-15のリガンド特異性の規定が、Fox-1ファミリーとSUP-12による組織特異的選択的スプライシング制御の重要な標的であることが遺伝学的に明らかとなった。

先述の井上らの報告以降、脊椎動物のFox-1ファミリー(Fox-1とFox-2)がUGCAUG配列を介して組織特異的選択的スプライシングを制御していることが多数報告されている。筆者らの線虫*egl-15*遺伝子制御機構の解明は、脊椎動物で見つかったFox-1ファミリーとUGCAUGによる組織特異的選択的スプライシング制御機構が線虫でも保存されていることを示すこととなった。前述の*FGFR2*遺伝子のエクソンIIIcの抑制もFox-1ファミリーによって制御されている<sup>19)</sup>。Fox-1ファミリーがUGCAUGを介してFGF受容体の相互排他的選択的スプライシングを制御してリガンド特異性を規定するという構図が哺乳類と線虫で相似形をなしており、進化的な面からも興味深い。

#### 4-2. イントロン除去の順序の制御による発生段階依存的スプライシング制御

線虫*let-2*遺伝子は、基底膜を構成するコラーゲンIVの $\alpha 2$ 鎖をコードする。*let-2*遺伝子のエクソン9と10は相互排他的で、発生段階依存的に制御される。すなわち、胚期にはエクソン9型のみが発現し、発生が進むに連れて徐々に切り替わり、成虫期はエクソン10型のみが発現する。このエクソン9と10の選択的レポーターを作製したところ、図5Aのように、胚期では9型(GFP)のみを発現するが、発生段階依存的に徐々に色が変わり、成虫では10型(RFP)のみを発現する、発生段階依存性を可視化した株が得られた<sup>20)</sup>。

発生段階依存性の制御因子を同定するために、レポーターの色の変化に異常を示す変異体をスクリーニングし、成虫になっても胚型(GFP)が優勢の発現を示す変異体を単離した(図5B)。そして、制御因子として進化的に保存されたSTAR(signal transduction and activation of RNA)ファミリーRNA結合タンパク質ASD-2(alternative-splicing-defective-2)を同定し、命名した。さらに、レポーターミニ遺伝子の改変を利用して、イントロン10に存在するCUAACの2回繰り返し配列が胚型から成虫型への発生段階依存的な切り替えに必要なシスエレメントであることを見出し(図5C)、試験管内でASD-2とこのCUAACリピートの特異的な結合も確認した。

この研究では、さらに、相互排他的エクソンの選択性の切り替え制御機構の詳細な解析を行った。*let-2*遺伝子のエクソン8から11に着目すると、pre-mRNAからエクソ



ン9型または10型の成熟 mRNA が生成するには、図5Dのように、選択的エクソンの上流と下流のイントロンが除かれる2度のスプライシングを必要とする。そこで、理論上4種類存在する、一つのイントロンのみが除去された「プロセシング中間体」の量を、放射性同位元素を利用したRT-PCRで定量し、野生型と *asd-2* 変異体の胚期とL4幼虫期（成虫期の一つ手前のステージ）で比較した。その結果、胚期ではエクソン9から11へスプライシングした中間体（8-9/11）のみが検出されること、野生型ではL4幼虫期にエクソン10から11へスプライシングした中間体（8-9-10/11）に切り替わること、それに対し *asd-2* 変異体では、L4幼虫期でも胚型が主要な中間体であることがわかった。

以上のさまざまな解析から、*let-2* 遺伝子の相互排他的選択的スプライシングの進行過程は図5Eのようにまとめられる。この選択的スプライシングの特徴は、選択的エクソンの下流のイントロンが先行して除去されることである。胚期では、エクソン9と10の5' スプライス部位の相対的な強さの違いから、エクソン9と11の間でスプライシングが起こって中間体8-9/11が生成し、続いてイントロン8が除去されてエクソン9型 mRNA が生成する（図5E左）。成虫期では、イントロン10に結合したASD-2のはたらきによりイントロン10の除去が促進されて中間体8-9-10/11が生成し、続いて3' スプライス部位の相対的な強さの違いによりエクソン10のスプライス部位が優先的に選択されてエクソン10型 mRNA が生成する（図5E右）。

この研究は、スプライス部位の相対的な強弱や制御因子による制御が運動して、除去されるイントロンが規定され、スプライシングパターンの厳密な制御が実現されることを示している。すなわち、本研究は、内在性の遺伝子を用いた遺伝学的な実験系でこのような厳密な制御を初めて明確に示したものであり、pre-mRNA プロセシングの運命決定機構の解析に新たな方法論を示すものである。

### おわりに

本稿で紹介した、筆者らの開発した生体内選択的スプライシング可視化技術とそれを利用した研究成果の意義は次のようにまとめられる。①選択的スプライシングレポーターの発現がモデルとして用いた内在性の遺伝子の選択的スプライシングパターンを反映しており、生体内における組織特異性や発生段階依存性などの選択性を1細胞の解像度でプロファイリングできること。②レポーターミニ遺伝

子のみならず内在性遺伝子の選択的スプライシングを制御する制御因子の同定、生体での選択性の制御に必要なシスエレメントの同定ができること。③スプライシング制御因子変異体を利用して、プロセシング中間体の同定によるイントロン除去の順序など pre-mRNA の運命決定機構の解明が可能であること。④選択的スプライシング制御因子やシスエレメントの配列が線虫から脊椎動物まで進化的に保存されていることを明らかにしたこと。これらはいずれも、先に紹介した従来の方法ではアプローチが困難だったものである。

ヒトの遺伝病の15%程度がスプライシング異常によるとされているが、これは、5' スプライス部位と3' スプライス部位のよく保存された塩基の変異に限ったものであり、実際には最大で50%程度がスプライシング異常によるとの推定もある<sup>21)</sup>。最近の次世代シーケンサーの利用によって個人のゲノムに膨大な量の塩基多型 (SNPs) が存在することが次第に明らかになってきたことから、遺伝病には至らなくとも、遺伝子の転写や pre-mRNA のプロセシングになんらかの影響を及ぼす SNPs は相当数存在すると考えるのが自然である。今後、さまざまな遺伝子の選択的スプライシングの生体での制御機構を解明していくことで、現在の知識では不可能な、SNPs がどの組織においてどのエクソンのスプライシングにどのような影響を及ぼすかの予測が可能になり、その検証を重ねていくことによって、スプライシング制御の「細胞暗号」の実体が明らかになるものと期待している。

- 1) Matlin, A.J., Clark, F., & Smith, C.W. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 386-398.
- 2) Modrek, B. & Lee, C. (2002) *Nat. Genet.*, 30, 13-19.
- 3) Pan, Q., Shai, O., Misquitta, C., Zhang, W., Saltzman, A.L., Mohammad, N., Babak, T., Siu, H., Hughes, T.R., Morris, Q. D., Frey, B.J., & Blencowe, B.J. (2004) *Mol. Cell*, 16, 929-941.
- 4) Licatalosi, D.D., Mele, A., Fak, J.J., Ule, J., Kayikci, M., Chi, S.W., Clark, T.A., Schweitzer, A.C., Blume, J.E., Wang, X., Darnell, J.C., & Darnell, R.B. (2008) *Nature*, 456, 464-469.
- 5) Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P., & Burge, C.B. (2008) *Nature*, 456, 470-476.
- 6) Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., & Blencowe, B.J. (2008) *Nat. Genet.*, 40, 1413-1415.
- 7) Minovitsky, S., Gee, S.L., Schokrpur, S., Dubchak, I., & Conboy, J.G. (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33, 714-724.
- 8) Wang, Z., Rolish, M.E., Yeo, G., Tung, V., Mawson, M., & Burge, C.B. (2004) *Cell*, 119, 831-845.
- 9) Jin, Y., Suzuki, H., Maegawa, S., Endo, H., Sugano, S., Hashimoto, K., Yasuda, K., & Inoue, K. (2003) *EMBO J.*, 22, 905-

- 912.
- 10) Park, J.W., Parisky, K., Celotto, A.M., Reenan, R.A., & Graveley, B.R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15974–15979.
  - 11) Ule, J., Stefani, G., Mele, A., Ruggiu, M., Wang, X., Taneri, B., Gaasterland, T., Blencowe, B.J., & Darnell, R.B. (2006) *Nature*, **444**, 580–586.
  - 12) Newman, E.A., Muh, S.J., Hovhannisyan, R.H., Warzecha, C. C., Jones, R.B., McKeehan, W.L., & Carstens, R.P. (2006) *RNA*, **12**, 1129–1141.
  - 13) Orengo, J.P., Bundman, D., & Cooper, T.A. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, e148.
  - 14) Stoilov, P., Lin, C.H., Damoiseaux, R., Nikolic, J., & Black, D. L. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 11218–11223.
  - 15) Bonano, V.I., Oltean, S., Brazas, R.M., & Garcia-Blanco, M.A. (2006) *Rna*, **12**, 2073–2079.
  - 16) Goodman, S.J., Branda, C.S., Robinson, M.K., Burdine, R.D., & Stern, M.J. (2003) *Development*, **130**, 3757–3766.
  - 17) Kuroyanagi, H., Kobayashi, T., Mitani, S., & Hagiwara, M. (2006) *Nat. Methods*, **3**, 909–915.
  - 18) Kuroyanagi, H., Ohno, G., Mitani, S., & Hagiwara, M. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 8612–8621.
  - 19) Baraniak, A.P., Chen, J.R., & Garcia-Blanco, M.A. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 1209–1222.
  - 20) Ohno, G., Hagiwara, M., & Kuroyanagi, H. (2008) *Genes Dev.*, **22**, 360–374.
  - 21) Caceres, J.F. & Kornblihtt, A.R. (2002) *Trends Genet.*, **18**, 186–193.

黒柳 秀人

(東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所,  
科学技術振興機構 さきがけ)

New approaches to decipher pre-mRNA splicing codes  
Hidehito Kuroyanagi (Graduate School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan)

## LDL 由来コレステロールの細胞内輸送機構

### 1. はじめに

コレステロールは動物細胞にとって細胞膜を構成する重要な脂質分子であり、成長や生存に必須の成分である。コレステロールの代謝や生合成に関わる遺伝子の変異は、ニーマン・ピック病C型 (NPC) など先天性代謝異常の症状を示す。またコレステロール代謝は、高脂血症や動脈硬化、脳血管障害のみならず、近年ではアルツハイマー病や糖尿病にも深く関与する可能性が示唆されている。動物

細胞において、コレステロールは主に二つの供給源から獲得される。すなわち細胞内における生合成とリポタンパク質を介した細胞外からの取り込みである。なかでも低密度リポタンパク質 (LDL) によるコレステロールの輸送は、末梢組織へのコレステロールの供給源として重要な生理的役割を果たしている。これまで LDL 受容体による LDL 自体の細胞内への取り込みについては多くの研究がなされているが、LDL 中に含まれるコレステロールの細胞内輸送については未知な点が多い。筆者らは最近、soluble N-ethylmaleimide (NEM)-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) 複合体を介した小胞輸送が、LDL 由来コレステロールの細胞内輸送に関与することを報告した<sup>1)</sup>。本稿では、この報告を中心に LDL 由来コレステロールの細胞内輸送について概説する。

### 2. 細胞内の LDL 由来コレステロール代謝機構

LDL は細胞外から細胞膜上にある LDL 受容体を介してエンドサイトーシスにより取り込まれる<sup>2)</sup>。LDL に含まれるコレステロールは遊離型 (約 8%) に比べてエステル型 (約 37%) が多い。取り込まれたコレステロールエステルは、エンドソームにおいて酸性リパーゼにより加水分解を受け、遊離型のコレステロールとなる。その後、コレステロールは NPC 病の原因遺伝子産物である NPC1 や NPC2 を含むエンドソームに運ばれたのち、細胞膜や小胞体、ミトコンドリア等の各オルガネラに輸送されることが知られている (図 1)<sup>3,4)</sup>。NPC1 や NPC2 が欠損した細胞では、遊離型のコレステロールは後期エンドソーム/リソソームに蓄積する。コレステロールは細胞膜を構成する主要な脂質成分であるのに対し、小胞体には細胞中の総コレステロールのうち 1% 程度しか存在しない。しかし sterol regulatory element-binding protein (SREBP) や SREBP cleavage-activating protein (SCAP)、ヒドロキシメチルグルタリル CoA (HMG-CoA) 還元酵素など、細胞内のコレステロールホメオスタシスを担う重要な膜タンパク質が数多く存在する。また細胞にとって余分となったコレステロールをエステル化して、コレステロールエステルという貯蔵しやすい形に変換する酵素である acyl-CoA: cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) も小胞体に存在する<sup>5)</sup>。変換されたコレステロールエステルは脂肪滴に貯蔵される。このようにコレステロールの代謝は細胞内の様々な場所で行われるが、各オルガネラ間の LDL 由来コレステロールの細胞内輸送については、NPC1 が重要な役割を果たすこと以外は詳細な解析が遅れていた<sup>3,4)</sup>。