



A novel cryptic exon in intron 2 of the human dystrophin gene evolved from an intron by acquiring consensus sequences for splicing at different stages of anthropoid evolution

Zacharias, Aloysius Dwi Pramono

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2000-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2131

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002131>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	ザッカーリアス アロイシウス ドウィ プラモノ Zacharias Aloysius Dwi Pramono	（インドネシア）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学位記番号	博い第1274号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成12年3月31日	
学位論文題目	A novel cryptic exon in intron 2 of the human dystrophin gene evolved from an intron by acquiring consensus sequences for splicing at different stages of anthropoid evolution （ジストロフィン遺伝子イントロン2内に同定された新たなエクソン）	
審査委員	主査 教授 松尾 雅文 教授 市橋 正光 教授 藤原 美定	

論文内容の要旨

Introduction

The human dystrophin gene, which is defective in patients with Duchenne or Becker muscular dystrophy (DMD/BMD), spans approximately 3000kb of the X-chromosome and encodes a 14 kb transcript consisting of 79 exons. Consequently, more than 99% of the gene sequence is composed of introns. Two exon sequences that were transcribed from intron of the dystrophin gene have been reported. These data suggested that cryptic exons that are expressed in a tissue-or development specific manner might be located within other introns of the dystrophin gene.

Here, we report an identification of a novel exon located in intron 2 of the dystrophin gene that is activated in a limited number of alternative splicing reactions. The phylogenetic analysis showed an interesting indication of how the exon evolved among anthropoids.

Results and Discussion

In a study on alternative splicing in the 5' region of the dystrophin gene, some unexpected transcripts were detected in addition to the expected size of cDNA fragments amplified. Sequencing analysis of the subcloned unexpected size of 674 bp amplified from exon 1 to 11 revealed an unidentified 140 bp sequence inserted between exon 2 and exon 8 in addition to the skipping of exons 3 to 7 and 9. The sequence data was found to be the same with another insert between exons 2 and 18 revealed from a sequence analysis of an unexpected size of 319 bp product amplified from the region spreading from exon 1 to 18. A BLAST search failed to reveal significant homology of this 140 bp DNA insert to the Gene Bank data.

The cloning and sequencing of the genomic region corresponding to and surrounding the 140 nucleotide sequence revealed 304 bp genomic region possessing a branch point and acceptor and donor splice site consensus sequences perfectly. Therefore, the 140 bp insertion sequence was considered to be a novel exon (GenBank accession number: AB016196).

In order to map the novel exon, a deletion analysis by using genomic DNA prepared from DMD patients with

different deletion mutations was performed. A fragment encompassing the novel exon could be amplified from DNA samples with deletions of exons 3 to 7 or exons 5 to 11, respectively, but could not be amplified from DNA with a deletion stretching from the 5' end of the dystrophin gene to exon 2, indicating that the novel exon is located in intron 2 and named as exon 2a.

Cloning of the 5' region of exon 2a from human muscle cDNA transcript disclosed that exon 2a was incorporated into transcript transcribed from the muscle promoter of the dystrophin gene. The protein coding capacity of exon 2a was examined by analyzing the translational reading frame of transcripts retaining exon 2a between either exons 2 and 8 or exons 2 and 18. Neither transcript maintained the open reading frame of the dystrophin gene. In order to analyze the tissue-specific usage of exon 2a, a fragment extending from exon 1 to exon 2a was amplified from cDNA prepared from total RNA of 12 different tissues. The results indicated its presence in 6 of them, including skeletal and cardiac muscles.

The phylogeny of exon 2a was analyzed by genomic DNA amplification from anthropoids {cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*), night monkey (*Aotus trivigatus*), Japanese macaque (*Macaca fuscata*), gibbon (*Hylobates lar*), orangutan (*Pongo pygmaeus*), gorilla (*Gorilla gorilla*), chimpanzee (*Pan troglodytes*)} and mouse (Jcl : ICR strain) by using the same primer set as that used to amplify exon 2a of human genomic DNA. The 304 bp PCR product was obtained from the 7 anthropoids DNA, but not from mouse DNA. All of the amplified products obtained from anthropoid were sequenced and compared with the sequence of the region amplified from human DNA. The result showed that consensus branch point and splice donor and acceptor sites in human exon 2a were created by nucleotide substitutions in intron 2 at different stages in anthropoid evolution. In contrast to New World monkeys that have no consensus sequences for splicing, Old World monkeys and hominoids possess both branch point and splice donor site consensus sequences. This observation strongly suggests that these consensus sequences were created in the DNA of a common ancestor of Old World monkeys and hominoids. In addition, the splice acceptor consensus sequence evolved after divergence from the ancestral Old World monkeys. As a result, exon 2a apparently acquired its consensus sequences for splicing early in hominoid evolution, before branching of the gibbon lineage occurred. Introns have been the subject of considerable debate since their discovery.

There are so far two theories proposed to explain the evolution of introns within eukaryotic genome representing opposing views of intron evolution. The "introns early" theory proposes that introns are ancient and that modification of intron sequences provided new exon structures and thus new genes. The "introns late" theory proposes that the ancient genes existed as uninterrupted exons and that introns have been introduced during the course of evolution.

Conclusion

We identified a novel sequence that is activated in a limited number of alternative splicing reactions inserted between exons 2 and 8 or exons 2 and 18 of dystrophin transcripts. The novel sequence possesses all of the consensus sequences necessary for splicing, located in intron 2 of the dystrophin gene, and to be referred as exon 2a.

Phylogenetic analysis indicated that exon 2a evolved from an intron DNA in ancestral hominoids as a result of the creation of consensus sequences necessary for splicing. Therefore our results support "introns early theory" since exon 2a was evolved from intron.

ジストロフィン遺伝子はヒト最大の遺伝子で、そのサイズは3,000kbにもおよぶ。ところが、実際にジストロフィンのタンパクをコードしている領域はわずか14kbで、99%以上の配列はイントロン

論文審査の結果の要旨

で何ら機能していないと考えられている。この不効率な構造は生物学的にみて非常に不合理で、この巨大なイントロン内に他の遺伝子が存在している可能性などが示唆されている。しかし、このことを支持するような結果は未だ得られていない。

今回、本学位申請者はジストロフィン mRNA を解析し、エクソン 2 の 3' 端に未知の挿入配列があることを見い出した。そして、この未知の配列のゲノム領域をクローニングし、これがイントロン 2 の中に存在する新たなエンソンであることを見い出した。

〔方法および結果〕白血球あるいは筋肉から RNA を抽出し、常法により cDNA を作製した。この cDNA を基にしてジストロフィン遺伝子のエクソン 1 から 18 に至る領域を PCR 増幅した。この増幅により、いくつかのサイズの異なる増幅産物を得た。そこで、これらの産物の塩基配列を解析し、そのエクソン構造を明らかにしていったところ、多くの産物はジストロフィンの様々なエクソンから構成されたもので、選択的スプライシングの機構により産生されたものであった。ところが、2 種の増幅産物ではエクソン 2 と 8 の間と、エクソン 2 と 18 の間に未知の配列が挿入されていた。驚くべきことに、その挿入配列は全く同一の 140 塩基かになっていた。

そこで、この挿入配列の由来を様々な欠失を有する Duchenne 型筋ジストロフィー患者の DNA を用いて調べたところ、この配列がイントロン 2 の中にあるものと決定された。さらに、この挿入配列領域をゲノム DNA からクローニングし、その塩基配列を決定した。挿入配列の周辺にはスプライシングに必要なアクセプターサイト、ドナーサイトおよびブランチポイントのすべてのコンセンサス配列が保持されていることが判明した。したがって、この挿入配列は mRNA でもゲノム構造的にもエクソンとして存在していることから、この配列をエンソン 2a と命名した。

このエクソン 2a を構成する 140 塩基にはオープンリーディングフレームは存在せず、タンパクをコードする能力はなかった。したがって、ジストロフィン mRNA の安定性などに関与しているものと推測された。このエクソン 2a の生物学的な意義を検討した。新世界にすむ夜ザルをはじめとした類人から DNA を抽出し、エクソン 2a 領域を PCR 増幅したのちその塩基配列を明らかにした。この領域の配列は、夜ザルではもともとイントロン配列であった。それが進化過程で塩基の置換を獲得していったオラウータンよりエクソン構造を取るようになり、それがヒトまで保存されていることが判明した。したがって、このエクソン 2a はより高等な哺乳類で機能しているものと結論された。

本研究は、ジストロフィン遺伝子についてその選択的スプライシングを研究したものであるが、従来ほとんど行なわれなかった新しいエクソンの存在について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。