



PURINE-RICH EXON SEQUENCES ARE NOT NECESSARILY SPLICING ENHANCER SEQUENCE IN THE DYSTROPHIN GENE

Ito, Toshiyuki

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2002-03-31

(Date of Publication)

2013-07-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2512

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002512>

※ 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。



【107】

氏 名・(本 籍) 伊東 利幸 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医学)

学 位 記 番 号 博い第1429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14年3月31日

【学位論文題目】

**PURINE-RICH EXON SEQUENCES ARE NOT
NECESSARILY SPLICING ENHANCER SEQUENCE IN THE
DYSTROPHIN GENE**

(ジストロフィン遺伝子エクソン内のスプライシング
促進配列に関する研究)

審 査 委 員

主査 教授 松尾 雅文

教授 中村 肇

教授 丸尾 猛

【はじめに】

ゲノムより転写された mRNA 前駆体はスプライシングなどの修飾を受け成熟 mRNA となる。スプライシングの部位決定には、従来より知られているエクソン・イントロン境界部に存在するコンセンサス配列のみでは十分ではなく、エクソン内に存在するスプライシング促進配列 (splicing enhancer sequences, 以下 SES) が重要な働きをしている事が明かとされている。また、SES のひとつの特徴としてプリン残基に富んだ配列ほど強い活性を認める事、small nuclear ribonucleoprotein particles (snRNPs) や non-snRNP 蛋白が結合する事によりスプライシングが促進される事が報告されている。

一方、Duchenne 型/Becker 型筋ジストロフィー (DMD/BMD) の責任遺伝子であるジストロフィン遺伝子は 3000kb というヒト最大の遺伝子であり 79 個のエクソンで構成されている。我々の今までの研究によって、エクソン 19 および 27 において SES が重要な役割を果たしている事、その SES に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドによってスプライシングを制御しエクソンスキッピングを誘導し得ることを明らかにしてきた。今回、我々はジストロフィン遺伝子エクソン 43、46 及び 53 において SES に関する検討を行い、SES は必ずしもプリン残基に富んだ配列ではなく、個々のエクソンによって多様であることを明らかにした。

【方法】

SES 候補の選択

ジストロフィン遺伝子イントロン 44 は 180kb 以上と非常に長くスプライシングが正確に行れるには SES が必要であると考えられるため、この周辺のエクソンにおいて候補配列の検索を行った。プリン残基に富んだ配列、中でも AAG の繰り返し配列が多いほどスプライシング活性が強い事が報告されており、この条件を出来るだけ満たす様な配列をエクソン 43、46 及び 53 内から各々 1 箇所選択した (SES 43, 46, 53)。配列の長さは、我々が以前に同定したエクソン 19 の SES (SES 19) が 31 塩基であったことから、30 塩基として検討した。

スプライシング促進活性の解析

ショウジョウバエの dsx 遺伝子エクソン 3・イントロン 3・エクソン 4 を組み込んだプラスミドのエクソン 4 の 3'側に SES 候補の配列を組み込みミニジーンを作製した。このプラスミドから転写された RNA は、通常はイントロン 3 のスプライシングは生じないが、エクソン 4 の 3'側に SES 活性を有する配列が存在した場合はイントロン 3 のスプライシングがみられるようになるため、この系を利用することによって組み込まれた配列の SES 活性を評価することが可能である。これらのプラスミドを鋳型として RNA ポリメラーゼによりラジオアイソトープによって標識された mRNA 前駆体を合成した。さらに mRNA 前駆体を HeLa 細胞核抽出液と 1 時間反応させ、スプライシング反応を進行させた後、ゲル電気泳動によってその産物を解析した。

SES としての活性の強さは、以前に我々が同定したエクソン 19 内の SES (SES19) の活性を 100%として、相対的な活性を%で示した。

RNA 結合蛋白の同定

SES の機能に関与する蛋白を同定するために、5'端を FITC ラベル化した SES43 の配列を有する RNA をプローブとし、HeLa 細胞核抽出液と 30℃、20 分間反応させた後にゲル電気泳動によって解析した。さらに RNA に結合した蛋白の特異性を検討する為、過剰量の tRNA を添加し比較検討した。

【結果】

SES 候補配列のスプライシング活性

SES43 の活性が 70.6%と最も強く認めたが、SES46 は 23.6%、SES53 は 31.4%と低かった。塩基配列からみると SES53 の配列は AAG 配列が 5 回、また 3 回連続繰り返し配列が含まれており強い SES 活性を有すると考えられていたが、実際の SES 活性は弱い物であった。この結果は、ジストロフィン遺伝子エクソン内のプリン残基に富んだ配列が、常にスプライシング促進活性を有する配列であるとは限らないことを示している。

SES43 のスプライシング促進活性の同定

SES43 に強い活性を認めた為、上流に 12bp ずらした領域に SES43-1 を、下流に 6bp ずらした領域に SES43-2 を作製し活性を検討した。しかし、いずれも SES43 より活性は弱く、SES43 が活性の中心であると考えられた。(SES43-1 が 55.7%, SES43-2 が 58.3%)

SES 結合蛋白の同定

SES43 の RNA probe を用いて検討したところ 120 kDa と 40 kDa の 2 種類の蛋白が同定された。しかしこの蛋白の結合能は t-RNA を増量すると低下した為 SES43 に結合している蛋白結合能は低い事が明かとなった。

SES53 のスプライシング促進活性の同定

今回検索した SES53 には有意なスプライシング活性を認めなかった為、エクソン 53 の 5' 及び 3' 端の 16 塩基を除き、6 つの領域(5' 端より順に SES 53-2~7)に分割して活性を検討した。SES 53-2,5,6 の活性がそれぞれ 69.9, 79.6, 80.2% と比較的高かった。さらに、SES 53-2 より 5 塩基 5' 側に移動させた SES 53-1 の活性は 73.5% であった。これらの結果よりエクソン 53 内には SES 53-1 を中心とした 5' 側と SES 53-6 を中心とした 3' 側の 2 つの領域に SES が存在する事が明かとなった。

SES46 のスプライシング促進活性の同定

SES46 の配列はプリン残基が 76.7% を占め、かつ AAG 繰り返し配列も 3 回あり、最も活性が高いことが予想されたが結果は非常に低かった。そこで、エクソン 46 の 5' の 13 塩基及び 3' 端の 15 塩基を除き、4 つの領域(5' 端より順に SES 46-1~4)に分割して活性を検討したが、すべて活性は低く(それぞれ 10.4, 12.9, 7.9, 27.9%)、今回の我々の検討ではエクソン 46 に SES を見いだせる事が出来なかった。

スプライシング促進活性とプリン残基に富む配列

今回の我々の検討ではプリン残基の含まれる割合とスプライシング活性の間に相関性は認められなかった。しかし、活性を 70% 以上認めた 4 つの SES(43, 53-1, 53-5, 53-6)について検討したところ、AAG 配列が少なくとも 2 つ以上含まれていた。しかしながら、SES46, 46-4 はこれらの条件

を満たしているにも関わらず活性が低く、これだけでは SES の条件として不十分であると考えられた。

【考案】

ジストロフィン遺伝子は非常に大きく、スプライシングには様々な因子が相互に作用する事によって行われている。その中で SES は重要な因子の 1 つとして考えられている。しかしながら、ジストロフィン遺伝子エクソン内の SES についての報告はあまり見られない。そこで、今回我々は 3 つの領域の SES について検討し、以下の 3 つの事を明らかにした。(i) SES はプリン残基に富んだ配列である必要がない。(ii) エクソン 53 には SES が 2 つ存在する。(iii) エクソン 46 に SES を同定する事が出来なかった。これらの結果から、ジストロフィン遺伝子におけるスプライシングは、各々のエクソンにおいて異なった機序によって制御されている事が明らかとなった。

プリン残基と SES 活性の関係に関しては、従来よりプリン残基中でも AAG の繰り返しが多い程 SES 活性が強いと報告されているが、今回 SES 候補の塩基配列とその活性について検討した結果、プリン残基の割合と活性の間には相関性が認められず、スプライシング促進活性はプリン残基の含有率だけでは決定されない事が明らかとなった。

また、エクソン 46, 53 ではエクソン内の全配列を機械的に分割してその SES 活性を検討したが、その結果、エクソン 53 内には離れた 2 つの領域に SES が存在する事が明かとなった。この様に 1 つのエクソン内に SES が 2 つ存在する報告は、ショウジョウバエ、鼠、牛では報告があるが、ヒトでは未だ無く今回が初めての報告である。また、今回エクソン 46 内に優位な SES を同定する事が出来なかった原因として、コンセンサス配列の結合能(シャピロのスコアが 85.6, 97.3)が強かった事及びイントロンが非常に長い為、SES 以外の他の因子がスプライシングに深く関与していた可能性がある。

近年 AC 配列に富む配列がスプライシング促進機能を持つ事、GRYYcSYR のアミノ酸配列に、SR 蛋白(スプライシングを制御する、セリン、アルギニンに富む領域を持つ核内蛋白)の 1 種である SC35 が結合する事が報告されているが、検討した配列には同様の配列は認められなかった。また、

A,C,A/G/T,G,G/C の配列が別の SR 蛋白である SR40C と結合する事が報告されており、今回比較的活性の高かった SES43,53-5,19 には、これらの配列が含まれていた。さらに SES43 の結合蛋白の検討においても、40 kDa の蛋白が結合しており報告と矛盾しなかった。しかし、SR 蛋白の結合能がスプライシング活性の強さと関係があるとされているが、今回検討した SES43 の蛋白への結合能は弱く特異性は乏しいと考えられる。

ジストロフィン遺伝子の SES を解析することは、複雑なスプライシングのメカニズムを解明することのみではなく、新たな DMD に対する治療を検討する上で重要である。我々は以前よりエクソン 19 内に SES が存在し、その配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドによってエクソン 19 のスキッピングを誘導しうることを見い出している。さらに、エクソン 20 の欠失した症例(242 塩基欠失)に対し、エクソン 19 内の SES に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドによってエクソン 19(88 塩基)のスキッピングを誘導し、アウトフレーム欠失からインフレーム欠失へと変換することによりアミノ酸読み取り枠のずれを修復する DMD の治療法の臨床応用を検討している。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた治療法の適応を拡大する上において、さらに SES に関する検討を行う必要である。

神戸大学大学院医学系研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 1 4 2 1 号	氏 名	伊 東 利 幸
論 文 題 目	PURINE-RICH EXON SEQUENCES ARE NOT NECESSARILY SPLICING ENHANCER SEQUENCE IN THE DYSTROPHIN GENE ジストロフィン遺伝子エクソン内のスプライシング促進配列に関する研究		
審 査 委 員	主 査 松 尾 雅 文 副 査 中 村 隆 副 査 丸 尾 結		
審 査 終 了 日	平成 1 4 年 2 月 2 3 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【はじめに】

ゲノムより転写された mRNA 前駆体はスプライシングによりイントロンが切り取られ成熟 mRNA となる。スプライシングの部位決定には、従来よりエクソン・イントロン境界部に存在するコンセンサス配列が重要であることが知られていた。最近、エクソン内に存在するプリンに富んだ領域がスプライシングに重要な働きをしていることが明らかにされ、スプライシング促進配列

(splicing enhancer sequences、以下 SES) と呼ばれている。一方、Duchenne 型/Becker 型筋ジストロフィー(DMD/BMD)の責任遺伝子であるジストロフィン遺伝子は3000kbというヒト最大の遺伝子であり79個のエクソンで構成され、そのスプライシング制御機構が注目されている。我々の今までの研究によって、エクソン19および27においてプリンに富んだ配列がSESであることを明らかにしてきた。本研究は、ジストロフィン遺伝子エクソン43、46及び53においてSESに関する検討を行い、SESは必ずしもプリンに富んだ配列ではないことを明らかにしたものである。

【方法】

SES 候補の選択

イントロン44は180kb以上と非常に長くスプライシングが正確に行われるにはSESが必要であると考えられるため、この周辺のエクソンにおいてSES候補配列の検索を行った。プリンに富んだ配列でAAGの繰り返し配列が多いほどスプライシング活性が強い事が報告されており、この条件を出来るだけ満たす様な配列をエクソン43、46及び53内から各々1箇所選択した(SES43,46,53)。

スプライシング促進活性の解析

ショウジョウバエのdsx遺伝子を組み込んだプラスミドの3'側にSES候補の配列を組み込みミニジーンを作製した。このプラスミドから転写された

mRNA 前駆体は、候補配列にSES活性を有する場合にのみ、スプライシングがみられる。これらのプラスミドを鋳型としてラジオアイソトープによって標識された mRNA 前駆体を合成し、HeLa 細胞核抽出液と混合し、スプライシング反応を進行させた。そして、その産物をゲル電気泳動によって解析した。また、エクソン19内のSES活性を100%として、相対的な活性を検討した。

【結果】

SES 候補配列のスプライシング活性

SES43では活性が70.6%と最も強く認めたが、SES46と53の活性は低かった。塩基配列のプリン量からみるとSES53が最も強い活性を有すると推察されたが、実際には弱い活性しか有さなかった。この結果は、プリン残基に富んだ配列が、常にスプライシング促進活性を有する配列であるとは限らないことを示した。

SES43,46,53のスプライシング促進活性の同定

SES43,46,53について、さらに活性の検討を施行した結果、エクソン43内ではSES43が活性の中心である事、エクソン53内には2つの領域にSESが存在する事が明かとなった。また、今回の検討では、エクソン46内にSESを見いだせる事が出来なかった。また、プリン残基の含まれる割合とスプライシング活性の間に相関性は認められず、プリン残基の含まれることだけではSESの条件として不十分であると考えられた。

【考案】

ジストロフィン遺伝子は非常に大きく、スプライシングの制御因子としてSESが重要な役割を果たしているものと考えられる。しかしながら、ジストロフィン遺伝子エクソン内のSESについての報告はあまり見られない。今回、3つのエクソンのSESについて検討し、以下の3つの事を明らかにした。(i)SESはプリン残基に富んだ配列である必要がない。(ii)エクソン53にはSESが2

つ存在する。(iii)エクソン 46 に SES を同定する事が出来なかった。これらの結果から、ジストロフィン遺伝子におけるスプライシングは、各々のエクソンにおいて異なった機序によって制御されている事が明らかとなった。

本研究は、ジストロフィン遺伝子のエクソン内にあるプリンに富んだ配列のスプライシング促進能について検討したものであるが、スプライシング促進配列が必ずしもプリンに富んだものではないことを明らかにする重要な知見を得たものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。