

長期間派遣成果報告書

Pre-mRNA スプライシングにおける正確性維持機構の解明

北海道大学 米田 宏

派遣機関 2004年4月15日～2006年3月16日

研究機関 Department of Molecular Genetics and Cell Biology, The
University of Chicago, 920 East 58th Street, Chicago IL 60637, U.S.A.

研究指導者 Dr. Jonathan P. Staley

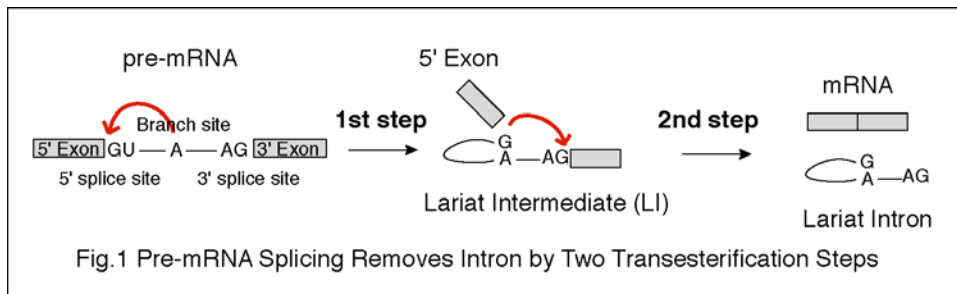
1. はじめに

私の派遣先での研究テーマは「pre-mRNA スプライシングにおける正確性維持機構の解明」である。そのテーマに沿った実験として主に2つのアプローチを派遣申請書では提案していた。その内の1つは、これまでの研究から pre-mRNA スプライシングの正確性維持機構に関わると予想できる因子について、その可能性を検討することであり、もう1つは、正確性維持に関わる新規または既知のスプライシング因子をゲノムライブラリーからのスクリーニングで同定することであった。2年間の滞在期間中、それぞれ研究計画に基づき研究を行い、目標を完全に達成するにはやや時間不足ではあったが、一定の成果を挙げる事ができたので以下報告する。

2. 研究の背景と概要

真核生物ではゲノム DNA 中にコードされた遺伝子情報はイントロンと呼ばれる配列によって分断されており、RNA として転写された後にエキソンと呼ばれる遺伝子発現に必要な配列をつなぎ合わせる必要がある。pre-mRNA スプライシングとは、そのイントロンを取り除きエキソンをつなぎ合わせることによって遺伝子情報を復元するプロセスである。もしも、この作業中に間違った部分をイントロンとして取り除いたり、つなぎ目がずれたりした場合には、遺伝子情報が正確に伝えられずに細胞にとって不要な産物や有害な産物が出来てしまう。細胞内でスプライシングを担う酵素であるスプライソソームはこのような状況の発生を精度良く抑制し、スプライシング反応における高度な正確性を維持している。そのためスプライソソームにはエキソンのつなぎ目を校正し、異常と認識された基質を除去する機能を持つことが予想され、実際に過去の研究からこれらの機能の存在が示されている^{1,2}。しかし、そのような校正機能、異常基質の除去機構がどのようなメカニズムで担われているかはこれまで全く不明であった。我々は酵母の遺伝学と生化学的アプローチを組み合わせる方法でこのメカニズムに関わる遺伝子の同定を試み、DEAH/X-box タンパク質 Prp22 が異常な基質の校正に必要であること、また同じく DEAH/X-box タンパク質である Prp16 が異常な基質の除去に機能することを示す結果を得た。

スプライシング反応では Fig.1 にあるように、まず第1段階の反応として、pre-mRNA 中の5'側のエキソンとイントロンの境界にあるイントロン側配列「5' splice site」をイントロン中の保存された配列である「branch site」が攻撃し、5'側のエキソンが切り離され、ラリアット中間体と呼ばれる反応中間体が形成される。続く第2段階の反応では5'エキソンの末端配列が、イントロンと3'エキソンの境界にあるイントロン側配列「3' splice site」を攻撃しエキソン同士が接続される。このような反応様式で起こるため、スプライシングに必要な RNA 中の認識配列はわずか3ヶ所である。そしてこれら認識配列の長さはきわめて短く数塩基に過ぎない。スプライソソームはこのような気質認識配



列を誤り無く読み取り、エキソンの接続を行っている。

この化学反応を触媒する

酵素が前述のスプライソソームである。ソームとつく名前が示すとおり、スプライソソームは1つのタンパク質ではなく、触媒活性を持つと考えられる5本のsnRNAとその機能を調節する100種以上のタンパク質からなる巨大複合体である。スプライソソームの酵素活性はRNAにあると考えられており、リボソームとよく似たRNP複合体である。スプライシング反応そのものにはATPは必要ないがこの巨大複合体がスプライシング

を行うためには多数の ATP のエネルギーを利用し、触媒中心となる RNA の構造を連続的に順序正しく変化していくことが必要であると考えられている³。我々はこの ATP の一部が Prp22 により加水分解され、スプライシングに必要な基質中の 3ヶ所の塩基配列が正確であるかを確認するのにそのエネルギーが利用されていることを明らかにした。

さらに我々は、スプライシングの第 2 段階に進めない異常な認識配列を持つラリアット中間体が、核から細胞質に移行して分解されることに着目した⁴。この事実は、スプライソソームが異常な基質を認識した場合には Prp22 のようなタンパク質によってスプライシング反応が停止するだけでなく、その後中間体を細胞質へ放出するためにスプライソソームが自身から中間体を取り外す機構を持つことを示唆している。我々はこのメカニズムの活性を調べる実験系を開発し、このメカニズムに Prp16 が必要であることを示す結果を得た。つまり、異常な基質の校正と除去という 2 つの連続するプロセスに必要な遺伝子として Prp22 と Prp16 を同定することができた。

3. 研究結果および考察

a) Prp22 のスプライシングにおける校正機能の発見

Jonathan P. Staley 博士の研究室では私が渡米する直前に *in vitro* のスプライシング反応の再構成系で、ATP の除去下では pre-mRNA が異常なスプライシング認識配列を持っていてもスプライシングされることを見出していた。私は研究テーマ 1 に基づいて、博士の研究室に参加した後に、出芽酵母のスプライソソーム構成因子の変異株に異常な認識配列を持つ pre-mRNA を取り込ませて、スプライシングが起こるかどうかを検討していた。その結果、私は Prp22 の変異株では基質が異常な認識配列を持っていても、スプライシングが野生型に比べて高頻度で起こるようになっていたことを発見した。Fig.2 はその結果を示す実験データで、(a)ではプライマー伸長法により、細胞内の pre-mRNA やラリアット中間体、mRNA を検出し、その割合を調べたものである。レーン 4 にある通り、Prp22 の R805A 変異体ではラリアット中間体に対する mRNA の比率が野生型に比較して約 2 倍に上昇している。また、(b)ではレポーターとなる mRNA に銅耐性に必要な遺伝子を利用することで、mRNA 産生量の増加を銅耐性の強度で検出した実験である。

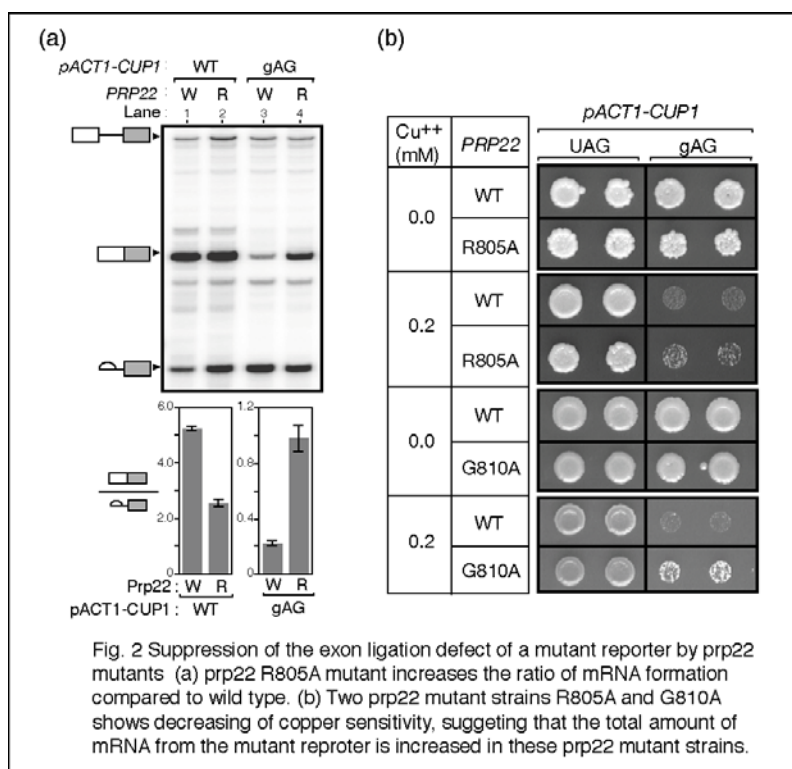


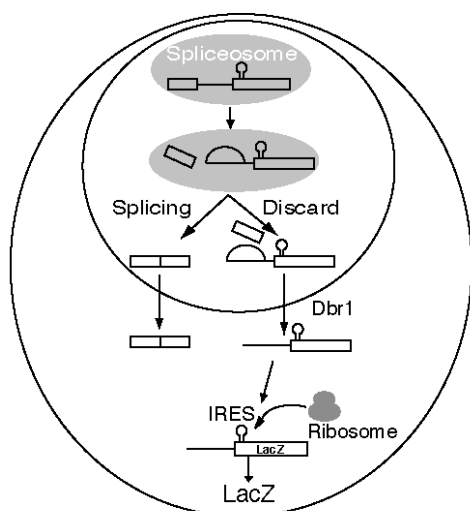
Fig. 2 Suppression of the exon ligation defect of a mutant reporter by prp22 mutants (a) prp22 R805A mutant increases the ratio of mRNA formation compared to wild type. (b) Two prp22 mutant strains R805A and G810A shows decreasing of copper sensitivity, suggesting that the total amount of mRNA from the mutant reporter is increased in these prp22 mutant strains.

この実験で Prp22 の変異株 R805A と G810A では野生型に比べて銅耐性が増加していたことから、Prp22 の変異株では異常な基質認識配列を持つ pre-mRNA でもスプライシングが起こること、つまり、異常な基質の校正がうまくいかなくなっていることが明らかとなった。一方同じ Staley 博士の研究室の大学院生 Rabiah M. Mayas により、前述の *in vitro* の実験系においても、Prp22 が ATP を利用して異常な認識配列を持つ基質の校正を行っていることを明らかにし、2 つの結果を合わせて報告した⁴。

b) ラリアット中間体を

検出するレポーターシステムの開発

第2のテーマとして異常基質の認識・除去に関わる新規の変異体を単離するための実験系の開発を目的として新たなレポーターシステムの構築を行った。我々は第1段階の産物であるラリアット中間体が細胞質で分解されることに着目し、細胞質に存在するラリアット中間体量を指標とした酵母細胞機能の検討を考えた。しかし、ラリアット中間体にレポーター遺伝子を組み込んだとしても、5'エキソンを欠いた中間体では翻訳開始に必要なキャップ構造を持たないため翻訳が起こることはない。そこで、この問題を解消するために我々は、ウィルス由来の **Internal Ribosome Entry Site (IRES)** 配列を利用することを考案した。IRES 配列はキャップ構造非依存的にリボソームを mRNA 上にリクルートし、翻訳を開始させる働きを持つ。Stanford 大学の Peter Sarnow 博士のグループは



コオロギのウィルスである CrPV の IRES 配列が出芽酵母の細胞内でも機能することを報告していたため、私は Sarnow 博士の研究室より CrPV の IRES 配列を譲り受け、IRES 配列をイントロンの下流に組み込んだレポーター遺伝子を考案し、ラリアット中間体の検出系を構築した。Fig.3 に示したものがレポーター遺伝子の構造と機能のモデル図である。図に示した通り、我々はラリアット中間体の分解を抑制した酵母変異株で、レポーター遺伝子である beta-galactosidase 遺伝子の活性が上昇していることを確認することができ、この新規レポーターシステムが計画通りに機能することを確認した。

Fig. 3 Schematic model for IRES reporter system

c) 新規レポーターを用いた Prp16 の機能の検討

スプライソソームの異常基質除去経路の活性を検出する新規レポーターシステムを構築できたので、次に私はそのレポーターシステムを既知のスプライソソームの構成因子の機能検討に応用した。1993年に Christine Guthrie 博士の研究室で、Prp16 の酵母の変異株では異常な基質認識配列を持つラリアット中間体の、第2段階での抑制が解除されることを報告していた¹。つまり、Prp16 は異常なラリアットの認識と排除に関わると解釈されていた。そこで私は、新規レポーターに Guthrie 博士らが使用したのと同じスプライス部位の変異を導入し、Prp16 の変異株ではラリアット中間体の細胞質への輸送がどうなるかを検討した。その結果 Prp16 の変異株では細胞質のラリアット中間体量の低下が観察された。さらに、第1段階を阻害する別のスプライス部位の異常を持つレポーターを用いた場合には細胞質に排出される pre-mRNA の量も低下していることが示された。このことは Prp16 がこれまでに知られていたような、スプライシングの第2段階の前で異常な配列を持つラリアット中間体の排除に機能するだけでなく、第1段階を越えられない異常な配列を持った pre-mRNA に対しても同様の機能を果たしていることを示唆している。このことは Prp16 が第1段階の反応が起きる起きないに関わらず、ある一定時間後にスプライソソームから基質を放出させることで正確性を維持している可能性が考えられる。この Prp16 の作用機構は (a) で説明した我々の発見した Prp22 の基質校正機能の作用機構のモデルともよく似ている。Prp16 と Prp22 は同じファミリーに属する近縁の遺伝子であるため、この両者の類似した動作機構は、これら DEAH/X ファミリー遺伝子の正確性維持における動作機構の一般的原理であると予想される。

4. まとめ

以上、シカゴ大学への長期派遣期間中に私が挙げた成果について簡潔に報告した。ゲノムプロジェクトが終了し、予想以上に可変的スプライシングによる遺伝子情報の多様化が重要であることが明らかとなりつつある中、スプライシングのメカニズムの詳細を明らかにする必要性が増している。また、多くの疾患で遺伝子配列の変異により、正しいエクソンを選択できなくなることが発症原因になることも明らかとなりつつあり、スプライシングの正確性がどのようなメカニズムで保たれているかは特に重要な課題である。本派遣中に挙げた成果は酵母を利用して得られたものであるが、スプライシングのメカニズムは酵母から哺乳類までほぼ保存され、ヒトにおいてもその基本的なメカニズムは共通なため、スプライシングの正確性維持と疾病との関連を解明していく上でも重要な貢献ができたと考えている。今後、酵母での研究を足がかりとして、ヒト細胞を用いた研究でさらなるスプライシングの正確性維持機構の解明を目指して励んでいきたい。

5. 引用文献

1. **Burgess, S. M., and C. Guthrie.** (1993) A mechanism to enhance mRNA splicing fidelity: the RNA-dependent ATPase Prp16 governs usage of a discard pathway for aberrant lariat intermediates. *Cell* 73:1377-91.
2. **Hilleren, P. J., and R. Parker.** (2003) Cytoplasmic degradation of splice-defective pre-mRNAs and intermediates. *Mol. Cell* 12:1453-65.
3. **Staley J. P. and Guthrie C.** (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92(3): 315-326.
4. **Mayas, M. M., Maita H. and Staley J. P.** Exon ligation is proofread by the DExD/H-box ATPase Prp22p. *Nat. Struct. Mol. Biol.* in press
5. **Thompson, S. R., Gulyas, K. D. and Sarnow P.** (2001) Internal initiation in *Saccharomyces cerevisiae* mediated by an initiator tRNA/eIF2-independent internal ribosome entry site element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:12972-7.