

## 論文の内容の要旨

論文題目 *Trans-splicing between pre-mRNAs from a single gene*

単一遺伝子に由来する mRNA 前駆体間でおこるトランス-スプライシング

氏名 高原 照直

真核生物の mRNA をコードする遺伝子から mRNA が生成するには RNA ポリメラーゼ II により転写された mRNA 前駆体中のイントロンがスプライシングにより除去される過程がある。mRNA 前駆体のスプライシングはスプライソームと呼ばれる多数の RNA とタンパクからなる複合体がイントロン中に存在する保存された配列(スプライス供与部位、スプライス受容部位そしてブランチ部位)を認識することで行われる。また、スプライシングは隣り合う 2 つのエクソン同士を結合するだけでなく、組織特異的や発生段階特異的に特定のエクソンを除外することもある。これは選択的スプライシングと呼ばれ、1 つの遺伝子から多様な mRNA を生み出す遺伝子発現機構として知られている。

ほ乳類の転写因子 Sp1 はさまざまな遺伝子のプロモーター中に存在する GC ボックスと呼ばれる配列に結合して、転写を活性化することが知られている。Sp1 の生理的機能に関しては多くの報告がなされている。しかしながら、ヒト Sp1 cDNA は N 末端領域を欠いた部分 cDNA クローンしか報告されていなかった。そこで、当研究室においては 5' RACE 法により、ヒト Sp1 cDNA の 5' 末端領域のクローニングを行った。その結果、0.34 kb, 0.41 kb および 1.6 kb の 3 つの大きさの cDNA クローンが得られた。これらのうち 2 つのクローン (0.34 kb および 0.41 kb) は通常のスプライシング過程を経て生成した mRNA に由来するものであると考えられたが、1.6 kb cDNA クローンは同一エクソンが別のエクソンの上流および下流の両方に存在するという興味深い構造をもっていた。また、RT-PCR 法によっても 1.6 kb cDNA クローンに相当するヒト Sp1 の転写産物の存在は示唆されていた。これまでに 1 つの mRNA 内でエクソンが重複した構造を有する例はほとんど報告されていない。そこで、本研究では、このエクソンが重複したと考えられる Sp1 mRNA がどのようなメカニズムによ

て生成したのかを明らかにすることにした。

ヒト Sp1 遺伝子の 5'末端側の染色体クローンの同定およびプライマー伸長法を用いた解析から、ヒト Sp1 遺伝子の 5'末端側の遺伝子構造を明らかにした。その結果、0.34 kb および 0.41 kb の大きさを持つ 5'RACE 産物はエクソン 1-2-3 からなる、同一の Sp1 mRNA に由来する cDNA クローンであることが分かった。一方、1.6 kb cDNA クローンはエクソン 3-2-3 配列を持つことが明らかとなった。さらに、RNase プロテクションアッセイ法による解析は、1.6 kb cDNA クローンに相当する Sp1 mRNA が存在し、この mRNA はポリ A 尾部を有していることを示していた。また、エクソン 3 の領域をプローブとして用いた染色体サザンブロット解析により、ヒト染色体中において Sp1 のエクソン 3 はシングルコピーであることが明らかとなった。これらの結果から、エクソン 3-2-3 配列を有する Sp1 mRNA は Sp1 mRNA 前駆体間のトランス-スプライシングによって生成したものであると結論づけられた。トランス-スプライシングは別々に生成した mRNA 前駆体間でスプライシングが起こることにより成熟 mRNA を生み出す反応であり、ほ乳類でおこることは最近になって報告されはじめた。

次に、トランス-スプライシングを受けた Sp1 mRNA の上流側の構造を RT-PCR 法により調べたところ、エクソン 2-3-2-3-4 構造をしていることが示唆された。トランス-スプライシングを受けた Sp1 mRNA の読み枠は Sp1 タンパクがコードするアミノ酸配列と同じ読み枠で連結していた。この mRNA に由来する Sp1 タンパクが生成しているかどうかを調べるためにウエスタンブロット解析を行ったが、それに相当すると思われるタンパク質は検出できなかった。当研究室ではラット Sp1 mRNA 中にもヒト Sp1 mRNA と同様にトランス-スプライシングを受けたと思われるエクソン 3-2-3 配列を有する mRNA が同定されていた。さらに、ラット Sp1 mRNA にはヒト Sp1 mRNA にはみられないエクソン 3-3 配列を有する mRNA も同定されていた。そこで、トランス-スプライシングにより生成するこれらの Sp1 mRNA のラットの各臓器において発現量を解析した。半定量的 RT-PCR 法を用いた解析から、トランス-スプライシング産物の発現量はシス-スプライシング産物の約 1%であると推定された。また、脾臓においてその発現量が低いことが分かった。

最近になり、ほ乳類細胞においてトランス-スプライシングにより mRNA の多様性が生み出されている遺伝子の例が相次いで報告されている。このことは細胞内ではこれまで考えられていた以上に多種多様の mRNA がスプライシング反応により生み出されている可能性を示唆しており、こうした多様性を生み出さるトランス-スプライシングのメカニズムの解析は興味深いものと考えられる。しかしながら、ほ乳類細胞内でおこるトランス-スプライシングの分子メカニズムについてはほとんど分かっていない。そこで、本研究ではさらに、ほ乳類細胞内でどのようにしてトランス-スプライシングがおこるのかについて解析した。ヒト Sp1 mRNA 前駆体間のトランス-スプライシングはエクソン 3-2 配列を生成する。そこで、ヒト Sp1 遺伝子のエクソン 3 からイントロン 3 の一部にわたる領域、およびイントロン 1 からエクソン 2 の領域をそれぞれ発現ベクターに組み込み、それぞれ独立した mRNA 前駆体として HepG2 細胞内で一過性発現させた後、これらの mRNA 前駆体間からトランス-スプライ

シングによりエクソン3-2配列が生成するかどうかを調べた。その結果、これらの mRNA 前駆体間からトランス-スプライシングが起こることが確認された。さらに、種々の発現プラスミドを用いた解析から、一過性発現させたプラスミド由来の mRNA 前駆体間からはどのようなスプライス供与部位と受容部位の組み合わせでもトランス-スプライシングが起こることが分かった。しかしながら、一過性発現させたプラスミド由来の mRNA 前駆体と内在の Sp1 mRNA 前駆体間でのトランス-スプライシングは検出できなかった。これらのことから一過性発現させたプラスミド由来の mRNA 前駆体と染色体由来の mRNA 前駆体では異なったようにトランス-スプライシングを受けることが考えられた。そこで、染色体上から転写された mRNA 前駆体間のトランス-スプライシングについて解析するために、安定的遺伝子導入法により、変異 Sp1 遺伝子を染色体に有する細胞株を作製した。内在の Sp1 遺伝子のイントロン3は非常に大きい(>40 kb)、イントロン3のスプライス供与部位と受容部位までの距離を203 bpまで短くした変異 Sp1 遺伝子由来の mRNA 前駆体におけるトランス-スプライシングは検出されなかった。一方で、イントロン3の5'末端領域84 bpのみを有し、下流のスプライス受容部位およびエクソン4を欠失した変異 Sp1 遺伝子についてトランス-スプライシングの解析を行ったところ、その mRNA 前駆体間からのトランス-スプライシングは観察された。このように、これら2つの変異 Sp1 遺伝子はどちらもイントロン3の大部分の配列を欠失しているにも関わらず、それらのトランス-スプライシングに差異がみられたことから、Sp1 mRNA 前駆体におけるトランス-スプライシングはイントロン3内の配列に依存していないことが分かった。また、スプライス受容部位を欠失した変異 Sp1 遺伝子においてはトランス-スプライシングがみられたことから、下流にスプライス受容部位が存在せず、スプライス供与部位が露呈した状態がトランス-スプライシングがおこる上で重要であることが示唆された。近年、転写とスプライシングは共役した過程であることが明らかとなってきている。この転写とスプライシングの共役により、内在の Sp1 mRNA 前駆体の大きいイントロン3ではスプライス供与部位がしばらくの間露呈した状態となりうる。すなわち、大きいイントロンではスプライス供与部位が合成された後、下流のスプライス受容部位が現れるまでに非常に長い時間がかかるために、しばらくの間、スプライス供与部位が露呈した状態になる。さらに、この露呈したスプライス供与部位が近傍のスプライス受容部位と組み合うことによりトランス-スプライシングがおこることが考えられた。そこで、大きいイントロンとトランス-スプライシングの関係を確かめるために、他の大きいイントロンを有する3つの遺伝子についてトランス-スプライシングの有無を調べたところ、2つの遺伝子において mRNA 中にトランス-スプライシングにより生じたと考えられるエクソンの重複が確認された。同様に、イントロン中に RNA ポリメラーゼ II の停止部位が存在している場合でもスプライス供与部位が露呈した状態をとっていると考えられる。そこで、既に、イントロン内で RNA ポリメラーゼ II の停止部位が存在することが示されているラットのアポリポ蛋白 A-I mRNA についてトランス-スプライシングの有無を調べたところ、重複したエクソンが確認された。これらの結果から、ほ乳類細胞でおこるトランス-スプライシングはスプライス供与部位が長い間露呈することが重要であることが示唆

された。