

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 高原 照直

mRNA 前駆体スプライシングは真核生物の遺伝子発現における重要な段階である。ほ乳類細胞においては 1 本の mRNA 前駆体内のスプライス供与部位と受容部位を選択することにより成熟 mRNA を生成するスプライシング（シス-スプライシング）がよく知られているが、近年になり、別々に生成した mRNA 前駆体上のスプライス供与部位と受容部位間でスプライシングが起こり成熟 mRNA を生成するトランス-スプライシングも報告され始めた。本論文中で申請者は転写因子である Sp1 mRNA 中において 2 つの Sp1 mRNA 前駆体間のトランス-スプライシングにより生成した mRNA バリエントが存在することを示し、さらに、このような単一の遺伝子に由来する mRNA 前駆体間のトランス-スプライシングが細胞内で起こる機構を解析している。

第 1 章では、既に所属研究室で見出されていたエクソンが重複したヒト Sp1 mRNA がどのようにして生成しているかを明らかにすることを目的としている。ヒト Sp1 遺伝子構造の解析から、エクソンが重複した mRNA はエクソン 3-2-3 配列を有していることが分かった。染色体サザンブロット解析によりエクソン 3 配列がシングルコピーであること、また、エクソン 3-2-3 配列を有する Sp1 mRNA にはポリ A 尾部が存在していることから、エクソン 3-2-3 配列を有する Sp1 mRNA がヒト Sp1 mRNA 前駆体間のトランス-スプライシングにより生成したと結論づけられた。ラットの Sp1 mRNA 中においてもトランス-スプライシングにより生成したエクソン 3-2-3 構造体が存在すること、また、ラットにはヒト Sp1 mRNA では見出されていないエクソン 3-3 構造体も存在していた。そこで、申請者はトランス-スプライシングを受けた Sp1 mRNA のラット各臓器における発現量を比較している。その結果、トランス-スプライシング産物はシス-スプライシング産物の約 1% の発現量であり、脾臓においてその発現量が低いことを明らかにした。このように申請者は Sp1 mRNA 前駆体間で起こるトランス-スプライシングにより生体内で成熟 mRNA を生成していることを証明し、生体内で起こる興味深い現象を明らかにしている。このような単一遺伝子に由来する mRNA 前駆体間のトランス-スプライシングという現象は申請者の研究と同時期にいくつかの遺伝子において相次いで報告されている。

第 2 章ではいまだほとんど分かっていない単一遺伝子に由来する mRNA 前駆体間で起こるトランス-スプライシングが細胞内でどのようにして起きているかを明らかにすることを

目的に、ヒト Sp1 遺伝子を用いて解析している。種々の発現プラスミドを作製し、HepG2 細胞内に一過性発現させたプラスミド由来の mRNA 前駆体間のトランス-スプライシングについて検討した結果、一過性発現させたプラスミド由来の mRNA 前駆体間ではどのようなスプライス供与部位および受容部位の組み合わせにおいてもトランス-スプライシングが起こるが、内在の Sp1 mRNA 前駆体とプラスミド由来の mRNA 前駆体間ではトランス-スプライシングみられないといった興味深い知見を得ている。この結果からトランス-スプライシングの解析には染色体上から転写される mRNA 前駆体を用いる必要が考えられることから、申請者はさらに染色体中に外来遺伝子を組み込んだ細胞株を樹立してトランス-スプライシングの解析を行っている。ヒト Sp1 遺伝子のイントロン 3 を短くした外来遺伝子やイントロン 3 の下流のスプライス受容部位を欠いた外来遺伝子を用いた解析から、イントロン 3 中にはトランス-スプライシングに参与する特定の配列が存在しないが、非常に長いイントロン 3 の存在がトランス-スプライシングに重要であると考えられた。近年、転写とスプライシングは共役した過程であることを示す結果が数多く報告されている。申請者はこの知見をもとに、トランス-スプライシングが起こるためには長いイントロンの存在によりしばらくの間スプライス供与部位が露呈した状態が重要であると考えた。長いイントロンを有する他の 2 つの遺伝子においてもトランス-スプライシングを確認しており、さらに、申請者は短いイントロン内でも RNA ポリメラーゼ II の停止がスプライス供与部位の露呈を生じることを考え、このような特徴を有するラットアポリボ蛋白 mRNA 前駆体間からのトランス-スプライシングを観察している。こうした結果は、単一遺伝子に由来する mRNA 前駆体間のトランス-スプライシングにはスプライス供与部位がしばらくの間露呈することが重要であることを支持する。

このように申請者は単一遺伝子に由来する mRNA 前駆体間で起こるトランス-スプライシングという新たな現象がほ乳類細胞内で起きていることを証明し、さらにこの現象が起こる上でスプライス供与部位がしばらくの間露呈することが重要であるという極めて新しい知見をもたらしたことは高く評価できる。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。