

論文内容の要旨

申請者氏名 神 唯

要旨

選択的スプライシングは、エキソンを使い分けることで一つの遺伝子から複数の遺伝子産物(タンパク質)を作り出すことのできる RNA レベルの遺伝子発現制御機構の一つである。組織特異的、あるいは発生分化段階特異的なスプライシングバリエーションの存在が多くの遺伝子で報告されており、選択的スプライシングは生体において重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、選択的スプライシング制御の分子機構は未だ明らかにされていない事柄が多く、且つ脊椎動物において、特異的な発現を示す選択的スプライシング制御因子は数例しか報告されていない。私は脊椎動物における選択的スプライシング制御機構の新たなモデルを打ち立てるべく新規制御因子の同定を試み、RRM 型の RNA 結合タンパク質をコードするゼブラフィッシュ及びマウス *fox-1* 遺伝子を同定した。*fox-1* は線虫 *fox-1* (feminizing locus on X) と相同性を持つ遺伝子である。線虫 *fox-1* は遺伝学的な解析により性決定過程に関わる *xol-1* (XO lethal) を抑制していることがわかっている。その抑制機構は転写後調節(性特異的スプライシング、あるいは RNA の安定性の調節)と考えられている。

ゼブラフィッシュおよびマウス *fox-1* 遺伝子を同定・単離し、発現解析を行ったところ、*fox-1* mRNA が筋肉系列組織(マウス *fox-1* は心臓にも発現)において特異的に発現すること、Fox-1 タンパク質が核に局在していることを明らかにした。さらに RNA 結合タンパク質である Fox-1 の標的 RNA 配列が GCAUG であることを、*in vitro* RNA 選別法とゲル移動度シフト法、UV クロスリンク法により決定した。以上の結果と線虫 *fox-1* の知見を総合することで、Fox-1 が核内において配列 GCAUG を介して筋肉型(及び神経型)スプライシングを制御しているのではないかと仮説を立てた。そして、Fox-1 がヒト・マウスのミトコンドリア ATP 合成酵素 γ サブユニット (*F1 γ*) 遺伝子、及びラット α -アクチニン遺伝子の筋肉系列特異的なスプライシングを誘導することを突き止めた。

F1 γ 遺伝子は筋肉系列組織においてのみエキソン 9 がスキップした mRNA が作り出される。またエキソン 9 の上流イントロンには配列 GCAUG が複数存在している。ほ乳類培養細胞を用いた *in vivo* スプライシング解析により、Fox-1 は自身の RNA 結合能、C 末端領域と、*F1 γ* 中の配列 GCAUG を介して筋肉型スプライシングを促進していることを明らかにした。

α -アクチニン遺伝子は上流 NM (non-muscle) エキソンと下流 SM (smooth-muscle) エキソンを排他的に使用する制御を受けている。通常は SM エキソンが PTB (Polypyrimidine tract binding protein) により抑制され、結果 NM エキソンが使用されることで筋肉組織において SM エキソンが使用される。この NM エキソン近傍に GCAUG が存在している。*Fox-1* が α -アクチニンの選択的

スプライシングを制御するとき、自身のC末端領域を介してNMエキソンの使用を抑制し、N末端領域でSMエキソンの使用を促進することで、 α -アクチニンの筋肉型スプライシングを促進していることを明らかにした。また、Fox-1はPTBによるスプライシング抑制を競合阻害的に解除していることを明らかにした。

配列GCAUGは今までに、いくつかの遺伝子の選択的スプライシングに関わるシス配列として同定されていた。その中の一つであるフィブロネクチン遺伝子のIIIbエキソンの使用をFox-1が促進する事を見いだした。フィブロネクチンIIIbエキソンの使用促進には下流イントロンに存在する複数の配列UGCAUGが必須であることが知られていた。

本研究により *fox-1* が配列GCUAGを介して選択的スプライシングを制御する因子であると結論づけた。Fox-1という制御因子は、同じ配列GCAUGを指標にスプライシングに対して抑制的にも促進的にも働く。今後、その分子機構の違いを明らかにすることは、膨大な数の遺伝子における選択的スプライシング制御機構の解明に繋がると確信している。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 神 唯

近年ゲノム解読が進んだ結果、ヒト遺伝子数は多くても4万程度であり、10万ないし20万種類と考えられる多様な蛋白質がどのようにして発現できるのか、という問題がクローズアップされている。この多様性を生む重要な鍵の1つが選択的スプライシングである。ヒト遺伝子の場合、約6割が何らかの選択的スプライシングを受けると推定されている。しかしながら、選択的スプライシング制御機構は不明な点が多い。本研究では、ゼブラフィッシュの筋肉系や、マウス神経系・筋肉系に発現する核内RNA結合蛋白質Fox-1を同定した。SELEX法やUVクロスリンク法をもちいて標的RNA配列の同定を行い、GCAUG配列に特異的に結合することを示した。そして、培養細胞へのトランスフェクション実験を行い、Fox-1蛋白質がGCAUG配列を介して、 α アクチニン遺伝子やATP合成酵素F1 γ 遺伝子の筋肉型スプライシング、および、フィブロネクチン遺伝子の選択的スプライシングを制御することを明らかにするとともに、これらのスプライシング制御様式として、エキソン挿入の抑制の場合と活性化の場合の2種類が存在することを示した。また、アクチニン遺伝子の筋肉型スプライシング制御の際には、普遍的なスプライシング抑制因子PTBとの拮抗作用が重要なことも示した。近年のコンピューター解析により、GCAUG配列が多く遺伝子の筋肉系列特異的エキソンや神経系特異的エキソンの近傍に有意に存在することが示されており、Fox-1がこれらの組織における多彩なスプライシング制御に重要な役割を果たすものと推察される。

以上のように、本論文は脊椎動物において組織特異的スプライシングの制御因子を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。