

総説 (第25回徳島医学会賞受賞論文)

選択的スプライシング反応による遺伝子発現制御

黒川 憲, 棚橋 俊仁, 増田 清士, 桑野 由紀, 六反 一仁

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生体制御医学講座ストレス制御医学分野

(平成22年10月29日受付)

(平成22年11月19日受理)

はじめに

ヒトゲノム配列は完全に解読され、ポストゲノム研究が進むに従って、さらに複雑な遺伝子の機能が明らかにされつつある。なかでも、RNAの多彩な機能が注目されており、転写、スプライシング、キャッピング、ポリ(A)付加、核外輸送、翻訳などの多段階で遺伝子発現を時空間的に制御する転写後調節機構の重要性が認識されている。特に選択的スプライシングは、mRNA前駆体のスプライシングはもちろんのこと、エピゲノム、転写調節、伸長反応、核外輸送、および翻訳調節の全ての過程に関わる重要な反応である。しかし方法論の確立が困難なこともあり、選択的スプライシング反応については未だ解明が進んでいない。本稿では、特に選択的スプライシングに着目し、その機能を概説する。

選択的スプライシング

遺伝子発現の過程において、DNAから転写されたmRNA前駆体は、タンパク質に翻訳されるエクソン領域と翻訳されないイントロン領域を含んでいるが、スプライシングによりイントロンは除去され、エクソンのみから成熟mRNAが生成される。さらに、スプライシングは発生段階や環境変化などに応じて選択するエクソンの組み合わせを変えており、単一の遺伝子から複数のスプライシングバリエントが生成される(図1)。この現象は選択的スプライシングと呼ばれ、各々のスプライシングバリエントから翻訳されたタンパク質は一次構造が異なるため、さまざまな細胞機能を変化させることができる。それに加え、タンパク質に翻訳されずに non-

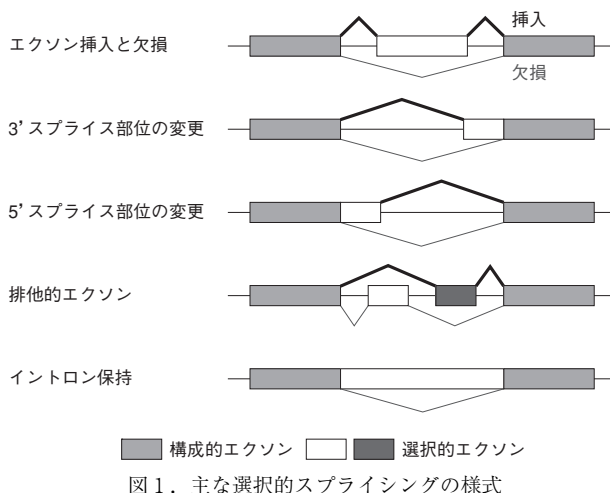


図1. 主な選択的スプライシングの様式

coding RNAとして機能するバリエントや、mRNAの品質管理機構により分解されるバリエントが生じる場合もある。選択的スプライシングはヒト遺伝子の95%以上に起こると示され、高等生物でゲノムの多様性を生み出す機構に強く寄与するとともに、遺伝子の組織特異的あるいは発生段階特異的な発現に深く関わっている¹⁾。

スプライシング反応におけるエクソン認識とイントロン認識

mRNA前駆体のスプライシングは、RNAとタンパク質の巨大な複合体であるスプライソソームにより触媒され、その中でも5種類(U1, U2, U4, U5, U6)の核内低分子リボタンパク質(small nuclear ribonucleoprotein; snRNP)は正確なエクソン認識およびイントロン認識に重要な役割を示す(図2)²⁾。イントロンには、5'

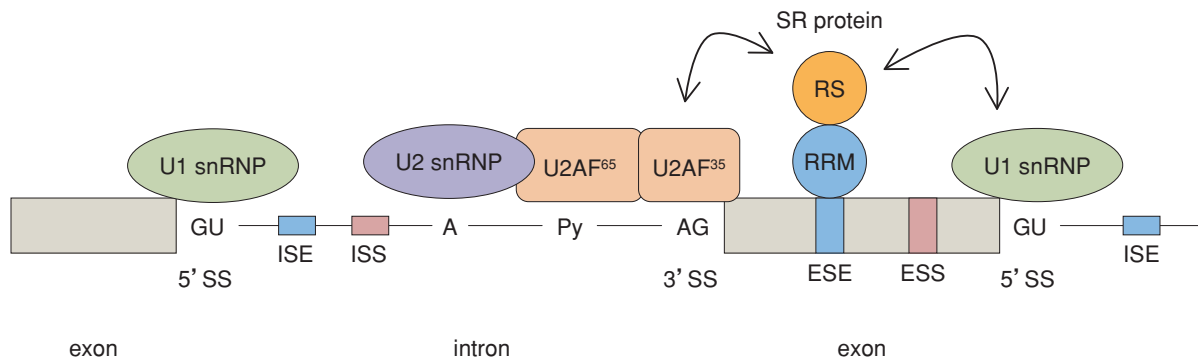


図2. スプライシング反応におけるエクソン認識とイントロン認識

SRタンパク質はRNA認識部位を介してESEに結合し、RSドメインを介してU1 snRNPやU2AF⁶⁵と相互作用する。U1 snRNPは5'スプライス部位(GU)に結合し、U2AF⁶⁵は3'スプライス部位(AG)を認識する。U2AF⁶⁵はポリピリミジントラクト(Py)に結合し、U2 snRNPがブランチポイント(A)へ結合するのを促進する。SRタンパク質とESE、U1 snRNPと5'SS、U2AF⁶⁵と3'SSの結合はRSドメインを介したタンパク質相互作用により促進される。5'SS; 5'スプライス部位, 3'SS; 3'スプライス部位, RRM; RNA認識部位, RS; RSドメイン

末端のスプライス部位(GU)、3'末端のスプライス部位(AG)、さらにその間にピリミジン塩基に富むポリピリミジントラクト(Py)とブランチポイント(A)と呼ばれる配列が存在する。まず、U1 snRNPが5'末端のスプライス部位を認識し、U2 auxiliary factor (U2 AF)の2つのサブユニットのうち、U2AF³⁵が3'スプライス部位を認識する。さらにU2AF⁶⁵がポリピリミジントラクトに結合し、ブランチポイントへのU2 snRNPの結合を促進する。この一連の過程を介して、U1 snRNP, U2 snRNP, U2 AFの相互作用によりイントロンを認識するスプライソソームが形成される。

成熟 mRNA の生成には、イントロンのスプライス部位の認識に加え、エクソン認識の機構も重要である。mRNA 前駆体には選択的スプライシングの制御配列(シス因子)が散在しており、それぞれの配列に特異的に結合するRNA結合タンパク質(トランス因子)と相互作用することでエクソン認識が進行する。シス因子として、mRNA 前駆体のエクソンには、エクソン自身の挿入を促進するESE配列(exonic splicing enhancer)と、逆に抑制するESS配列(exonic splicing silencer)が存在する。そしてイントロンにも同様に、エクソンの挿入を促進するISE配列(intronic splicing enhancer)と抑制するISS配列(intronic splicing silencer)が存在する³⁾。脊椎動物ではイントロンが長大なため、エクソン認識がイントロン認識に先行すると考えられているが、エクソン認識からイントロン認識へ移行する機序は未だ解明されていない。

スプライシング調節因子

代表的な正のトランス因子であるSRタンパク質は、ESE配列に結合してエクソンの挿入を促進する(図2)。それに対して負のトランス因子であるhnRNP(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein)は、ESS配列に結合してエクソンを除去する方向に働く。これら多くのスプライシング調節因子が発生段階特異的、また組織特異的に機能することで、複雑な選択的スプライシングの制御が可能となる。さらに、特定のトランス因子はストレスに応じて急激に発現が変化するため、選択的スプライシングを介したストレス応答機構の存在が示唆される⁴⁾。

Serine/arginine-rich splicing factor (SRSF) ファミリー

選択的スプライシングを制御する主要なSRタンパク質として、Serine/arginine-rich splicing factor (SRSF)ファミリーがあげられる(図3)。これらタンパク質の遺伝子はヒトとマウスの間で塩基配列が高度に保存されており⁵⁾、N末側にRNA認識部位(RNA recognition motif; RRM)、C末側にRS(arginine/serine-rich)ドメインを有するRNA結合タンパク質である⁶⁾。この構造上の特徴から、RNA認識部位を介してmRNA前駆体に結合し、さらにRSドメインを介してU1 snRNP、U2AFなどのスプライソソームを構成するタンパク質と相互作用することで、標的エクソンの選択を調節している(図2)。

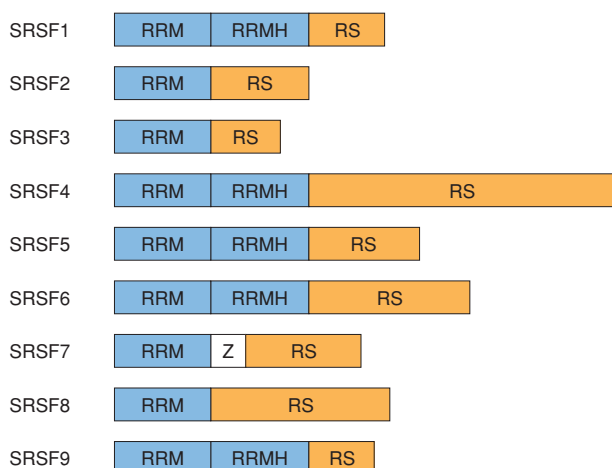


図3. Serine/arginine-rich splicing factor (SRSF) ファミリー
 SRSFは、N末側にRNA認識部位、C末側にRSドメインを有する選択的スプライシングの調節因子群である。RRM; RNA recognition motif, RRMH; RRM homolog, RS; arginine/serine-rich domain, Z; zinc knuckle

ナンセンス変異依存mRNA分解機構 (Nonsense-mediated mRNA decay ; NMD)

スプライシング異常や遺伝子変異の結果、本来の終止コドンの上流に premature termination codon (PTC)

と呼ばれる終止コドンが新たに生じる場合がある (図4)。しかし、PTCが存在する mRNA (PTCバリエント) は、mRNAの品質管理機構の一つであるナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (nonsense-mediated mRNA decay ; NMD) により分解を受け、異常なアミノ酸配列を持つタンパク質の生成は防止されている⁷⁾。スプライシング反応の際には、隣接するエクソンの結合部に exon junction complex (EJC) が付加されるが、NMDが機能するためには、このEJCとPTCとの位置関係が重要である。リボソームで成熟 mRNA からの翻訳が初めて起こる場合、EJCは成熟 mRNA から取り外されて翻訳が進むが、PTCを認識すると SMG1, UPF1, eRF などのタンパク質からなる SURF 複合体がリボソームに結合する。PTCの位置が最終のEJCよりも50から55塩基以上の上流に存在した場合、UPF1がSMG1によりリン酸化され、NMDによるPTCバリエントの分解が進行すると考えられている。

また選択的スプライシングにより、PTCを含むエクソンを除去して正常な mRNA を生成する場合と、PTCを含むエクソンを挿入して NMD により分解させる場合を状況に応じて使い分ける遺伝子もあり、nonsense-associated altered splicing (NAS) 機構と呼ばれている⁸⁾。

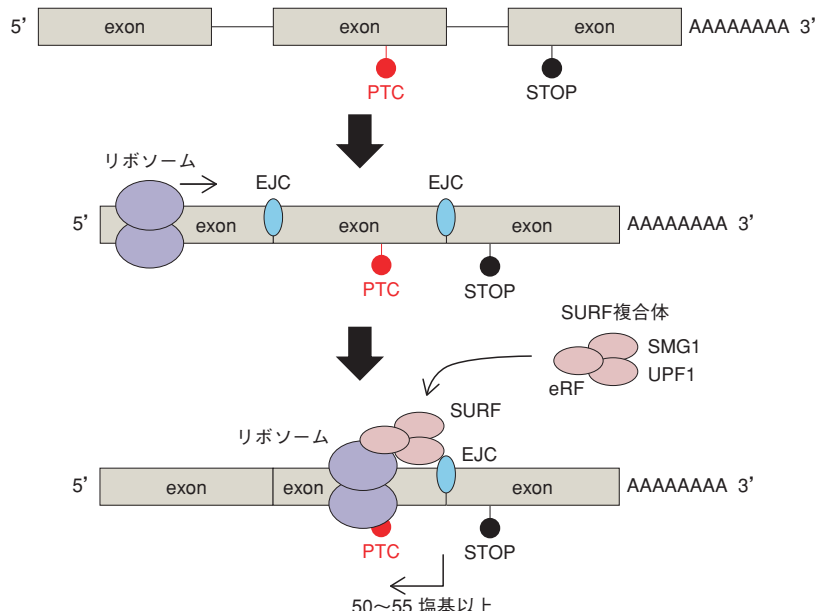


図4. ナンセンス変異依存 mRNA 分解 (NMD) の分子機構
 リボソームは、初回の翻訳時に EJC を外しながら翻訳を進めるが、PTCに遭遇すると SURF 複合体がリボソームに結合する。PTCの位置が最終のEJCよりも50から55塩基以上上流であった場合、リボソーム、SURF、EJCによる複合体が形成される。そしてUPF1がSMG1によりリン酸化されることでNMDによるPTCバリエントの分解が進行する。PTC; premature termination codon, EJC; exon junction complex, SURF; SMG1-UPF1-eRF1-eRF3 complex

SRSF 遺伝子自身の選択的プライシング

SRSF 遺伝子は構成的および選択的スプライシングの制御に必須であるが、特定のストレスに反応すると、SRSF 遺伝子自身にも選択的スプライシングが生じる(図5)。この選択的スプライシングには、大別して coding region 内のエクソン挿入と 3'UTR 内のイントロン保持の2種類あるが、興味深いことに、SRSF 遺伝子の選択的スプライシングを受ける領域の塩基配列はヒトとマウスではほぼ100%保存されており、いずれも PTC バリエントが生成される^{5,9,10}。coding region 内の選択的エクソンには PTC が存在し、通常はこのエクソンがスプライシングにより除去されることで、正常な成熟 mRNA が生成される。しかし、酸化ストレスや低酸素に反応すると、PTC を含むエクソンが成熟 mRNA に挿入され、PTC バリエントが生成される⁴⁾。

また、一般的に 3'UTR にスプライシングは起こらないが、SRSF 1 遺伝子や SRSF 2 遺伝子では 3'UTR に選択的スプライシングが起こり、その部位に新たに EJC が付加される。その結果、本来の終止コドンが最終の EJC よりも上流に存在することになり、やはり PTC バリエントとして NMD に認識される。特に SRSF 1 遺伝子では、3'UTR における選択的スプライシングの結果、4種類の PTC バリエントが生じると報告されてい

る¹¹⁾。しかし、このストレス下で SRSF 遺伝子に生じる選択的スプライシングの制御機構や他の遺伝子の選択的スプライシングに及ぼす影響は未だ完全に解明されていない。適切な遺伝子発現を保つためのスプライシング因子の自己調節機構や選択的スプライシングを介したストレス応答機構である可能性があり、今後さらに研究が進むことが期待される。

選択的スプライシングと疾患

悪性腫瘍、神経変性疾患、遺伝病など数多くの難治性疾患でスプライシングの異常に起因する病態形成が報告されている。これら異常なスプライシングは、遺伝子の正常な機能発現を阻害するため、癌細胞の直接的な発生やその悪性度に影響を及ぼす可能性があり、新たな治療標的や疾患マーカーとなりうる可能性が考えられている。

おわりに

選択的スプライシングの結果生じるエクソンの同定は、従来は個別に RT-PCR 法で検出する方法が用いられていた。しかし最近では大量の転写産物を一度に分析可能なマイクロアレイや次世代型シーケンサーの登場により、癌特異的なスプライシングや選択的スプライシング

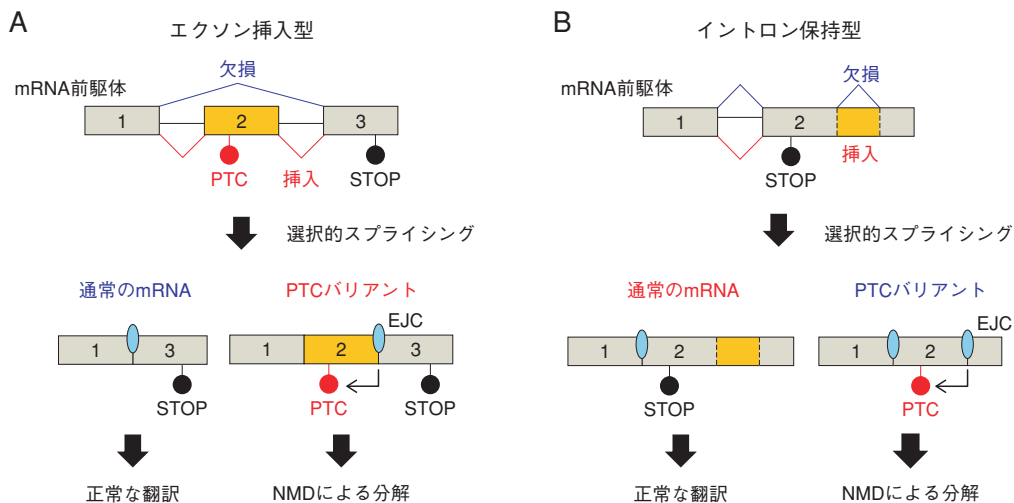


図5. SRSF 遺伝子自身の選択的スプライシング

SRSF 遺伝子が受ける選択的スプライシングには、coding region 内のエクソン挿入型 (A) と 3'UTR 内のイントロン保持型 (B) の2種類あり、いずれも PTC バリエントが生成される。(A) Coding region 内の選択的エクソンには PTC が存在し、成熟 mRNA に挿入されると PTC バリエントが生成される。(B) 3'UTR にスプライシングが起こると、その部位に新たに EJC が付加される。その結果、本来の終止コドンが最終の EJC よりも上流に存在することとなり、やはり PTC バリエントが生成される。

調節因子の発現変動を大規模に解析することが可能である。しかし、これら新技術は有用な情報源として研究の端緒を切り開くに過ぎない。グローバルなスプライシング促進因子として働くSRタンパク質は癌組織で発現が変化していることが示されている。しかし、何が原因でその発現が変化しているかは不明であり、発現変化をきたす外的あるいは内的な要因の同定が必要である。また選択的スプライシングをうける標的遺伝子を厳密に同定し、癌の表現型への関与を徹底的に解明する地道な研究も必要不可欠と考えられる。

文 献

- 1) Chen, M., Manley, J.: Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **10**: 741-754, 2009
- 2) Wahl, M., Will, C., Lührmann, R.: The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*, **136**: 701-718, 2009
- 3) Srebrow, A., Kornblihtt, A.: The connection between splicing and cancer. *J. Cell. Sci.*, **119**: 2635-2641, 2006
- 4) Takeo, K., Kawai, T., Nishida, K., Rokutan, K., *et al.*: Oxidative stress-induced alternative splicing of transformer 2 beta (SFRS10) and CD 44 pre-mRNAs in gastric epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **297**: C330-338, 2009
- 5) Lareau, L., Inada, M., Green, R., Wengrod, J., *et al.*: Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature*, **446**: 926-929, 2007
- 6) Long, J., Caceres, J.: The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem. J.*, **417**: 15-27, 2009
- 7) Gardner, L.: Nonsense-Mediated RNA Decay Regulation by Cellular Stress: Implications for Tumorigenesis. *Molecular Cancer Research*, **8**: 295-308, 2010
- 8) Cartegni, L., Chew, S., Krainer, A.: Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.*, **3**: 285-298, 2002
- 9) Ni, J., Grate, L., Donohue, J., Preston, C., *et al.*: Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. *Genes. Dev.*, **21**: 708-718, 2007
- 10) McGlincy, N., Smith, C.: Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? *Trends Biochem. Sci.*, **33**: 385-393, 2008
- 11) Sun, S., Zhang, Z., Sinha, R., Krainer, A., *et al.*: SF 2/ASF autoregulation involves multiple layers of post-transcriptional and translational control. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**: 306-312, 2010

Regulation of gene expression by alternative splicing

Ken Kurokawa, Toshihito Tanahashi, Kiyoshi Masuda, Yuki Kuwano, and Kazuhito Rokutan

Department of Stress Science, Institute of Health Biosciences, the University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan

SUMMARY

The human genome sequence has been decoded, and the more complicated regulation of gene function is revealed in the post-genome era. In the various mechanisms of epigenome, RNA dramatically controls gene expression through the various post-transcriptional processing including transcription, splicing, cap addition, polyadenylation, nuclear export, translation. Especially, the alternative splicing is involved in all of those post-transcriptional regulations, as well as splicing of pre-mRNA. However, there were few reports, how the alternative splicing contributes to the regulations of cellular functions because of its difficulty of the analysis. This review discusses the molecular mechanism of alternative splicing and its regulator; Serine/arginine-rich splicing factor (SRSF). We also discuss how the SRSF genes sustain their own proper expressions and functions.

Key words : alternative splicing, SRSF, PTC, NMD