可視化スプライシング・レポーターシステムで開く，哺乳類のmRNA制御の世界

Visualizing Splicing Reporter System Explores the mRNA Regulation World in Mammal

武内章英，萩原正敏
Akihide Takeuchi, Masatoshi Hagiwara

真核生物は，ゲノム情報からタンパク質を合成する過程でメッセンジャーRNA（mRNA）を媒介にしている．このmRNAの成熟過程に選択的スプライシングをはじめとする様々な調節を加えることで，遺伝情報のバリエーションを指数関数的に増やしている．これまではこの魅力的な制御をリアルタイムに捉えることやモデル化することが難しかった．そこで筆者らは，mRNA制御に応じて異なる蛍光タンパク質が発現するスプライシング・レポーター系を構築し，生体内において*in situ*でスプライシングパターンの解析を可能とする技術を開発した．このシステムを用いて，細胞でのイメージング，トランスジェニックマウスの作製，スプライシング制御のメカニズム解析，RNA病を標的したスプライシング制御低分子化合物探索などを行っている．本稿ではスプライシング・レポーターシステムとその応用について議論する．

key words　選択的スプライシング制御，スプライシング・レポーターシステム，スプライシング・レポーターマウス，RNA結合タンパク質，スプライシング制御配列

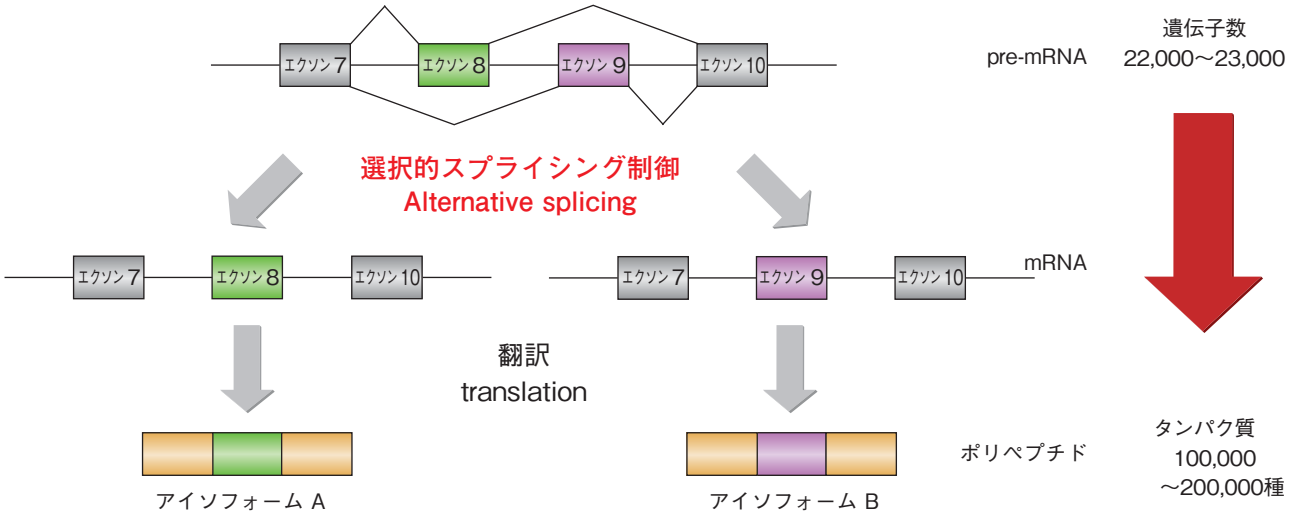
Ⅰ．選択的スプライシングとは？

筆者が米国での留学生活を終えてそろそろ帰国しようと考えていた2006年ころから，神経分化の調節にmRNAの制御が重要ではないかということがレビューなどで論じられ始めた．それまでは，mRNAのバリアントとは，遺伝子の機能解析やノックアウトマウスの作製のときに考慮しなければならない厄介な情報でしかなかったが，いろいろなことを知るにつれて，無謀にも自分で紐解いてみたい現象であるように思えてきた．

mRNAの制御とは，染色体情報から転写されたpre-mRNAに切断・修飾を加え，成熟したmRNA（mature mRNA）にする制御である．このmRNA制御の1つである選択的スプライシングとは，図1の例のようにpre-mRNAから成熟mRNAを生成する過程で使うエクソンを場合分けすることにより，1つの遺伝子から複数のmRNA（スプライスアイソフォームまたはスプライスバリアント）を作り出す制御のことである．ゲノムプロジェクトと次世代高速シークエンサーによるゲノムDNAとmRNAの網羅的な解読により，かつては10万以上と言われた哺乳類の全遺伝子数は，たかだか22,000～23,000くらいしかないことがわかってきた一方，ヒトでは複数のエクソンを持つ遺伝子のじつに90%以上が選択的スプライシング制御を受け，推定で10～20万種類のタンパク質が作り出されると考えられている．遺伝子を体の設計図とすると，ヒトの場合部品の数が22,000個ほどしかないと言われるとちょっと足りないんじゃないか（高性能な車のほうがもっと多いんじゃないか？）という気がするが，20万と言われると何だか安心するのは筆者だけだろうか？ ちなみに，モデル生物として利用されている線虫（*C. elegance*）の遺伝子数は約20,000個と推定されており，ヒトとの違いはたった1割程度と考えると，選択的スプライシング制御はヒトへの進化に重要な機能を果たしただろうことは容易に想像できる．

Ⅱ．選択的スプライシングのモデル化と可視化

筆者がこの選択的スプライシング制御に興味を惹かれたとき，まず最初に取りかかったのは，その制御を再現できるモデルを作製して，かつその制御の実態を発生過程で眼に見える形にしたいということであった．mRNAのスプライスアイソフォームを見る方法というのは，相手がmRNAであるがゆえに，主に細胞や組織をホモジナイズしてmRNAを抽出・精製しRT-PCRのような方法で見る方法が一般的であった．また，それまでの選択的スプライシング制御のモデル化は，解析したい遺伝子のゲノム断片の一部を限定的に利用するものが多く，モデルが内在性の遺伝子のスプライシング制御を忠実に反映しているかどうかに疑問があった．内在性の遺伝子のスプライシング制御に関わるゲノム領域をすべて用いて，単一細胞レベルの解像度で，感度良く，さらに生きたまま細胞や個



■図1　mRNA制御のスキーム（選択的スプライシングを例として）

選択的スプライシングを含むmRNA制御により，1つのpre-mRNAから複数のmRNAのバリアント（スプライスアイソフォーム）が産生される．このメカニズムにより，1つの遺伝子から複数の機能の異なるタンパク質が作られることになり，遺伝情報が指数関数的に増える．mRNA制御は，高等生物の発生や高度な臓器・細胞特異的機能を調整するのに重要な役割を果たすと推定される．

体で見られるシステムがあれば，発生過程における選択的スプライシングのダイナミズムなどを捉えられ，これまで知られていなかった様々な事象を明らかにできる可能性があると考えられた．この取り組みは，筆者が所属した研究室で線虫を用いた先行研究がされており，蛍光タンパク質を用いた可視化システムが非常にうまく動いていたため[1]，最初はこれを哺乳類用に改変して使い始めた．ゲノムサイズがコンパクトなどのメリットで線虫ではうまく動いていた系は，転写や翻訳レベルの制御の違いから哺乳類ではうまく働かず，初期に作製したレポーターはほとんど光らないものだった．うまく光らない問題点を1つずつ見つけて改変して行った結果，8カ月ほどかかってようやく実験に使えるものになった．

筆者らがスプライシング・レポーターシステムを構築するうえで求めた性能は，以下の3点である．

①内在性の遺伝子のスプライシング制御を忠実に反映させるため，制御に必要なゲノム領域をすべて含むこと

②スプライスバリアントの生成を定量的にモニターできること

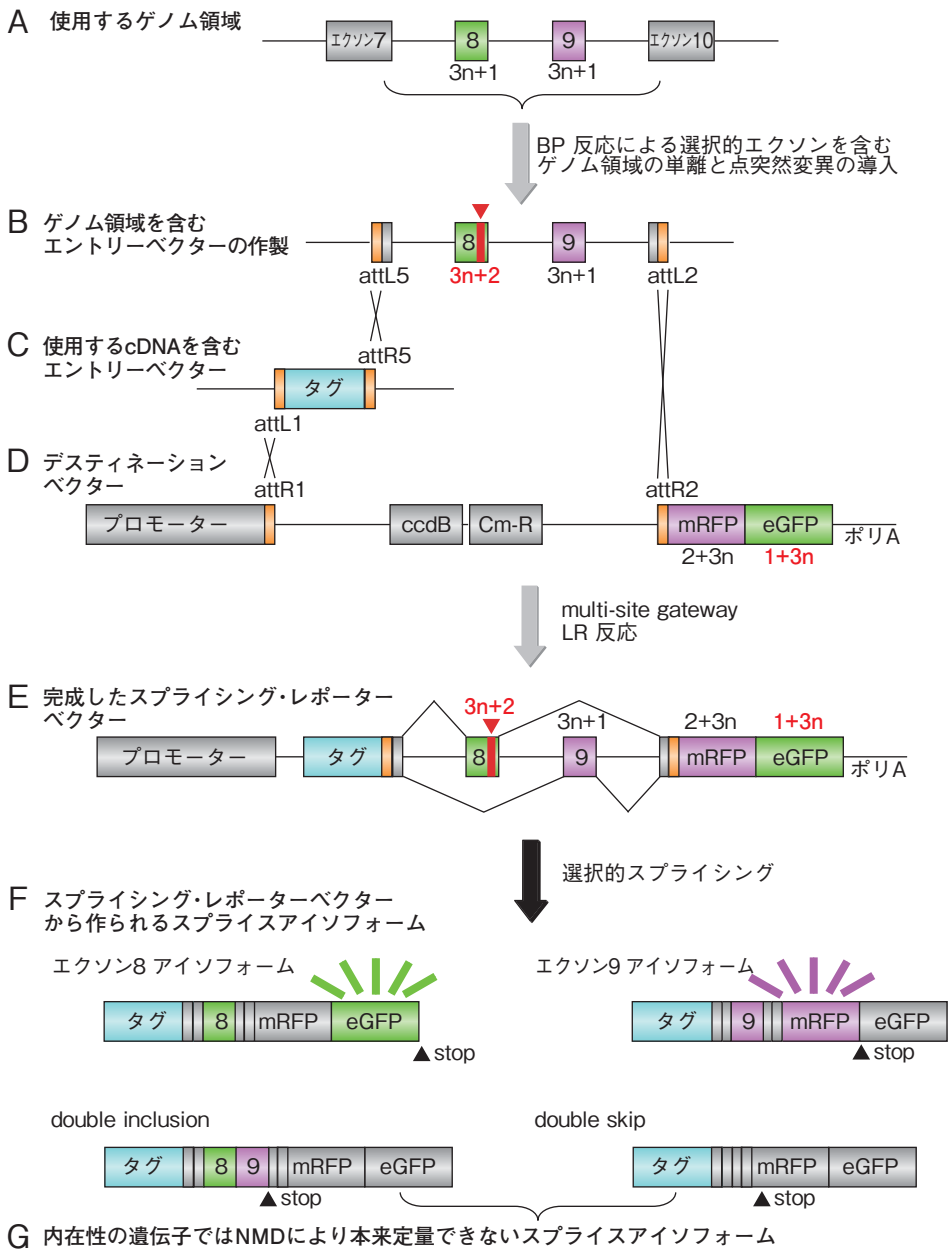
③*in vivo*イメージングやスクリーニングなどに利用できるように十分明るいこと

1．制御に必要なゲノム領域をすべて含むこと

選択的スプライシング制御では，選択的エクソン上またはその周辺のイントロン部分に制御配列（シス・エレメント）が存在するが，必ずしも近傍にだけ存在するわけではないため，選択的エクソンとそれを挟む恒常的エクソンを含むゲノム領域を全長で使うことを目指した（図2A）．哺乳類のイントロンの平均長は約3,300bpと使用するゲノム領域だけでもかなりの大きさになるため，サブクローニングが容易なGateway® system（Invitrogen）の相同組換えを用いたベクターシステムとした．Gateway systemは，ベクターバックボーンの構造を固定し（図2D），さらにそこに入れたい構造や配列をエントリークローンとして作製してしまえば（図2B，C），その後のベクター作製では制限酵素サイトの組み合わせを考える必要がなく，10kbpを超えるような長いベクターの構築でも組み換え効率が落ちないので，レポーターベクターの構築が容易になる．このメリットを生かして，ゲノム領域のエントリーベクター（図2B）のスプライシング制御領域（シス・エレメント）に変異を入れたベクターを次々に作製するような用途に非常に有用であった．またタグを変えたい，プロモーターを変えたい，蛍光タンパク質を変えたいというニーズにも，対応するエントリークローンを準備すれば対応可能である．

2．スプライスバリアントの生成を定量的にモニターできること

初期のベクターはスプライスバリアントごとに1色の蛍光タンパク質と対応させて設計し，観察したいスプライスバリアントごとに違う色でベクターを個別に作製して，それらを



■図2　スプライシング・レポーターシステムの説明

A：スプライシング・レポーターシステムには，選択的エクソン（この例ではエクソン8，エクソン9）とその上流（5'）および下流（3'）の恒常的エクソン（エクソン7，エクソン10）のゲノム領域を含むことで，選択的エクソンの調節に関与すると考えられる制御配列（シス・エレメント）をすべて含むように設計する．

B：使用するゲノム領域は，忠実性の高いPCRを用いて単離しBP反応によりエントリーベクター化する．エントリーベクターに単離したゲノム領域はシークエンスにより全領域確認し，PCRによる想定外の変異が入っていないことを確認している（特にエクソン部分，スプライシング認識部位=splice site，シス・エレメント）．ゲノム領域のシークエンスはシス・エレメントの解析のために変異を導入した後にも行っている．

C：使用するcDNAをエントリーベクター化するほか，用途によりプロモーターや蛍光タンパク質の種類を変えたい場合も，それらのエントリーベクターを作製して利用することが可能．

D：ベクター作製のバックボーンとなるデスティネーションベクター．細胞に入れて安定発現株を作る場合などは，デスティネーションベクターに選択マーカーを挿入したりJump-in system（Invitrogen）を利用したデスティネーションベクターを作る．

E，F：LR反応により作られる完成型のスプライシング・レポーターベクターとそこからスプライシング制御で作り出されるスプライスアイソフォーム．

組み合わせて細胞や臓器に入れて光らせていたが，導入時のコピー数の違いなどから微妙なスプライシングの違いを異なる色の蛍光強度で定量的に反映させるのに問題があった．蛍光タンパク質をコードする遺伝子配列は，翻訳のフレーム（リーディングフレーム）を1つずらしたものでも終止コドンを生じることなく別のタンパク質をコードできるということを利用して，2つの蛍光タンパク質のcDNAをリーディングフレームを1つずらしてタンデムに配列して，さらに単離したゲノム内の選択的エクソンの片方にもフレームシフトを入れることで，異なる蛍光タンパク質がそれぞれの選択的エクソンが選択されたときのみ光るような設計として，1つのスプライシング・ベクターからスプライシング制御に応じて2色の蛍光タンパク質が産生されるようにした（図2E，F，赤字と黒字の数字はアミノ酸フレームの情報）．

また，選択的スプライシング制御で産生される可能性のあるdouble inclusionやdouble skip[注1]というスプライスアイソフォームは，内在性の遺伝子ではフレームシフトにより生じるmRNA終止コドン〔またはPTC（premature termination codon）stopシグナルとも呼ばれる〕によりタンパク質ができないばかりでなく，NMD（nonsense-mediated mRNA decay）

というメカニズムによりmRNAごと壊されてしまう．スプライシング制御メカニズムの解明のために，内在性の遺伝子由来のmRNAでは本来分解されて定量できないこれらのスプライスアイソフォームが制御の過程でいったいどれくらい作られているのかを定量することは大きなアドバンテージになる．そこでスプライシング・レポーターではNMDを回避するような改変を行い，これによりdouble inclusionやdouble skipの定量が可能となるようにした（図2G）．改変は制御領域に変異を入れてしまう可能性があるので，その構造が過去に報告されている制御配列を含んでいないかデータベースにより調べることと，改変のための点突然変異を入れる前後でレポーターのスプライシング制御状態が変化していないかの確認が必要である．

蛍光タンパク質の組み合わせとして，筆者らは前にmRFP後ろにEGFPというタンデム構造を最終的に選んだが（図2E），mRFPの別フレームのタンパク質が核移行シグナル様の挙動を示すため，赤の蛍光シグナルが細胞質全体，緑の蛍光シグナルが核に局在し，特に緑の変化が鋭敏に補足されるため，捉えたいスプライシング制御のタイプによりどのエクソンをどちらにつなぐか使い分けている．

3．データ解析のために十分明るいこと

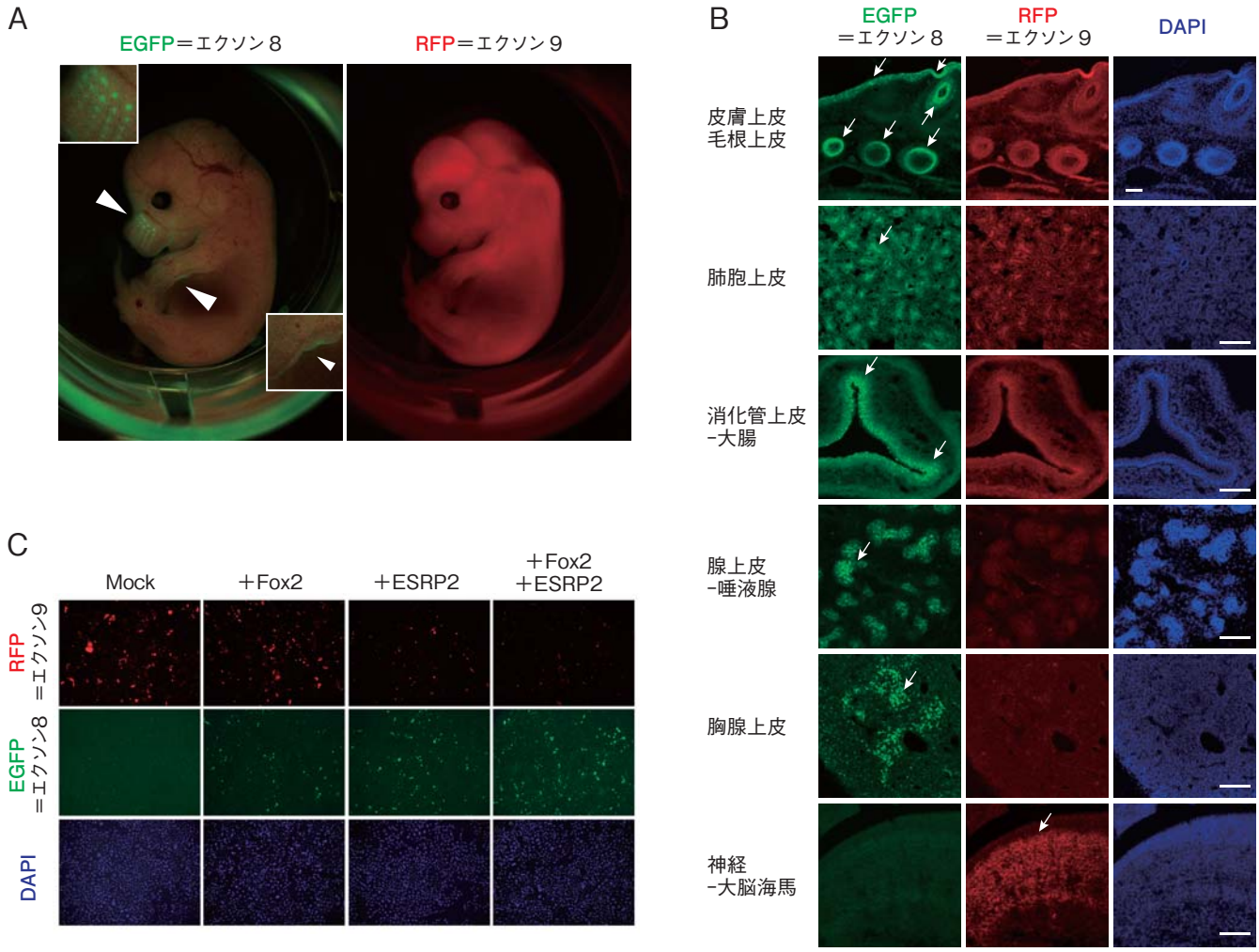
初期のレポーターでは，RT-PCRによる確認でスプライシング制御自体は内在性の遺伝子の制御を反映しているのだが，蛍光強度がなかなか満足いくレベルにならなかった．十分に明るくなければイメージングにもスクニーリングにも使えず，このことは筆者を長期にわたって悩ませた．原因は，①レポーターに使用するエクソン由来のペプチド部分の配列が蛍光タンパク質と融合タンパク質を作るが，この部分が高度に疎水性の場合など，細胞の中でアグリゲーションを起こしてしまったり分解されてしまう場合，②使用したゲノム領域の配列に潜在的なスプライシング認識部位（cryptic site）が含まれるため，予想外の部分でスプライシングする産物ができ，本来見たいスプライスアイソフォーム以外がドミナントに産生されてしまう場合，③使用したゲノム領域にkozak-ATGに近い配列があり，そこから翻訳開始されてしまい，最終的に蛍光タンパク質が減少すると考えられる場合，④導入したレポーター由来のmRNAに内在性のスプライシング制御因子（RNA結合タンパク質）が結合することで奪われてしまい（制御因子のstealing現象），細胞本来のスプライシング制御に異常を来してしまう場合，⑤原因を同定できない場合（さんざん調べてもよくわからん……）：作られたタンパク質が不安定などの理由で壊されていてうまく補足できないため原因を特定できない場合，などがある．

これらに対処するために，作製したスプライシング・レポーターはRT-PCRとタグや蛍光タンパク質に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングを行い，予想外のスプライシング産物やタンパク質が観察されたときは，ゲノム領域の改変（制御に関係のないと思われる部分への変異の導入）で対処した．さらに，第一エクソンを長いものにし，経験的に細胞内で安定に存在すると考えられているタンパク質との融合タンパク質を作らせるとよいということを示唆する論文がいくつかあり，筆者らはGST（glutathione-S-transferase）のcDNAを一部改変したものをタグ兼レポーター内の翻訳開始部分として用い，最終的に満足のいく蛍光強度を得た（図3）．

蛍光タンパク質を利用する場合，基質を必要とすることなく，かつ生きた細胞や個体（透過性のある早期の胎児や臓器のスライスなど）でその状態や変化を観察でき，スプライシング制御の変化が蛍光強度の変化として比較的linearityを持つというメリットがある．さらシグナル強度を上げたい場合，蛍光物質の代わりにルシフェラーゼのような酵素を用いたり，テトラサイクリン制御因子を用いてさらに別の遺伝子を発現誘導することでスプライシング変化を補足するなどの方法でスプライシング変化を増強することが技術的には可能である．

筆者がこのスプライシング・レポーターシステムを完成させてから，ラボ内でこのシステムを用いていくつかの遺伝子の選択的スプライシング制御のモデルが作製された．そのほとんどは内在性の遺伝子の制御を反映しており，このシステムが有用であることを確信したが，例外的に内在性の遺伝子のスプライシングのパターンをあまり反映しないものが存在した．近年，スプライシング制御にゲノムのクロマチン構造が影響しているとの報告が散見されるようになり[2]，このようなクロマチン制御がスプライシングに強く影響するものに関しては，一過性のレポーターの導入ではなく，Jump-in

注1　double inclusion，double skip：選択的スプライシング制御において，本来は2つのうちの1つのエクソンしか選ばれないような制御の過程で，mRNAに2つのエクソンが含まれたり（double inclusion），または2つとも含まれない（double skip）スプライス・バリアントのことを言う．1つのエクソンのみが選ばれたときだけ正常なタンパク質が作られるような場合は，double inclusion, double skipのmRNAでは途中に終止コドンが生じるために正常なタンパク質が作られず，このためにこのmRNAは分解されることが多い．



■図３　スプライシング・レポーターの実際の応用例

A：FGFR2（fibroblast growth factor receptor 2）の相互排他的スプライシング制御をモニターするレポーターマウスの胎児．毛根や皮膚での上皮特異的なエクソン（エクソン8）の発現を反映し，Whisker Pattern（EGFP内左上図）や四肢の皮膚のエッジ部分（EGFP内右下図）にEGFPシグナルが見られる．神経系などに間葉系特異的なエクソン（エクソン9）の発現としてmRFPのシグナルが見られる．

B：Aのマウスの組織切片．全身のあらゆる臓器の上皮細胞に，特異的にEGFPシグナルが観察される．スケールバーは100 μm．

C：同スプライシング・レポーターを細胞にトランスフェクションし，そこにスプライシング制御因子（RNA結合タンパク質）のcDNAを強制発現したもの．RbFox2，ESRP2という2つのRNA結合タンパク質により，スプライシングのパターンが完全に切り替わっていることがわかる．

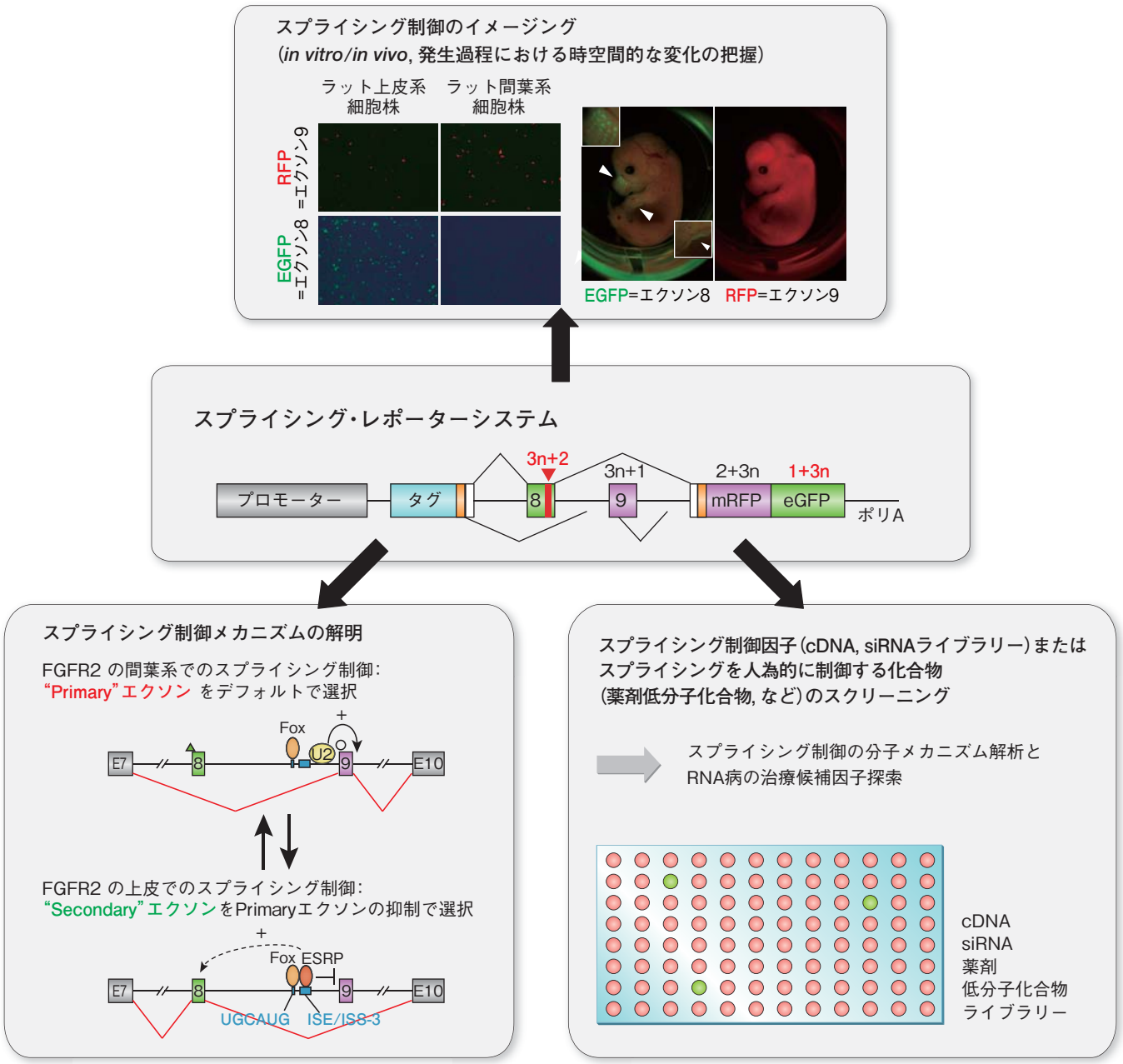
Takeuchi A, et al: PLoS One（2010）5: e10946 より改変．

system（Invitrogen）などを用いて染色体にレポーターを組み込むことが必要である．

Ⅲ．選択的スプライシングのレポーターシステムは何に使えるの？

選択的スプライシングを可視化するレポーターシステムは，一過性に細胞に発現させるだけでなく安定発現株の作製やトランスジェニックマウスからの初代培養細胞の採取・利用も可能である．これらを用いて，選択的スプライシング変化のダイナミズムを，単一細胞レベルの解像度で継時的にリアルタイムにイメージングすることが可能で，これまでに知られていなかったスプライシング制御の変化などを知ることができる．

内在性の遺伝子のスプライシング制御を忠実に反映することを利用して，比較的簡単に調節領域に変異を入れることが可能なため，スプライシング制御に重要なシス・エレメントの解析および，制御のメカニズムを調べることが可能である．筆者たちはこのレポーターシステムの第一例として，FGFR2



■図4　スプライシング・レポーターシステムの用途

スプライシング・レポーターシステムを用いることで，スプライシング制御のイメージング，シス・エレメントの同定および制御因子のスクリーニングによる制御メカニズムの解明，スプライシング制御が切り替わることを指標にして制御因子や創薬スクリーニングなどが可能となる．

(fibroblast growth factor receptor-2)の選択的エクソン領域を用いてスプライシング・レポーターを作製した[3]．FGFR2は発生過程で上皮系ではエクソン8を，間葉系ではエクソン9を使用するスプライスアイソフォームを特異的に発現する．このレポーターを導入した細胞株およびトランスジェニックマウスでは，内在性のFGFR2のスプライシング制御を反映した蛍光パターンが観察され，特にマウス個体において選択的エクソンの制御がこのように忠実に反映された例は現時点で世界で初めてであると思われる(図3A，B)．筆者らは，これまでそれぞれの選択的エクソンを個別に正または負に制御する多因子の総和で選択的スプライシング制御がなされていると考えられていたFGFR2のスプライシング制御

において，じつはスプライス部位の配列特異性と組織特異的RNA結合タンパク質により，あたかもスイッチを切り替えるように選択するエクソンが変わる制御メカニズムを見いだすことができた（図3C）[3]．

さらに，このレポーターシステムとアレイスキャンを組み合わせcDNA，siRNA，化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングを行うことで，解析したい遺伝子のスプライシング制御因子の探索[4]，遺伝的な変異などからスプライシングが異常になることで起こる神経・筋変性疾患などの標的因子の探索，異常なスプライシングを是正する化合物などの探索[5]が可能である．染色体や遺伝子の変異に起因するスプライシング異常により発症する先天性疾患などに対しては，原因となる遺伝子異常を是正することは現在の医学ではまだハードルが高い．しかしながら，医学・薬学が発展させてきた創薬技術をもとに，スプライシング・レポーター系を用いてスプライシング異常を是正する治療薬候補物質を見つけることができれば十分治療として成立する．

mRNAの制御，特に個体の発生プロセスでの役割はまだ大きな謎に包まれていると考えている．このようなツールを駆使して，その謎を解き明かし，さらにRNA病の疾患治療などにも応用したいと考えている．

PROFILE **武内章英**

■ 京都大学大学院医学研究科 形態形成機構学教室 助教
■ E-mail：takeuchi.akihide.8r@kyoto-u.ac.jp
■ 趣味：読書，剣道（5段），Mac，ドライビング（NC2-RS 6MT）

1995年名古屋大学医学部卒業，脳神経外科医師を経て1999年名古屋大学大学院医学研究科博士課程修了（医学博士）．国立長寿医療研究センターリサーチレジデントおよび研究員（磯部研一部長），The Salk Institute, Research Associate（La Jolla, CA, USA, Prof. Dennis O'Leary），東京医科歯科大学難治疾患研究所助手-助教（萩原正敏教授），2010年より現職．転写制御による発生プロセスの解明が主流の神経発生研究のフィールドで，mRNA制御が何を担っているのか見極めようと挑戦中．

PROFILE **萩原正敏**

■ 京都大学大学院医学研究科 形態形成機構学教室 教授
■ E-mail：hagiwara.masatoshi.8c@kyoto-u.ac.jp

1984年三重大学医学部卒業．Salk研究所ポスドク，名古屋大学医学部助教授，東京医科歯科大学難治疾患研究所教授などを経て，2010年より現職．RNAプロセシング過程を標的とした創薬により，不治の病を1つでも多く治したい．

文献

1) Kuroyanagi H, et al: Nat Methods (2006) 3: 909-915
2) Luco RF, et al: Cell (2011) 144: 16-26
3) Takeuchi A, et al: PLoS One (2010) 5: e10946
4) Nojima T, et al: Nucleic Acids Res (2009) 37: 6515-6527
5) Nishida A, et al: Nat Commun (2011) 2: 308

for beginners

・「Molecular Biology of THE CELL, 5th Edition」Bruce Alberts, et al: Garland Science (2008)