

メダカ apoptosis-inducing factor like 遺伝子 (*AIFL*) mRNA スプライシング変異体の $\gamma$ 線照射による発現変化

キーワード: *AIFL*、スプライシング、 $\gamma$ 線、アポトーシス、Rieske ドメイン 2007年3月修了

先端生命科学専攻動物生殖システム分野 学生証番号 56543 古山 勲 指導教官 三谷 啓志 教授

### 【序論】

高等真核生物において、mRNA スプライシングは遺伝情報の発現に必須な過程である。このうちの選択的スプライシングにより、真核生物は1つの遺伝子から複数のタンパク質を合成し、遺伝子発現を時間・空間的に制御することができる。さらに、mRNA スプライシング異常は重篤な疾患にもつながることが報告されている。本研究では、メダカにおいてアポトーシス関連遺伝子 *AIFL* mRNA に少なくとも十数種類のスプライシング変異体(以下SV)が存在することを発見した。*AIFL* のスプライシング研究はアポトーシス経路の詳細な理解だけでなく、スプライシングの観点からみた疾患の原因解明の一助となる。そこで、メダカ *AIFL* スプライシング変異体のうち $\gamma$ 線照射により存在量の変化がみられるSVを同定し、さらに突然変異メダカ系統を活用し、 $\gamma$ 線照射応答におけるp53の*AIFL* mRNA スプライシングとの関連について検討した。

### 【結果と考察】

#### メダカ *AIFL* スプライシング変異体の多様性

メダカ *AIFL* mRNA のSVを同定するため、TAクローニングによりCAB系統およびRIC1系統のメダカ胚(発生段階25)由来*AIFL*のクローンをCAB系統およびRIC1系統からそれぞれ88個、105個ずつ得、挿入配列をシーケンスした。その結果、CAB系統とRIC1系統合わせて少なくとも十数種類のSVの存在が明らかとなった。

#### TAクローニングによる $\gamma$ 線照射した胚および細胞由来 *AIFL* スプライシング変異体の存在比率の変化

TAクローニングにより、増殖期において10 Gyの $\gamma$ 線を照射後8時間経過させたCAB細胞および発生段階25において同様な処理をしたCAB系統の胚由来*AIFL*のSVのクローンをそれぞれ計61個、121個ずつ得た。また、コントロールとして、 $\gamma$ 線を照射せずに8時間経過

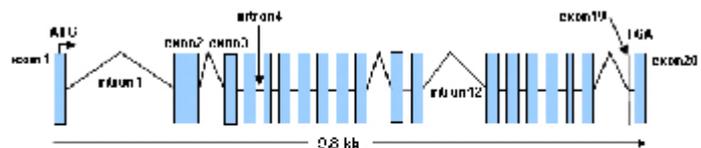


図1.メダカ*AIFL*のゲノム構造。区中の矢印はボックス。ボックス間の矢印はイントロン。A1G1は起始コドン、G591は終止コドンを示す。開始コドンの位置はエクスオン1に、終止コドンの位置はイントロン19に示されている。

させた細胞および胚由来*AIFL*のSVのクローンをを用いた。全クローンの挿入配列のシーケンス解析から、胚では非照射および照射群ともに exon19 (エキソンの位置は図1参照)を有するSVが確認できたのに対し、細胞においては非照射および照射群のいずれにおいてもその存在が確認されないという結果が得られた。また、細胞では $\gamma$ 線照射により intron4 (イントロンの位置は図1参照)が保持されたSVの存在比率が顕著に減少することも判明した。

#### exon19を有するSVの存在量の変化

exon19を有するSV特異的プライマー対およびexon19がスキップされたSV特異的プライマー対を用いて、10 Gyの $\gamma$ 線を照射したCAB細胞および胚由来全RNAを鋳型としてRT-PCRを行ったところ、 $\gamma$ 線照射の有無に関わらず、exon19を有するSVは胚では発現するが細胞では発現しないという結果が得られ、TAクローニングによる実験結果を反映するものとなった。さらに、CAB系統の組織由来全RNAを鋳型として同様にRT-PCRを行ったところ、exon19を有するSVの存在量は組織ごとに異なることが示唆された(図2)。また、*in silico*による解析から exon19はmRNAの活性あるいは安定性などに寄与している可能性も示唆された。

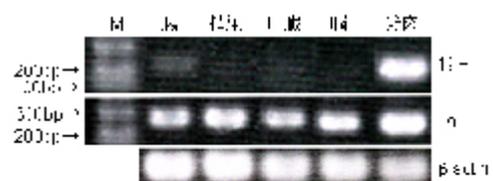


図2. exon19を有するスプライシング変異体の組織別における存在量変化。胚由来全RNA(胚)と細胞由来全RNA(細胞)を鋳型としてRT-PCRを行ったところ、exon19を有するSV特異的プライマー対を用いて、胚では発現するが細胞では発現しないという結果が得られた。また、細胞では $\gamma$ 線照射により intron4が保持されたSVの存在比率が顕著に減少することも判明した。

### intron4 が保持された SV の $\gamma$ 線照射による存在量変化

intron4 が保持された SV 特異的プライマー対および intron4 を有しない SV 特異的プライマー対を用いて、10Gy の $\gamma$ 線を照射した CAB 細胞および胚由来全 RNA を鋳型として RT-PCR を行った結果、 $\gamma$ 線照射により intron4 が保持された SV の存在量は細胞および胚のいずれにおいても減少することが判明した。10 Gy の $\gamma$ 線を照射後 4 時間経過させた CAB 系統の組織由来全 RNA を鋳型として同様に RT-PCR を行ったところ、intron4 が保持された SV の存在量は組織ごとに異なり、さらにその $\gamma$ 線照射による変化についても組織特異的であることが明らかとなった（図 3）。また、この SV から翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列は exon19 を有する SV に比べて 433 残基短いアミノ酸配列であることが予想された。

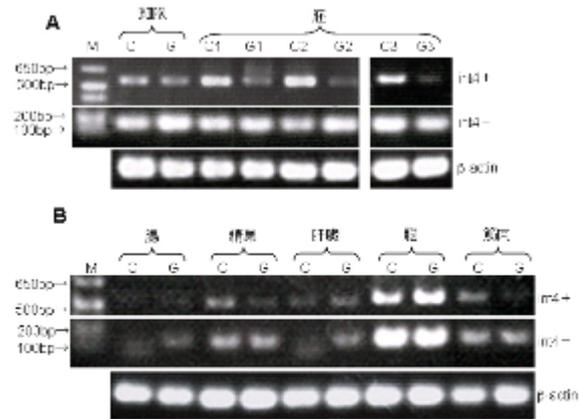


図3. intron4 が保持されたスプライシング変異体の存在量変化。  
A. intron4 が保持された SV 特異的に増殖するプライマー対 (m4+) と exon19 を有しない SV 特異的に増殖するプライマー対 (m4-) を用いて、10 Gy の $\gamma$ 線を照射した CAB 細胞由来の胚由来全 RNA を鋳型として RT-PCR を行った。  
B. 10 Gy の $\gamma$ 線を照射した CAB 系統の組織由来全 RNA を鋳型として RT-PCR を行った。図中の C1-G3 は胚由来全 RNA を用いて RT-PCR を行った。M は 1 kb plus ladder marker であり、数字は各プライマー対の位置とサイズを示す。 $\beta$ -actin コードする遺伝子を RT-PCR の内部標準として用いた。

### 突然変異系統メダカにおける intron 4 が保持された SV の $\gamma$ 線照射による存在量変化

発生段階 33 において 10 Gy の $\gamma$ 線を照射後 4 時間経過させた RIC1 系統および p53 欠損系統のメダカ胚由来全 RNA を鋳型とした RT-PCR 解析により intron4 が保持された SV の $\gamma$ 線照射による存在量変化を調べたところ、RIC1 系統では $\gamma$ 線照射により intron 4 が保持された SV の存在量が顕著に減少したのに対し、p53 欠損系統においてはその存在量に顕著な減少がみられなかった。この結果から、p53 の AIFL mRNA スプライシングへの関与の可能性が示唆された。

p53 の異常は癌の主要な原因であることを踏まえると、p53 欠損系統における AIFL の $\gamma$ 線照射による選択的スプライシングの変化は癌と密接な関係を有すると考えることができ、本研究の結果からも序論で述べたスプライシングと疾患との密接な関係性が強く支持された。

#### 【まとめ】

本研究により、メダカ AIFL においてヒトでは未確認の SV が少なくとも十数種類存在することが明らかとなった。このうち、exon19 を有する SV の存在量には組織特異性があることが明らかとなり、*in silico* による解析から exon19 は mRNA の活性あるいは安定性などに寄与している可能性が示唆された。また、intron 4 が保持された SV は $\gamma$ 線照射によりメダカ胚全体における存在量が顕著に減少し、その変化には組織特異性があることが示された。さらには、intron4 の選択的スプライシングは p53 と密接な関係を有することが明らかとなった。

今後、本研究により検出されたすべての SV に対して、 $\gamma$ 線を照射した胚、組織および突然変異系統を用いた SV 存在量変化の解析を行うことにより、アポトーシス経路の詳細な理解だけでなく、癌などの疾患と mRNA スプライシングの関係性がより詳細に理解されるものと期待できる。

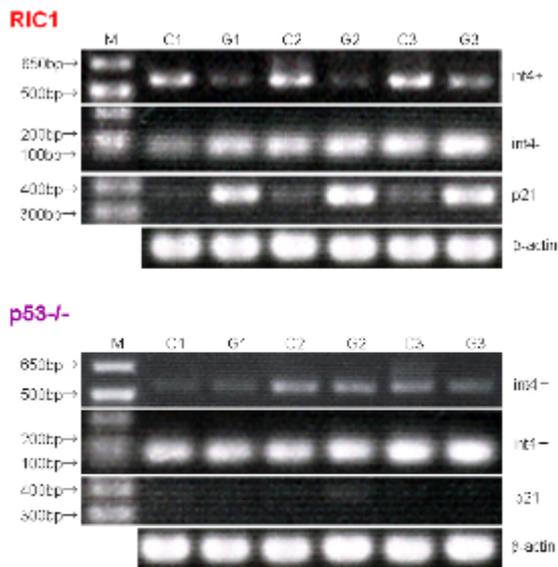


図4. 突然変異系統メダカ胚における intron4 が保持されたスプライシング変異体の存在量変化。  
10 Gy の $\gamma$ 線を照射した RIC1 系統胚および p53 欠損系統 (p53<sup>-/-</sup>) のメダカ胚由来全 RNA を鋳型として、プライマー対 m4+ および m4- を用いて RT-PCR を行った。また、非照射の胚由来全 RNA をコントロールとして同様に RT-PCR を行った。さらに、 $\gamma$ 線照射による発現が顕著に増加している p21 遺伝子特異的プライマー対 (p21) を用いて同様の RT-PCR を行った。図中の C1-G3 は照射制御、番号は用いたプライマー対の位置とサイズを示す。M は 1 kb plus ladder marker. 数字は各プライマー対の位置とサイズを示す。 $\beta$ -actin コードする遺伝子を RT-PCR の内部標準として用いた。