

最近のトピックス

新たな骨形成不全症モデルマウスに見られた選択的スプライシング -*Seal* における GT-AG ルールの例外 - A novel mutation generated a rare splice site in Osteogenesis imperfecta model mice - an exception to the GT-AG rule in *Seal*-

新潟大学超域研究機構

多部田康一, 高橋直紀, 前川知樹, 山崎和久

Center for Transdisciplinary Research, Niigata University

Koichi Tabeta, Naoki Takahashi, Tomoki Maekawa,

Kazuhisa Yamazaki

【*Seal*: 新しい骨形成不全症モデルマウス】

現在, 私たちは骨形成不全症モデルマウスにおける疾患発症メカニズムについての解析を行っている。このマウスはENU (N-ethyl-nitrosourea) というアルキル化剤の一種を投与することによりゲノム遺伝子上にランダムに点突然変異 (ポイントミューテーション) を導入したマウスの子孫において発見された¹。体を掴まれた直後にアザラシ (*Seal*) が陸をどのように歩くフェノタイプ (表現系) から *Seal* マウスと命名された。当初はヒトに掴まれた恐怖のあまり? 神経症状により後ろ足に麻痺がでるものかと考えられていたが, その後詳細に検討すると, 体幹をつかむと逃げようともがくことにより自分自身の力で脊椎を骨折しているらしく, 麻痺は脊椎の損傷によるものであることがわかった。約 2000 頭の *Seal* マウスの交配と遺伝子マッピングによる実験結果から, 第 11 染色体の Type I コラーゲンの遺伝子付近に発生した遺伝子変異によりこのフェノタイプが発生していることが予測された。従ってこのマウスはヒト骨形成不全症 (OI: Osteogenesis Imperfecta) の新たな疾患モデルマウスであると考えられた。

ヒトにおける OI は遺伝性疾患であり約 2 万人に 1 人の割合で発症する。最も高頻度なケースは Type I コラーゲンの遺伝子変異が原因であり, その変異の位置により産生される Type I コラーゲンたんぱく質がどのように

変異による影響を受けるかで症状の強さが異なる。症状としては, 脆弱な骨形成による易骨折性, 骨の変形を主とし, 青色強膜, 難聴, 成長障害, 歯科と関連して象牙質形成不全が認められる。幼児期より骨折を繰り返すため特に成長期の小児に大きな負担となり, のちに障害を残すこともある。小児慢性特定疾患に指定される疾患であり, 多様な症状に対して治療法は十分に確立されていない。疾患の解析, 治療法の開発などに有用なツールとして, これまでいくつかの疾患動物モデルとなる Type I コラーゲンのミュータントマウスが作られてきたが, コラーゲン分子の生体における重要性がゆえに, 胎生致死もしくは誕生後すぐに死亡してしまうため, 疾患モデルとして利用できるものは限られている。*Seal* マウスはミューテーションによる影響が非常に小さく, ミューテーションがホモ接合子となった場合のみ易骨折性を示す劣性遺伝形質である。骨折させない限りは正常に生育する。ヒト OI のモデルとして極めて貴重なモデルマウスであると考えられる。

【Type I コラーゲン遺伝子に変異がない?】

マウス Type I コラーゲン ($\alpha 1$ 鎖) は約 4000bp (塩基) にコードされる大きな遺伝子である。約 40 のエクソンより構成され, ゲノム上 15000bp の範囲にわたってコードされている。真核細胞の遺伝子は pre-mRNA 転写後の選択的スプライシングにより mRNA が形成され, さらにアミノ酸に翻訳されることにより機能する。*Seal* マウスの明らかなフェノタイプから, この Type I コラーゲン遺伝子の mRNA 配列上に遺伝子の変異があるものと予測されたため, この点について検索した。しかし実際には mRNA 上には変異は存在しなかった。結果として変異はイントロン上の 5' 末端にある選択的スプライシングにおけるイントロン認識部位に存在していた。ところが信じられないことにスプライシング産物は正常であり, 正常なたんぱく質が翻訳されていることも解った。常識的には考えられないことである。

選択的スプライシングは真核細胞の遺伝子発現における中心的なメカニズムであり, これにより一般には直接的にアミノ酸をコードするエクソンの間に複数介在するたんぱく質としての情報をもたないイントロンの除去が行われる。ヒトの遺伝子のうち約 70% の遺伝子はこの選択的スプライシングを受ける。長さの異なるスプライシング産物であるスプライシングアイソフォームが転写されることから, 高等動物においてコードされるたんぱ

く質の機能により多様性を与える仕組みの一つであると考られている。この切り取られるイントロンの5'末端と3'末端はGTとAGの塩基対でコードされている。教科書的には選択的スプライシングにおけるGT-AGルールとして知られている。また、わずかであるがその他の例外的なスプライシングのメカニズムが存在することも知られている。

選択的スプライシングはUracil rich small nuclear RNA (U-snRNA) とそれに結合する Small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) の複合体で形成されるスプライソゾームによって2つのステップにより行われる。①イントロンの5' splice site (SS) の塩基配列GTと3' SSのAGさらにその間に位置するBranch pointのA(アデノシン)を認識する。②投げ縄構造にイントロンを切り捨てる。この過程においてU2 snRNP-dependentのスプライシング(図1a)が大部分をしめるが、ごくわずかにU12 snRNP-dependentにスプライシングを受けるイントロン(約0.3%)の存在も知られている²(図1b)。ヒトのゲノムシーケンスがほぼ解読され、このU12 TypeのなかにはGT-AG以外のスプライシングによるものが約30%存在すると最近報告された。全スプライシングの約99.7%を占めるU2タイプではその99%以上が通常にGT-AGによりスプライシングを受けるため、GT-AG以外でのスプライシングは本当にレアなものである³。

実際GT-AG以外のスプライシングが行われる遺伝子はクラスターを形成してゲノム上にコードされていることが報告される。つまりスプライシングのメカニズムとして安定したシステムが進化の中で淘汰に耐えて残ってきたものであると考えられる。このSSに塩基の置換が起きれば、正常なスプライシングが阻害されることでエクソンのskipping等を生じ、正常たんぱく質として機能しなくなるためにSSに生じた一塩基の変異の個体生存へのリスクは非常に大きい。ヒトの遺伝疾患の約15%がスプライシング異常によるものであるとされている。

【Seal マウスが貴重な理由】

これまでSealマウスに認められる5'SSミューテーションのタイプで正常なスプライシングが起きる例は知られていない。しかし昨年U1-snRNP非依存性(イントロンの5'SSを認識するsnRNPに依存しない)スプライシングが細胞レベルでも起きることが報告された⁴。現在のところ生体レベルでこの現象が起きていることは報告されていないが、私たちがSealマウスに見ている現象はU1-snRNP非依存性経路と同一または類似した新たなスプライシングメカニズムが生体において機能することを示す。

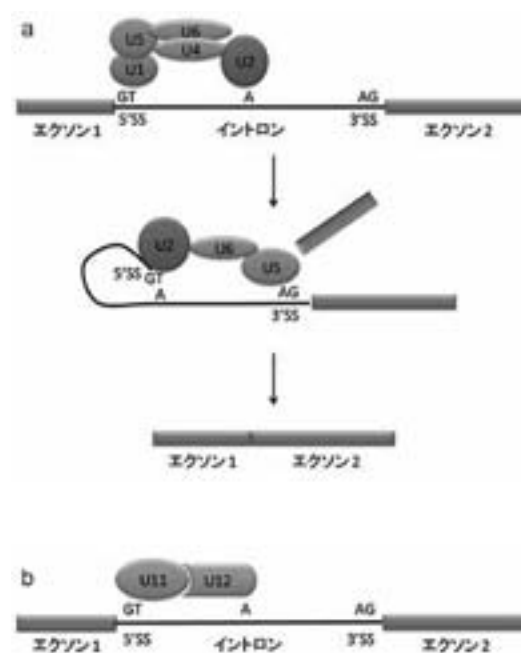


図1. 選択的スプライシング

A: U2 snRNP-dependent スプライシング, B: U12 snRNP-dependent スプライシング

Sealマウスは骨の組織学的所見において非常に薄い皮質骨と骨梁を有し、電顕レベルにおいても明らかに希薄なコラーゲン線維束が観察される(図2, 図3)。遺伝子の発現レベルはわずかに減少しているのみだが、Type Iコラーゲン量が恒常的に減少することが脆弱な骨のフェノタイプを生じさせていると考えられる。ヒトOIにおいても同様にType Iコラーゲンの低産生が原因となっているタイプが多い。そのような点でこのSealマウスはOIの治療法の開発などに非常に貴重なモデルとな

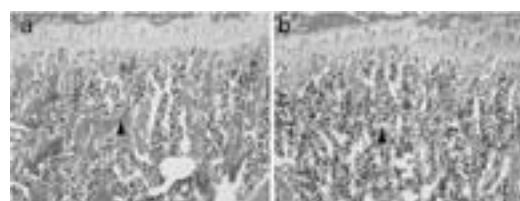


図2. 脛骨骨端軟骨部のH-E染色像(a: Wild-type, b: Seal) SealにおいてWild-typeに比べて著しく骨梁構造(矢頭)が減少している。



図3. 電顕像(x5000), (a: Wild-type, b: Sealマウス) SealにおいてWild-typeに比べて疎なコラーゲン線維の走行を認める。

りうると考えられる。現在さらなる解析を進めている。

(共同研究者)

The Scripps Research Institute

Bruce Beutler

北海道大学大学院歯学研究科

網塚 憲生 教授

(前 新潟大学超域研究機構 教授)

【参考文献】

- 1) Beutler B, Hoebe K, Georgel P, Tabeta K, Du X:
Genetic analysis of innate immunity. *Tir adapter*

proteins in innate and adaptive immune responses. *Microbes Infect*, 6:1374-1381, 2004.

- 2) Reed R: Mechanisms of fidelity in pre-mrna splicing. *Curr Opin Cell Biol*, 12:340-345, 2000.

- 3) Sheth N, Roca X, Hastings ML, Roeder T, Krainer AR, Sachidanandam R: Comprehensive splice-site analysis using comparative genomics. *Nucleic Acids Res*, 34:3955-3967, 2006.

- 4) Fukumura K, Taniguchi I, Sakamoto H, Ohno M, Inoue K: U1-independent pre-mrna splicing contributes to the regulation of alternative splicing. *Nucleic Acids Res*, 37:1907-1914, 2009.