

吉川大介 論文内容の要旨

主 論 文

Newly established in vitro system with fluorescent proteins shows that abnormal expression of downstream prion protein-like protein in mice is probably due to functional disconnection between splicing and 3' formation of prion protein pre-mRNA

(蛍光蛋白を利用した新規 in vitro システムによるプリオン蛋白 pre-mRNA のスプライシング異常解析)

吉川 大介、Juraj Kopacek、山口 尚宏、石橋 大輔、山中 仁木

山口 仁孝、片峰 茂、坂口 末廣

(GENE, in press, accepted 25 August 2006)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科

新興感染症病態制御学系専攻

(主任指導教員：片峰 茂)

<緒言>

PrP-like protein(PrPLP or Dpl)をコードする遺伝子はPrP遺伝子の下流に存在するが、これまでの検討によって、PrPノックアウトマウスではDplを脳内に異所性発現する系統があることが明らかとなった。この異所性発現によりマウスに神経変性が惹起される。Dpl発現は、プレメッセンジャーRNA(pre-mRNA)のスプライシング異常と3'末端転写終止異常に起因する遺伝子間スプライシングの結果と考えられている。本研究では、PrPとDpl遺伝子間スプライシングをenhanced green fluorescence protein (EGFP)の発現として可視化できるシステムを構築した。この実験系は、培養細胞にプラスミドDNAをトランスフェクションして一過性発現させる方法である。遺伝子間スプライシングの阻止に関与するPrPゲノム領域(ターゲット領域)に変異を加えなければEGFPは発現せず、その領域を欠損させるとEGFPは発現する。この実験系をもちいて、PrPゲノムのターゲット領域に様々な欠損や変異を加えることで、PrP-RNAのスプライシング及び転写終結に重要な領域を明らかにした。また、今回の実験系はpre-mRNAのプロセッシングをEGFPやDsRedで可視化して検討できるsystemを構築したといえる。

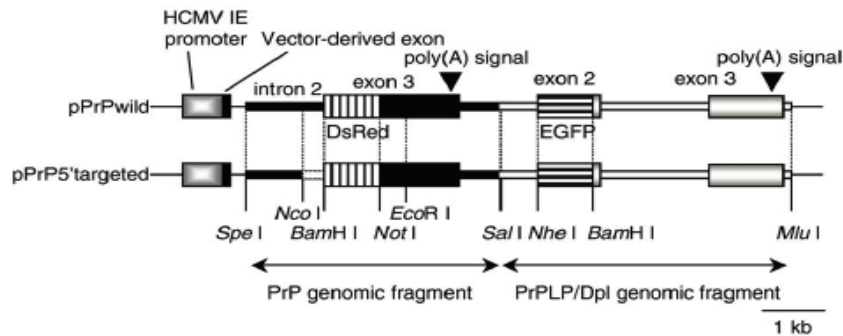
<対象と方法>

- 1) pDON-AI プラスミドベクターに *Prnp*(PrP 発現遺伝子ゲノム)の 5' UTR から ORF 領域、3' UTR まで含めた遺伝子約 3200bp を挿入し、その下流には *Prnd*(Dpl 発現遺伝子ゲノム)の 5' UTR から ORF 領域、3' UTR まで約 3500bp を連結させた。PrP-ORF は *Discosoma Red* (DsRed) に置き換え、Dpl-ORF は EGFP に置換した (pPrPwild)。

さらに、RFP を含むエクソン 3 に続くイントロン 2 の 3' 末端 (ターミナルイントロン) に

欠損領域もったプラスミドや変異を挿入したプラスミドを作製した (fig. 参照)。

(fig.)



2) Neuroblastoma 由来細胞株 N2a に作製したプラスミドをリポフェクション法で導入し、48 時間後に蛍光顕微鏡で EGFP と DsRed の発現を観察した。

3) さらに細胞より RNA を抽出し、3' RACE (3' Rapid amplification of cDNA ends) 法により RNA 3' 末端の構造を解析した。3' 側に 22bp のアダプター配列をもつオリゴ dT で RT を行った後、splicing donor よりも 5' 側の塩基配列 20bp の 5' primer とアダプタープライマー (3' primer) を用いて PCR を行い、得られた PCR 産物の DNA シーケンス解析を行った。

<結果>

pPrPwild を導入した N2a は DsRed を発現し、RT-PCR とそのシーケンス解析では PrP 自体のスプライシングアクセプターとポリ (A) シグナルが利用されていることが確認された。次に、Dpl を発現する PrP ノックアウトマウスの幾つかの系統に共通するターゲット領域 (約 250bp) を欠損させた構造を持つプラスミドを作製した (pPrP5' targeted)。このプラスミドをトランスフェクションした細胞では Dpl のスプライシングアクセプターとポリ (A) シグナルが利用された EGFP を発現した。同様の検討で EGFP を発現する領域の絞り込みを行ったところ、PrP ターミナルイントロン 26bp にスプライシングに重要な領域があることがわかった。さらに、この 26bp 内にあるブランディングポイントに変位を加えると 5' 側の代わりのポイントでブランディングがなされ RFP が発現した。スプライシングアクセプターに変位を加えると pPrP5' targeted と同様に EGFP が発現した。

<考察>

今回の検討では、Dpl を発現する PrP ノックアウトマウスはスプライシングに重要なターミナルイントロン領域を欠損させたために異常なスプライシングがおきたことが確認された。さらに重要なことは、蛍光を利用し pre-mRNA のスプライシング異常を検出する簡単なシステムを構築したことにある。この新しく構築した in vitro システムは pre-mRNA に関わる蛋白成分の機能的関連性を解明するために有効であると考えられ、さらにはスプライシング関連蛋白の異常が原因とされる疾患の解析に有用であると思われる。