

USP15 による mRNA スプライシング制御と特異性解析

森山 大気 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 千葉 智樹 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

ユビキチンシステムは、脳の恒常性を維持する上で必須の生体反応機構である。ユビキチンシステムは、プロテアソームを介した選択的タンパク質分解以外に、DNA 損傷修復、膜輸送、シグナル伝達など多彩な細胞内メカニズムを制御している。近年、基質タンパク質へユビキチンを付加するユビキチンリガーゼ以外に、ユビキチン化を除去する脱ユビキチン化酵素 (Deubiquitinating enzymes: DUBs) の働きに注目が集まっている。先行研究から、ヒトでは約 100 近くの DUBs の存在が報告されており、Ubiquitin specific protease (USP) ファミリーは最も大きなグループを形成する。その中の一つ、USP15 は様々な細胞内シグナル伝達の制御に関与することが報告されている。また USP15 の異常は、自閉症を始めとする様々な脳神経疾患発症との関連が示唆されている。しかしながら、神経系における USP15 の詳細な分子メカニズムは不明な点が数多く残されている。

本研究の先行研究で、USP15 遺伝子欠損 (USP15 KO) マウスが月齢依存的に小脳変性や筋萎縮を伴った運動障害様の表現型を呈すること、また個体差はあるものの行動異常の表現型を示すことを見出している。さらに、USP15 がスプライシング制御因子であるヌクレオチド転移酵素 TUT1 を脱ユビキチン化し、グローバルな RNA スプライシング制御に関与することも明らかにしている。これまでに本研究室では、Affymetrix GeneChip Exon Array を用いたスクリーニングで、USP15 KO 脳でスプライシング変動を起こす標的候補 mRNA を数多く同定しているが、これら mRNA のスプライシング変化が USP15 KO の表現型の原因となりうるのか、また USP15 によるスプライシングがどのように制御されているのか、詳細なメカニズムは未解明であった。

本研究では、Exon array のスクリーニングで高い Splicing index を示した標的遺伝子の一つ Sparcl1 に着目した。Sparcl1 はアストロサイトから分泌される細胞外タンパク質で、視床皮質における興奮性シナプス形成を制御することが報告されている。また病態との関連として、自閉症などの発達障害、多発性硬化症などの神経疾患に関与することが報告されている。本研究では、USP15 KO で得られた表現型に Sparcl1 の mRNA スプライシング変化が関係するか明らかにすることを目的に、Sparcl1 の mRNA スプライシング解析を行った。また USP15 KO による mRNA スプライシング制御に法則性がないか、*in silico* 解析を行い、USP15 によるスプライシング制御の分子基盤を検証した。

【材料・方法】

1. RT-PCR

野生型(WT)ならびに USP15 KO マウスの大脳から ISOGEN II (NIPPON GENE) を用いて total RNA を精製し、ReverTra Ace (TOYOBO) で逆転写して cDNA library を作成した。これを鋳型に KOD Plus DNA polymerase を用いて RT-PCR を行った。

2. *in silico* でのスプライシング解析

Affymetrix GeneChip mouse Exon Array の結果から、Splicing index に大きく差がある mRNA を同定し、変動のあるエクソン領域のプローブを NetAffx Analysis Center

(<https://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>) で解析し、どのエクソン領域に差があるか UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) を用いて特定した。

【結果考察】

Exon array の結果から、USP15 KO による Sparcl1 mRNA のスプライシング制御を起こす領域は最終エクソンであることが推測できた。Sparcl1 の C 末端領域は EF hand を持つことから、機能制御に重要な領域であることが考えられる。まず Sparcl1 mRNA の 3' UTR を含む最終エクソンのスプライシング調節に USP15 が関与するか、RT-PCR で確認した。その結果、WT と USP15 KO 脳由来の RNA に有意な差は認められなかった。しかしながらサンプル間の誤差も存在することから、実験条件を再検討する必要性が考えられた。

RT-PCR を用いた実験で、WT ならびに USP15 KO 間で明確な差が認められなかったことから、コンピューターを用いた *in silico* 解析を行い、USP15 によるスプライシング制御に法則性がないか検証した。Exon array で得られた結果のうち、splicing index の高い候補因子を選択し、どの領域のエクソンが変化しているか検証したところ、いくつかの mRNA では Sparcl1 と同様、最終エクソンが脱落していることを見出した。このことから、USP15 によるスプライシング制御は、「共通配列」ではなく「位置」が重要なのではないかと推測した。

【展望】

現段階までに、Sparcl1 mRNA の RT-PCR の結果は Exon array をサポートする内容に至っていない。実験条件をはじめとする様々な原因も考慮しつつ再度検証する。また、より詳細な情報を得るために qPCR を用いたスプライシング解析や RNA-Seq なども視野に入れて検証していく予定である。

また *in silico* 解析から、mRNA の最終エクソンに変化があるものが複数認められことから、解析するサンプル数を増やしてスプライシング変動の法則性を詳細に検証していく。今後、USP15 のスプライシング制御の分子メカニズムを解析すると同時に、Sparcl1 をはじめとする候補 mRNA のスプライシング変化が、USP15 KO 依存的な神経機能の異常に関与するのかが詳細に検証していく予定である。