

新規RNA スプライシング検出システム

Methods for quantification of RNA splicing

村山 洋

麻布大学生命・環境科学部食品生命科学科遺伝子科学研究室

Ohoshi Murayama

Lab. of Molecular Biology, Dept. of Food and Life Science School of Life and Environmental Science, Azabu University

Abstract: Alternative splicing that contributes to proteomic diversity is a mechanism by which multiple transcripts are generated from a transcript from single gene. This post-transcriptional processing may occur in over 70 % of human genes. Abnormal splicing is associated with some disease, such as Alzheimer's disease (AD) and FTDP-17. Microtubule associated protein tau (MAPT) is produced as six alternative splicing isoforms in brain. Abnormality in this splicing has been thought as a causative event through which AD and FTDP-17 might be developed and/or progressed. Hence a change in alternative splicing must be worth monitoring for diagnostics and therapy of the diseases. In this study, we tried to develop a method for visualizing alternative splicing of tau pre-mRNA. Using the splicing cassette vector, pGL3int1 and pGL3int1-MCS, we have developed, we constructed plasmids containing tau exon (exon 2, 3 or 10) and observed the alternative splicing of each exon in cultured cells such as COS7, SH-SY5Y or HEK293.

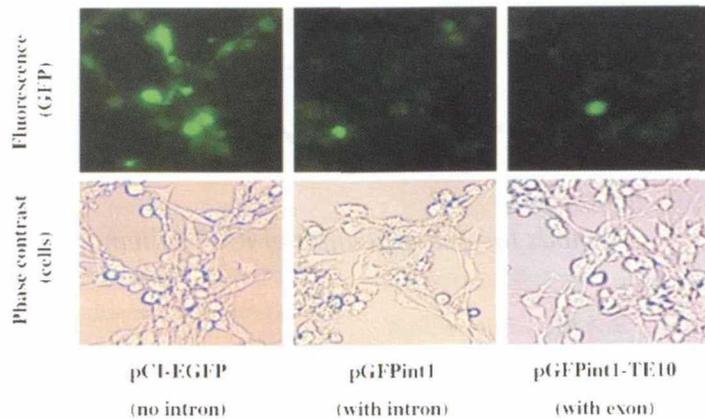
1. 目的：選択的スプライシングが、ヒトの全遺伝子の少なくとも70%以上で起こっていると予想されており、タンパク質の多様性に大きな役割を果たしている。また、ヒトの家族性疾患の中には、選択的スプライシングに異常を来す変異が原因となっているものもある。しかし、選択的スプライシング機構は必ずしも明らかとはいえない。本研究では、選択的スプライシングの検出技術として簡便でかつ汎用性の高い技術（スプライシングベクター：特願2007-38491）にさらに改良を加えるとともに、FTDP-17やアルツハイマー病の発症に深く関与する微小管結合タンパク質タウ遺伝子の選択的スプライシング調節機構解明を目的とした基礎的研究に応用することを目的とした。

2. 方法：スプライシングベクター（特願2007-38491）及びその改良ベクターを作成し、タウ・エクソン10

をスプライシングカセットとしてクローニング部位に挿入した。培養細胞（COS7, SH-SY5Y, HEK293）にベクターを導入し、蛍光タンパク質（GFP）および発光タンパク質（ルシフェラーゼ）をレポータータンパク質として、スプライシングの様子を顕微鏡による観察及び分光学的に測定した。

3. 結果と考察：タウ・エクソン2, および10についてスプライシングの様子を観察したところ、エクソン2を除いて、エクソン3および10のスプライシングを観察することができた。この結果は、ベクターを導入後に回収したRNAを用いたRT-PCRにおいても確認できた。エクソン2は全てスプライスアウトされたが、全長タウ mRNA におけるエクソン2および3の選択的スプライシングの特徴を反映するものとして興味深い。

4. 要約：遺伝子の働きを多様にする重要なステップ



スプライスアウトされたことを示す蛍光を観察

であるRNA スプライシングの様子を蛍光・発光タンパクを利用して可視化・定量化する技術を開発し改良を加えた。微小管結合タンパク質タウのエキソン(2, 3, 10)を持つスプライシングベクターを作製し、各エキシンの選択的スプライシングについて詳細な解析を進めている。

文 献

Ueno H., Murayama O., Maeda S., Sahara N., Park JM., Murayama M., Sanda A., Iwahashi K., Matsuda M., Takashima A.: Novel conformation-sensitive antibodies

specific to three- and four-repeat tau. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 358(2): 602-607, 2007.

Planel E., Miyasaka T., Launey T., Chui DH., Tanemura K., Sato S., Murayama O., Ishiguro K., Tatebayashi Y., Takashima A.: Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, 24(10): 2401-2411, 2004

Sergeant N, Delacourte A, Buée L.: Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta.*, 1739(2-3): 179-97, 2005