

氏名	よ も だ じゅん いち ろう 四方田 純一郎
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 3221 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 病 理 系 専 攻
学位論文題目	Combination of Clk family kinase and SRp75 modulates alternative splicing of Adenovirus E1A (Clk と SRp75 による mRNA の選択的スプライシング制御)
論文調査委員	(主 査) 教 授 野 田 亮 教 授 小 柳 義 夫 教 授 武 藤 誠

### 論 文 内 容 の 要 旨

高等真核生物において、遺伝子発現の多様性を獲得する手段のひとつとして、messenger RNA (mRNA) の成熟過程における選択的スプライシングがある。近年、選択的スプライシング異常に起因する疾患の報告も増え、その制御機構の解明が重要視されてきている。構成的スプライシングの必須因子である SR タンパク質群は、選択的スプライシングの制御においても重要な働きを担っている。SR タンパク質は哺乳類で 11 種類知られており、N 末端側に RNA 認識配列、C 末端側に Ser/Arg の反復に富む配列 (RS ドメイン) を持つ。SR タンパク質の機能に RS ドメインの Ser 残基のリン酸化が重要であることが示されているが、その制御機構については不明な点が多い。また、そのリン酸化酵素として、SRPK (SR protein kinase) ファミリー、Clk (Cdc2-like kinase) ファミリー、Prp4 (pre-messenger RNA processing mutant 4) など複数の酵素が報告されているが、それぞれのリン酸化酵素の役割は明らかになっていない。

今回、ヒト培養細胞を用いて、これらのリン酸化酵素がアデノウイルス E1A mRNA 前駆体の選択的スプライシングに与える影響を解析した。その結果、Clk ファミリー特異的に 5' スプライス部位の選択パターンに変化が見られた。このことから、Clk によって SR タンパク質がリン酸化を受け、その結果スプライス部位の選択が変化した可能性が考えられた。そこで、リン酸化 SR タンパク質を特異的に認識する抗体を用いて SR タンパク質のリン酸化状態の変化を調べた結果、SR タンパク質の一つである SRp75 のリン酸化が Clk により亢進されることが明らかになった。さらに、Clk 特異的阻害剤 (主要参考文献参照) を培地中へ添加すると、添加後数分で SRp75 は低リン酸化型に変換され始め、一時間後には高リン酸化型は消失することを見出した。またこのリン酸化の阻害により、SRp75 の局在が核質全体から核スペckルへ集積していく様子も観察できた。これらのことから、SR タンパク質群のうちの SRp75 が Clk による特異的なリン酸化の標的であり、Clk と未同定の脱リン酸化酵素によって SRp75 のリン酸化状態が細胞内でダイナミックに調節されていると考えられた。さらに、SRp75 は E1A mRNA 前駆体の 5' スプライス部位のうち上流から 2 番目の 5' スプライス部位の選択に働くこと、および、その活性は Clk によるリン酸化により促進されることも明らかとなった。

以上の結果から、SR タンパク質とリン酸化酵素の特異的な組み合わせが、選択的スプライシングにおけるスプライス部位選択に重要な役割を果たすことが強く示唆された。今後、それぞれの SR タンパク質とリン酸化酵素の組み合わせが、どのような遺伝子の選択的スプライシングに作用するのかを明らかにすることで、遺伝子発現制御の多様性についての理解が進むと考えられる。また、本研究で示したように、SR タンパク質リン酸化酵素の特異的阻害剤を用いた研究は、選択的スプライシングの分子機構の解明に加えて、スプライシング異常による病因の解明とその治療への応用にも発展できるのではないかと期待される。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

遺伝子発現の多様性を獲得する手段のひとつとして、mRNA の選択的スプライシングがある。構成的スプライシングの必

須因子である SR タンパク質群は、選択的スプライシングにおいても重要な働きを担っている。SR タンパク質は、N 末端側に RNA 認識配列、C 末端側に Ser/Arg の反復に富む配列 (RS ドメイン) を持つ。SR タンパク質の機能にとって Clk (Cdc2-like kinase) ファミリーなどによる RS ドメインの Ser 残基のリン酸化が重要であることが示されているが、その制御機構については不明な点が多い。

申請者らは、培養細胞を用いて、これらのリン酸化酵素がアデノウイルス E1A mRNA 前駆体の選択的スプライシングと、SR タンパク質のリン酸化状態に与える影響を解析した。その結果、Clk の過剰発現に伴い E1A のスプライス変化と、SRp75 のリン酸化亢進が観察された。Clk 特異的阻害剤を培地中へ添加すると、SRp75 の低リン酸化型への変換が認められた。これらのことから、SRp75 が Clk によるリン酸化の標的であることが示唆された。また、Clk によるリン酸化が SRp75 によるスプライス部位の選択を増強することも明らかとなった。このことから、SR タンパク質とリン酸化酵素の特異的な組み合わせが、スプライス部位選択に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

以上の研究は、生細胞における選択的スプライシングのリン酸化による制御機構の一端を明らかにしたものであり、スプライシング異常による疾患の病因解明やウイルス感染症治療に貢献する可能性が考えられる。

したがって本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 2 月 18 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。