

カルシウムシグナルによる選択的スプライシング制御機構の解明

増田 誠司

京都大学大学院生命科学研究科

概要 mRNA の選択的スプライシングは、ゲノムにコードされる遺伝子の数を遙かに超えた数のタンパク質を発現させるメカニズムであり、選択的スプライシングを受ける遺伝子の数(割合)は、生物の高等化や複雑化に伴って多くなる。このため選択的スプライシング機構の解明は、ヒト遺伝病の原因究明や治療法開発の鍵となる。しかしヒトにおける選択的スプライシングの分子機構は十分にわかっていない。加えて、Ca²⁺シグナルと mRNA 選択的スプライシングを結びつける知見はこれまでにはなかった。

mRNA スプライシングに関する研究過程で、CHERP が mRNA スプライシングを制御する因子である事を見だし機能解析を開始した。本研究は、Ca²⁺濃度の有無に伴って CHERP と相互作用する因子を明らかにすること、CHERP の制御する遺伝子を網羅的に解析することを目的とした。

まず、CHERP と相互作用する因子を免疫沈降と質量分析により解析した。次いで、遺伝子発現の解析としてエキソンアレイを用いて解析を行った。

CHERP と相互作用する因子の網羅的解析について、Ca²⁺非存在下では、SF3A や SF3B などの多くのスプライシング因子との相互作用が示唆された。またスプライシング因子の中でも、スプライシングの初期段階に関わる U2snRNP タンパク質が数多く検出された。次いで、Ca²⁺存在下では、強く結合する因子が変わった。特にリボソームタンパク質とヒストンタンパク質が数多く見られた。

次に CHERP が関与するスプライシングの網羅的解析を行った。エキソンアレイ解析の指標となる Splicing Index (SI) 値について絶対値が 1.0, 1.5, 2.0 を基準として、それを満たす遺伝子の個数を調べたところ、発現の上昇するエキソンと減少するエキソンを観察した。この結果から、CHERP により SI の正負の遺伝子数に大きな差はなく、特異的に inclusion や skipping が起きている可能性は低いと考えられた。

現在、個別に DNA 損傷, cell survival, アポトーシスに関わるスプライシングに影響があるかについて IPA (Ingenuity Pathway Analysis) を用いて解析中である。

1. 研究目的

1.1 研究の背景

1.1.1 カルシウムシグナルと遺伝子発現

カルシウム(Ca²⁺)は、刺激をきっかけとして細胞外や小胞体から細胞質に流入することにより細胞内情報伝達を制御する因子である。細胞内の Ca²⁺濃度の変化は幅広い細胞応答へとつながっており、Ca²⁺シグナルの一部は、核に伝えられて特異的な遺伝子群の転写を促進する。これまで Ca²⁺シグナルによる遺伝子発現はもっぱら転写のレ

ベルで解析されてきた。

1.1.2 遺伝子発現とヒトにおける選択的スプライシングの意義

mRNA の選択的スプライシングは、ゲノムにコードされる遺伝子の数を遙かに超えた数のタンパク質を発現させるメカニズムであり、選択的スプライシングを受ける遺伝子の数(割合)は、生物の高等化や複雑化に伴って多くなる。実際、選択的スプライシングは酵母ではほとんど見られず、生物の複雑さが増すにしたがって多く観察される。特に、

ヒトでは70%以上の遺伝子において選択的スプライシングが起こる。また、ヒト遺伝病の20-50%はスプライシングの異常に起因する。筋ジストロフィーや筋萎縮性側索硬化症といった難治性疾患も選択的スプライシングの破綻によるRNA病である⁽¹⁾。このため選択的スプライシング機構の解明は、ヒト遺伝病の原因究明や治療法開発の鍵となる。しかしヒトにおける選択的スプライシングの分子機構は十分にわかっていない。加えて、Ca²⁺シグナルとmRNA選択的スプライシングを結びつける知見はこれまでにはなかった。

1. 2 報告者の従来研究

報告者は、mRNA スプライシングに関する研究を行ってきた⁽²⁻⁴⁾。この過程で、スプライシングを制御するU2AFと相互作用する因子としてCHERPを同定し、新たに機能解析を開始した。CHERPをノックダウンすると、通常は細胞質に局在するmRNAが核内に滞留した。さらに、CHERPノックダウンでCa²⁺チャネルを形成するIP3R2のスプライシングパターンが体細胞型から神経細胞型へとシフトした。

CHERPの発見当初、細胞内Ca²⁺シグナリングの制御に関わる因子として報告された⁽⁵⁾。最近、CHERPがmRNAスプライシングを行うスプライソソーム因子であることや⁽⁶⁾、スプライシングに関わる因子特有のドメインも存在することが報告された⁽⁷⁾。これらの知見と申請者の発見から、Ca²⁺シグナリングを介した遺伝子発現にCHERPが重要な役割を担っていると考えられた。

1. 3 目的

本研究は、第1にCa²⁺濃度の有無に伴ってCHERPと相互作用する因子を明らかにする。第2にCHERPの制御する遺伝子を網羅的に解析することを目的として研究を行った。

2. 研究方法

2. 1 動物細胞株と細胞培養法

培養細胞は、56°Cで30分間非働化したFETAL BOVINE SERUMを10%添加したDMEM(High Glucose)(Wako社)を用いて37°C、CO₂5%で培養した。

ヒト培養細胞株として、ヒト骨肉腫由来U2OS細胞、ヒト子宮頸癌由来HeLa細胞、ヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293 Flp-InTMT-RexTM細胞(invitrogen社)を使用し

た。

2. 2 RNAiによるノックダウン

RNAiはStealth RNAi siRNA(invitrogen社)を用いて、Lipofectamine2000(invitrogen社)により細胞導入した。導入後、48時間37°Cで培養した。

本研究で用いたCHERP#1 siRNAはCHERP遺伝子のCDS領域、CHERP#2 siRNAはCHERP遺伝子の5'UTR領域である。

2. 3 ヒト培養細胞からの核タンパク質抽出法

15cm dish 5枚に培養したヒト培養細胞をPBSで洗浄した後回収し、遠心後に上清を除いた。細胞量の2倍量のhypotonic buffer(10 mM HEPES / 1.5 mM MgCl₂ / 10 mM KCl / 0.2 mM PMSF / 0.5 mM DTT)で洗浄し、buffer置換をおこない、氷上で10分間おくことで細胞を膨張させた。次にホモジナイザー(WHEATON社)を用いてホモジナイズして遠心し、上清を細胞質抽出物として回収した。沈殿物を半量のlow salt buffer(20 mM HEPES / 1.5 mM MgCl₂ / 1.4 M KCl / 0.2 mM EDTA / 25% Glycerol / 0.2 mM PMSF / 0.5 mM DTT)をゆっくりと添加し、更に4°Cで30分攪拌した。この溶液を14,000 rpmで15分間遠心し、得られた上清を核抽出物として回収した。また残りのペレットをソニケーションにかけ、同様に遠心し、得られた上清も核抽出物に加えた。得られた核抽出物は、dialysis buffer(20 mM HEPES / 100 mM KCl / 0.2 mM EDTA / 20% Glycerol / 0.2 mM PMSF / 0.5 mM DTT)を用いて4°Cで90分を2回で攪拌し、透析を行った。以上の操作は全て氷上または4°Cで行った。

2. 4 Western blotting法

抽出したタンパク質は10% SDS-PAGE gelで電気泳動後、polyvinylidene difluoride(PVDF)メンブレン(ImmobilonTM-P)(Milipore社)にセミドライ式ブロッティング装置(Bio-Rad社)を用いてブロッティングした。メンブレンを5%スキムミルク / 0.1% Tween20 / PBSを用いて1~2時間ブロッキング後、0.1% Tween20 / PBSで軽くリンスし、0.1% / PBSで希釈した一次抗体を4°Cで一晩反応させた。次にメンブレンを0.1% Tween20 / PBSで10分3回洗浄し、0.1% Tween20 / PBSで希釈したHPR融合二次抗体を常温で1~3時間反応させた。メンブレンを0.1% Tween20 / PBSで10分3回洗浄した後、Immobilon Western(MILLIPOLE社)を用いて化学発光させ、

LAS-4000 mini (GE Healthcare 社) を用いて撮影した。

用いた抗体 α -CHERP ラビットポリクローナル抗体は名古屋大学 牧 正敏教授より分与して頂いた。

2. 5 免疫沈降法 (Immunoprecipitation: IP)

Anti-FLAG 抗体 (SIGMA-ALDRICH 社) を protein G ビーズ上にクロスリンクするため、60mM DMP (SIGMA-ALDRICH 社) / 0.2M NaBorate (pH 9.0) を添加し室温で 30 分間攪拌した。この溶液を遠心し、沈殿物に 0.2 M ethanol amine (pH 8.0) を添加し室温で 1 時間攪拌した。この溶液を遠心し、沈殿物に 100 mM Glycine (pH 3.0) を添加し室温で 10 分間攪拌した。さらにこの溶液を遠心し、沈殿物に 0.2 M ethanol amine を添加し室温で 5 分攪拌した。次に PBS / T buffer (PBS / 0.1% Triton-x100 / 0.2 mM PMSF) で洗浄し、遠心して生じた沈殿物をクロスリンク処理後 Anti-FLAG Affinity Gel とした。

Flag-融合タンパク質を発現させた細胞から得た核抽出物 (NE) を適量、protease inhibitor cocktails Complete EDTA-free (Roche 社) 1 μ l, RNaseA 10 μ g, PBS / T buffer 200 μ l を加え 30°C で 20 分間 RNase 処理した。上記の処理を行った NE とクロスリンク処理後の Anti-FLAG Affinity Gel を 4°C, 3 時間攪拌した。この溶液を遠心し、沈殿物を PBS / T buffer で 4 回洗浄した後、SDS sample buffer (250 mM Tris-HCl / 1% SDS / 40 mM DTT / 0.002% BPB / 40% Glycerol) を添加して 37°C で 5 分間静置した。この溶液を遠心し、上清に終濃度が 0.5 mM になるように DTT を添加し、煮沸して抗体に結合したタンパク質を溶出した。

2. 6 質量分析による相互作用蛋白質の同定

前述に示す方法で調製したヒト培養細胞の核画分を、Flag 抗体を用いた IP によってサンプルを調製した。SDS-PAGE で展開しタンパク質を分離し、銀染色によって染色し、グレードの良いサンプルを選んだ。サンプルに含まれる全てのタンパク質を同定するために、ゲルの上端から下端まで全てを切り出してプロテアーゼ処理を行い、LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry) 法により解析した。

2. 7 培養細胞からの total RNA 抽出法

培養細胞を回収し、Sepasol-RNA I Super G (ナカライテスク社) を 1 ml 加え、ボルテックスミキサーで 2 分間攪拌後、5 分間室温に静置した。次に 200 μ l クロロホルムを加え転倒混和し、3 分間室温で静置した。次に室温、14,000

rpm、20 分間遠心して、上層 (水相) 700 ml を収集した。等量の 2-プロパノールと 3M NaOAc を 50 μ l 加え、転倒混和して室温で 10 分間静置した。15,000 rpm 4°C で 10 分間遠心し、上清を除いた。そこへ 75% エタノールを 1 ml 加え、ゆっくりと攪拌し懸濁した。15,000 rpm 4°C で 6 分間遠心し、上清を除いた。完全に乾燥させ、RNA 用の water に 20 倍希釈した。その後 DNaseI 処理を行い、total RNA を抽出した。

2. 8 リアルタイム PCR 法

調製した total RNA を鋳型として、後述の方法で cDNA を合成した。合成した cDNA をテンプレートとして、Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO 社) を使用してリアルタイム PCR を行った。解析は ABI Prism 7700 (Applied Biosystems 社) により行った。

2. 9 Exon array 解析

U2OS 細胞を 24 時間培養後、各因子を siRNA でノックダウンした。ノックダウン後 48 時間で total RNA を抽出した。Nano drop によって total RNA の濃度を測定した。次いで、アガロースゲル電気泳動によって RNA の状態が良いサンプルを選んだ。その後の操作は三重大学生命科学研究支援センターの小林裕子博士に解析を依頼した。RNA Integrity Number (RIN 値) が 8.5 以上のサンプルを選び、ラベル化、ハイブリダイゼーション、スキャン、数値化をおこなって頂いた。Exon array 解析には Sure Print G3 Human Exon マイクロアレイキット 4 \times 180K G4832A (Agilent 社) を使用した。生データ (CEL file) を Gene Spring GX 13.0 (Agilent 社) を用いて解析した。

2. 10 RT-PCR 法

抽出した total RNA を鋳型として、Rever Tra Ace (TOYOBO 社) を用いて逆転写 PCR を行った。プライマーには Random9 (TOYOBO 社) を用いた。合成した cDNA を鋳型として、プライマーを用いて KOD+ (TOYOBO 社) もしくは KOD FX NEO (TOYOBO 社) により PCR を行い、評価した。

3. 研究結果

3. 1 CHERP と相互作用する因子の網羅的解析

タンパク質には、単体で機能するタンパク質も存在するが、他のタンパク質や生体高分子と相互作用することで機能を果たすタンパク質も存在する。よって、タンパク質間

相互作用に関する情報は、そのタンパク質の機能を推定する上で必要不可欠な情報となる。これまでの知見から CHERP が mRNA スプライシングに関与することが示唆された。

そこで CHERP がスプライシング反応に関与するのか、またスプライシングだけでなく他の細胞内プロセスに関与するのかを調べるために CHERP と相互作用する因子を LC-MS/MS 解析により調べた。

3. 2 Flag-CHERP の特異的な発現の確認と核抽出液の調整

初めにタンパク質間相互作用の解析に用いた Flag-CHERP を発現させた HEK293 細胞を用いて α -Flag M2 抗体と α -CHERP 抗体でウェスタンブロットを行い、Flag-CHERP の発現を確認した (Figure 1)。次に CHERP と相互作用する因子を探索するために免疫沈降を行った。免疫沈降で調整したサンプルを SDS-PAGE でタンパク質を分離した後、銀染色によって染色し、コントロールと明瞭に差の見えるサンプルを選抜した。

3. 3 CHERP を用いた免疫沈降により検出されたタンパク質

LC-MS/MS の結果ではデータベース検索をして、該当するタンパク質を検出した。独立した 2 回 LC-MS/MS 解析を行い、Table 1 に示す数のタンパク質が検出された。また今回の解析で CHERP を用いた免疫沈降によって検出されたタンパク質を CHERP と相互作用するタンパク質とした。

3. 4 CHERP と相互作用するタンパク質

LC-MS/MS 法により CHERP と相互作用すると考えられるタンパク質について、初めに Ca^{2+} を付加しない場合の相

互作用因子について述べる。本実験では 2 回の LC-MS/MS 解析で再現性がとれたタンパク質を探索したところ、計 59 個のタンパク質が検出された。これらの中には SF3A や SF3B などの多くのスプライシング因子との相互作用が示唆された。またスプライシング因子の中でも、スプライシングの初期段階に関わる U2snRNP タンパク質が数多く検出された⁽⁸⁾。また、これらのタンパク質の Gene Ontology (GO) term 解析を DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) を用いて行った。GO term 解析の結果をフィッシャー検定によって統計解析した。p<0.05 を有意であると定めた (Table 2)。その結果、mRNA プロセッシング関連因子、特にスプライシング関連因子との強い相互作用がみられた。

CHERP は元々カルシウム動員に関わるタンパク質として単離された。よって CHERP と Ca^{2+} 依存的に相互作用するタンパク質があるのではないかと仮定し、 Ca^{2+} を付加したサンプルを用いて、 Ca^{2+} 付加時に CHERP と特異的に相

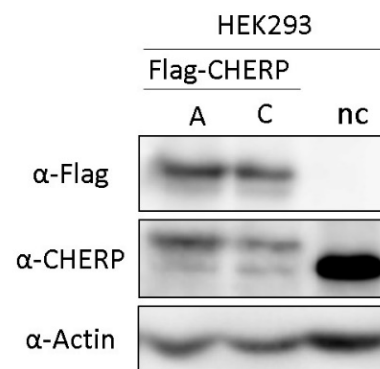


Figure 1. Detection of Flag-CHERP expression in HEK293 cells

Table 1. The number of proteins associated with CHERP

	Ca^{2+}					
	—		100 μM		10 μM	1 mM
	1	2	1	2	1	2
total	323	423	1082	690	417	884
>0.0005	260	368	977	625	365	785
>0.001	209	323	851	550	324	684
>0.005	92	125	368	217	137	313
>0.01	53	48	178	91	54	165

Table 2. GO term analysis (Ca²⁺ free condition)

ID	Term	P-value
GO:0008380	RNA splicing	1.52E-43
GO:0006397	mRNA processing	8.30E-42
GO:0016071	mRNA metabolic process	1.10E-39
GO:0006396	RNA processing	1.90E-37
GO:0016070	RNA metabolic process	3.10E-29
GO:0000245	spliceosome assembly	2.50E-15
GO:0022618	ribonucleoprotein complex assembly	4.50E-12
GO:0000389	nuclear mRNA 3'-splice site recognition	5.60E-07
GO:0006376	mRNA splice site selection	2.00E-05
GO:0051258	protein polymerization	1.60E-02

相互作用するタンパク質の探索を行った。2回のLC-MS/MS解析で共通に見られ、Ca²⁺を100 μM加えたときと加えていないとき(EGTA)を比較してCa²⁺付加時に特異的に見られたタンパク質を選出した。その結果、Ca²⁺付加時において、46個の特異的なタンパク質を検出した。内訳について、リボソームタンパク質とヒストンタンパク質が数多く見られた。またEGTAサンプルには見られなかったSRタンパク質も見られた。

次に上の表の46個のタンパク質のGO term解析を行った(Table 3)。Table 2と同様に生物学的プロセスに着目し、DAVIDを用いてタンパク質の機能を分類した。P値<0.05を有意であると定め、それを満たすGO termを表にした。その結果、EGTAのサンプルで見られたmRNAスプライシングに関するGO termの割合は少なかった。それに比べて、translationやtransportに関連するGO termがたくさん見られた。中でもtranslationに関するGO termはP値が低く見られた。これらの結果から、CHERPはCa²⁺によって相互作用するタンパク質が変化し、CHERPが関与する細胞内のプロセスにも変化が生じている可能性が考えられた。

3.5 CHERPが関与する選択的スプライシングの網羅的解析

LC-MS/MS法による解析でCHERPは多くのスプライシング関連因子と相互作用していることが示唆された。U2snRNP関連因子の数が多かったことから、CHERPはmRNAスプライシングの初期段階である3'スプライス部位

の認識に関与することが考えられる。しかしCHERPが選択的スプライシングの制御に関与することが報告されているのは、IP3R1遺伝子のみであるため、CHERPが実際にmRNAスプライシングに関与しているのか、またCHERPがmRNAスプライシングを制御しているとする、標的はどのような遺伝子なのかは不明である。

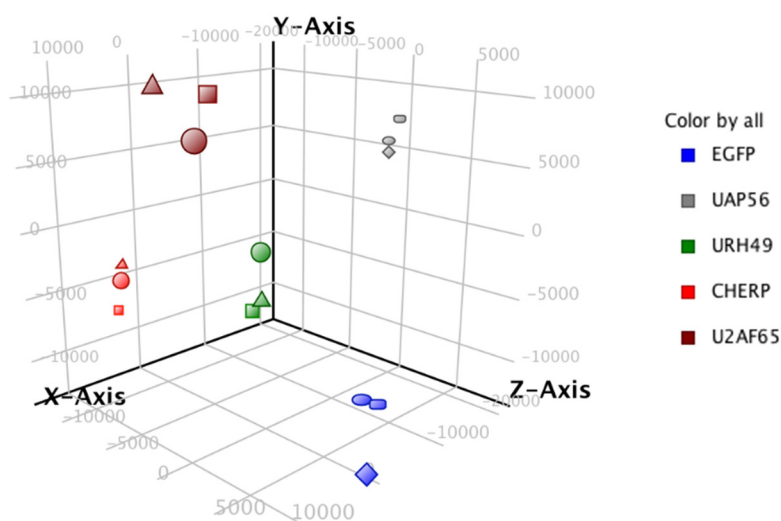
そこでCHERPが制御する遺伝子を網羅的に探索するためにエキソンアレイ解析を行った。またCHERPとの相互作用が確認されており、スプライシング反応に関与することが示されているU2AF65タンパク質をノックダウンしたサンプルも準備し、CHERPとの関連性を比較した。それと同時にmRNAの核外輸送などmRNAの転写とプロセシングに関与することが報告されているUAP56とURH49についても同様に比較した。

Total RNAを逆転写によってcDNA化した後、リアルタイムPCRを行い、特異的なプライマーを用いてノックダウン効率を調べた。その結果、CHERPを10%程度までノックダウンできていることが確認できた。またtotal RNAの分解度を調べることによりRNAの品質評価をおこなうRIN(RNA Integrity Number)値をもとに、RIN値が8.5以上のサンプルを選んでエキソンアレイ解析を行った。

はじめに、サンプル間に誤差が少ないか、対照群ごとに差があるかを判断するために、3D PCA解析(3次元主成分解析)をおこなった。3D PCA解析は、分散が大きくなるところに3つ軸をとって3次元でサンプルのクオリティを表す方法である。解析の結果、条件ごとにそれぞれサン

Table 3. GO term analysis (Ca²⁺ plus condition)

ID	Term	P-value
GO:0006414	translational elongation	7.30E-16
GO:0006412	translation	1.70E-11
GO:000639	RNA processing	7.20E-06
GO:0008380	RNA splicing	7.90E-05
GO:0006397	mRNA processing	1.50E-04
GO:0016071	mRNA metabolic process	3.30E-04
GO:001607	RNA metabolic process	4.80E-04
GO:0044267	cellular protein metabolic process	4.10E-03
GO:0010608	posttranscriptional regulation of gene expression	1.70E-02
GO:0009133	nucleoside diphosphate biosynthetic process	1.80E-02
GO:000913	purine nucleoside diphosphate metabolic process	2.10E-02
GO:0051028	mRNA transport	2.10E-02
GO:0050657	nucleic acid transport	2.60E-02
GO:0050658	RNA transport	2.60E-02
GO:0006417	regulation of translation	4.90E-02

**Figure 2.** Quality check of array analysis

プルがまとまっていて、条件間では差があることが分かる (Figure 2)。

これらのクオリティーコントロールの結果からもサンプル内の誤差は少なく、信頼のある結果であると判断して発現変動遺伝子の抽出を行った。

3. 6 CHERP と U2AF65 をノックダウンしたときの Fold Change(FC)と Splicing Index(SI)が変動した遺伝子

FC は遺伝子の発現量の変化を表しており、発現量をコントロールと比較して比で表される。SI は遺伝子の発現量

でノーマライズさせたプローブセットの強度を対数表示した値で、エキソンアレイ解析においてスプライシングバリエーションの存在を表す指標となる⁽⁹⁾。

エキソンアレイ解析の指標となる Splicing Index (SI) 値について調べた。SIの絶対値が1.0, 1.5, 2.0を基準として、それを満たす遺伝子の個数を調べた (Table 4)。

上の結果から、CHERP ノックダウン、U2AF65 ノックダウン共に SI の正負の遺伝子数に大きな差はなく、特異的に inclusion や skipping が起きている可能性は低いと考えられる。また U2AF65 は mRNA スプライシングに関与していると報告されていることから、SI が変動した遺伝子の数が多くなったことは合理的な結果であると考えられた。

4. 考察

4.1 CHERP の相互作用因子

免疫沈降と質量分析の結果から CHERP はスプライソーム、特に U2 snRNP との相互作用が認められた。検出した因子はいずれもイントロンの 3'末端とエキソンの 5'末端の境界領域とそのすぐ上流に存在するポリピリミジン領域に結合する。この領域はそれぞれのイントロンによって配列特異性を持つ。CHERP は分子内に RNA 結合ドメインを持つことから、ポリピリミジン領域かその近傍の特定の RNA 配列に直接結合すると予測している。今後は相互作用因子の免疫沈降を行い、CHERP 特異的に相互作用しているのか確認する必要がある。

Ca シグナリングは選択的スプライシングを制御することが知られている⁽¹⁰⁾。特に Ca²⁺シグナルによる神経活動に依存な選択的スプライシングの分子メカニズムが明らかになりつつある。例として、Neurexin と呼ばれるシナプス形成因子のエキソン 20 の選択的スプライシングが小脳顆粒細胞において Ca²⁺依存的に制御されていることが分かっている⁽¹¹⁾。

本研究では、CHERP と Ca シグナリングとの関係を調べるために、CHERP と Ca²⁺依存的に相互作用する因子を探索した。その結果 Ca²⁺依存的にヒストタンパク質やリボソームタンパク質が多く見られた。今後、実際に Ca²⁺依存的に CHERP と相互作用していることを免疫沈降に続くウェスタンブロットにより確かめたい。またその作用機構について解析していきたい。

4.2 エキソンアレイ解析における遺伝子の機能解析

CHERP ノックダウン時に SI 値が大きく変動した遺伝子群において、アポトーシスに関する重要因子が見られた。選択的スプライシングの影響がアポトーシスに関与することが報告されている TRAF1, APAF1, CASP8 についても SI が |1.0| 以上であった。DNA 損傷により、cell survival やアポトーシスに関わるスプライシングに影響があることがわかっている。このような細胞機能に重要な遺伝子や機能について IPA (Ingenuity Pathway Analysis) を用いて解析中である。

5. 文献

1. Nishida A et al. Chemical treatment enhances skipping of a mutated exon in the dystrophin gene. *Nat Commun.* 2011; 2: 308
2. Yamazaki, T. et al. The closely related RNA helicases, UAP56 and URH49, preferentially form distinct mRNA export machineries and coordinately regulate mitotic progression. *Mol. Biol. Cell.* 2010; 21, 2953-2965
3. Okamura, M, Inose, H. and Masuda, S. RNA export pathways in eukaryotes. *Genes*, 2015; 6, 125-149,
4. Inose, H., Mukai, K., Ito, M. and Masuda, S. Gene Regulation through mRNA Expression. *Adv. Biol. Chem.*, 2015; 5, 45-57,

Table 4. The gene number changed by indicated siRNA treatment

	SI> 1.0		SI> 1.5		SI> 2.0	
CHERPkd	1222	(+)553	447	(+)189	164	(+)96
		(-)669		(-)258		(-)68
U2AF65kd	1649	(+)876	645	(+)346	219	(+)113
		(-)773		(-)299		(-)106

5. O'Rourke FA1, LaPlante JM, Feinstein MB. Antisense-mediated loss of calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP; ERPROT213-21) impairs Ca²⁺ mobilization, nuclear factor of activated T-cells (NFAT) activation and cell proliferation in Jurkat T-lymphocytes. *Biochem J.* 2003, 373: 133-143.
6. Lin-Moshier Y. et al. Re-evaluation of the role of calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) in cellular calcium signaling. *J Biol Chem.* 2013, 288: 355-367
7. Sasaki-Osugi K. et al. Nuclear ALG-2 protein interacts with Ca²⁺ homeostasis endoplasmic reticulum protein (CHERP) Ca²⁺-dependently and participates in regulation of alternative splicing of inositol trisphosphate receptor type 1 (IP3R1) pre-mRNA. *J Biol Chem.* 2013, 288: 33361-33375
8. Kotake, Y., et al., Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nat Chem Biol,* 2007. 3: 570-575.
9. Hill, R.J. and K.J. Fox, Splicing Index Numbers. *Journal of Business & Economic Statistics,* 1997. 15: 387-389.
10. Xie, J., Control of alternative pre-mRNA splicing by Ca⁽⁺⁺⁾ signals. *Biochim Biophys Acta,* 2008. 1779: 438-452.
11. Iijima, T., et al., SAM68 regulates neuronal activity-dependent alternative splicing of neuexin-1. *Cell,* 2011. 147: 1601-1614.

Analysis of Alternative Splicing Regulated by Ca²⁺ Signaling

Seiji Masuda

Kyoto University

Summary

Alternative splicing achieves a numbers of protein expression more than those encoded in its genome. The number of alternative splicing increases as living organism becomes complexity. However, the mechanism of alternative splicing is still largely unknown. Therefore, uncovering the mechanism of alternative splicing may give a key role for the investigation of human genetic diseases and establishment of their therapy.

CHERP is first identified as Ca²⁺ signaling related protein in the endoplasmic reticulum. Then, is also found that CHERP is also localized in the nucleus, suggesting CHERP has another role in the nucleus. Here, I examined the CHERP interacting proteins by immune precipitation and the genes regulated by CHERP to elucidate whether CHERP has a role for the alternative splicing. CHERP interacting proteins were precipitated using Flag tagged CHERP and M2 antibody, and analyzed by mass-spec. In the absence of Ca²⁺, SF3A and SF3B were most abundantly detected in addition to U2 snRNP related proteins. By contrast, ribosomal and histone proteins were dominantly detected in the presence of Ca²⁺. These results suggest that CHERP will have a role for the alternative splicing by the association with U2 snRNP and may alter the alternative splicing pattern through exchanging the associated proteins when Ca²⁺ signaling is activated. Next, the exon array analysis was performed to investigate the CHERP regulated exon. In the absence of CHERP by the siRNA mediated knock-down, the expression of more than thousands of exons were altered 2 fold and more. About a half of them were exon skipped and the rest of them were exon included. This observation suggests that CHERP affect the pattern of alternative splicing both positively and negatively. The mechanism of the alternative splicing regulated by CHERP is now on going.