

スプライシング因子の新機能に関する化学遺伝学研究 Chemical Genetics on Novel Functions of Splicing Factors

吉田 稔 (YOSHIDA MINORU)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・主任研究員



研究の概要

Spliceostatin A (SSA) はスプライシング因子 SF3b に結合してスプライシングを阻害する世界初のスプライシング阻害剤である。SSA を用いることでスプライシング因子やイントロンの新しい機能の同定につながると考えられる。本研究は SSA を用いて mRNA 監視機構、エピジェネティクス、非コード RNA、核内ドメイン等におけるスプライシング因子の未知の役割の解明を目指す。

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：遺伝子発現、スプライシング

1. 研究開始当初の背景

DNA から転写された mRNA 前駆体 (pre-mRNA) には、アミノ酸配列の暗号情報を持たないイントロン (介在配列) が存在する。このイントロンを取り除き、残りの部分を結合して完全な配列を示す成熟型 mRNA を作るスプライシングは、正しい遺伝子発現に必須であり、スプライソソームと呼ばれる巨大複合体がその反応を担う。スプライシングは mRNA の効率的な核外輸送にも重要であることも知られており、組織の違いによって異なるパターンを示すことによって遺伝子発現の多様性を担う (選択的スプライシング) など、高等生物の進化の過程にも重要な役割を果たしたと考えられている。近年、膨大な数の非コード RNA (ncRNA) の存在が示されたが、同時にこれまで意味を持たないと思われてきたイントロン配列中にも ncRNA である miRNA や snoRNA がコードされていることが徐々に明らかにされ、イントロンの持つ新しい機能にも注目が集まりつつある。しかし、スプライシング反応を阻害剤によって制御することが困難であったため、イントロンの機能解析は進んでいない。我々のグループによる SSA の発見とその作用機構解明は、初めて特異的阻害剤によってスプライシングを自由に制御することを可能にした。これにより、イントロン配列を持った mRNA を生化学的に取り扱うことが可能となった。そこで、SSA を用いてスプライシング因子とイントロンの持つ隠された機能を明らかにしようと計画した。

2. 研究の目的

抗癌剤候補化合物として発見された FR901464 を改変して作成した安定誘導体 Spliceostatin A (SSA) がスプライシング因子複合体 SF3b に結合してスプライシング反応を阻害し、その結果 pre-mRNA からタンパク質が合成され、イントロンの配列が翻訳されることを見いだした。スプライシング反応の小分子阻害剤自体、世界初の発見であり、これを用いて反応の詳細やイントロンの持つ機能が解明できる可能性がある。そこで SSA を用い、スプライシングが pre-mRNA の監視機構やクロマチン構造を介したエピジェネティックな遺伝子発現調節などのゲノム機能にどのように関与するかを明らかにすることを通じてスプライシング因子とイントロンの新しい機能を解明し、「イントロン生物学」の基盤を形成することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

SSA の細胞内標的である SF3b の機能について、以下の4点に絞って研究を行う。すなわち、(1) mRNA 監視機構における役割、(2) 転写とクロマチン調節における役割、(3) ncRNA 調節における役割、(4) 核小体および核内ドメインの機能と構造における役割である。SSA 処理によって変化する mRNA、ncRNA 等の量、プロセッシング、局在やクロマチン修飾の変化を調べ、そのメカニズムを明らかにする。

4. これまでの成果

(1) mRNA 監視機構における役割: SSA によるスプライシングおよび監視機構の阻害効果はブランチ部位の配列の強さに依存していた。トランスクリプトーム解析結果、多くの遺伝子において発現、スプライシングパターンの変化を観察した。中でも SSA は血管新生因子 VEGF のスプライシングを阻害し、血管新生を阻害すること、FIR/PUF60 遺伝子のスプライシングパターンを変化させ、*c-myc* の発現を誘導することを明らかにした。

(2) 転写とクロマチン調節における役割: イントロンを持つレポーター遺伝子と MS2-GFP を用いたイメージング法を利用した実験から、スプライシングが抑制された pre-mRNA は RNA ポリメラーゼから離脱せず、クロマチンに結合したままなのに対し、SSA 存在下では転写複合体の解体がおこり、RNA ポリメラーゼ、転写物の双方が転写部位から脱落することがわかった。また、SSA 処理によって、細胞内のヒストンアセチル化及びメチル化状態が変化することを見いだした。驚いたことにこの現象は Argonaute1 (Ago1) に依存しており、Ago1 をノックダウンすると抑制された。

(3) ncRNA 調節における役割: 核内 ncRNA である Malat1 は SSA によって配列内の潜在的ポリ A 付加部位から切断、ポリ A 付加が起こり、生じた短鎖の RNA が速やかに核外輸送されることがわかった。また、スプライシング因子 SF1 が Gomafu の核内繫留に必要なこと、hnRNP U が Xist の X 染色体上への局在に必須な役割を果たしていることを明らかにした。

(4) 核小体および核内ドメインの機能と構造における役割: 分裂酵母において SSA によって 100 種類以上のタンパク質の局在異常が起こり、核小体の構造異常が引き起こされることがわかった。

5. 今後の計画

SSA は細胞内でスプライシングを完全に阻害するのではなく、様々な遺伝子でスプライシングパターンを変化させることが示された。また、多くの ncRNA の局在や安定性を変化させ、クロマチンの修飾にも影響を与えることが判明した。今後はそれぞれの作用について SF3b を含めたスプライシング因子の関与、必要性、役割を解析する。さらにクロマチンや核内ドメインへの効果を検証し、広範にスプライシング因子の新しい機能を解明する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Nakagawa, S., Naganuma, T., Shioi, G., and Hirose, T., Paraspeckles

are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice. **J. Cell Biol.** 193 (1), 31-9 (2011). 査読有

2. Martins, SB, Rino, J, Carvalho, T, Carvalho, C, Yoshida, M., Klose, JM, de Almeida, SF, Carmo-Fonseca, M., Spliceosome assembly is coupled to RNA polymerase II dynamics at the 3' end of human genes. **Nat. Struct. Mol. Biol.** 18, 1115-1123 (2011). 査読有
3. Tsuiji, H., Yoshimoto, R., Hasegawa, Y., Furuno, M., Yoshida, M., and Nakagawa, S., Competition between a noncoding exon and introns: Gomafu contains tandem UACUAAC repeats and associates with splicing factor-1. **Genes Cells** 16 (5), 479-90 (2011). 査読有
4. Hasegawa, Y., Brockdorff, N., Kawano, S., Tsutui, K., and Nakagawa, S., The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of Xist RNA. **Dev. Cell** 19 (3), 469-76 (2010). 査読有
5. Furumai, R., Uchida K, Komi Y, Yoneyama M, Ishigami K, Watanabe H, Kojima S, Yoshida, M., Spliceostatin A blocks angiogenesis by inhibiting global gene expression including VEGF. **Cancer Science** 101, 2483-2489 (2010). 査読有
6. Schneider-Poetsch, T., Usui, T., Kaida D., Yoshida M., Garbled messages and corrupted translations. **Nat. Chem. Biol.**, 6, 189-198(2010). 査読有

受賞

1. バイオインダストリー協会賞 (平成 21年10月)
2. 文部科学大臣表彰科学技術賞 (研究部門) (平成22年4月)
3. 日本農芸化学会賞 (平成23年5月)

ホームページ等

研究室ホームページ:

<http://www.riken.go.jp/r-world/research/lab/wako/chemi-gene/>

<http://www.riken.jp/SPD/ChemicalGeneticsLab/index.html>

RIKEN ニュースホームページ:

http://www.riken.jp/r-world/info/release/news/2008/jul/index.html#frol_01