

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06448

研究課題名(和文)精子形成におけるU12イントロンスプライシング因子ZRSR1の役割と治療への応用

研究課題名(英文)Study of splicing factor ZRSR1 in spermatogenesis for therapeutic application

研究代表者

堀内 恵子(HORIUCHI, Keiko)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：00456203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ZRSR1/2は、U12イントロンのスプライシングファクターであり、骨髄異形成症候群の発症と関連することが報告されているが、スプライシングにおける分子メカニズムは明らかになっていない点が多い。これまでのZrsr1変異マウスの解析から、U12イントロンのスプライシングが阻害されるとその近隣のU2イントロンのスプライシングも阻害されることを発見し、major spliceosomeとminor spliceosome間に相互作用があることが考えられた。U12イントロンを含むminigeneを用いた解析およびプロテオミクス解析から、U12イントロンスプライシングを促進する相互作用を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Zrsr1変異マウスの解析、分子生物学的、生化学的解析からminor spliceosomeとmajor spliceosome間の相互作用を明らかにし、この相互作用がU12イントロンスプライシングを促進していることを示した。Zrsr1変異マウスは精子形成不全を示し、ZRSR1のパラログであるZRSR2の変異は骨髄異形成症候群の発症と関連することが報告されており、本研究の成果はZRSR1/2によるU12イントロンのスプライシング促進による治療の可能性を持っており、社会的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：ZRSR1/2 have been implicated in 3' splice site recognition of U12 introns, a rare group of introns (approximately 0.5% in humans). Our previous study using Zrsr1 mutant mice revealed that increased U12 intron retention inhibited adjacent U2 intron splicing, suggesting mutual influences between neighboring U12 and U2 introns. To further understand the interplay between U2 and U12 intron splicing, we generated a minigene containing U12 intron 5 flanked by U2 introns 4 and 6 of the Rfx5 gene. Minigene analysis showed that 1. U12 intron represses the efficiency of upstream U2 intron splicing, 2. the upstream U2 intron promotes the U12 intron splicing, 3. deletion of 5' splice site of U12 intron increased the efficiency of the upstream U2 intron splicing, suggesting an interaction of 5' splice site of U12 intron with major spliceosome enhances U12 intron splicing. Proteomic analysis of Zrsr1-interacting proteins identified candidates for exon definition components between minor and major spliceosomes.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNAスプライシング minor spliceosome ZRSR2 exon definition プロテオミクス Targeted proteomics

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

近年スプライシングファクターの変異が白血病など癌で多く同定されている。ZRSR2はU12イントロンのスプライシングファクターであり、その変異が骨髄異形成症候群(MDS)の発症と関連することが報告されており、ZRSRのスプライシングにおける分子メカニズムを明らかにすることが、病態発症を理解する上で重要と考えられる。これまでZRSR2のパラログであるZrsr1変異マウスの解析から、Zrsr1がU12イントロンのスプライシングおよび精子形成に重要であること、Zrsr1変異によりU12イントロンとその近隣のU2イントロンのスプライシングも阻害されることから、U2イントロンのスプライソソームであるmajor spliceosomeと、U12イントロンのminor spliceosomeの相互作用が、イントロン認識機構に関与すると考えられた。本研究では、ZRSRによるU12イントロン認識メカニズムと、major spliceosomeとminor spliceosomeの相互作用を明らかにすることを目的として研究を進めた。

### 2. 研究の目的

スプライシングはイントロン、エクソンの制御配列および制御タンパク質、転写速度などの因子により影響を受けるが、Minor spliceosomeとMajor spliceosomeの相互作用についてはこれまでほとんど報告がない。Minor spliceosomeのイントロンへのリクルート、安定化に、隣接するエクソンを介したMajor spliceosomeとの相互作用が重要である可能性があり、本研究ではZRSR1変異をモデルとして、Major spliceosomeとMinor spliceosomeの相互作用とU12イントロンスプライシングの分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) minigeneを用いたU2とU12イントロンスプライシングの動態解析

U12を含む遺伝子であるRfx5のminigeneの解析により、U12イントロンのリテンションにより上流のU2イントロンのスプライシングが顕著に抑制されることがわかり、隣接するU2イントロンとU12イントロン間(Exon definition)に相互作用があることがわかった。このminigeneのスプライシング制御配列の変異体を作成して、U12イントロンのスプライシングと隣接するU2イントロンとの相互作用について解析する。

#### (2) MS2システムを用いたU2-exon-U12に結合するタンパク質の同定

3'側にMS2配列を付加したRfx5 minigeneと、MS2 coat proteinを共発現し、MS2を免疫沈降し、Rfx5 minigeneから転写されたRNAに結合しているタンパク質を質量分析により同定した。

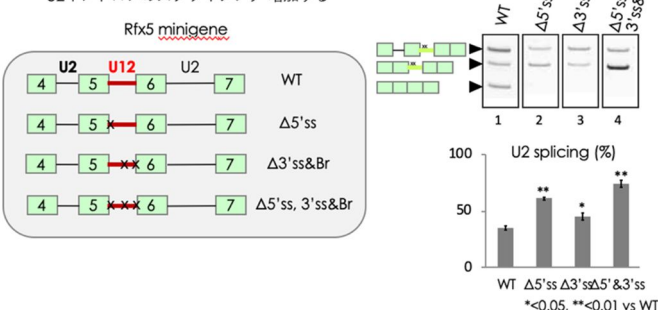
#### (3) ZRSRを介したMinor spliceosomeとMajor spliceosomeを仲介するexon definition complexの同定

Zrsr1変異マウスにおいてZRSRに結合するタンパク質にどのような違いが見られ、それが隣接するU2イントロンのスプライシングに影響するのか解析した。Zrsr1変異マウスはRRMドメインの中央にストップコドンが入っており、truncatedのタンパク質が発現している。HEK細胞を用いた系では、truncatedタンパク質の発現はわずかながらdominant negativeの作用が見られ、truncatedタンパク質がMinor spliceosomeに組み込まれている可能性がある。マウスZRSR1, ZRSR2を認識する抗体を作成し、免疫沈降LC-MS/MSにより複合体タンパク質を同定する。

### 4. 研究成果

(1) Rfx5遺伝子のminigeneを用いた解析により、U2イントロンとU12イントロン間(Exon definition)の相互作用を評価した。Rfx5のU12イントロンが上流のU2イントロンのスプライシングを抑制していること、U2イントロンがU12イントロンのスプライシングを促進していることがわかった。さらにZRSRのノックダウンでU12イントロンリテンションが増加すると上流のU2イントロンのリテンションも増加すること、しかし上流のU2イントロンのスプライス部位を強い配列にするとZRSRをノックダウンしてもU2イントロンスプライシ

図1 U12イントロンの5'ssのdeletionで上流のU2イントロンのスプライシング増加する



WT Δ5'ss Δ3'ss&Br Δ5'ss, 3'ss&Br

U2 splicing (%)

WT Δ5'ss Δ3'ss&Br Δ5'ss, 3'ss&Br

\* < 0.05, \*\* < 0.01 vs WT

グに影響はないことから、U2イントロンのスプライシング自体は主にU2イントロン自体のスプライス部位の強さに依存していることがわかった。さらに、U12イントロンの5' ssあるいは3' ss、両方の欠失変異体を用いた解析から、U12イントロンの5' ssの欠失で上流のU2イントロンのスプライシングが顕著に増加することから、U12イントロンの5' ssが、上流のU2イントロンのスプライシング因子と相互作用していることが考えられた。(図1)

(2) Minor spliceosome と Major spliceosome を仲介する exon definition complex の同定  
 3'側にMS2配列を付加したRfx5 WTおよび、U12イントロン3' ssの欠失および、5'および3' ss欠失 minigene を作成した。3' ss欠失 minigene は、U12イントロンスプライシングを阻害するため上流のU2イントロンとの相互作用(結合タンパク質)がより多く残っていると予想される。また、5'および3' ss欠失 minigene は minor spliceosome に認識されないため相互作用のないnegative control として考えた。これらをMS2 coat protein と共発現し、MS2 coat protein の免疫沈降と質量分析により、結合因子を同定した。Negative control の mock と比較して、Rfx5 WT あるいは Rfx5 3' ss欠失 minigene を発現したサンプルで2倍以上同定できたタンパク質として、RNAヘリケースであるDDX39Bなどの候補タンパク質を得た。(図2)

(3) ZRSR を介した Minor spliceosome と Major spliceosome を仲介する exon definition complex の同定  
 合成ペプチドを用いた免疫により抗体作成を試みたが、内因性のZRSR1/2タンパク質を認識する抗体を得られなかった。そこで、V5-tagを付加したZRSR1を発現する安定発現株を用いて、anti-V5抗体により免疫分離プロテオミクスを行い、SF3B複合体、smタンパク質、Minor spliceosome 構成因子の他、exon definition complex となる候補タンパク質を同定、exon definition complex の形成にZrsr1が関与していることが示唆された。Zrsr1変異マウスに発現しているtruncated変異体では、興味深いことに、WTに比べてわずかながらSF3B複合体と結合しており、Zrsr1のN末端、Zncフィンガー1およびRRMの一部を介してminor spliceosome に含まれることが明らかとなった。(図3)

図2

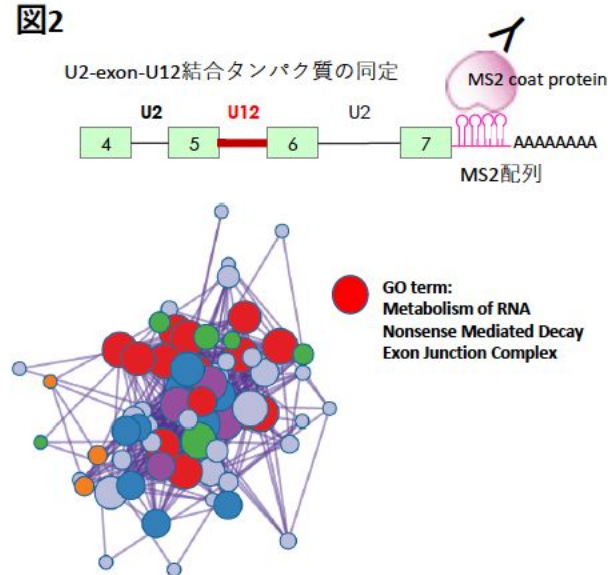
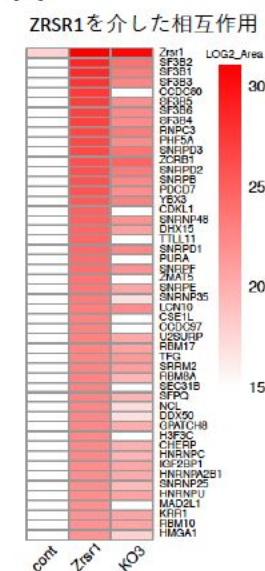


図3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Horiuchi Keiko, Kawamura Takeshi, Hamakubo Takao	4. 巻 297
2. 論文標題 Wilms' tumor 1-associating protein complex regulates alternative splicing and polyadenylation at potential G-quadruplex-forming splice site sequences	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101248 ~ 101248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.101248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Gomez-Redondo Isabel, Pericuesta Eva, Navarrete-Lopez Paula, Ramos-Ibeas Priscila, Planells Benjamin, Fonseca-Balvis Noelia, Vaquero-Rey Aida, Fernandez-Gonzalez Raul, Laguna-Barraza Ricardo, Horiuchi Keiko, Gutierrez-Adan Alfonso	4. 巻 25
2. 論文標題 Zrsr2 and functional U12-dependent spliceosome are necessary for follicular development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103860 ~ 103860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.103860	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀内恵子
2. 発表標題 WTAP複合体によるオルタナティブスプライシング/ポリアデニレーション制御とG-quadruplex配列の関与、Identification of WTAP complex-regulated alternative splicing/polyadenylation reveals potential G-quadruplex-forming sequences at splice sites
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会、【ワークショップ：[3AW-07]機能性RNAネットワークによる生体恒常性の維持】
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀内恵子
2. 発表標題 Interaction of major and minor spliceosomes in regulating splicing of U12-type introns
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会、【2SP-23分子08「サイエンスピッチ4」, 2SP-23-06】
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	浜窪 隆雄  (Hamakubo Takao)  (90198797)	日本医科大学・先端医学研究所・教授    (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
スペイン	INIA			
スペイン	CRG			