

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07028

研究課題名(和文) スプライソソーム形成障害を標的とした低分子薬の探索と解析

研究課題名(英文) Investigation of small molecule compounds that target the cellular defect in spliceosome assembly and function.

研究代表者

米田 宏 (Maita, Hiroshi)

北海道大学・薬学研究院・講師

研究者番号：60431318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：スプライシング異常の原因には、イントロン側のシス変異とスプライソソーム構成因子のトランス変異、2つのタイプがあり、本研究では、トランス変異により異常を来したスプライソソームを標的とするスプライシング制御法の開発を目指した。戦略として、直接的にスプライソソームを狙うのではなく、化合物により細胞内環境を撓動させ、トランス変異によって脆弱化したスプライソソームを含む細胞を制御する戦略を考えた。そのような化合物の候補として、これまでに取得したスプライソソームのサブユニットsnRNP量を変動させうる化合物を詳細に解析し、snRNP生合成に影響する細胞内経路を明らかにしつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患原因となる遺伝子発現機構の異常が多数報告されているが、重要なメカニズムであるほど、それらの直接的な低分子化合物による制御には弊害も大きい。我々は、変異によりスプライシング機構に異常を来した細胞が脆弱となる化合物処理を探索し、より温和な条件で疾患原因となる異常細胞を排除する手法の開発を目指している。この目的のためにいくつかのユニークな活性を示す化合物の作用機序の検討を行い、これまでに知られていないタイプの作用も明らかになりつつある。これは低分子化合物の新規な利用方法にもつながるもので、スプライシング異常にとどまらないインパクトをもたらすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：There are two types of splicing abnormalities; cis intron mutations and trans mutations of spliceosomal components. In this study, we aimed to develop a method to control splicing by targeting the spliceosome weakened by trans mutations. To this end, we considered controlling cells containing abnormal spliceosomes with a trans mutation by perturbing the intracellular environment with small compounds, rather than targeting the spliceosome directly with a small compound. As candidates for such compounds, we tried to elucidate the mode of action of compounds that we had previously obtained by an activity to alter cellular snRNP levels, and we found some mechanisms that influence snRNP biogenesis or the spliceosome.

研究分野：分子生物学

キーワード：スプライソソーム スプライシング snRNP

### 1. 研究開始当初の背景

近年、骨髄異形成症候群や複数の固形がんで多くのスプライソソーム構成因子で変異や予後不良と関係する発現増加が同定され、異常なスプライソソームの活性を抑えることで疾患の増悪抑制につながる治療法が考えられている<sup>1-3</sup>。一方で、スプライシングは真核生物の遺伝子発現に必須の過程であることに加え、スプライソソームが 100 種を超える構成因子からなる巨大な複合体であり、しかもイントロンごとにアクセサリ分子の必要性が変わること、恒常的構成因子でもスプライシング反応の過程で入れ替えが起こるなど、反応全体での各因子の働きが複雑であるため<sup>4,5</sup>、スプライソソーム活性制御には多くの課題がある。スプライソソームの恒常的構成因子に結合する化合物は影響が広範囲にわたり、変異の有無に関わらず正常細胞にも働くことで副作用も強いことが予想される。また、スプライソソームの巨大さ故に、1つの低分子化合物でスプライソソーム全体の活性をオン、オフできる可能性は低く、特定の化合物は、その効果として固有のイントロン群のスプライシングを変動させることが考えられる<sup>6</sup>。つまり、変異を含む異常スプライソソームだけを狙う場合でも、特定の遺伝子のスプライシング制御を目的とした場合でも、スプライソソームを標的とする低分子化合物の応用には困難が予想される。

スプライソソームを標的とした治療薬には、関連する疾患が多いこともあり注目されているが、このようなアプローチの難しさもあり、現在承認されたスプライシングを標的とした薬は特定のイントロン配列に結合してスプライシングを改変する核酸医薬や、スプライソソームと pre-mRNA 複合体に結合してスプライシングを誘導する化合物など、特定のシス変異を含む mRNA を標的とした遺伝性疾患治療薬のみであり、異常なスプライソソームを標的として合成致死などの相乗効果を誘導する薬物は存在しない。

### 2. 研究の目的

真核生物の場合、ほぼすべての遺伝子がイントロンを含み、かつその平均のイントロン数が 7 を超えることから、全ての転写産物を翻訳可能な正常な mRNA に変換するためには、膨大な量のスプライソソームを細胞は準備する必要がある。スプライソソームはサブユニットである 5 種類の snRNP と呼ばれる低分子 RNA を骨格としたタンパク質複合体が各イントロンごとに集合して形成されるため、十分なスプライソソームを形成するには細胞は、各 snRNP を常に大量に用意する必要がある<sup>4,5</sup>。実

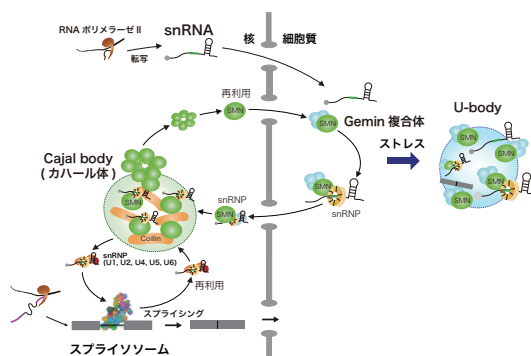


図 1. スプライシングと snRNP 生合成経路

際、snRNP は多いもので 1 細胞あたり 100 万個も存在すると見積もられている。この snRNP 量が必要なレベルにない場合は、イントロンによってはスプライシングの kinetics が変わることによってスプライシングパターンに影響し、必要な遺伝子産物の発現が妨げられる。つまり、スプライソソームの活性が必要十分に発揮されるためには、単純に構成因子の配列が正常であるだけでなく、その合成量も正常な範囲にあることが必要である。

申請者らは、スプライソソームの活性調節を行う方策として、複合体そのものを低分子化合物で狙うのではなく、細胞内で産生されるスプライソソーム量を調節すれば、細胞ごとのスプライソソームの必要量との兼ね合いで、不安定で脆弱なスプライソソームを持つスプライソソーム変異細胞や、がん細胞のように転写が活発化して多量のスプライソソームを必要とする細胞に特異的にスプライソソームの減少効果を出せると考えた。そこで、スプライソソームの生合成経路を標的としてスプライシング調節を可能とするような低分子化合物の探索と評価を目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

申請者のグループではこれまでに細胞内 snRNP 量を検出するレポーター遺伝子を構築して、その変動を指標とした化合物ライブラリーのスクリーニングを行ってきた<sup>7,8</sup>。スクリーニングで得られたヒット化合物については、有用な化合物を絞り込むために、snRNP やスプライシングと関連した観察系を用いて二次スクリーニングを行った。その中で、snRNP 生合成経路で重要な役割を果たすことが知られている核内構造体カハール体の構成因子 Coilin を本来の局在部位であるカハール体から核内全体に分散させる活性を示す化合物や、snRNP 生合成のシャペロン分子 SMN の局在を変化させる化合物が得られていた。さらにスプライソソームが認識するイントロン内の配列であるスプライス部位に変異を導入すると、変異部位でのスプライシングが起こらなくなるが、そのような変異スプライス部位を含むレポーター遺伝子を用いて、そのスプライシングを回復させる化合物も取得することができた<sup>6</sup>。これまでは変異スプライス部位でのスプライシング停止を回避する化合物の作用機序にフォーカスして研究を進めてきたが、本研究ではその研究に加えて、それ以外の上記の様々な snRNP 生合成関連分子の局在を変化させる化合物について、それらがどのような機序で作用するのか、snRNP 生合成経路の外部刺激との応答性とい

う観点から検討した。

snRNP 生合成経路は大量の snRNP 形成を賄う必要があるにも関わらず、その経路はとても複雑で、snRNP の骨格となる低分子 RNA “snRNA” は転写後に一旦細胞質に輸送され、細胞質でキャップ構造のハイパーメチル化やいくつかの結合タンパク質を得て核内に戻るといった一見無駄な過程を経ることが知られている (図 1)。しかも、この多くのステップからなる snRNP 生合成が細胞の内部環境や外部刺激とどのように接続されているかについてはほとんど知見がなく、我々の化合物群の作用機構の解析は、snRNP 生合成経路の基礎的な側面の解明にも資することが期待された。

#### 4. 研究成果

##### (1) 変異スプライス部位でのスプライシングを回復させる化合物の作用機序解析

これまでに BAY61-3606 が 3' スプライス部位に変異を含むイントロンが通常ではスキップされ使用されなくなるのを回避して、変異があるにも関わらずスプライソソームに認識されてスプライシングを起こすようになることを発見していた。本研究期間では BAY61-3606 のスプライシング調節の対象となるトランスクリプトーム全体のイントロンの解析を行い、レポーター遺伝子のスプライシング調節のメカニズムについて考察し、論文として報告した。また、BAY61-3606 は、転写とスプライシングを共役する足場となる RNA ポリメラーゼ II の C 末端部のリン酸化酵素である CDK9 の阻害活性が報告されていた。これまでの報告で CDK9 の活性抑制は RNA ポリメラーゼ II の C 末端部のリン酸化低下を引き起こし、転写伸長速度の低下を誘導し、スプライソソームによって認識されることになる塩基配列がポリメラーゼの外部に露出される速度も低下するために、通常はスプライソソームによる認識確率が低いスプライス部位であっても、後続の認識強度の高い競合するスプライス部位が露出してこないために、使用される頻度が上昇することが知られていた<sup>9,10</sup>。そのため、BAY61-3606 同様の効果がある他の CDK9 阻害剤にもあると考えレポーター遺伝子のスプライシングへの影響を検討したところ、実際にいくつかの阻害剤で有効性を確認できたが、そのレベルは化合物によって異なっていた。また、最近 CDK9 については活性抑制だけでなく、molecular glue と呼ばれる分解を誘導する低分子化合物 THAL-SNS も報告されており<sup>11</sup>、これもアウトプットとして CDK9 の活性を低下させることには変わりはないため同様の検討を行ったところ、やはりレポーター遺伝子のスプライシングを回復させたがその回復度合いは BAY61-3606 と比べて低いものであった。THAL-SNS は十分に CDK9 タンパク質の分解を誘導していたことから、BAY61-3606 と THAL-SNS を同時に処理したところ、BAY61-3606 の効果は抑えられ、レポーター遺伝子のスプライシング回復は THAL-SNS のレベル以下に低下した (図 2)。このことは、BAY61-3606 のスプライシングへの効果が十部に発揮されるには、化合物が結合した CDK9 タンパク質自体が存在する必要性を示していると考え、現在 BAY61-3606 が結合した状態での CDK9 複合体構成因子の同定を行っている。

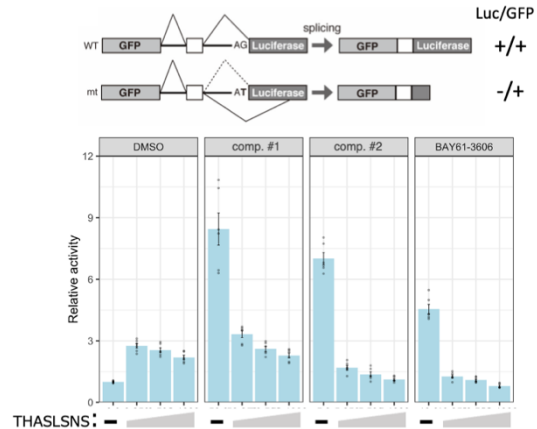


図 2. スプライシングレポーターの構造と THALSNS と BAY61-3606 の併用効果

##### (2) U-body 形成を誘導する化合物の解析

snRNP 量の検出レポーターで得られたヒット化合物が示した特徴的な活性の 1 つは U-body の誘導であった (図 3)。U-body は snRNA が細胞質で集積した構造体で (snRNA がウリジンを多く含むため U snRNA と呼ばれていてそれが蓄積するため U-body となった)、元はハエの卵巣で見つかるが、その構造体が栄養飢餓時に誘導されること、哺乳動物細胞でも栄養飢餓や細菌感染で誘導され、その誘導はキャップ依存性翻訳開始の抑制と相関することが示されている<sup>12-14</sup>。我々の化合物も翻訳抑制活性を示す可能性が考えられ、翻訳活性をいくつかのアッセイ系で検討したところ、生細胞での翻訳活性は化合物処理後 1 時間で低下していくことが示された。一方で、化合物を *in vitro* 翻訳系に加えても翻訳は阻害されなかったため、この化合物の翻訳抑制効果はリボソームや eIF などの翻訳開始段階のコア因子に対するものではないことが明らかになった。この化合物による U-body 誘導過程を可視化するために、SMN とともに snRNA に結合して snRNP 形成のシャペロンとして機能する Gemin 複合体の 1 つ Gemin5 に GFP をノックインした細胞を作成し、ライブイメージングで化合物効果を観察したとこ

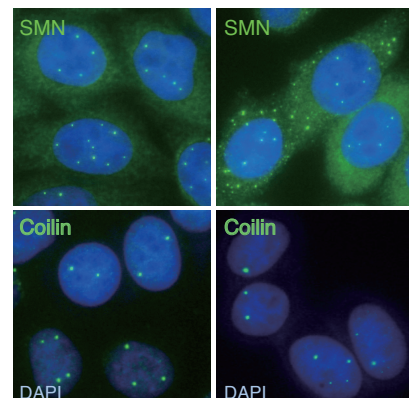


図 3. 化合物で誘導した U-body 構造

ろ、U-body が生じる過程や、U-body が融合する過程を観察することに成功した。このことはU-body の形成にも、非膜オルガネラを形成する原理として近年精力的に研究されている液-液相分離が関わることを示唆している。また、これまでの固定細胞の観察で、未処理の細胞でも U-body がごく一部の細胞で観察されることに気づいていたが、ライブイメージングでそれが細胞分裂直後の細胞に誘導され、短時間で消える構造体であることが明らかとなった。Gemin 複合体がストレスと関係なく細胞周期に依存して細胞質で似た形態の構造体を形成することはこれまで知られておらず、現在その観察結果を論文報告すべくまとめている。

本研究期間での代表的な研究成果は上記の通りであるが、この他にも複数の化合物をツールとして snRNP 生合成経路が細胞内外の環境変化にどのように応答するか検討しており、いろいろな細胞内プロセスと snRNP 生合成のリンクが明らかになりつつある。これらは低分子化合物によって強い摂動を与えることで初めて観察可能になっているが、実際には、細胞は snRNP 生合成を通常の生活の中での様々な刺激と連動させて、必要なレベルのスプライシング活性を維持していることが予想され、こうしたツール化合物を用いた基礎的知見から異常なスプライソソーム活性を示す細胞に対処する方策につながることを期待している。

## 引用文献

1. Niño, C. A., Scotto di Perrotolo, R. & Polo, S. Recurrent Spliceosome Mutations in Cancer: Mechanisms and Consequences of Aberrant Splice Site Selection. *Cancers* 14, (2022).
2. Yang, H., Beutler, B. & Zhang, D. Emerging roles of spliceosome in cancer and immunity. *Protein Cell* 13, 559–579 (2022).
3. Eymin, B. Targeting the spliceosome machinery: A new therapeutic axis in cancer? *Biochem. Pharmacol.* 189, 114039 (2021).
4. Wilkinson, M. E., Charenton, C. & Nagai, K. RNA Splicing by the Spliceosome. *Annu. Rev. Biochem.* 89, 359–388 (2020).
5. Wan, R., Bai, R., Zhan, X. & Shi, Y. How Is Precursor Messenger RNA Spliced by the Spliceosome? *Annu. Rev. Biochem.* 89, 333–358 (2020).
6. Tomita, K., Nakagawa, S., Ariga, H. & Maita, H. BAY61-3606 Alters snRNP Composition and Enhances Usage of Suboptimal Splice Acceptor Site. *Biol. Pharm. Bull.* 46, 147–157 (2023).
7. Maita, H., Tomita, K. & Ariga, H. A split luciferase-based reporter for detection of a cellular macromolecular complex. *Anal. Biochem.* 452, 1–9 (2014).
8. Chiba, M., Ariga, H. & Maita, H. A splicing reporter tuned to non-AG acceptor sites reveals that luteolin enhances the recognition of non-canonical acceptor sites. *Chem. Biol. Drug Des.* 87, 275–282 (2016).
9. Ip, J. Y. et al. Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation. *Genome Res.* 21, 390–401 (2011).
10. Hu, Q. et al. Inhibition of CDK9 activity compromises global splicing in prostate cancer cells. *RNA Biol.* 18, 722–729 (2021).
11. Olson, C. M. et al. Pharmacological perturbation of CDK9 using selective CDK9 inhibition or degradation. *Nat. Chem. Biol.* 14, 163–170 (2018).
12. Liu, J.-L. & Gall, J. G. U bodies are cytoplasmic structures that contain uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins and associate with P bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11655–11659 (2007).
13. Buckingham, M. & Liu, J.-L. U bodies respond to nutrient stress in *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* 317, 2835–2844 (2011).
14. Tsalikis, J. et al. Intracellular Bacterial Pathogens Trigger the Formation of U Small Nuclear RNA Bodies (U Bodies) through Metabolic Stress Induction. *J. Biol. Chem.* 290, 20904–20918 (2015).

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Osamu Takahashi, Mayuko Tanahashi, Saori Yokoi, Mari Kaneko, Kaori Yanaka, Shinichi Nakagawa, Hiroshi Maita	4. 巻 27
2. 論文標題 The cell type-specific ER membrane protein UGS148 is not essential in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 43-60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12910	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenji Tomita, Shinichi Nakagawa, Hiroyoshi Ariga, Hiroshi Maita	4. 巻 46
2. 論文標題 BAY61-3606 Alters snRNP Composition and Enhances Usage of Suboptimal Splice Acceptor Site	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 147-157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b22-00471	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米田 宏
2. 発表標題 天然物を用いたsnRNP形成機構の解明
3. 学会等名 第23回天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大峽咲希、中川真一、米田 宏
2. 発表標題 SMNタンパク質のプロリン異性化によるCajal bodyとGem形成の制御機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米田 宏
2. 発表標題 CDK9阻害剤のスプライシング調節メカニズムの解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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

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