

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790056

研究課題名（和文）網膜色素変性症を引き起こすスプライソソーム生成経路の異常とその調節機構の解明

研究課題名（英文）A study to elucidate how AdRP-associated mutations in splicing factors affect the spliceosome formation pathway

研究代表者

米田 宏（ MAITA HIROSHI ）

北海道大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号：60431318

研究成果の概要（和文）：優性遺伝型の網膜色素変性症(AdRP)では網膜での光受容シグナルに直接働く遺伝子だけでなく、pre-mRNA スプライシングを行う巨大 RNA-タンパク質複合体であるスプライソソームの構成因子にも複数の原因遺伝子変異が同定されているが、その発症機構は不明である。本研究ではスプライソソーム量を簡便に検出する実験系を構築し、細胞内のスプライソソーム形成経路に及ぼす AdRP 原因変異の影響とその調節機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Although autosomal dominant retinitis pigmentosa (AdRP) is a tissue specific disease, disease associated mutations were found in several constitutive splicing factors consisting the spliceosome as well as genes in photo signal transduction pathway. To elucidate the mechanism how abnormality of general splicing factors triggers AdRP, we tried to detect the effect of the mutations on the cellular spliceosome levels using a newly developed reporter. The reporter experiment suggested that the cell may regulate the spliceosome level to adjust the surrounding environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：分子生物学、pre-mRNA スプライシング

1. 研究開始当初の背景

pre-mRNA スプライシングはDNAから転写されたpre-mRNAのイントロンを除去し、エキソンをつないでmRNAを産生する反応である。この反応を担う巨大複合体スプライソソームは5種類のサブユニットに分けられ

る。各サブユニットはそれぞれに特異的な核内低分子RNAとそのRNAに結合するタンパク質群からなり、U1、U2、U4、U5、U6 snRNP（スナープ）と呼ばれる。スプライソソームはこの各snRNPがpre-mRNA上でスプライシング反応に沿って集合・分離することで機

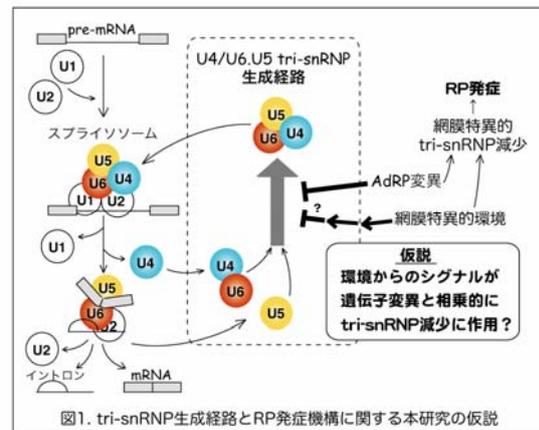
能する動的な複合体の総称である¹。スプライソソームの触媒活性に重要なU5、U6 snRNPはU4/U6、U5 tri-snRNP(トリスナー)複合体として供給される(図1)。従って、U4/U6、U5 tri-snRNPが不足するとスプライシングが滞り細胞機能に支障が生じると予想される。事実、網膜視細胞死による視覚障害を起こす優性遺伝型網膜色素変性症(AdRP)では10%にtri-snRNP因子(Prp3、Prp31、Prp8)に原因変異が認められ、最近新たにBrr2遺伝子にも原因遺伝子変異が報告された²。いずれの原因変異においてもtri-snRNP生成経路の異常に伴うtri-snRNPの減少が細胞機能を破綻させていると推定されるが、tri-snRNP減少がどのように網膜特異的疾患を引き起こすかは不明であり、その機構が注目されている。

2. 研究の目的

我々は細胞増殖・生存シグナルに機能するPim-1 kinaseの結合因子として新規遺伝子PAP-1を単離し解析を行ってきた³。興味深いことに、近年AdRP原因変異がPAP-1遺伝子に同定された⁴。我々はPAP-1がスプライシング調節能を持つこと、またPAP-1がAdRP原因遺伝子であるtri-snRNP因子のPrp3と結合して一部がtri-snRNPに含まれることから、PAP-1が第4のスプライシング関連AdRP原因遺伝子であると考えている⁵。さらにPim-1によるリン酸化調節がPAP-1のスプライシング調節能を変化させる結果がこれまでに得られている。一方、最近他からも相次いでtri-snRNP因子のリン酸化やユビキチン化による機能調節の存在が報告された^{6,7}。これらの知見から申請者は、tri-snRNP異常による網膜特異的細胞死は遺伝子変異によるtri-snRNP減少に網膜特異的シグナル伝達が相乗的に作用するためと推測した。従って、tri-snRNP量を減少、もしくは増加させるシグナル分子を同定することはスプライシング因子の異常が原因で発症するAdRP治療および予防の手がかりになると予想される。そこで本研究では、その詳細がほとんど不明である動物細胞のシグナル伝達によるtri-snRNP調節機構の解明に取り組み、調節因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

これまでのtri-snRNP研究の多くは出芽酵母の遺伝学的解析によるものであり、スプライソソームやtri-snRNPが真核細胞の遺伝子発現に必須の複合体であるにもかかわらず、こ



れらのシグナル伝達経路による調節という観点からの研究はほとんど成されていない。

tri-snRNP研究が進展していない原因は適切な手法の欠如にもあると考えられる。スプライソソームも巨大なRNA-タンパク質複合体であるが、tri-snRNPも25Sとい十分に巨大であり、その検出には通常の生化学的手法を複数組み合わせる必要があった。とくに従来から行われてきたtri-snRNP検出法は複合体精製とノーザンブロットを組み合わせた方法であり、実験スケールの少量化と多検体処理に難点があった。そのため、近年盛んとなっている、多数の候補遺伝子のRNAiによる遺伝子発現抑制効果による関連遺伝子の検討などができず、鍵となる分子の同定は困難であった。本研究ではこの点を克服するために新規tri-snRNP検出法を確立することを目的の一つとして据えた。

新規検出法には分割ルシフェラーゼ法を応用することを考案した。分割ルシフェラーゼ法は、ルシフェラーゼのN・C末端断片を異なる2分子に連結し、その2分子間の相互作用により再構成されるルシフェラーゼ活性で相互作用を定量する(図2)^{8,9}。tri-snRNP特異的タンパク質は15種類知られ、tri-snRNPでのみ相互作用する分子ペアも存在する¹⁰。本手法ではそのような分子ペアを利用し、tri-snRNP生成時にのみ再構成され

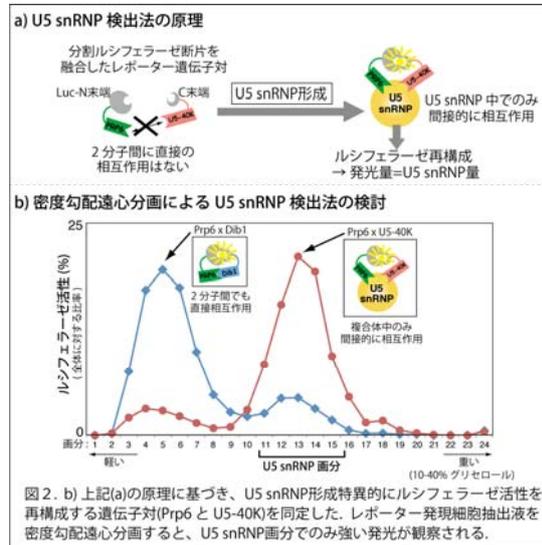
るルシフェラーゼ活性により tri-snRNP を定量する(図2)。本研究ではこの原理に基づいたレポーター系を確立し、様々な細胞内経路の阻害剤として知られている低分子化合物を処理した際の細胞内の snRNP の動態を検討した。

4. 研究成果

分割ルシフェラーゼを用いた snRNP 検出レポーター系を作成するためにまず、各遺伝子をルシフェラーゼ断片と接続した発現ベクターライブラリーを作成し、タンパク質間相互作用によりルシフェラーゼ活性が再構成される遺伝子ペアを探索した。その結果、予定していた tri-snRNP だけでなく、U4/U6 snRNP や U5 snRNP というスプライソーム形成の前段階の各ステップの複合体中でのみ発光する遺伝子ペアも得られた。これが本研究から得られた大きな成果の一つである。

このレポーター系の中でもとくに U5 snRNP を特異的に検出するレポーターの概要を図2で説明している。図に示したように細胞抽出液をグリセロール密度勾配で分画すると、複合体中でのみ発光する遺伝子ペアではルシフェラーゼ活性が複合体が分離される画分でのみ発光が検出される。また、この U5 snRNP を検出するレポーターを用いた実験で、プロテアソームやカルパインなどの阻害剤として知られる MG132 処理により、U5 snRNP が約 50%にまで減少することを見いだした。この現象はレポーターによる確認だけではなく、内在性の U5 snRNP においても同様の変化が起きていることが生化学的手法を用いて確認されつつある。一方で、ActD のような転写阻害剤で細胞を処理するとスプライシング反応の基質となる pre-mRNA が減少するためか、スプライソームの前駆体である tri-snRNP が蓄積することが観察され、この際に tri-snRNP のさらに前段階にある U5 snRNP においてもレポーター活性が上昇することが示された。このことから本研究で作成したレポーターが細胞内の snRNP 動態を反映していることを示唆している。MG132 による U5 snRNP の減少が細胞内のどのような状況と関係した

ものかはいまだ不明であるが、スプライソームを構成する snRNP レベルが細胞の状況によって変動しうことは非常に興味深い。現在この現象がどの経路の阻害によって起こるのか、そのような構成因子の変化が原因であるのかを引き続いて調べている。また、U5 snRNP のレポーター系を用いて 20 種以



上の低分子阻害剤処理の効果を1時間と6時間処理で検討したところ、MG132やActD以外の多くの阻害剤では影響がほとんど見られないことが明らかとなった。このことはスプライソームの細胞内量はばらつきが小さいことを示しており、MG132処理によるレポーター活性の減少が意味のあるものである可能性を示しており興味深い。

他の snRNP の検出系については十分な検討はまだ終わっていないものの、RP 遺伝子変異の導入がそのルシフェラーゼ活性を低下させることが確認でき、このレポーターの本来の目的の一部も達成できつつある。このように本研究で確立した手法はスプライソームの細胞内動態に及ぼす遺伝的変化や環境変化の影響を検討することができることが示され、さらに snRNP が細胞内で変動する条件をいくつか同定することができたのは今後の研究の進展に非常に重要な成果である。今後はどのような状況で細胞がスプライソーム量を調節する必要があるのか、またその経路を含めて全貌を明らかにすべく継続して研究を進めていく。

参考文献

1. Staley J. P. and Guthrie C. *Cell* (1998) 92:315-326.

なし

2. Zhao C., Bellur D. L., Lu S., Zhao F., Grassi M. A., Bowne S. J., Sullivan L. S., Daiger S.P., Chen L. J., Pang C. P., Zhao K., Staley J. P. and Larsson C. *Am. J. Hum. Genet.* (2009) 85:617-27.
3. Maita H., Harada Y., Nagakubo D., Kitaura H., Ikeda M., Tamai K., Takahashi K., Ariga H. and Iguchi-Ariga S. M. *Eur. J. Biochem.* (2000) 267:5168-5178.
4. Keen T.J., Hims M. M., McKie A. B., Moore A. T., Doran R. M., Mackey D. A., Mansfield D. C., Mueller R. F., Bhattacharya S. S., Bird A. C., Markham A. F. and Inglehearn C. F. *Eur. J. Hum. Genet.* (2002) 10:245-249.
5. Maita H., Kitaura H., Keen T. J., Inglehearn C. F., Ariga H. and Iguchi-Ariga S. M. *Exp. Cell Res.* (2004) 300:283-296.
6. Maita H., Kitaura H., Ariga H. and Iguchi-Ariga S. M. *Exp. Cell Res.* (2005) 302:61-68.
7. Mathew R., Hartmuth K., Möhlmann S., Urlaub H., Ficner R. and Lührmann R. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2008) 15:435-443.
8. Bellare P., Small E. C., Huang X., Wohlschlegel J. A., Staley J. P. and Sontheimer E. J. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2008) 15:444-451.
9. Ozawa T., Kaihara A., Sato M., Tachihara K. and Umezawa Y. *Anal. Chem.* (2001) 73:2516-2521.
10. Paulmurugan R. and Gambhir S. S. *Anal. Chem.* (2005) 77:1295-1302.
11. Liu S., Rauhut R., Vornlocher H. P. and Lührmann R. *RNA* (2006) 12:1418-1430.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- 1) Spliceosome discards intermediates via the DEAH box ATPase Prp43p. Mayas R. M., Maita H., Semlow D. R. and Staley J. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2010) 107:10020-5. (査読有り)

[学会発表] (計2件)

- 1) Detection of free U5 snRNP levels in living cells Maita, H. and Ariga, H. 平成22年12月10日 第32回日本分子生物学会年会(神奈川県)
- 2) Split Luciferase を応用した新規U5 snRNP検出法の確立 Maita, H. and Ariga, H. 平成21年7月28日 第11回日本RNA学会年会(新潟県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米田 宏 (MAITA HIROSHI)
北海道大学・大学院薬学研究院・講師
研究者番号：60431318

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者