

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22657050

研究課題名（和文）選択的スプライシングを制御する核内微小時間場のバイオプローブを用いた解析

研究課題名（英文）Analyses on the nuclear structures regulating the alternative splicing spatiotemporally using bioprobes

研究代表者

谷 時雄（TANI TOKIO）

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：80197516

研究成果の概要（和文）：

真核細胞の核内は、多数の核内構造体によって高度に区画化された空間である。遺伝子発現は、核スペckルなどの核内構造体によって形成される微小核内空間場を介した制御を受ける。本研究では、放線菌培養上清から分離した核スペckル形成阻害化合物をバイオリジカルプローブに用いて、核内構造体を介して選択的スプライシングや mRNA 核外輸送などの転写後遺伝子発現が如何に制御されるか、その時空間的な場による制御機構を解明した。

研究成果の概要（英文）：

In eukaryotic cells, the nucleus is highly compartmentalized with dozens of nuclear structures. Gene expression in the eukaryotic cells is co-ordinately regulated via those nuclear structures. In this study, we analyzed the mechanisms of the post-transcriptional regulation of gene expression, such as alternative splicing and nuclear mRNA export, conducted spatiotemporally via the nuclear structures, using the compounds isolated from cultures of the actinomycetes, which inhibit the formation of the nuclear structures, as biological probes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	0	1,100,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	540,000	3,440,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：遺伝子発現制御・核内構造・バイオプローブ・選択的スプライシング・mRNA 核外輸送

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の核内は、クロマチンのみが均一に存在する空間ではなく、核小体、PML ボディ、Cajal ボディ、GEM、核スペckルなど十数種類にも及ぶ核内構造体が存在する高度に区画化された空間である。それらの核構

造体のうち、核スペckルは選択的スプライシングの制御に関わる SF2、SC35、hnRNP1 など、多数のスプライシング因子や輸送因子などが集積化することにより形成され、それら因子群の貯蔵部位（本体領域）や、スプライシング反応部位（周辺領域）としての機能

が考えられている (Lamond & Spector, 2003)。

選択的スプライシングの制御には、特異的因子が関与する場合もあれば、各種スプライシング制御因子 (SF2 や SC35 など SR タンパク質とそれらの拮抗因子 hnRNP A1 など) の量比が大きな役割を果たす場合もある。例えば、スプライシング反応が行われている核内微小空間において SF2 が多く存在すると、エクソン内の splicing enhancer 配列に SF2 が結合する確率が高まり、そのエクソンのスキッピングが抑制される。即ち、成熟 mRNA にそのエクソンが含まれる方向に反応が進む。核内反応部位でのスプライシング因子濃度は、核スペckルにける各因子の集積と分散によって制御されていると考えられる。従って、細胞核内でスプライシング反応が行われる微小空間場の様態は、スプライシング反応の制御に重要な観点である。

現在までの様々な解析結果から、スプライシング反応は、核内構造体である核スペckルの内部及び周辺部における微小空間で行われていると考えられている。核スペckルは極めて動的な構造体で、その形態や大きさ、核内で形成される数は、遺伝子の転写活性や細胞周期などによって大きく変化する。核スペckルに局在する様々なスプライシング因子や転写因子群は、FLAP 解析の結果から、数十秒のタイムスケールで外部と入れ替わっていることが示されており、極めてダイナミックで流動的な構造体である。従って、核スペckル及びそれらの周辺部領域は、構成因子群の自己集積、もしくは noncoding poly A⁺ RNA 等を集積基盤として、多くの因子群が迅速に出入りする微小空間場となっており、その限られた空間における制御因子群の時空間的濃度変化は、選択的スプライシングの制御につながる重要な環境的側面となっていると考えられる。しかしながら、それら微小空間への因子群の流入や流出、局在の制御など、時空間的な場の制御機構は、研究開始時点において十分に解明されていない状況であった。

2. 研究の目的

真核細胞の核内は、多数の核内構造体によって高度に区画化された空間である。遺伝子の転写やスプライシングなどの反応は、核スペckルや PML ボディなどによって形成される微小核内空間 (場) と密接に連携して進行する。本研究は、これらの核内構造体構築に影響を与える、放線菌培養から分離した天然阻害化合物をバイオロジカルプローブに用いて、核内構造体を基盤に様々な因子が出入りして形成される微小空間場によって、転写後遺伝子発現、特に選択的スプライシングが如何に制御されるか、その時空間的な場による制御機構を解明することを目的に実施し

た。研究実施期間内で、核内微小空間場の形成による、転写後遺伝子発現制御という概念を確立することを目指した。

3. 研究の方法

SC35 は、選択的スプライシングにおいて SF2 と協調的/拮抗的な活性をもつ因子であり、通常は、核全体及び核スペckルに局在する。1870-14a (トヨカマイシン) は、核スペckルに SF2 や SC35 を過剰集積 (肥大化) させ、Clk 遺伝子のエクソンスキッピングを抑制する活性をもつ。SF2 の核内分布はリン酸化によって制御されていることが報告 (Stamm, 2008) されているので、トヨカマイシンのリン酸化酵素に対する効果を、*in vitro*、*in vivo* 系によって解析した。核スペckルへのスプライシング因子集積変化 (核内微小空間濃度変化) による、核質と核スペckル領域におけるスプライシング因子の相対濃度変化を明らかにし、選択的スプライシング制御への関連を解明する。平行して、化合物の標的タンパク質の同定と解析を行った。

また、各阻害化合物で処理した細胞より全 RNA を抽出し、全遺伝子 (全エクソン) の選択的スプライシングをゲノムスケールで解析可能な Affimetrix 社製エクソンマイクロアレイ (GeneChip exon array など) を用いて、どのような遺伝子 (エクソン) の選択的スプライシングに化合物が影響を与えるか、網羅的に解析した。次に、同定した遺伝子群について、統計的相互比較検討を行い、シス制御配列の分布等を解析した。

4. 研究成果

核内構造体 (核スペckル) を肥大化する化合物として放線菌培養上清から同定したトヨカマイシンは、スプライシング因子のリン酸化 kinase を阻害 (ATP との結合拮抗阻害) することにより、核スペckルへのスプライシング因子の集積を促進し肥大化をもたらすことが、*in vitro* でのリン酸化反応阻害実験、及びリン酸化 SR タンパク質特異的抗体を用いた *in vivo* 解析実験で示された。Clk kinase などのスプライシング因子特異的リン酸化 kinase を抑制することにより、SF2 等スプライシング因子のリン酸化が抑制され、核スペckルへのスプライシング因子の集積を促進し核スペckル肥大化をもたらすことが示された。

一方、核スペckルを分散化させるツベルシジンは、スプライシング因子の核スペckル局在に必須な non-coding RNA (MALAT1 RNA) に取り込まれ、その分解を促進することで、核スペckルからのスプライシング因子 SF2 の分散化を惹起している可能性が示唆された。

また、これら二種類の阻害化合物処理によって引き起こされる核スペックルの変化（集積と分散化）による選択的スプライシングへの影響を解析し、Clk 遺伝子においては、核スペックルへのスプライシング因子の集積（トヨカマイシン処理）によって選択的 exon inclusion が、核スペックルからのスプライシング因子分散（核質濃度上昇、ツベルシジン処理）によって、選択的 exon skipping が引き起こされることが示唆された。

一方、核スペックルを分散化させるツベルシジンは、Clk などスプライシング因子リン酸化酵素の阻害活性がトヨカマイシンに比較して強くなかったことから、転写阻害剤を用いた解析を行い、ツベルシジンがスプライシング因子の核スペックル局在に必須な non-coding RNA (MALAT1 RNA) に取り込まれ、MALAT1 RNA の分解を促進することで、核スペックルからのスプライシング因子 SF2 の分散化を惹起している可能性を支持する結果を得た。

さらに、exon array 解析を行い、ゲノムワイドにこれら二種類の阻害化合物が選択的スプライシングに与える遺伝子群を同定した。それら候補遺伝子（エキソン）グループの塩基配列情報を基に統計的解析を行い、トヨカマイシンにより選択的スプライシングが影響を受けるエキソンには、SF2 結合配列の分布に特徴的な偏りがあることが示された。

興味深いことに、トヨカマイシンは、選択的スプライシングへの影響に加えて、一部の成熟 mRNA に対して、核から細胞質への核外輸送も阻害することが判明した。SF2 はスプライシング反応に加えて、mRNA 核外輸送においてもアダプター因子としても機能していることから、トヨカマイシンによる SF2 のリン酸化阻害により、mRNA 核外輸送の阻害が生じた可能性が考えられた。更に、RIP assay の結果から、トヨカマイシンは SF2 と核外輸送因子 TAP の相互作用に影響を及ぼして核外輸送阻害を引き起こしている可能性が示された。

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 11 件）

① Visual screening for the natural compounds that affect the formation of the nuclear structures.

Kaya Shigaki, Kazuaki Tokunaga, Yuki Mihara, Yota Matsuo, Yamato Kojimoto, Hiroaki Yagi and Tokio Tani. *In Chembiomolecular Science: at the Fronteir of Chemistry and Biology*, Springer,

183-192 (2012). 査読なし

② Characterization of the *ptr5⁺* gene involved in nuclear mRNA export in fission yeast.

Nobuyoshi Watanabe, Terumasa Ikeda, Fumitaka Mizuki and Tokio Tani. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 69, 1197-1204 (2012). 査読有り

③ Role of the RNA-binding protein Nrd1 in stress granule formation and its implication in the stress response in fission yeast.

Ryosuke Satoh, Akitomo Tanaka, Yhako Kita, Takahiro Morita, Yasuhiro Matumura, Nanae Umeda, Sachiko Hayashi, Tokio Tani, Kaori Shinmyozu and Reiko Sugiura. *PLoS ONE*, 7(1) :e29683 (2012).

査読有り

④ Diverse functions of nuclear non-coding RNAs in eukaryotic gene expression.

Madoka Chinen and Tokio Tani. *Frontiers in Bioscience*, 17, 1402-1417 (2012).

査読有り

⑤ スプライシング因子 SF2 の核スペックル局在化阻害化合物の解析。八木浩亮、黒木優太郎、松尾陽太、江藤俊志、徳永和明、萩原正敏、五十嵐雅之、谷時雄。ケミカルバイオロジー、5(1)、3-6 (2012).

査読なし

⑥ Dynamic association/dissociation and harboring of endogenous mRNAs in stress granules. Junwei Zhang, Kohki Okabe, Tokio Tani and *Takashi Funatsu.

J. Cell Sci., 124, 4087-4095 (2011).

査読有り

⑦ *EGDI* (β -NAC) mRNA is localized in a novel cytoplasmic granule in *Saccharomyces cerevisiae*.

Sachiko Hayashi, Tomoko Andoh and Tokio Tani. *Genes to Cells*, 16(3), 316-329 (2011). 査読有り

⑧ Real time monitoring of endogenous cytoplasmic mRNA using linear 2'-O-methyl RNA probes in living cells.

Kohki Okabe, Yoshie Harada, Junwei Zhang, Hisashi Tadakuma, Tokio Tani and Takashi Funatsu. *Nucleic Acids Res.*, 39(4), e20 (2011). 査読有り

⑨ Involvement of the spliceosomal U4 snRNA in heterochromatic gene silencing at fission yeast centromeres.

Madoka Chinen, Misato Morita, Kazuhiro Fukumura and Tokio Tani.

J. Biol. Chem., 285, 5630-5638 (2010).

査読有り

⑩Critical role of Pcid2 in B cell survival through the regulation of MAD2 expression. Teruo Nakaya, Kazuhiko Kuwahara, Kazutaka Ohta, Masahiro Kitabatake, Teppei Toda, Naoki Takeda, Tokio Tani, Eisaku Kondo and Nobuo Sakaguchi. *J. Immunol.*, 185, 5180-5187 (2010).

査読有り

⑪A novel ER J-protein DNAJB12 accelerates ER-associated degradation of membrane proteins including CFTR. Yo-hei Yamamoto, Taiji Kimura, Shuku Momohara, Masato Takeuchi, Tokio Tani, Yukio Kimata, Hiroshi Kadokura and Kenji Kohno. *Cell Structure and Function*, 35, 107-116 (2010).
査読有り

[学会発表] (計 25 件)

①核スペックル及び選択的スプライシングに影響を及ぼす天然化合物の解析。

黒木優太郎、八木浩亮、松尾陽太、三原由揮、鈴木仁、萩原正敏、五十嵐雅之、谷時雄。第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場 (福岡)

②核スペックル形成に影響を及ぼす抗癌化合物の解析。阿多晃平、志柿花矢、三原由揮、五十嵐雅之、谷時雄。第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場 (福岡)

③核スペックルの異常形成を引き起こす放線菌培養上清の解析。松山将太、豊田修吉、五十嵐雅之、谷時雄。

第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場 (福岡)

④分裂酵母を用いた mRNA 核外輸送機構の解析。北畑衣理、西村侑子、金田加奈子、谷時雄。第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場 (福岡)

⑤セントロメア由来 Satellite I RNA の染色体分離における役割。井手上賢、長裕紀子、西村佳菜子、谷時雄。第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場 (福岡)

⑥スプライシング因子 SF2 の核スペックル局在を促進する化合物 Toyocamycin の解析。八木浩亮、黒木優太郎、松尾陽太、江藤俊志、萩原正敏、五十嵐雅之、谷時雄。

第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場 (福岡)

⑦セントロメアヘテロクロマチン形成における dg ncRNA イントロンの役割。

牟田園正敏、森田京、弓掛辰洋、塚原千紘、知念まどか、中山潤一、石井浩二郎、井手上賢、谷時雄。第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場 (福岡)

⑧セントロメア dg ncRNA イントロンのスプライシング制御とヘテロクロマチン形成の関連。塚原千紘、牟田園正敏、森田京、弓掛辰洋、知念まどか、中山潤一、石井浩二郎、井手上賢、谷時雄。第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場 (福岡)

⑨選択的に mRNA 核外輸送を阻害する化合物の同定と解析。糺本大和、三原由揮、松尾陽太、前田紗希、五十嵐雅之、谷時雄。第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場 (福岡)

⑩核スペックル及び選択的スプライシングに影響を及ぼす天然化合物ツベルシジンの解析。黒木優太郎、八木浩亮、松尾陽太、三原由揮、鈴木仁、萩原正敏、五十嵐雅之、谷時雄。RNA フロンティアミーティング 2012、2012 年 9 月 20 日、メルパルク熊本 (熊本)

⑪セントロメアヘテロクロマチン形成における dg ncRNA イントロンの役割。牟田園正敏、森田京、弓掛辰洋、塚原千紘、知念まどか、中山潤一、石井浩二郎、井手上賢、谷時雄。RNA フロンティアミーティング 2012、2012 年 9 月 20 日、メルパルク熊本 (熊本)

⑫スプライシング因子 DHX38 / Prp16 の染色体分離における機能。井手上賢、西村佳菜子、長裕紀子、谷時雄。RNA フロンティアミーティング 2012、2012 年 9 月 20 日、メルパルク熊本 (熊本)

⑬核スペックル形成に影響を及ぼす抗癌化合物の解析。阿多晃平、志柿花矢、三原由輝、五十嵐雅之、谷時雄。第 7 回日本ケミカルバイオロジー学会、2012 年 6 月 7 日、京都大学百周年時計台記念館 百周年記念ホール (京都)

⑭ Novel and conserved roles of the splicing factor Prp14p RNA helicase in the noncoding RNA-mediated centromere function. Masatoshi Mutazono, Takashi Ideue, Misato Morita, Kanako Nishimura Chihiro Tsukahara, Madoka Chinen, Jun-ichi Nakayama, Kojiro Ishii and Tokio Tani. *Regulatory and non-coding RNAs*, 2012 年 8 月 31 日、Cold Spring Harbor Laboratory Grace Auditorium (New York, USA)

⑮選択的に mRNA 核外輸送を阻害する化合物の同定と解析。糺本大和、三原由揮、松尾陽太、前田紗希、五十嵐雅之、谷時雄。第 14 回 RNA ミーティング、2012 年 7 月 18 日、東北大学川内萩ホール (仙台)

⑩Characterization of Natural Compounds that Affect Nuclear Speckle Formation and Alternative Pre-mRNA Splicing in Mammalian Cells. Yutaro Kurogi, Yota Matsuo, Hiroaki Yagi, Yuki Mihara, Haruka Iwamoto, Hafize A. Demirkol, Yamato Kojimoto, Yuya Uehara, Hitoshi Suzuki, Masatoshi Hagiwara, Masayuki Igarashi, and Tokio Tani. The 22nd CDB Meeting "RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II" 2012年6月13日、理研CDB (神戸)

⑪スプライシング装置を介したセントロメアヘテロクロマチン形成の制御。牟田園正敏、森田京、弓掛辰洋、知念まどか、中山潤一、石井浩二郎、井手上賢、谷時雄。第6回日本エピジェネティクス研究会年会、2012年5月14日、学術総合センター (東京)

⑫スプライシング因子 SF2 の核スペckル局在を促進する化合物 Toyocamycin の解析。八木浩亮、黒木優太郎、松尾陽太、江藤俊志、萩原正敏、五十嵐雅之、谷時雄。第34回日本分子生物学会、2011年12月15日、パシフィコ横浜 (横浜)

⑬Screening and Characterization of Natural Compounds that Affect Nuclear Speckle Formation and Alternative Pre-mRNA Splicing in Mammalian Cells. Yota Matsuo, Yutaro Kurogi, Hiroaki Yagi, Yuki Mihara, Haruka Iwamoto, Hafize A. Demirkol, Yamato Kojimoto, Yuya Uehara, Hitoshi Suzuki, Masatoshi Hagiwara, Masayuki Igarashi, and Tokio Tani. 第34回日本分子生物学会、2011年12月15日、パシフィコ横浜 (横浜)

⑭pre-mRNA スプライシング/mRNA 核外輸送装置によるクロマチンサイレンシングの多元的制御。知念まどか、水谷文哉、牟田園正敏、弓掛辰洋、塚原千紘、森田京、谷時雄。第84回日本生化学会年会、2011年9月21日、国立京都国際会館 (京都)

⑮poly(A)⁺ RNA の核スペckル集積阻害化合物 tubercidin の解析。松尾陽太、黒木優太郎、三原由揮、萩原正敏、五十嵐雅之、谷時雄。RNA フロンティアミーティング 2011、2011年8月30日、愛知健康プラザ (名古屋)

⑯スプライシング因子の核スペckル局在に影響を与える化合物の作用解析。八木浩亮、黒木優太郎、松尾陽太、江藤俊志、萩原正敏、五十嵐雅之、谷時雄。RNA フロンティアミーティング 2011、2011年8月30日、愛知健康プラザ (名古屋)

⑰核スペckルへの poly(A)⁺RNA 局在に影響を与える化合物のスクリーニング。三原由揮、松尾陽太、豊田修吉、江藤俊志、志柿花矢、東祐子、徳永和明、五十嵐雅之、谷時雄。第33回日本分子生物学会年会、2010年12月9日、神戸国際会議場 (神戸)

⑱バイオプローブを用いた核スペckルの機能解析。松尾陽太、三原由揮、八木浩亮、東祐子、志柿花矢、豊田修吉、江藤俊志、岩本はる香、糺本大和、上原裕也、徳永和明、萩原正敏、五十嵐雅之、谷時雄。第33回日本分子生物学会年会、2010年12月9日、神戸国際会議場 (神戸)

⑲核内構造体(核スペckル)形成阻害化合物のスクリーニングと転写後遺伝子発現制御機構解析への応用。松尾陽太、三原由揮、江藤俊志、豊田修吉、徳永和明、岩本はる香、萩原正敏、五十嵐雅之、谷時雄。日本ケミカルバイオロジー学会、2010年5月19日、東京工業大学70周年記念講堂 (東京)

[その他]

ホームページ等

谷研究室ホームページ (研究成果)

<http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/bio/staff/tani/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 時雄 (TANI TOKIO)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：80197516