

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510234

研究課題名(和文)異常スプライシングRNAの網羅的同定とその意義の解明

研究課題名(英文)Comprehensive identification of abnormally spliced RNAs and elucidation of their significance

研究代表者

坂本 博 (Sakamoto, Hiroshi)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00187048

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：mRNA前駆体のスプライシング後のエキソン連結部に形成されるエキソン連結部複合体(EJC)の構成タンパク質であるY14の発現を阻害した線虫*C. elegans*では、イントロンを含むスプライシング未完了RNAが細胞質に漏出することが明らかになった。さらに、これらのスプライシング未完了RNAの中には、細胞質において小胞体タンパク質IRE-1によってプロセシングを受けるものが存在することが示唆された。以上の結果は、Y14を含むEJC中核因子がイントロンを含むRNAの核外漏出を防ぐことによって、遺伝子発現の正確性を保証するゲートキーパーとしての新規機能を持つことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In Y14(RNAi) and mag-1(RNAi) animals, unspliced tra-2 RNA is leaked to the cytoplasm and unusually spliced to tra-2s RNA by the cytoplasmic splicing enzyme IRE-1. The protein produced from tra-2s RNA acts dominant-negatively against normal TRA-2 protein because transgenic animals expressing TRA-2s protein showed germline masculinization like Y14(RNAi) animals. Interestingly, the leakage of unspliced RNA caused by the inhibition of Y14 or MAG-1 was also observed for almost all genes examined so far. Moreover, inhibition of eIF4AIII and SAP130 also caused leakage of unspliced RNA to the cytoplasm. Double RNAi analysis indicated that Y14 interacts with both SAP130 and two other splicing-related factors. These results suggest that the EJC core subunits associate with pre-mRNA and function as the gatekeeper to watch and block premature export of unspliced RNA, thereby contributing to mRNA quality control in *C. elegans*.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：mRNA品質管理 生殖細胞 エキソン連結部複合体 細胞質スプライシング

1. 研究開始当初の背景

形質発現の基本となる遺伝子発現の正確性を保証するために、異常な mRNA の産生とその発現を防ぐ異常 mRNA 産生発現抑制機構は不可欠である。これまでに知られている異常 mRNA 産生発現抑制機構としては、正確にスプライシングを受けた mRNA のみを選択的に核外輸送する機構、異常なストップコドンを持つ mRNA を分解する機構などが代表的である。哺乳類においては、どちらの機構においてもスプライシング依存的に mRNA に結合するエキソン連結部複合体(EJC)が重要な役割を果たす(Lau et al., *Curr. Biol.*, 2003)。異常 mRNA 産生発現抑制機構が機能しなくなると、異常な mRNA が発現することによって疾患等につながるものが予想される。実際に、ヒトの癌細胞において通常のスプライス部位(GU-AG)とは全く異なる部位で切断・結合される異常スプライシングが起こることが知られている。この異常スプライシング RNA の切断部位のドナー部位とアクセプター部位には短いダイレトリプート配列が存在する(Lukas et al., *Cancer Res.* 2001; Lazzereschi et al., *Oncogene*, 2005)。一方で、申請者は、線虫 *C. elegans* の雌雄同体において EJC 構成蛋白質 Y14 の発現阻害を行うと、生殖細胞の性分化が異常になり、卵母細胞形成ができず精子のみが形成されることを報告していた(Kawano et al., *Mech. Dev.* 2004)。

2. 研究の目的

本研究では、線虫 EJC 構成因子 Y14 の発現阻害によって起きる生殖細胞の性分化異常の分子機構を詳細に明らかにすることを目的とした。特に、卵母細胞が形成されないという表現型を念頭に置き、卵母細胞形成を促進する遺伝子である *tra-2* の発現に Y14 がどのように関与するのかを中心に解析を進めることとした。

3. 研究の方法

申請者が線虫において見いだしたスプライシング未完了 RNA の細胞質漏出とその後の異常スプライシング RNA 生成を端緒として、線虫 Y14 阻害時に生成する異常スプライシング RNA の網羅的同定を行い、スプライシング未完了 RNA 漏出に伴う細胞質での異常スプライシングがどのような遺伝子で起きているかを明らかにした。また、Y14 阻害によるスプライシング未完了 RNA 漏出の一般性を検証した。さらに、スプライシング未完了 RNA 漏出機構や異常スプライシング RNA 生成機構の解析を行った。

4. 研究成果

Y14 が制御する遺伝子を明らかにするため

エピスタシス解析を行った結果、Y14 が卵母細胞形成を促進する *tra-2* の転写後制御に関与することが示された。さらに、卵母細胞形成を促進する *tra-2* mRNA の正常発現に Y14 が必要であることが明らかになり、Y14 発現阻害個体ではイントロンを含むスプライシング未完了 RNA が蓄積し細胞質に漏出していることが明らかになった。しかも、漏出した *tra-2* 及び *tra-3* のスプライシング未完了 RNA が通常のスプライス部位(GU-AG あるいは AU-AC)とは全く異なる配列で切断・結合されて、異常に短い mRNA が蓄積することを見出した。きわめて興味深いことに、Y14 発現阻害個体で見られた *tra-2* や *tra-3* の異常スプライシングのドナー部位とアクセプター部位には、前述の癌細胞の場合と同様に短いダイレトリプート配列が存在することが明らかになった(図1)。

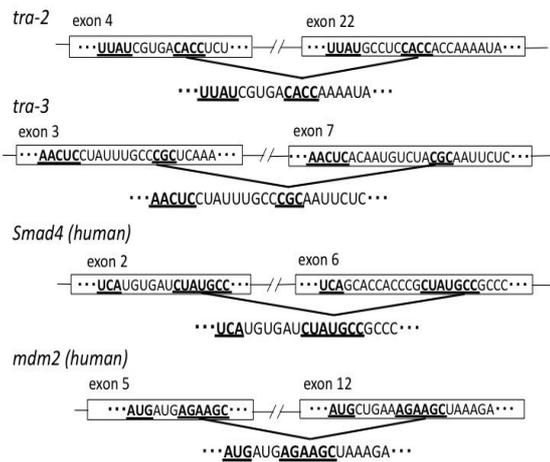


図1. 線虫及びヒト癌細胞で検出された異常スプライシング

以上の知見から、Y14 は正常なスプライシングを終了していないイントロンをもった RNA を核内に留めておく機能をもっており、その機能が破綻するとスプライシング未完了 RNA が細胞質に漏出し(図2)、その後特

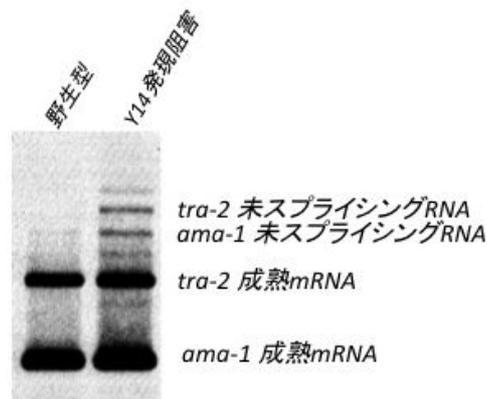


図2. Y14を阻害すると未スプライシング RNAが蓄積する。

定のスプライシング未完了 RNA が細胞質スプライシングを受けた結果、異常スプライシ

グ mRNA が産生・発現し、最終的に異常な線虫表現型やヒトの疾患につながっているという、これまで誰も注目してこなかった可能性が考えられる。また、*tra-2* の発現を詳細に解析した結果、Y14 発現阻害個体では、*tra-2* mRNA の核内滞留や、特に生殖細胞においては TRA-2 タンパク質の局在異常が観察された。さらに、Y14 発現阻害個体においては、通常のスプライス部位とは無関係な部位で切断・結合された短鎖 mRNA (*tra-2s* RNA) が、細胞質スプライシング因子 IRE-1 によるプロセッシングを経て発現することを見出した。この *tra-2s* RNA を野生型の生殖巣内で強制発現すると、Y14 発現阻害個体と同様に TRA-2 タンパク質の局在異常や性分化転換異常が引き起こされた。興味深いことに、Y14 発現阻害個体では、*tra-2* を含め、解析を行ったほとんどの遺伝子でイントロンを含むスプライシング未完了 RNA が細胞質に漏出していた。さらに *tra-2* スプライシング未完了 RNA が、細胞質において異常プロセッシングを受け、*tra-2s* mRNA が生じることが示唆された。また、EJC の中核因子 Y14, Magoh, eIF4A がスプライシング過程において CWC22, PRP19 複合体, IBP160 などに依存的にイントロンに呼び込まれ、U2 snRNP, U6 snRNP などに含まれるスプライシング因子と共にスプライシング未完了 RNA の核外漏出阻止に働くことを見出した。

以上の結果から、従来スプライシング後の mRNA 制御に重要と考えられてきた EJC 中核因子が、核内においてスプライシング未完了 RNA の細胞質への漏出を防ぐことで、遺伝子発現の正確性を保証するゲートキーパーとしての新規機能を持つ可能性が強く示唆された(図3)。以上の成果は、国際学術誌 *Mol. Cell. Biol.* 誌において公表した。

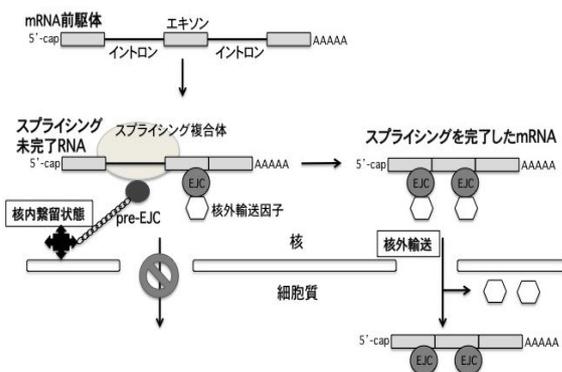


図3. EJC中核因子(pre-EJC)によるスプライシング未完了RNAの核内滞留

本研究では、スプライシング未完了 RNA の細胞質漏出とその後の異常スプライシング RNA 生成機構を明らかにし、新規の異常 mRNA 産生阻止機構を解明した。異常 mRNA 産生阻止機構は、遺伝子発現の正確性を保証するために不可欠であるが、これまではスプライシングされたことを認識し、正確にプロセッシングを受けた mRNA を選択的に発現させる機構

についての研究がほとんどであるのに対し、本研究では、スプライシングが正確に行われていないスプライシング未完了 RNA の生成と、その後の細胞質における異常スプライシングを防ぐ全く未知な機構を明らかにした点が極めて独創的である。

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)

Masami Shiimori, Kunio Inoue & Hiroshi Sakamoto (2013) A specific set of exon junction complex subunits is required for the nuclear retention of unspliced RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* 33, 444-456. DOI: 10.1128/MCB.01298-12(査読有)

〔学会発表〕(計4件)

椎森仁美、井上邦夫、坂本博．線虫 EJC 中核因子 Y14 はスプライシング未完了 RNA の核外輸送を防ぐ．第 14 回日本 RNA 学会年会(2012年7月18日～20日 東北大学百周年記念会館)

Masami Shiimori, Kunio Inoue & Hiroshi Sakamoto. EJC core subunits have a novel gatekeeper function in mRNA quality control in the nematode *C. elegans*. The 22th CDB Meeting - RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II (2012年6月11日～13日 理研神戸 CDB)

椎森仁美、井上邦夫、坂本博．線虫 Y14 はイントロンを含む未スプライシング RNA の核外輸送を防ぐ．RNA フロンティア ミーティング 2011 (2011年8月30日～9月1日 あいち健康プラザ)

Masami Shiimori, Shunichi Wakabayashi, Yutaka Suzuki, Kenta Nakai, Kunio Inoue & Hiroshi Sakamoto. Two EJC core subunits, Y14 and MAG-1, have a novel gatekeeper function in mRNA quality

control in the nematode *C. elegans*.
The 16th annual Meeting of the RNA
Society. (2011年6月14日～18日 京都
国際会館)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.edu.kobe-u.ac.jp/fsci-biol/
faculty/sakamoto.html](http://www.edu.kobe-u.ac.jp/fsci-biol/faculty/sakamoto.html)

[http://www.research.kobe-u.ac.jp/
fsci-rna/](http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-rna/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 博 (SAKAMOTO, Hiroshi)

神戸大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00187048

(2) 研究分担者

井上 邦夫 (INOUE, Kunio)

神戸大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：40252415

中井 謙太 (NAKAI, Kenta)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：60217643

鈴木 穰 (SUZUKI, Yutaka)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・

教授

研究者番号：40323646