

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657118

研究課題名(和文) 選択的スプライシング制御を介した熱ストレス応答機構

研究課題名(英文) Regulation of alternative splicing in response to heat-stress

研究代表者

井上 邦夫 (Inoue, Kunio)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40252415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：熱ストレスはRNAスプライシング過程をグローバルに抑制すると考えられているが、実際には、効率よくスプライシングされる遺伝子や選択的スプライシングを受ける遺伝子が存在する。本研究では、私達の見出したU1 snRNP非依存적スプライシングが、熱ストレスによるスプライシング抑制を回避する機構として働いている可能性について検証したが、現時点ではこの仮説を支持する結果は得られていない。

一方、ヒトhsp105遺伝子の選択的スプライシング機構の解析を行い、熱ストレス応答性制御に必須のRNA結合蛋白質を明らかにするとともに、熱ストレスに反応して選択的スプライシングが誘導される新規遺伝子群を同定した。

研究成果の概要(英文)：It is known that RNA splicing is repressed in response to heat-stress. Here we examined if the U1 snRNP-independent splicing plays a role in efficient splicing of hsp genes under heat condition. Moreover, we identified an RNA-binding protein required for induction of alternative splicing of hsp105 in response to heat-stress.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、分子生物学

キーワード：遺伝子 発現制御 細胞環境 スプライシング

1. 研究開始当初の背景

細胞は、各種ストレス、外部からの物理的・化学的刺激や細胞間相互作用、細胞増殖・細胞周期・細胞死、感染などに応答して適切・迅速な遺伝子発現制御を行う。mRNA 前駆体におけるスプライシング制御は、これら細胞環境による発現制御機構として重要と考えられるが、その分子基盤については多くの未解明な問題が存在する。

これまでに、熱ストレス条件下や細胞周期 M 期においてグローバルなスプライシング抑制が起こることが知られている。これに対し、いくつかのヒートショック遺伝子にはイントロンが存在するが、熱ストレス下でも正常にスプライシングが行われる。しかしながら、これらの遺伝子がスプライシング抑制を受けない機構の研究は皆無に等しい。

スプライシングは、5 種類の核内低分子 RNA (一般的な GT-AG 型イントロンの場合、U1, U2, U4, U5, U6 snRNA) と 300 種にも及ぶ蛋白質の会合・解離を伴うダイナミックな反応である。スプライシング反応に必要なシス配列は、イントロン末端の 5' スプライス部位と 3' スプライス部位、および、3' スプライス部位上流のブランチ部位とピリミジン配列である。スプライシング装置であるスプライソソームの形成初期段階には、U1 snRNP が RNA の相補対合によって 5' スプライス部位に会合するとともに、U2AF などの相互作用を介して U2 snRNP がブランチ部位に会合する。このように、U1 や U2 はスプライス部位の初期認識段階 (あるいはエキソン領域の認識) に不可欠な因子である。しかし、U1 snRNP はその後の過程でスプライソソームから解離し、RNA 切断・再結合の触媒活性を有する活性型スプライソソーム中には含まれない。私たちは、一般的な GT-AG 型イントロンにもかかわらず U1 snRNP に依存せずにスプライシングされる哺乳類遺伝子を同定している (Fukumura et al, *Nucleic Acids Res*, 2009; *RNA Biol*, 2009)。

熱ストレス下や細胞周期 M 期におけるグローバルなスプライシング抑制機構としては、脱リン酸化修飾を受けたスプライシング因子 SRp38 蛋白質が U1 snRNP 機能を阻害する結果、スプライシング反応が抑制されることが報告されている (Shi & Manley, *Mol Cell*, 2007 など)。従って、私たちの見出した U1 snRNP 非依存性のイントロンは、このような熱ストレス下における U1 snRNP を標的としたスプライシング抑制を回避する可能性がある。

また、ヒートショック遺伝子の中には、hsp47 遺伝子や hsp105 遺伝子など、熱ストレス依存的に選択的スプライシングが誘導されるものが存在している (Takeuchi et al, *Mol Cell Biol*, 1994 など)。これらの選択的スプライシングは、熱ストレス応答機構を理

解する上で好個のモデル解析系になるものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、哺乳類細胞において、(1) U1 snRNP に依存しないスプライシング機構が熱ストレスによるスプライシング抑制の回避機構の一つとして働いている可能性を検証するとともに、(2) 熱ストレスによって選択的スプライシングがどのように制御されているか、(3) 熱ストレスによって誘導される選択的スプライシングが生理的にどのような役割・意義を有するのかを明らかにすることにより、スプライシング制御を介した熱ストレス応答機構の理解を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 熱ストレス条件下でスプライシングされるイントロンについて U1 snRNP 非依存性スプライシングが行われているか検討を試みるとともに、U1 snRNP 機能を阻害した培養細胞を用いて、通常のイントロンと hsp 遺伝子群のイントロンのスプライシング効率を解析した。

(2) ヒト hsp105 遺伝子のゲノム断片を恒常的プロモーターに連結したミニ遺伝子を培養細胞に導入・発現させ、熱ストレスによる選択的スプライシング制御を再現する実験系、および、培養細胞の核抽出液を用いた *in vitro* スプライシング反応系により、熱応答性選択的スプライシング制御機構の解析を行った。さらに、培養細胞における RNA 干渉 (RNAi) によるノックダウン実験を行い、熱応答性制御に働く蛋白質の同定を行った。

(3) 通常培養温度および高温処理したヒト HeLa 細胞からそれぞれ全 mRNA を精製・蛍光標識し、DNA チップを用いたマイクロアレイの一種であるエキソンアレイ法による比較解析により、熱ストレス応答性の選択的スプライシング制御を受ける遺伝子を網羅的に解析し、熱応答性制御における生理的役割を検討した。

4. 研究成果

(1) 熱ストレス条件下での U1 snRNP 非依存性スプライシングの役割検討

いくつかの遺伝子について熱ストレスによるスプライシング抑制の検討を行ったが、抑制効率について定量的な評価を行うことが難しいことが判明した。また、U1 snRNA に対するアンチセンス DNA を導入して U1 snRNA 機能を阻害した培養細胞、および、RNAi により U1 snRNP 構成蛋白質である U1 70kd のノックダウンを行った細胞を用いて、hsp 遺伝子群のイントロンのスプライ

シング効率を解析したが、現在までのところ、U1 非依存性スプライシングが熱ストレスによるスプライシング抑制を回避する機構として働くことを支持する結果は得られていない。

(2) ヒト hsp105 遺伝子における熱ストレス応答性スプライシング機構

ヒト hsp105 遺伝子のゲノム配列を有するレポーター遺伝子について培養細胞へのトランスフェクション実験を行うと、正常温度の 37 度ではエキソン 12 を含む mRNA が生成するが、42 度の熱ストレス処理に反応してエキソン 12 のスキップが観察される。この実験系において、エキソン 12 内部の各所に順次塩基置換を導入したレポーター遺伝子を作成して解析を行った結果、C 残基に富む配列に変異を導入した場合に熱ストレス応答性の選択的スプライシングが誘導されなくなるが明らかとなった。また、脊椎動物種間（ヒト、マウス、ツメガエル、ゼブラフィッシュ）で hsp105 遺伝子配列の比較を行ったところ、この C 残基に富む配列がよく保存されていた。さらに、ゼブラフィッシュ胚を通常の飼育温度である約 28 度から 37 度に置くと、熱応答性の選択的スプライシングがおこることがわかった。

また、培養細胞核抽出液を用い、熱応答制御を再現する *in vitro* 実験系における解析を行った。hsp105 mRNA 前駆体と HeLa 細胞の核抽出液を混合し、常法に従って 30 度でスプライシング反応を行うと、エキソン 12 を含む mRNA のみが生成したが、37 度で反応を行ったところ、エキソン 12 をスキップするスプライシングが起こり、エキソン 12 を含まない mRNA が生成した。これに対して、エキソン 12 内部の C 残基に富む配列に変異を導入した hsp105 mRNA 前駆体を基質として用いると、高温処理下でもエキソンスキップが誘導されなかった。次に、まず HeLa 細胞の核抽出液を 37 度処理後、30 度で基質となる hsp105 mRNA 前駆体と混合・反応を行わせたところ、スプライシング効率はある程度低下するものの、エキソン 12 をスキップするスプライシングが行われることがわかった。従って、熱ストレス効果は、直接に基質の mRNA 前駆体の二次構造変化を起こしている訳ではなく、核抽出液中のタンパク質因子の修飾や複合体変化を介して選択的スプライシング制御が行われていることが示唆された。

さらに、核タンパク質をコードする約 160 種の遺伝子について、RNA 干渉法 (RNAi) による網羅的な発現阻害を行った（廣瀬博士との共同研究）。その結果、hnRNP K の発現阻害を行った細胞では、hsp105 遺伝子における熱ストレス応答性の選択的スプライシングが著しく阻害されることが明らかとなった。また、PSF の発現阻害を行った細胞でも、熱応

答性スプライシングがある程度阻害されることがわかった。hnRNP K タンパク質や PSF タンパク質は、いずれもピリミジン (C, U) に富んだ配列に結合する RNA 結合性タンパク質であり、様々な mRNA 代謝を調節することが報告されている。そこで、hnRNP K タンパク質について RNA 結合実験を行ったところ、hsp105 遺伝子のエキソン 12 に強く結合するが、C 残基に富む配列に変異を導入したエキソン 12 には殆ど結合しないことが示された。これらのことから、細胞が熱ストレスを受けると、hnRNP K タンパク質や PSF タンパク質の働きにより、hsp105 遺伝子における熱ストレス応答性の選択的スプライシングが誘導されるものと結論される（図 1）。

hnRNP K タンパク質や PSF タンパク質は通常の培養温度下でも細胞内で発現していることから、これらのタンパク質が熱ストレスに応じて何らかの修飾制御を受けて機能が変化し、あるいは、これらのタンパク質を含む複合体が熱ストレス依存的に変化するものと推測される。今後は、これらの分子機構を詳細に検討していくことで、細胞が熱ストレスを感知する機構の理解が進むものと期待される。

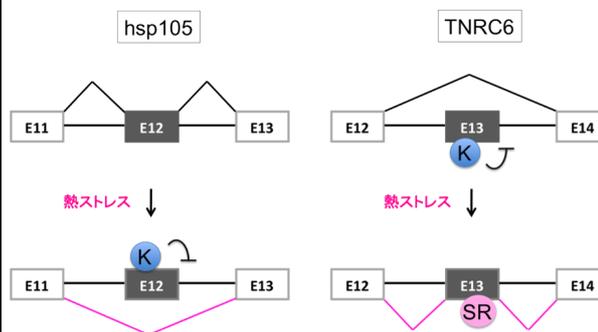


図 1 . 熱応答性の選択的スプライシング機構

(3) 熱ストレスに反応して選択的スプライシングが誘導される遺伝子群の同定

エキソンアレイ法による解析を行い、熱ストレスによりスプライシング様式の変化した遺伝子を網羅的に同定した（鈴木仁博士らとの共同研究）。その結果、hsp105 と同様に熱ストレスによってエキソンスキップが誘導される遺伝子群に加え、エキソン挿入が誘導される遺伝子や、イントロンの残留が誘導される遺伝子が存在することがわかった。

エキソンアレイによって同定された遺伝子には、マイクロ RNA 機能に必須な TNRC6 や、クロマチン結合タンパク質をコードする RCC1、スプライシング制御を行う SRSF5 など、ゲノム情報発現の様々な段階に関与するものが含まれていることが明らかになった。従って、熱ストレスによってこれらの遺伝子が選択的スプライシングによる制御を受けて通常と異なるタンパク質や機能を持たない

タンパク質を発現するようになることで、ゲノム情報発現の諸段階での制御が引き起こされ、最終的な細胞の振る舞いの変化へと結びついていくものと考えられる。

また、同定した遺伝子のうち、TNRC6 は、熱ストレスに応じてエキソン 1 3 の挿入が誘導される。このエキソン中には、hsp105 の場合と類似した C 残基に富む配列が存在していた。そこで、培養細胞への RNAi 実験により、TNRC6 の選択的スプライシング制御に hnRNP K が関与するか検討したところ、hnRNP K は正常温度下で、C 残基に富む配列を介してエキソン 1 3 の使用を抑制する効果を持つが、熱応答性の選択的スプライシング誘導には直接関与していないことが明らかとなった。さらに、核タンパク質をコードする遺伝子群の RNAi による解析を行った結果、TNRC6 の熱応答性制御には、スプライシング因子である SR タンパク質ファミリーが必要なことが明らかとなった(図 1)。

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)

Shiimori, M., Inoue, K., Sakamoto, H. (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 査読有り

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-rna/>

<http://www.edu.kobe-u.ac.jp/fsci-biol/staff/kunio.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

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