

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770166

研究課題名(和文) スプライシング依存的な新規ストレス応答機構とその役割の解析

研究課題名(英文) analyses of splicing-dependent stress response mechanism

研究代表者

二宮 賢介 (Ninomiya, Kensuke)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00437279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、スプライシングに依存したユニークな遺伝子発現制御機構を見出し、それが細胞のストレスからの回復に寄与している例を見出した。そこで、その機構の分子メカニズムの解明と同様の機構によって発現を制御される遺伝子の網羅的探索を行った。その結果、新規スプライシング制御機構の制御を担う候補蛋白質を複数見出した。また、同様の機構によって発現を制御される遺伝子の候補として、多数の遺伝子群を取得した。

研究成果の概要(英文)：We have found a novel mechanism of splicing-dependent regulation of gene expression, attributing to certain stress recovery function of cells. Thus, we analyzed its molecular mechanism and found some candidates for trans-acting proteins required for this splicing-dependent regulation. In addition, we searched for other genes regulated by this novel mechanism and obtained a number of candidate genes.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：遺伝子発現制御 ストレス応答 スプライシング

## 1. 研究開始当初の背景

細胞はストレスに曝されると、遺伝子発現の各過程が正常に行われなくなること知られている。以下にスプライシングを例に挙げて説明する。

スプライシングが正常に行われるためには、スプライシング反応に必須の因子群である SR 蛋白質ファミリーの適切なリン酸化が必である。正常時の細胞では、リン酸化された SR 蛋白質群がエキソンに結合することで、エキソンが正確に認識され、正常なスプライシングが行われる。ストレス条件下においては、SR 蛋白質のリン酸化レベルが低下し、その結果、エキソン認識が低下し、スプライシング反応の停止や異常なスプライシングが起きることが知られている。しかし、ストレスに対する耐性機構やスプライシングを正常化する回復機構はこれまで殆ど明らかにされてこなかった。

申請者は、最近、SR 蛋白質を基質とするキナーゼ・ファミリーのうち、Clk ファミリーに属する Clk1 と Clk4 の以下に述べるユニークな発現機構が、ストレス後の SR 蛋白質のリン酸化レベル正常化を担っていることを報告した。Clk1 と Clk4 は 12 個のイントロンを持つ遺伝子であるが、その転写産物の大半は 3 番目と 4 番目のイントロンだけスプライシングされずに保持した成熟直前の状態で予め核内に豊富に蓄積している。この保持されたイントロンのスプライシングは、通常のスプライシングを停止させるストレス(ヒートショック、浸透圧ショックなど)によってむしろ促進され、その結果、すみやかに成熟型 mRNA が産生される。重要な点として、ストレス条件下においては転写や通常のスプライシングは抑制されることが知られているが、この機構による遺伝子発現はそれらの抑制を回避することが可能である。さらに、産生された Clk1 および Clk4 mRNA から翻訳された蛋白質が、ストレス後の SR 蛋白質の再リン酸化を促進していることを見出した。逆に、イントロンを保持した Clk1/4 RNA の核内プールを事前に枯渇させた細胞においては、ストレス後の SR 蛋白質の機能回復は阻害された。申請者はこの機構を ReSCUE(Rephosphorylation of SR proteins by Clk Urgent Expression)と名付けた。しかし、この機構の機序や他にどのような遺伝子が同様の機構で発現を制御されているかについては明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

申請者は、ストレスによって誘導される新規な遺伝子発現誘導機構を発見した。また、その機構によって発現する遺伝子産物がストレスによって抑制された細胞機能の回復を担っていることを見出した。本研究課題は、この新しい遺伝子発現制御機構の分子メカニズムの解明を目指すとともに、同様の機構によって発現を制御される遺伝子が多数あるのではないかと考え、それらの網羅的探索を行う。これらの研究が、細胞防御機構の更なる理解につながることを期待している。

## 3. 研究の方法

### (1)

Clk1 のスプライシング制御に関わる因子の同定のために、Clk1 のミニ遺伝子を元にしたスプライシング・レポーターを作成し、Clk1 の特殊なスプライシング制御機構に関わる RNA 結合蛋白質の探索と解析を行った。得られた候補について siRNA ノックダウンなどの手法を用いて、スプライシング制御における役割を解析した。

### (2)

特定のイントロンを保持した状態で核内に蓄積している RNA の網羅的探索と同定を行った。これまでに行った予備的な探索により、申請者はイントロンを保持した状態で核内に蓄積している RNA の候補を Clk1 と Clk4 の他に幾つか得ていた。これらの RNA 全てに共通の特性を利用して、イントロンを保持した RNA の 1 次スクリーニングを行った。得られた候補について、RT-PCR 等による検証を行った。

## 4. 研究成果

### (1)

図 1 で原理を説明するスプライシング・レポーターを用いた解析の結果、Clk1 の新規スプライシング制御に関わる候補因子を取得し、siRNA ノックダウンなどの手法で検証を行い、5 種の蛋白質を同定した。

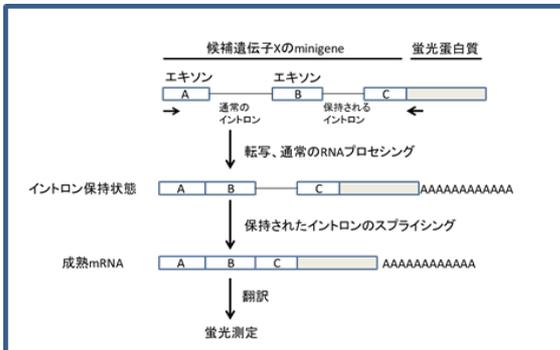


図1. スプライシングレポーター発現ベクターの原理

候補遺伝子の保持イントロンを含むminigeneをスプライシングレポーター化し、蛍光によりスプライシングの状態を評価する。様々なRNA結合蛋白質発現ライブラリーと共に細胞に共発現し、蛍光変化を指標に、保持イントロンのスプライシングを制御する因子を一次スクリーニングする。

同様の制御様式で発現制御を受けると考えられる他の遺伝子に対しては、これら5つの蛋白質は必ずしもスプライシング制御において同様の寄与を示さなかった。このことは、制御を受ける遺伝子の種類によって、制御蛋白質の種類がそれぞれに異なることを示唆している。

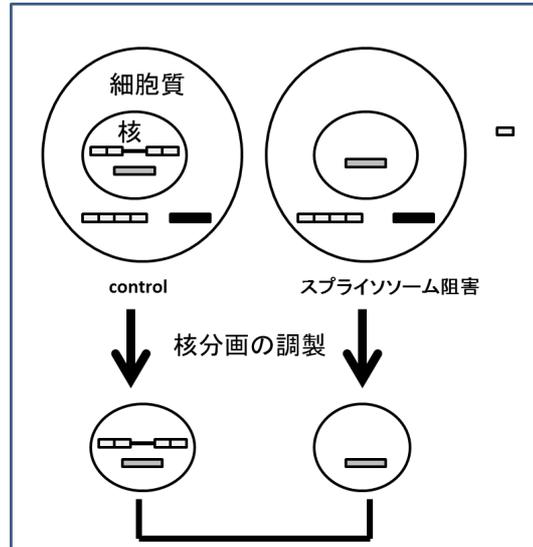
(2)

図2で概略を示した方法で、同様の機構によって発現を誘導される遺伝子群の網羅的探索を行い、約900個の候補イントロンを同定した。その一例を図3に示す。興味深いことに、これらの候補遺伝子群の機能分類を行った結果、スプライシングを含むRNAプロセッシングに関わる遺伝子や特定の細胞機能に関わる遺伝子が多く見られた。これらのことから、新しいスプライシング制御機構がストレス回復時のスプライシング活性回復だけでなく、様々な細胞機能へ寄与している可能性が示唆され、今後の研究のための新たな着想が得られた。それらの候補遺伝子について、実験的な検証を行った結果、その大半について、実際に特定のイントロンを保持したRNAの状態に核内に存在していることが確認できた。また、その一部について、細胞外の刺激によってスプライシングが誘導され発現が上昇することを示す予備的な結果を得た。

(3)

以上の結果により、新しいタイプのスプライシング制御により発現を制御される遺伝子が多数存在する可能性、および、それらが個別に制御されている可能性が示唆された。また、それらの遺伝子群が担う細胞機能がRNAプロセッシングだけでなく、多岐にわた

ることから、この発現制御機構が様々な細胞機能の制御に寄与している可能性が示唆された。



大規模シークエンスによる発現量が変動しているイントロンの探索

- 成熟型 mRNA
- イントロンを保持した X RNA
- その他の成熟型 mRNA
- その他の核内 RNA

図2. 他の候補遺伝子探索法

スプライソソームの阻害によってイントロンを保持した状態で核内に蓄積しているRNAのみが減少し、成熟型mRNAや他の遺伝子の転写産物には殆ど影響を与えない。その結果、read数の変動するイントロンを抽出することで目的の遺伝子(X)のイントロンを同定することが出来た。

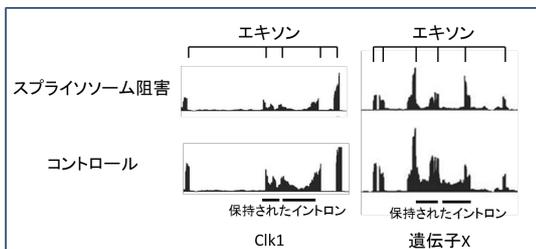


図3. 候補遺伝子探索の結果の一部

スプライソソーム阻害によってread数が低下するイントロンを保持されたイントロンの候補とした。通常のイントロンはread数自体が極めて少ない。左は既に報告したClk1の保持イントロンにおける結果で、右は今回新たに得た候補遺伝子の保持イントロン領域を一例として示したもの。

5. 主な発表論文等  
〔学会発表〕(計 1 件)

二宮賢介 佐古有季哉 萩原正敏  
変異ジストロフィン遺伝子のエキソンスキップによる筋ジストロフィー治療法開発の試み  
第 119 回日本解剖学会総会全国学術集会  
2014 年 3 月 28 日  
栃木県下野市

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.anat1dadb.med.kyoto-u.ac.jp/Anat1DADB/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二宮 賢介 (Ninomiya Kensuke)  
京都大学大学院・医学研究科・助教  
研究者番号：00437279