

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25711001

研究課題名(和文) スプライシング異常による未成熟mRNAの蓄積を防ぐチェックポイント機構の解析

研究課題名(英文) Study on the splicing checkpoint mechanism to prevent pre-mRNA accumulation caused by splicing abnormality

研究代表者

甲斐田 大輔 (Kaida, Daisuke)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：60415122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,600,000円

研究成果の概要(和文)：mRNAスプライシングは真核細胞の遺伝子発現に必須な機構であり、スプライシングに異常があると、異常なpre-mRNAが蓄積し、個体レベルでは疾患を引き起こす可能性がある。そこで、スプライシング異常時には、異常なpre-mRNAを蓄積させないために、転写伸長を抑制するというチェックポイント機構が存在すると考えた。本研究の結果から、実際にそのようなスプライシングチェックポイントメカニズムが存在することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：mRNA splicing is a fundamental mechanism for the gene expression in eukaryotes. Splicing abnormality might cause pre-mRNA accumulation and diseases. Therefore, I assumed that cells have a checkpoint mechanism that detects splicing abnormality and suppresses transcriptional elongation to prevent pre-mRNA accumulation. I revealed that such a splicing checkpoint mechanism actually exists in this study.

研究分野：分子生物学

キーワード：スプライシング 転写

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞においては、転写されたばかりの mRNA は未成熟の状態であり、スプライシングによるイントロンの除去、5' 末端のキャッピング、3' 末端のポリ(A)化などの転写後修飾を受け成熟型となる。これらの転写後修飾因子は転写因子と結合し、転写直後の mRNA を常にスキャンすることによって、自身の結合配列を効率的に認識している。言い換えれば、転写後修飾は転写と共役する事によってその効率を高めているのである。

一方、転写後修飾が転写活性に与える影響に関しては、研究開始当初においてはあまり知見がなかった。そこで、予備実験として、スプライシング異常と転写伸長との関係を調べるため、細胞をスプライシング阻害剤であるスプライソスタチン A で処理し、スプライシングの阻害がトランスクリプトームに与える影響を解析したところ、以下のことが明らかとなった。

(1) スプライソスタチン処理時には、全体の約 18% の遺伝子において、遺伝子の 5' 側のみが発現し、3' 側の発現が低下していた。

(2) 5' 側のみが発現している遺伝子をいくつか解析したところ、それらの遺伝子上では、mRNA の転写を司る RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が遺伝子前半で停滞していた。

(3) さらに、スプライソスタチン処理により、転写伸長を促進する Pol III のリン酸化が低下した。

以上の結果から、スプライシングに異常があると、転写伸長を促進する Pol II のリン酸化を低下させ、遺伝子の前半部分での Pol II の停滞を引き起こし、スプライシングを受けていない異常な mRNA の産生や蓄積を防止するスプライシングチェックポイント機構が存在すると考えられた。しかしながら、実際にそのような機構が存在するかどうかは証明されていなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、細胞が遺伝情報の正確性を守るために持つと考えられるスプライシングチェックポイント機構の存在を証明し、その詳細な分子機構を解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

スプライシングチェックポイント機構の存在の証明、ならびにその詳細なメカニズムの解明のために、以下の実験を行った。

(1) この転写伸長抑制が、スプライシング阻害の結果によるものか、もしくは、SSA 処理の副次的効果なのかを区別するために、SSA 以外のスプライシング阻害剤や、アンチセンスオリゴを用いたスプライソソームの不活性化などを行い、同様の現象が観察されるかどうかを確かめる。

(2) SSA 処理時に観察された Pol II の脱リン酸化が、スプライシング阻害特有の現象なのか、それとも、転写や、翻訳など、他の遺伝子発現機構の抑制でも同様の現象が観察されるのかどうかを明らかにするため、転写阻害剤のアクチノマイシン D や翻訳阻害剤のシクロヘキシミドで細胞を処理し、その際の Pol II のリン酸化レベルを観察する。また、真に、スプライシング阻害の結果であるかどうかを確かめるため、SSA 以外のスプライシング阻害剤や、アンチセンスオリゴを用いたスプライソソームの不活性化などを行い、Pol II の脱リン酸化が観察されるかどうかを確かめる。

(3) 遺伝子 5' 側のみが発現は、転写伸長抑制の結果であると考えられるものの、RNA の部分的な分解の結果である可能性も残されている。そこで、pre-mRNA を分解する Nuclear Exosome の構成因子を siRNA でノックダウンすることにより、部分的な分解の可能性を排除する。

(4) Pol II は、P-TEFb というリン酸化酵素によりリン酸化される。SSA 処理による Pol II のリン酸化レベルの低下は、P-TEFb の不活性化である可能性を検討するために、HeLa 細胞から抽出した P-TEFb と基質を混ぜ、反応液中に SSA を加え、リン酸化活性を測定することにより、SSA が P-TEFb のリン酸化活性を制御するかどうかを観察する。

(5) Pol III の脱リン酸化は転写伸長が抑制された遺伝子上に限って観察されるのか、それとも全体的なリン酸化レベルが低下しているのかを確かめるために、リン酸化 Pol III の抗体を用いたクロマチン免疫沈降実験を行なう。

(6) スプライシング阻害により引き起こされる Pol III の脱リン酸化のメカニズムを明らかにするため、SSA 処理時に、Pol III をリン酸化するキナーゼや、脱リン酸化するフォスファターゼのタンパク量の変化が観察されるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 転写伸長抑制がスプライシング阻害によるものであることを確かめるために、SSAとは異なるスプライシング阻害剤であるブラジエノライド B やスプライソソームに対するアンチセンスオリゴを用いてスプライシング阻害を行い、その際の転写伸長を観察したところ、これらの阻害剤やアンチセンスオリゴにおいても転写伸長抑制が観察された。このことから、転写伸長抑制は、SSA の副次効果ではなく、スプライシング阻害の結果であると考えられる。

(2) SSA 処理時に観察された Pol II の脱リン酸化がスプライシング阻害特有の現象であるかどうかを確かめたところ、転写阻害剤のアクチノマイシン D や翻訳阻害剤のシクロヘキシミド処理では観察されず、スプライシング阻害剤であるブラジエノライド B やスプライソソームに対するアンチセンスオリゴ処理では観察された。このことから、スプライシング阻害が Pol II の脱リン酸化を引き起こしていると考えられる。

(3) 遺伝子 5' 側のみの発現が、RNA の部分的な分解の結果である可能性を排除するために、pre-mRNA を分解する Nuclear Exosome の構成因子を siRNA でノックダウンした細胞を SSA 処理し、その際の RNA 量を測定したところ、Nuclear Exosome をノックダウンしても、遺伝子 5' 側のみの発現が観察された。したがって、遺伝子 5' 側のみの発現は pre-mRNA の部分分解によるものではないと考えられる。

(4) SSA が Pol II のリン酸化酵素である P-TEFb の活性を阻害する可能性を検討したところ、P-TEFb の活性は SSA の添加により影響を受けなかった。このことから、SSA は直接 P-TEFb の活性を制御するわけではなく、スプライシング阻害を介して間接的に制御していると考えられる。

(5) Pol II の脱リン酸化が、転写伸長の抑制された遺伝子上でのみ観察されるのか、それとも、すべての遺伝子上で観察されるのかを確かめたところ、遺伝子特異的なリン酸化の減少が観察された。

以上の結果から、SSA 処理によるスプライシング阻害により、細胞が何らかの機構により、pre-mRNA の蓄積、もしくはスプライシング活性の低下を感知し、異常な pre-mRNA の蓄積を防ぐために、転写伸長を抑制するというスプライシングチェックポイントメカニズムが存在することが明らかとなった。

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4件)

Daisuke Kaida、The reciprocal regulation between splicing and 3'-end processing、Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA、査読有、Vol. 7、2016、499-511、DOI: 10.1002/wrna.1348

Takayuki Satoh and Daisuke Kaida、Upregulation of p27 cyclin-dependent kinase inhibitor and a C-terminus truncated form of p27 contributes to G1 phase arrest、Scientific Reports、査読有、Vol. 6、2016、27829、DOI: 10.1038/srep27829

Mitsunori Koga, Megumi Hayashi and Daisuke Kaida、Splicing inhibition decreases phosphorylation level of Ser2 in Pol II CTD、Nuclear Acids Research、査読有、Vol. 43、2015、8258-8267、DOI: 10.1093/nar/gkv740

Mitsunori Koga, Takayuki Satoh, Ichiro Takasaki, Yumi Kawamura, Minoru Yoshida and Daisuke Kaida、U2 snRNP is required for expression of the 3' end of genes、PLOS ONE、査読有、Vol. 9、2014、e98015、DOI:10.1371/journal.pone.0098015

〔学会発表〕(計13件)

甲斐田大輔、細胞の正常な機能を維持する mRNA スプライシングチェックポイント機構、富山 RNA ワークショップ、2017 年 3 月 13 日、富山大学(富山県・富山市)

甲斐田大輔、細胞の正常な機能を維持する mRNA スプライシングチェックポイント機構、第 3 回バイオシグナル研究会、2017 年 3 月 8 日、神戸大学(兵庫県・神戸市)

甲斐田大輔、スプライシング阻害剤スプライソスタチン A は転写活性と細胞周期進行を制御する、第 38 回 日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日-4 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

古賀光徳、甲斐田大輔、mRNA スプライシングの異常は Pol II Ser2 の脱リン酸化を引き起こす、第 2 回北陸エピジェネティクス研究会、2015 年 11 月 11 日-12 日、富山大学(富山県・富山市)

Daisuke Kaida and Mitsunori Koga, Splicing inhibition decreases phosphorylation level of Pol II CTD Ser2, RNA 2015 The 20th Annual Meeting of the RNA Society, 2015年5月25日-31日、Madison (USA)

古賀 光徳、佐藤 崇之、甲斐田 大輔、スプライシング活性は Pol II Ser2 のリン酸化と転写伸長に必要である、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日-27日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

甲斐田大輔、スプライシング異常が転写活性に与える影響、第1回北陸エビジェネティクス研究会、2014年11月18日-19日、金沢大学 (石川県・金沢市)

古賀 光徳、佐藤 崇之、甲斐田 大輔、スプライシング活性は Pol II Ser2 のリン酸化と転写伸長に必要である、第16回日本 RNA 学会年会、2014年7月23日-25日、ウインクあいち (愛知県・名古屋市)

Daisuke Kaida, Mitsunori Koga and Takayuki Satoh, U2 snRNP is required for transcription elongation in a gene specific manner, RNA 2014 The 19th Annual Meeting of the RNA Society, 2014年6月3日-8日、Quebec (Canada)

Mitsunori Koga, Takayuki Satoh and Daisuke Kaida, U2 snRNP is required for the phosphorylation of Pol II CTD and efficient transcription elongation, 2014 American Society for Biochemistry and Molecular Biology Annual Meeting, 2014年4月26日-30日、San Diego (USA)

11古賀 光徳、佐藤 崇之、甲斐田大輔、スプライシング異常は P-TEFb を阻害することで転写伸長抑制を引き起こす、RNA フロンティアミーティング 2013、2013年9月3日-5日、ラフォーレ修善寺 (静岡県・伊豆市)

12 Daisuke Kaida, Mitsunori Koga, U2 snRNP is required for the phosphorylation of CTD Ser2 and efficient transcription elongation, Cold Spring Harbor Laboratory meeting "Eukaryotic mRNA processing", 2013年8月20日-24日、New York (USA)

13 古賀 光徳、甲斐田 大輔、スプライシング異常は P-TEFb を阻害することで転写伸長抑制を引き起こす、第15回日本 RNA 学

会年会、2013年7月24日-26日、ひめぎんホール (愛媛県・松山市)

〔図書〕 (計1件)

甲斐田大輔 他、化学同人、ノンコーディング RNA、2016、28-37

〔その他〕

ホームページ等

<http://kaida-lab.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐田 大輔 (KAIDA, Daisuke)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・准教授

研究者番号：60415122