

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830124

研究課題名(和文) WTAP複合体によるオルタナティブスプライシング制御機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of WTAP protein complex on alternative splicing

## 研究代表者

堀内 恵子 (Horiuchi, Keiko)

東京大学・先端科学技術研究センター・助教

研究者番号：00456203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Wilms' tumor 1-associating protein (WTAP) は、マウス初期発生および細胞周期のG2/M移行に必須のスプライシング因子であるが、そのターゲットRNAはあまり明らかになっていない。WTAP複合体によるオルタナティブスプライシングのターゲットRNAを同定する目的で、WTAPをノックダウンした細胞を用いたRNAseqを行い、スプライシングの変化を調べた。その結果、WTAPがヒストンH4K20のメチル化酵素であるSUV420H2およびSUV420H1のオルタナティブスプライシングを制御し、H4K20のメチル化レベルの調節に関与していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Wilms' tumor 1-associating protein (WTAP) is a putative splicing regulator which is required for mouse early embryo development and cell cycle progression. We previously isolated the proteins which interact with WTAP, including VIRILIZER, CBLL1, KIAA0853, RBM15, BCLAF1, THRAP3 and general splicing regulators. To identify the alternative RNA splicing regulated by WTAP protein complex, we performed high-throughput mRNA sequencing using WTAP knockdown cells. Interestingly, WTAP regulates alternative splicing of histone H4 Lys 20 methyltransferases SUV420H1 and SUV420H2 by promoting a production of the truncated isoforms, leading to a change in the global H4K20 methylation level.

研究分野：RNAスプライシング

キーワード：RNAスプライシング WTAP 細胞周期 SUV420H2

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) オルタナティブスプライシングによる遺伝子発現調節

オルタナティブスプライシングは同一の遺伝子から複数の mRNA を産生し、タンパク質の多様性をもたらす重要な機構である。ほとんど全てのヒト遺伝子がオルタナティブスプライシングを受けており、正確なスプライシングパターンとその調節の破たんが様々な疾患や発生異常と関連していることが報告されている。オルタナティブスプライシングによる遺伝子発現の調節についての概念は主にショウジョウバエの性決定における研究により明らかになった。ショウジョウバエではメスにのみ機能的な Sex Lethal (SXL) タンパク質が発現しており、SXL タンパク質は性決定、分化に重要な遺伝子である Sxl 自身, transformer, ヒストン H4K16 アセチル化酵素 msl-2 などのオルタナティブスプライシングを介して、機能的(全長)タンパク質の発現を制御することで、性決定、性分化、オス X 染色体の遺伝子量補償を調節している。ショウジョウバエの遺伝的解析から Sxl と協調して働く遺伝子として、snf, vir, fl(2)d 遺伝子が同定されている。

### (2) スプライシングファクター WTAP の機能

Wilms' tumor1-associateing protein (WTAP) は、ショウジョウバエ fl(2)d のホモログであり、Wilms' tumor-1 や GATA2 などの zinc finger タンパク質に結合する因子として報告されている。また、WTAP は核内で核質、核スペckルに局在しており、スプライセオソームの構成因子としても同定されていることから、進化的に保存されたスプライシングにける制御機能があると考えられる。

我々はこれまで、ノックアウトマウスの解析および RNAi による解析から、WTAP ノックアウトマウスは胎生致死であり、WTAP が cyclin A2 mRNA の安定性に関与し、細胞周期の G2/M 移行に必須であることを見出した。平滑筋細胞では逆に WTAP が増殖を阻害しているという報告がある一方、近年膠芽腫および胆管癌で WTAP が高発現していることが報告されており、WTAP が細胞増殖において細胞種特異的な作用をしていると考えられた。

### (3) WTAP に結合するタンパク質

我々は WTAP の細胞内での挙動を明らかにする目的で、WTAP に対する特異的抗体を作成し、免疫沈降物のショットガンプロテオミクスにより新規 WTAP 複合体タンパク質を同定した。WTAP の複合体として同定したタンパク質は、その多くがスプライシング、ポリアデニル化、核外輸送などの RNA プロセッシングに関わるタンパク質であり、そのうち virilizer ホモログ、zinc finger protein KIAA0853、Hakai、RBM15、BCLAF1、

THRAP3 は WTAP 複合体の主要な構成因子であることがわかった。これらの構成因子は WTAP と同様、いずれも核内で核質と核スペckルに局在し、そのうち SR-like proteins の BCLAF1/THRAP3 をノックダウンすると、WTAP の核スペckルへの局在が減少することが分かった。SR-like protein である BCLAF1/THRAP3 は WTAP への核スペckルへの局在化を促進し、複合体形成に作用していると考えられた。

### (4) WTAP 複合体のオルタナティブスプライシングにおける役割

複合体としての生理機能を見るために、siRNA を用いて細胞周期の解析を行ったところ、主要な構成因子それぞれをノックダウンすると、WTAP のノックダウンと同様、顕著に細胞増殖が抑制され G2 期の割合が増え、WTAP が複合体として細胞周期を制御していると考えられた。siRNA を用いた解析の過程で、WTAP 複合体の構成因子をノックダウンすると WTAP 自身の発現量が増えることがわかった。WTAP は full length と、intron6 がスプライシングされずに stop コドンを持つ truncated isoform の 2 つのアイソフォーム ('bleeding exon') を持ち、WTAP 複合体の構成因子をノックダウンすると、WTAP のオルタナティブスプライシングが変わることにより (Full length が増える) タンパク質の発現量が増えることがわかった。以上から、WTAP 複合体が、細胞周期およびオルタナティブスプライシング (WTAP 自身のオルタナティブスプライシング) に作用していることがわかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、WTAP 複合体のターゲット遺伝子の同定およびその調節機構を明らかにし、WTAP 複合体によるオルタナティブスプライシングとその生物学的意義を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) WTAP 複合体が制御する標的 RNA の同定

WTAP および複合体構成タンパク質である Virilizer をノックダウンした細胞 (ヒト臍帯静脈内皮細胞、HUVEC) を用いて RNAseq を行い、スプライシングバリエーションの発現プロファイルから、オルタナティブスプライシングのターゲット RNA を同定する。

### (2) Truncaed protein の機能解析

ヒト遺伝子のうち 95% がオルタナティブスプライシングをうけるが、スプライシングバリエーションの機能については一部の遺伝子を除いて未解明なものが多い。スプライシングバリエーションの機能としては、全長タンパクと同様の機能、機能の欠失、逆にドミナントネガティブの作用を持つなどが考えられる。また、タンパク質に翻訳されないものは RNA と

しての未知の機能が考えられ、RNA 分解の対象となるスプライシングバリエーションを持つ遺伝子についてはオルタナティブスプライシングによる発現量の調節を受けていることになる。WTAP 複合体のターゲット遺伝子のスプライシングバリエーションについて、タンパク質または RNA の発現および機能を解析する。

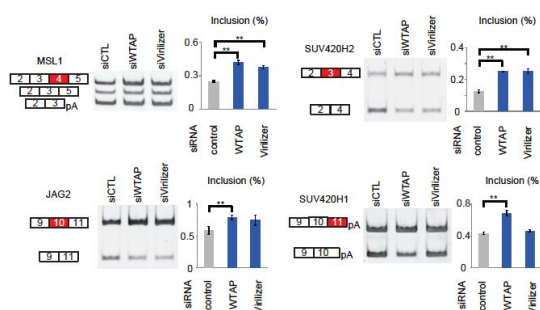
### (3) WTAP 複合体によるオルタナティブスプライシングの制御機構の解析

標的 RNA の制御メカニズムについて定量的 PCR、RIP-PCR、minigene などの手法を用いて解析を行う。Minigene では、オルタナティブスプライシングに関わる配列の mutation を用いた解析や、WTAP 複合体タンパク質それぞれに対する siRNA によるノックダウンや過剰発現系での解析を行い、オルタナティブスプライシングに必要なタンパク質複合体を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) WTAP 複合体が制御する標的 RNA の同定

WTAP または Virilizer を siRNA によりノックダウンした HUVEC を用いて RNAseq を行い、遺伝子発現プロファイルへの作用を調べた。WTAP のノックダウンにより、約 250 の遺伝子について 5 倍以上の発現変動が見られ、GO term で cell cycle に関係するものが最も enrich されており、以前報告した microarray のデータと合致していた。また、MapSplice software を用いてスプライシングジャンクションを含む read を抽出してスプライシングバリエーションの発現量およびスプライス部位の違いを調べた結果、コントロールの細胞で 60% 以上のエクソンスキップがみられ、かつ WTAP のノックダウンによりエクソンスキップが 1.5 倍以下になるもの、また、コントロールの細胞では 40% 以下のエクソンスキップであるが、WTAP のノックダウンにより 1.5 倍以上になるもの、それぞれ、34 events と 14 events を同定した。このうち 8event についてのオルタナティブスプライシングについて、RT-PCR により確認した。(例、下図)



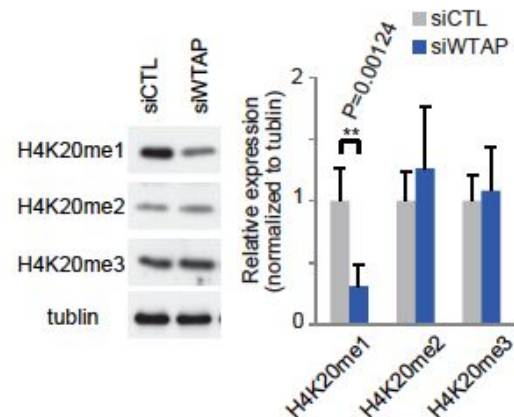
WTAP のターゲット RNA のうち、SUV420H2 はヒストン H4K20 のメチルトランスフェラーゼであり、H4K20me1 から me2、me3 へのメチル化を触媒する。また、MSL1 は MOF ヒストンアセチルトランスフェラーゼ複合体の構成因子であり、ヒストン H4K16 のアセチル化に働く。

SUV420H2 のオルタナティブエクソンである Exon3 の inclusion は、コントロールの細胞では 13% 程度であるのに対して、WTAP をノックダウンすると 25% に上昇することがわかった。Exon 3 の skip は frame shift により truncated のタンパク質になるため、機能を持たない。

また、MSL1 に関しては、RNAseq のデータより、intron 3 のオルタナティブポリアデニル化によりさらにもう一つのアイソフォームがある ( 'bleeding exon' ) ことがわかったが、WTAP のノックダウンにより、Exon 4 を含むアイソフォームの割合が 25% から 42% に上昇することがわかった。

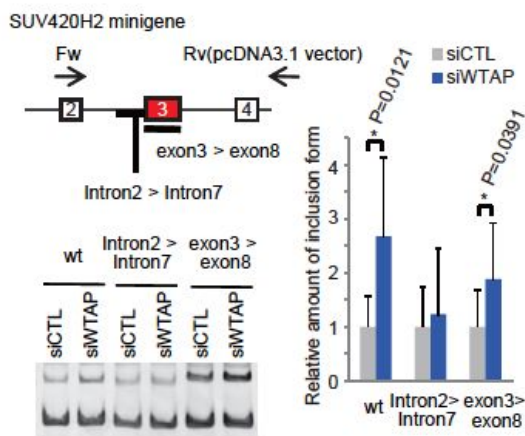
### (2) Truncaed protein の機能解析

ヒストン H4K20 のメチル化酵素は SUV420H1 および SUV420H2 がある。WTAP のノックダウンによる SUV420H2 のオルタナティブスプライシングを介した発現上昇がヒストン H4K20 のメチル化にどの程度寄与しているのかを調べるために、まず SUV420H1 の発現量を RNAseq のデータから確認した。興味深いことに、SUV420H1 も 'bleeding exon' を持ち、その発現は WTAP のノックダウンにより減少 ( full length は上昇 ) していることを見出した。そこで、ヒストン H4K20 のメチル化のレベルを Western blot により調べると、WTAP のノックダウンにより、ヒストン H4K20me1 のレベルが顕著に減少していることが明らかになった。WTAP のノックダウンによりヒストン H4K20me2、me3 の顕著な上昇は見られなかったものの、H4K20me1 のメチル化の促進により、H4K30me1 レベルが減少したと考えられた。(下図)



### (3) WTAP 複合体によるオルタナティブスプライシングの制御機構の解析

WTAP によるオルタナティブスプライシング調節機構を明らかにするために、SUV420H2 の minigene を用いた解析を行った。オルタナティブエクソンである Exon 3 を含む、Exon2 から Exon4 のゲノム配列を持つ minigene を作成し、HUVEC にトランスフェクションし、minigene 特異的な配列を持つプライマーを用いた RT-PCR により、minigene からのスプライシングを調べた。その結果、WTAP のノックダウンにより、exon 3 の inclusion が増えることが見られ、minigene においても、内因性の SUV420H2 と同様の結果を得られることを確認した。そこで、スプライシングに関与する配列を同定するために、exon 3 および上流のイントロン配列 (intron 2) を constitutive exon である exon 8 とその上流 (intron 7) に置き換えた minigene を用いて、WTAP のノックダウンによる効果を調べた。その結果、intron 2 を intron 7 に置き換えると、WTAP のノックダウンによる exon 3 inclusion の増加がなくなることから、WTAP は SUV420H2 のオルタナティブエクソンの 3' スプライス部位認識を阻害することにより制御していると考えられた。(下図)



### (4) 考察

本研究では、RNAseq 解析により、WTAP のオルタナティブスプライシングターゲット RNA を同定した。WTAP のターゲット RNA にはヒストン修飾酵素である SUV420H2, SUV420H1, MSL1 が含まれることがわかり、いずれの場合も、WTAP がオルタナティブスプライシングによる truncated isoform の発現を促進していることがわかった。SUV420H1 および SUV420H2 の基質であるヒストン H4K20me1 は、WTAP のノックダウンにより減少しており、SUV420H1, SUV420H2 の full length の発現の上昇と一致していた。

Minigene を用いた解析により、WTAP が

SUV420H2 のオルタナティブエクソンの 3' スプライス部位の認識を阻害していることが考えられ、このことは、ショウジョウバエでの SXL によるスプライシング調節機構と類似している可能性があり、結合配列の同定等、さらなる解析が必要である。さらに、ショウジョウバエの SXL のターゲット遺伝子にもヒストンアセチルトランスフェラーゼの msl-2 が含まれることから、ヒストン修飾酵素の発現に関して、WTAP によるオルタナティブスプライシングを介した保存された調節機構が考えられる。

我々は、WTAP の複合体解析から、上述した主要な複合体構成因子の他に、N6-adenosine のメチル化 (m6A) 酵素である Mettl3, Mettl14 複合体を同定している。m6A 修飾は、40 年以上前に発見された mRNA の内部修飾で最も多く見られる修飾であるが、その生理的機能は近年までわかっていなかった。近年 m6A 修飾が mRNA の安定性、オルタナティブスプライシングに関わることが報告されてきており、m6A 修飾が WTAP によるオルタナティブスプライシング(または安定性)制御に関与している可能性がある。今後、WTAP による RNA 修飾とオルタナティブスプライシングの関連について明らかになることが期待される。

### 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

Keiko Horiuchi, TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF SPERMATOGENESIS-DEFICIENT Zrsr1 MUTANT MICE REVEALS EXTENSIVE IMPACT ON U12 INTRONS, EUKARYOTIC mRNA PROCESSING (CSHL meeting), August 18 - 22, 2015, Cold Spring Harbor, NY

Keiko Horiuchi, TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF SPERMATOGENESIS-DEFICIENT Zrsr1 MUTANT MICE REVEALS EXTENSIVE IMPACT ON U12 INTRONS, RNA Biology in Cancer and other Diseases, November 24 - 26, 2015, Centre for Genomic Regulation (CRG), Barcelona, Spain

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

堀内 恵子 (HORIUCHI, Keiko)

東京大学・先端科学技術研究センター・助教

研究者番号：00456203