

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14919

研究課題名(和文) CHERPが制御するmRNA選択的スプライシングの新たな分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of alternative splicing regulated by CHERP

研究代表者

増田 誠司 (Masuda, Seiji)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：20260614

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)： mRNAの選択的スプライシングは、ゲノムにコードされる遺伝子の数を遙かに超えた数のタンパク質を発現させるメカニズムである。これまでに選択的スプライシングに関わる分子機構についてはいまだ不明な部分が多い。本研究は、CHERPがmRNAスプライシングを制御する因子である事を見だし機能解析を行った。そのために、網羅的解析法を用いてCHERPにより発現の制御されている遺伝子とそのエキソンを明らかにした。その結果、CHERPは細胞増殖に関する遺伝子の発現や選択的mRNAスプライシングを制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Alternative mRNA splicing is a fundamental mechanism to produce plenty of protein more than those encoded in its genome. The understanding of alternative splicing will make us to develop the therapy strategy for diseases based on the inadequate miss-splicing. CHERP is first identified as Ca²⁺ signaling related protein in the endoplasmic reticulum. Then, CHERP is also localized in the nucleus, suggesting CHERP has another function. Here, I examined the CHERP regulating genes and alternative splicing. To analyze the genome wide expression change of each mRNA and exon, the exon array analysis was performed. To know the function of CHERP, then, GO term analysis was also carried out. The depletion of CHERP caused the decreased expression of cell cycle, mitosis, cytokinesis, meiosis, DNA repair and DNA replication GO term and increased the induction of apoptosis GO term, suggesting that CHERP has a role for cell proliferation and survival by regulating mRNA splicing.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：選択的mRNAスプライシング CHERP カルシウム 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子発現とヒトにおける選択的スプライシングの意義

遺伝情報は、ゲノム DNA から mRNA 前駆体として転写された後、5'末端のキャッピング、スプライシング、3'末端の poly(A)付加を受け成熟 mRNA となる。成熟 mRNA は核膜を通過して細胞質に輸送され、タンパク質へと翻訳される。加えて、ヒトを含む高等真核生物では1つの遺伝子から異なるエキソンを組み合わせることで複数の成熟型 mRNA を生み出している。このメカニズムを選択的スプライシングと呼び、高等真核生物において遺伝子の数を遙かに超えるタンパク質の発現を生み出す原動力となっている。しかし、ヒトにおける選択的スプライシングの分子機構はいまだ未解明の部分が多く残されている。

(2) CHERP に関する国内外の研究状況

CHERP は、当初細胞内 Ca シグナリングの制御に関わる因子と報告された (*Biochem. J.*, 373, 133-143, 2003)。最近、CHERP が mRNA スプライシングを行うスプライソソーム因子であることや (*J. Biol. Chem.*, 288, 355-67, 2013)、スプライシングに関わる因子特有のドメインも存在することから (*J. Biol. Chem.*, 288, 33361-33375, 2013)、核内での生理機能と Ca²⁺シグナリングとの関係が注目されている。

(3) 申請者のこれまでの研究と準備状況

申請者は、mRNA プロセッシングに関する研究を行ってきた (*Nature*, 417, 304-308, 2002, *Genes Dev.*, 19, 1512-1517, 2005, *Mol. Biol. Cell*, 21, 2953-2965, 2010 等)。また、mRNA 研究で培った知見を用いて、動物細胞での有用タンパク質生産へと展開する研究に発展させている (*J. Biotechnol.* 153, 86-91, 2011、2011 年長瀬研究振興賞、特願 2012-165287)。他に mRNA のスプライシング異常を観察する探索系を構築し (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 1248-1251, 2012 等)、複数のフラボノイドが調節活性をもつことを見いだした (2012 年日本農芸化学研究企画賞)。

この過程で、申請者は mRNA スプライシングを制御する U2AF と相互作用する因子として CHERP を同定し、その機能解析を開始した。CHERP をノックダウンすると、通常は細胞質に局在する mRNA が核内に滞留した。さらに、IP₃R2 mRNA の選択的スプライシングパターンが体細胞型から神経細胞型に変化した。次いで免疫沈降と質量分析からは、CHERP が U2AF だけでなく 3' スプライス部位を決定する U2 snRNP とも強く相互作用することを見いだした。また Ca 濃度の変化により相互作用する因子が変化した。これら一連の解析から、CHERP は mRNA の選択的スプライシングに関わる新規因子であり、3' スプライス部位選択を制御すると推測した。

2. 研究の目的

第1に、CHERP による選択的スプライシング制御についてゲノムワイドに解析する。第2に、選択的スプライシングを制御する新規の分子基盤を解明することにより、新たな原理を提示する。

3. 研究の方法

(1) 動物細胞株と細胞培養法

培養細胞は、56 で 30 分間非働化した FETAL BOVINE SERUM を 10% 添加した DMEM (High Glucose) (Wako 社) を用いて 37 °C、5%CO₂ で培養した。

ヒト培養細胞株として、ヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞、ヒト胎児腎臓由来細胞株 HEK293 Flp-InTM T-RexTM 細胞 (invitrogen 社) を使用した。

(2) RNAi によるノックダウン

RNAi は Stealth RNAi siRNA (invitrogen 社) を用いて、Lipofectamine2000 (invitrogen 社) により細胞導入した。導入後、48 時間 37 °C で培養した。

本研究で用いた CHERP#1 siRNA は CHERP 遺伝子の CDS 領域、CHERP#2 siRNA は CHERP 遺伝子の 5'UTR 領域を認識する。

(3) ヒト培養細胞からの核タンパク質抽出法

15cm dish 5 枚に培養したヒト培養細胞を PBS で洗浄した後回収し、遠心後に上清を除いた。細胞量の 2 倍量の hypotonic buffer (10mM HEPES / 1.5mM MgCl₂ / 10mM KCl / 0.2mM PMSF / 0.5mM DTT) で洗浄し、buffer 置換をおこない、氷上で 10 分間おくことで細胞を膨張させた。次にホモジナイザー (WHEATON 社) を用いてホモジナイズして遠心し、上清を細胞質抽出物として回収した。沈殿物を半量の low salt buffer (20mM HEPES / 1.5mM MgCl₂ / 1.4M KCl / 0.2mM EDTA / 25% Glycerol / 0.2mM PMSF / 0.5mM DTT) をゆっくりと添加し、更に 4 °C で 30 分攪拌した。この溶液を 14000rpm で 15 分間遠心し、得られた上清を核抽出物として回収した。また残りのペレットをソニケーションにかけ、同様に遠心し、得られた上清も核抽出物に加えた。得られた核抽出物は、dialysis buffer (20mM HEPES / 100mM KCl / 0.2mM EDTA / 20% Glycerol / 0.2mM PMSF / 0.5mM DTT) を用いて 4 °C で 90 分を 2 回で攪拌し、透析を行った。以上の操作は全て氷上または 4 °C で行った。

(4) Western blotting 法

抽出したタンパク質は 10%SDS-PAGE gel で電気泳動後、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (ImmobilonTM-P) (Milipore 社) にセミドライ式ブロッティング装置 (Bio-Rad 社) を用いてブロッティングした。メンブレンを 5%スキムミルク / 0.1% Tween20 / PBS を用いて 1~2 時間ブロッティング後、0.1% Tween20 / PBS で軽くリンス

し、0.1% / PBS で希釈した一次抗体を 4 で一晚反応させた。次にメンブレンを 0.1% Tween20 / PBS で 10 分 3 回洗浄し、0.1% Tween20 / PBS で希釈した HPR 融合二次抗体を常温で 1~3 時間反応させた。メンブレンを 0.1% Tween20 / PBS で 10 分 3 回洗浄した後、Immobilom Western (MILLIPOLE 社) を用いて化学発光させ、LAS-4000 mini (GE Healthcare 社) を用いて撮影した。

用いた抗体 α -CHERP ラビットポリクローナル抗体は名古屋大学 牧 正敏教授より分与して頂いた。

(5) 培養細胞からの total RNA 抽出法

培養細胞を回収し、Sepasol-RNA I Super G (ナカライテスク社) を 1ml 加え、ポルテックスミキサーで 2 分間攪拌後、5 分間室温に静置した。次に 200 μ l クロロホルムを加え転倒混和し、3 分間室温で静置した。次に室温、14000rpm、20 分間遠心して、上層(水相) 700ml を収集した。等量の 2-プロパノールと 3M NaOAc を 50 μ l 加え、転倒混和して室温で 10 分間静置した。15000rpm 4 で 10 分間遠心し、上清を除いた。そこへ 75%エタノールを 1ml 加え、ゆっくりと攪拌し懸濁した。15000rpm 4 で 6 分間遠心し、上清を除いた。完全に乾燥させ、RNA 用の water に 20 倍希釈した。その後 DNaseI 処理を行い、total RNA を抽出した。

(6) リアルタイム PCR 法

調製した total RNA を鋳型として、後述の方法で cDNA を合成した。合成した cDNA をテンプレートとして、Thunderbird SYBR qPCR Mix (TOYOBO 社) を使用してリアルタイム PCR を行った。解析は ABI Prism 7700 (Applied Biosystems 社) により行った。

(7) Exon array 解析

U2OS 細胞を 24 時間培養後、各因子を siRNA でノックダウンした。ノックダウン後 48 時間で total RNA を抽出した。Nano drop によって total RNA の濃度を測定した。次いで、アガロースゲル電気泳動によって RNA の状態が良いサンプルを選んだ。その後の操作は三重大学生命科学研究支援センターの小林裕子博士に Exon array 解析を依頼した。RNA Integrity Number (RIN 値) が 8.5 以上のサンプルを選び、ラベル化、ハイブリダイゼーション、スキャン、数値化をおこなって頂いた。Exon array 解析には Sure Print G3 Human Exon マイクロアレイキット 4 \times 180K G4832A (Agilent 社) を使用した。生データ (CEL file) を Gene Spring GX 13.0 (Agilent 社) を用いて解析した。

(8) RT-PCR 法

抽出した total RNA を鋳型として、Rever Tra Ace (TOYOBO 社) を用いて逆転写 PCR を行った。プライマーには Ramdom9 (TOYOBO

社) を用いた。合成した cDNA を鋳型として、プライマーを用いて KOD plus (TOYOBO 社) もしくは KOD FX NEO (TOYOBO 社) により PCR を行い、評価した。

4. 研究成果

(1) CHERP の特異的なノックダウンの確認

はじめに CHERP が RNAi によって特異的にノックダウンされているかを確認した。コントロールとして EGFP をノックダウンした細胞を用いた。ノックダウンした HeLa 細胞の抽出液中の CHERP を特異的な抗体を用いてウェスタンブロットを行った (図 1)。CHERP がノックダウンされていることを確認したことから、siRNA を使用して CHERP の発現量を大きく減少させることができるようになった。

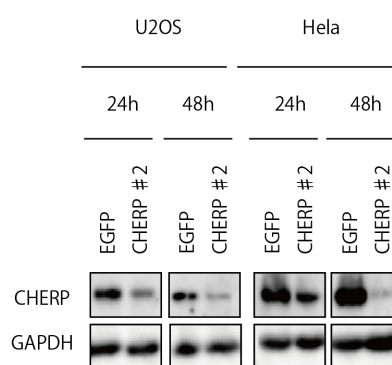


図 1 CHERP の siRNA によるノックダウン

(2) エキソンアレイ解析用サンプルの調整

次に RNA-FISH によって、CHERP ノックダウンで mRNA の核への蓄積が見られている細胞は U2OS であった。以後の解析に使用する細胞種を統一するため、エキソンアレイ解析では U2OS 細胞を用いて行うこととした。U2OS 細胞を用いてこれらの siRNA を使用してノックダウンを行い、48 時間後に細胞を回収し、total RNA 回収を行った。なお、LC-MS/MS 法による解析で CHERP は多くのスプライシング関連因子と相互作用していることが示唆された。U2snRNP 関連因子の数が多かったことから、CHERP は mRNA スプライシングの初期段階である 3' スプライス部位の認識に関わることが考えられる。そこで CHERP の他にも mRNA スプライシングに関連する U2AF65, UAP56, URH49 についても比較対象として解析を行った。

Total RNA を逆転写によって cDNA 化した。その後、リアルタイム PCR を行い、ノックダウン効率を調べた。その結果、10%程度までノックダウンできていることが確認した。結果として、エキソンアレイに用いた 3 つの lot はノックダウン効率が全て約 10%程度となっており、効率よくノックダウンできていると考えられた。後述のエキソンアレイ解析の結果からも、それぞれの発現量が減少していることを実際に確認した。

次に total RNA の完全度を調べることでより RNA の品質評価を行った。そのために RIN

(RNA Integrity Number) 値で評価することとし、RIN 値が 8.5 以上のサンプルを選んだ(表 1)。RIN 値は Agilent2100 バイオアナライザを用いて測定した。エキソンアレイ解析には RIN 値が 8.0 以上のサンプルが必要であるが、今回調製した RNA サンプルは全て基準を満たしていた。以上の結果より、今回の RNA の純度はアレイ解析に用いるサンプルとして適していると判断し、解析を進めた。

表 1 各サンプルの RIN 値等

		濃度 (ng/μl)	RIN 値	28S/18S
EGFP KD	lot1	446	8.8	1.8
	lot2	214	8.7	1.9
	lot3	248	9	2.1
CHERP KD	lot1	452	8.8	1.8
	lot2	306	8.5	1.6
	lot3	308	9	2.2
U2AF65 KD	lot1	438	9	1.7
	lot2	388	9	1.8
	lot3	376	9.1	2.2
UAP56 KD	lot1	458	8.9	1.7
	lot2	46	9	1.8
	lot3	372	8.8	1.6
URH49 KD	lot1	446	8.8	1.8
	lot2	402	8.8	1.8
	lot3	414	8.7	1.8

(3) CHERP ノックダウンによって発現量が大きく変動した遺伝子の GO term 解析

CHERP ノックダウンによって発現量が大きく変動した遺伝子についてどのような特徴があるか、GO term 解析を行った。CHERP ノックダウンによって 2 倍以上増加、減少した遺伝子の生物学的プロセスに分類される GO term を解析した。フィッシャー検定によって P 値<0.05 を有意であると定め、表に示した(表 2、3)。

表 2 CHERP ノックダウンで 2 倍以上発現が増加する GO term 解析

ID	Term	P-value
BP00203	Cell cycle	3.00E-21
BP00034	DNA metabolism	1.20E-10
BP00035	DNA replication	2.30E-10
BP00282	Mitosis	1.30E-09
BP00031	Nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	5.30E-08
BP00273	Chromatin packaging and remodeling	3.00E-05
BP00206	Chromosome segregation	6.00E-05
BP00207	Cell cycle control	6.50E-05
BP00036	DNA repair	6.90E-04
BP00204	Cytokinesis	7.80E-03
BP00224	Cell proliferation and differentiation	1.60E-02
BP00281	Oncogenesis	2.50E-02
BP00195	Meiosis	4.60E-02

その結果、発現量が減少した遺伝子群は有糸分裂や減数分裂など細胞周期に関わる GO

タームが多く見られた(表 2 にセルを灰色に塗りつぶして示す)。その他、DNA 修復に関わる遺伝子や腫瘍形成に関わる遺伝子が検出された。BP00203: Cell cycle の GO term の P 値が 3.00E-21 と非常に低いことから CHERP ノックダウンによって細胞周期に関与する遺伝子の発現が特異的に減少したことが分かる。

一方、発現量が増加した遺伝子群は、アポトーシス関連の GO term が最も P 値が低く、その他細胞の構造に関与する GO term が良く見られた。

表 3 CHERP ノックダウンで 2 倍以上発現が増加する GO term 解析

ID	Term	P-value
BP00253	Induction of apoptosis	3.50E-03
BP00120	Cell adhesion-mediated signaling	1.10E-02
BP00285	Cell structure and motility	1.40E-02
	Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	2.30E-02
BP00107	pathway	2.30E-02
BP00292	Other carbon metabolism	3.20E-02
BP00145	Small molecule transport	3.70E-02
BP00286	Cell structure	3.90E-02
BP00289	Other metabolism	4.10E-02

(4) CHERP ノックダウンによって Splicing Index が大きく変動した遺伝子の GO term 解析

エキソンごとの発現量の変化に着目した。CHERP ノックダウンによってスプライスインデックス(SI)が大きく変動した遺伝子についてどのような特徴があるか、GO term 解析を行った。

はじめに SI > |2.0| の遺伝子の GO term 解析を行った。CHERP ノックダウンによって特定のエキソンの発現量が 4 倍以上変化した遺伝子の生物学的プロセスに分類される GO term を解析した。フィッシャー検定によって P 値<0.05 を有意であると定め、表に示した(表 4)。

表 4 CHERP ノックダウンで 4 倍以上スプライスインデックス(SI)が変化する GO term 解析

ID	Term	P-value
GO:0001539	Ciliary or flagellar motility	2.00E-04
GO:0001568	Blood vessel development	4.70E-03
GO:0001944	Vasculature development	5.40E-03
GO:0007420	Brain development	1.10E-02
GO:0030334	Regulation of cell migration	1.40E-02
GO:0045765	Regulation of angiogenesis	1.60E-02
GO:0048699	Generation of neurons	2.00E-02
GO:0030856	Regulation of epithelial cell differentiation	2.50E-02
GO:0021932	Hindbrain radial glia guided cell migration	2.50E-02
GO:0022008	Neurogenesis	3.10E-02
GO:0045601	Regulation of endothelial cell differentiation	3.30E-02
GO:0006464	Protein modification process	3.50E-02
GO:0016310	Phosphorylation	3.70E-02
GO:0030900	Forebrain development	4.00E-02
GO:0006865	Amino acid transport	4.10E-02
GO:0021535	Cell migration in hindbrain	4.20E-02
GO:0051260	Protein homooligomerization	4.70E-02

有意差のある GO term をいくつも観察したが、CHERP ノックダウンで2倍以上発現が減少する GO term 解析に比べて P 値は低く特定の細胞過程で特に働いているという結果は得られなかった。

(5) 考察

遺伝子レベルの解析とエキソンレベルの解析において、細胞周期関連の GO タームが上位に見られた(表2)。一概に細胞周期と言っても、細胞周期制御のメカニズムは複雑であり、数多くの様々なタンパク質が関与している。また“cell cycle”、“mitosis”、“cell division”などの GO タームはいずれも大意であり、様々な意味を含む。よって細胞周期にどのように関与する遺伝子が含まれているのかを調べるために細胞周期関連遺伝子のみを GO term 解析にかけた。遺伝子レベルとエキソンレベル共に発現量が変化していた細胞周期関連の遺伝子は、有糸分裂の M 期に関わる GO タームが上位を占めた。CHERP ノックダウンにより細胞分裂に何らかの異常が起きていることが考えられる。CHERP は mRNA スプライシングに関与する因子であり、間期で働く因子であるが、細胞周期に関わる遺伝子の発現を制御することを通して M 期での機能を調節している可能性が考えられた。

現在、CHERP ノックダウン時の細胞周期への影響をフローサイトメトリーにて解析中である。CHERP ノックダウンによる細胞周期への影響が見られる場合、その原因を探索していきたい。

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 3 件)

Fujimoto, S., Tsuji, T., Fujiwara, T., Takeda, TA., Merriman, C., Fukunaka, A., Nishito, Y., Fu, D., Hoch, E., Sekler, I., Fukue, K., Miyamae, Y., Masuda, S., Nagao, M., and Kambe, T. The PP-motif in luminal loop 2 of ZnT transporters plays a pivotal role in TNAP activation. *Biochem J.* 2016 Sep 1;473(17):2611-21. doi: 10.1042/BCJ20160324.

Miyamae, Y., Nishito Y., Nakai, N., Nagumo, Y., Usui, T., Masuda, S., Kambe, T. and Nagao M. Tetrandrine induces lipid accumulation through blockade of autophagy in a hepatic stellate cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Aug 12;477(1):40-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.018.

Kurata, M., Murata, Y., Momma, K., Mursi, I. F. A., Takahashi, T., Miyamae, M., Kambe, T., Nagao, M., Narita, H., Shibuya, Y. and Masuda, S. The isoflavone fraction from

soybean presents mRNA maturation inhibition activity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2017 Mar;81(3):551-554. doi: 10.1080/09168451.2016.1249451.

[学会発表](計 15 件)

猪瀬春子、増田誠司、人工的 mRNA 核外輸送システムによる組換えタンパク質高効率発現系の構築、日本動物細胞工学会、仙台市・東北大学、2015年7月9日、10日

伊藤慶紗、藤田賢一、増田誠司、異なる複合体を形成する mRNA 輸送因子 UAP56 および URH49 の構造解析、日本 RNA 学会、札幌、ホテルライフオート札幌、2015年7月16日

藤田賢一、伊藤慶紗、増田誠司、mRNA 核外輸送因子 UAP56 ならびに URH49 における複合体形成基盤と選択的 mRNA 輸送制御機構の解明、日本 RNA 学会、札幌、ホテルライフオート札幌、2015年7月17日

伊藤慶紗、藤田賢一、増田誠司、異なる複合体を形成する mRNA 輸送因子 UAP56 および URH49 の三次元構造解析、日本分子生物学会・日本生化学会合同大会、神戸、神戸ポートアイランド、2015年12月3日

藤田賢一、伊藤慶紗、増田誠司、mRNA 核外輸送共役因子 UAP56 ならびに URH49 における複合体形成と選択的 mRNA 輸送の制御基盤、日本分子生物学会・日本生化学会合同大会、神戸、神戸ポートアイランド、2015年2月3日

猪瀬春子、増田誠司、哺乳類 mRNA 核外輸送受容体補因子 NXT 遺伝子の多様化による mRNA 核外輸送ならびに遺伝子発現の制御、日本分子生物学会・日本生化学会合同大会、神戸、神戸ポートアイランド、2015年12月3日

藤田賢一、伊藤慶紗、増田誠司、mRNA 核外輸送因子 UAP56 と URH49 が異なる標的 mRNA 群を認識する仕組み、RNA frontier Meeting、蔵王、タカミヤヴィレッジホテル樹林、2015年12月10日

Kenichi Fujita, Misa Ito and Seiji Masuda、A Molecular mechanism to recognize distinct target mRNAs by UAP56 and URH49, the two closely related DEAD-box helicases., The 14th International Student Seminar、京都大学芝蘭会館、2016年3月11日

Intisar F. A. Mulsi, Naoko Fujiwara and Seiji Masuda、The interactome analysis of PABPN1 in the nucleus of HeLa cells, The 14th International Student Seminar、京都大学、芝蘭会館、2016年3月11日
増田誠司、大豆中の mRNA 成熟阻害活性の同定・構造活性相関・作用基盤の解明、日本農芸化学会大会、札幌、2016年3月

28日

Naoko Fujiwara, Maki Shigemoto, and Seiji Masada, A Dual function of MPP6 to stimulate the nuclear exosome、RNA2016、京都国際会議場、2016年6月28日

重本真紀、藤原奈央子、増田誠司、MPP6によるヒト核内エキソソーム活性化の分子機構、第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2016年12月2日

倉田雅志 増田誠司、mRNA成熟阻害活性を持つ食品由来成分の探索と作用機序の解明、第498回日本農芸化学会関西支部講演会、京都大学百周年時計台記念館、2017年2月4日

倉田雅志 渋谷恭之 増田誠司、The elucidation of the mechanism by which flavonoids inhibit mRNA processing 15th INTERNATIONAL STUDENT SEMINAR、京都、芝蘭会館、2017年2月23日

倉田雅志 増田誠司、mRNA成熟阻害活性を持つフラボノイドの作用機序の解明、日本農芸化学会2017年度大会、京都・京都女子大学(京都)2017年3月20日

〔その他〕

ホームページ

京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学教室

<http://www.bunshioutou.lif.kyoto-u.ac.jp>

https://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/?post_type=labos&p=160&doing_wp_cron=1461128165.6797769069671630859375

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 誠司 (MASUDA, Seiji)

京都大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号： 20260614