

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08225

研究課題名(和文) 低分子化合物によるスプライス部位選択制御の分子機構解明と疾患原因変異への応用

研究課題名(英文) Chemical approach to elucidate the molecular mechanism for the splice site selection

研究代表者

米田 宏 (Maita, Hiroshi)

北海道大学・薬学研究院・講師

研究者番号：60431318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでの研究でスプライシング異常を誘導する遺伝子変異を含むモデル遺伝子を構築し、これをレポーターとしてスプライシング改善化合物を同定してきた。さらに、同定した化合物の作用点を解析し、スプライシング異常が原因の遺伝性疾患の治療法の開拓を目的としている。本研究では転写産物全体への影響を検討するRNA-seq解析をきっかけとして、化合物がスプライシング調節活性を示すための標的候補としてCDK9を特定し、さらに他のCDK9キナーゼ阻害剤に同様のスプライシング調節作用を示すものがあることを見出した。これらはスプライシングの正確性を化合物で制御するための基盤的知見となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では遺伝性疾患の原因遺伝子変異のうち、mRNAの編集に必要なスプライシング反応に異常を誘発する変異に着目した。スプライシング反応を異常にする変異があっても正常なスプライシングを可能にする薬があれば、このタイプの変異による遺伝性疾患は治療できる可能性がある。実際、スプライシング調節による治療法自体はすでに開発されており、RNAに張り付いてスプライシングを調節する核酸医薬が承認されている。ただし、これは遺伝子特異的な治療薬であり、広範なスプライシング異常を是正する低分子化合物は存在しない。本研究ではそのような活性化化合物を探索し、作用の仕組みを明らかにすることを目的とした。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we have developed a reporter gene that contains the splice site mutation. We have screened small compounds using the reporter gene to identify hit compounds that can correct the splicing pattern of the reporter gene. A compound was successfully found and then we analyzed changes of transcriptome by RNA-seq. Transcriptome analysis revealed that the compound significantly reduced the normally retained introns, which may be interpreted as a result of transcription repression because generally half-life of introns are shorter than mature mRNA. In addition, this compound has been reported to block CDK9, a kinase stimulating transcription elongation by phosphorylating RNA polymerase II. Therefore, we hypothesized that the splicing modulating activity of the compound is based on inhibition of CDK9 and further analysis confirmed that CDK9 inhibitors have indeed an activity to modulate splicing, which suggest the novel approach to modulate splicing.

研究分野：分子生物学

キーワード：スプライシング ケミカルバイオロジー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

スプライシングにおけるイントロン上のスプライス部位の選択機構は2つの階層での研究が進んできた。1つは pre-mRNA 内にあるモチーフに結合する SR タンパク質や hnRNP タンパク質による制御で、これは上記の RNA 結合タンパク質が結合した RNA 部位近傍でのスプライソソーム形成を調節することで、特定の位置のスプライス部位を活性化/抑制するメカニズムである<sup>1</sup>。これは長大なイントロン配列のどこでスプライシングを起こすかの、大まかなスプライス部位の選択機構を説明する。また、もう一つは出芽酵母を中心に進んできた研究で、スプライソソームそのものにスプライシング反応の配列特異性を維持する校正機能が備わっていることが明らかにされている<sup>2</sup>。この校正機構はスプライソソームがスプライシングの化学反応を行う際の反応時間の長短を kinetic に検知して基準に合わないものを放出する仕組みとなっている。保存されたスプライス部位はわずか数塩基であり、このごく短い配列しか目印にできないにも関わらず、スプライシング反応が極めて正確に、1塩基のズレもなくイントロンを取り除けるのはこの校正機構によるところが大きいと推測される。このように、スプライス部位の選択は複数の段階で制御されている。

近年、疾患原因変異の探索が進むに連れ、その5%以上が、スプライシングが正常に起こらなくなるスプライス部位の置換変異であることが明らかとなっている。この事実は言い換えれば、変異部位でのスプライシングが回復できさえすれば、疾患原因となる異常タンパク質の産生を抑え病態を根本から改善できると予想される。しかし、スプライス部位の選択は前述の通り多段階の反応であり、どの段階を標的にすれば変異スプライス部位での異常なスプライシングを回復させることができるのかは不明であった。そこで我々は変異スプライス部位を有するレポーター遺伝子を作成し、そのレポーター遺伝子のスプライシングを正常なスプライス部位を持つレポーター遺伝子と同じパターンに回復させる化合物を取得することで<sup>3</sup>、動物細胞でのスプライス部位選択で重要かつ治療標的となりうる段階を明らかにしようと考えた。

まず、スプライソソームの生合成に影響する化合物を化合物ライブラリーからスクリーニングし、そこから変異スプライス部位でのスプライシングを回復させる化合物として前述のレポーター遺伝子への効果を指標とする二次スクリーニングを行い、取得した(図1)。

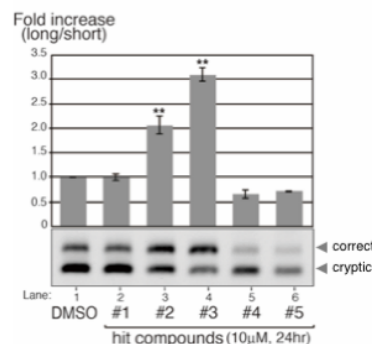


図1. 陽性化合物の同定

### 2. 研究の目的

本研究ではこの陽性化合物群がなぜレポーター遺伝子の変異スプライス部位でスプライス部位が正常であるときと同じようなスプライシングパターンを誘導できるのかを調べることで、また、その作用機構に関する分子レベルの解析、さらにこのような化合物が疾患原因変異を含むモデル細胞のスプライシングに示す効果を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

化合物の作用解析では、類縁化合物を合成し、化合物のどの部位が重要かを調べ、より高活性な化合物、もしくは構造は近いが活性を失った化合物を取得することがその後の解析を進める鍵となる。本研究ではそのような化合物を有機合成の研究グループとの共同研究で合成し、細胞をこれらの化合物で処理した場合の転写産物全体への影響を検討した。この比較により、レポータースプライシングへの効果と関連した転写産物の変化を検出することが可能となる。さらに、その抽出してきたスプライシング調節活性と関係する転写やスプライシングへの影響の全体像を既知の阻害剤と比較することで、作用点を推測することが可能になると考えた。

### 4. 研究成果

次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析結果にさらにスプライシングパターンを抽出して比較できるソフトウェアを適用して、化合物処理後のスプライシング変化を可視化した。その結果、この化合物を処理して起こる転写産物のスプライシング変化の大多数がイントロンリテン

ションと呼ばれるタイプの選択的スプライシングの変動に集中していた (図2)。

イントロンリテンションは、スプライシングされるはずのイントロンが残ってしまう選択的スプライシングであるが、陽性化合物を処理すると、この残存することの多いイントロンが除去されたアイソフォームが増加、すなわちスプライシングが起りやすくなったとの結果になった。これは一見すると、変異スプライス部位でも正常なスプライシングが起りやすくなる現象と似ているように感じられるが、他の解釈もある。今回の RNA-seq 解析には化合物処理 4 時間後の細胞全体から調整した total RNA を用いており、これは、例えば転写が停止した場合と同じ現象が観察される可能性がある。すなわち、転写停止時には、スプライシングされてイントロンを含まない成熟 mRNA の方が細胞内での寿命が長い  
ため、相対的にイントロンを含むスプライシング前の転写産物よりも細胞内での比率が高まり、結果的にスプライシングが亢進したように見える可能性である。また、この陽性化合物が以前に別のグループからの報告で mRNA の転写を行う RNA ポリメラーゼの転写活性化に必要なキナーゼである CDK9 の阻害活性が報告されており<sup>4</sup>、この阻害作用が転写抑制を誘導して、イントロンリテンションの減少という結果が得られたとの仮説が考えられた。

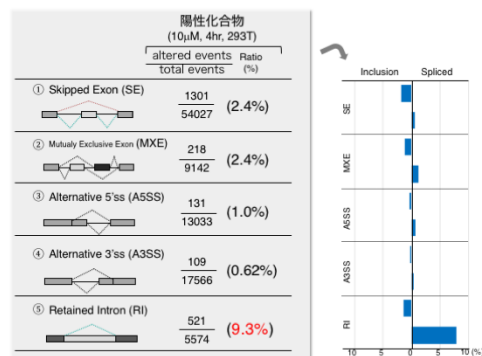


図2. RNA-seq の解析結果

そこで、その他の CDK9 阻害剤についての RNA-seq データを公共データベースから取得し、それらについても同じ解析パイプラインで処理して、同様のスプライシング変化が検出されるか検討した。その結果、イントロンリテンションの減少が CDK9 阻害剤の total RNA-seq 解析に共通して観察される現象であることが明らかになった。この結果は CDK9 阻害が陽性化合物のスプライシングへの効果の作用点である可能性を示していることから、続いて他の CDK9 阻害剤が変異スプライス部位を持つレポーター遺伝子のスプライシングにどのような効果を示すか検討した。その結果、スクリーニングで得られた陽性化合物以外の CDK9 阻害剤も変異スプライス部位でのスプライシング回復活性を示すことが確認できた。しかし、その回復活性の程度は CDK9 阻害の強弱とは相関がなく、CDK9 阻害剤の中でもばらつきが見られた。

さらに CDK9 阻害が作用点であるかを調べるために、CDK9 やその補助因子である cyclin T1 をノックダウンした場合に陽性化合物の効果はどうなるかを検証したところ、他の CDK ファミリー分子のノックダウンでは化合物効果との相互作用が見られなかったが、CDK9 や Cyclin T1 ノックダウン時には化合物効果の減弱や増強といった相互作用が見られた。この結果は CDK9 活性の阻害が陽性化合物のスプライシング調節活性と関係することを裏付ける。

CDK9 による RNA ポリメラーゼ II のリン酸化はその C 末端のリピード領域に起こるもので、そのリン酸化の有無が C 末端を介した RNA ポリメラーゼ II の転写伸長活性と強く関係することが知られている。そこで、既知の CDK9 阻害剤と陽性化合物を処理した場合の RNA ポリメラーゼ II の C 末端領域のリン酸化の変動を検討したところ、興味深いことに陽性化合物では RNA ポリメラーゼ II のリン酸化にそれほど顕著な影響は見られなかった。前述のレポーター遺伝子を用いた実験でも複数の CDK9 阻害剤がスプライシング調節活性を示したが、その程度にはばらつきがあったことと考えると、陽性化合物が CDK9 を阻害した場合に、リン酸化レベルが変動してスプライシングにつながる因子は、当初想定された RNA ポリメラーゼ II ではない可能性が示唆される。

本研究ではこれまでのスクリーニングで得られたスプライシング調節化合物の作用点を詳細に解析し、その標的タンパク質が CDK9 であるところまで確認することができた。また、一般的にはキナーゼには多数のリン酸化基質となる分子が存在し、CDK9 阻害剤によってもリン酸化が変動するスプライシング関連因子が RNA ポリメラーゼ II 以外に存在する可能性が示せたことは今後の展開を考えると重要な結果である。CDK9 阻害剤は転写への影響が大きく様々な副作用が予想されるが、もしスプライシングに特化した CDK9 のリン酸化標的分子が見つければ、その分子の活性を調節することで、より特異性の高いスプライシング調節法につながる可能性が期待される。また今後、この CDK9 下流のスプライシング調節因子を同定することで、動物細胞でス

プライス部位を選択する機構の解明も進むことが予想される。

#### 引用文献

1. Ule J, Blencowe BJ. (2019) *Mol. Cell.* 76(2):329-345.
2. Mayas RM, Maita H, Semlow DR, Staley JP. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(22):10020-5.
3. Chiba M, Ariga H, Maita H. (2016) *Chem Biol Drug Des.* 87(2):275-82.
4. Lau KS, Zhang T, Kendall KR, Lauffenburger D, Gray NS, Haigis KM. (2012) *PLoS One.* 7(7):e41343.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maita H. and Nakagawa S.	4. 巻 11
2. 論文標題 What is the switch for coupling transcription and splicing? : Pol II- CTD phosphorylation, phase separation and beyond.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA	6. 最初と最後の頁 e1574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/wrna.1574	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumaru T., Inai M., Ishigami K., Iwamatsu T., Maita H., Otsuguro S., Nomura T., Matsuda A., Ichikawa S., Sakaitani M., Shuto S., Maenaka K. and Kan T.	4. 巻 27
2. 論文標題 Divergent synthesis of kinase inhibitor derivatives, leading to discovery of selective Gck inhibitors.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2144-2147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2017.03.055.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米田 宏
2. 発表標題 翻訳抑制作用を示す化合物による U-body 誘導機構の解析
3. 学会等名 日本RNA学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米田 宏
2. 発表標題 Chemical approach to study how membrane-less organelles control RNA processing
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米田 宏
2. 発表標題 変異スプライス部位でのスプライシングを誘導する化合物の発見と解析
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第12回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 米田 宏
2. 発表標題 スプライス部位認識の正確性を緩める化合物の作用機構
3. 学会等名 日本RNA学会第19回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 米田 宏
2. 発表標題 高等真核生物がスプライス部位認識の正確性と柔軟性を両立する仕組み
3. 学会等名 日本分子生物学会第40回年会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 米田 宏
2. 発表標題 Chemical approach to elucidate the regulatory mechanisms of snRNP biogenesis
3. 学会等名 日本分子生物学会第42回年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----