

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19232

研究課題名(和文)カルシウムシグナリングによる選択的mRNAスプライシング制御原理の新規解明

研究課題名(英文) Analysis of the principle of alternative mRNA splicing evoked by calcium signaling.

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：カルシウムシグナルはセカンドメッセンジャーとしてよく知られているが、そのシグナルの一部は核に伝えられて特異的な遺伝子群の転写を促進する。しかし、選択的スプライシングに関わるかについて知見はなかった。選択的mRNAスプライシングは、遺伝子がコードする数以上のタンパク質を生み出す仕組みであり、生物の高等化に伴ってその数は増加する。本研究では、カルシウムシグナルによる選択的スプライシング制御を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルシウムシグナルはセカンドメッセンジャーとして細胞代謝、遺伝子発現に影響を与える。しかし遺伝子がコードする数以上のタンパク質を生み出す仕組みである選択的mRNAスプライシングに影響を与えるかについて分かっていなかった。今回の研究は、カルシウムシグナルが選択的mRNAスプライシングにどのような影響を持つかを明らかにすることによってこれまでにない新しい概念を提示でき、他のセカンドメッセンジャー研究にも影響を及ぼすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Calcium signaling is well known as a second messenger in the cell. Part of the signal is delivered into the nucleus and evoked the specific set of gene transcription. However, there is no information whether calcium signaling affect the regulation of alternative mRNA splicing at the genome wide level. Alternative mRNA splicing produces more proteins than genes encoding proteins. The use of alternative mRNA splicing becomes frequent when living organisms acquire a complexity in their body. In this study, the regulation of alternative mRNA splicing was examined when calcium signaling was induced.

研究分野：細胞生物学

キーワード：選択的スプライシング カルシウム

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Ca²⁺シグナリングと遺伝子発現

Ca²⁺は、刺激をきっかけとして細胞外や小胞体から細胞質に流入することにより細胞内情報伝達を制御するセカンドメッセンジャーである。細胞内の Ca²⁺濃度の変化は幅広い細胞応答へとつながっており、Ca²⁺シグナルの一部は、核に伝えられて特異的な遺伝子群の転写を促進する。これまで Ca²⁺シグナルによる遺伝子発現はもっぱら転写のレベルで解析されてきた。

(2) 遺伝子発現と選択的スプライシングの意義

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り、選択的スプライシングを受ける遺伝子の数(割合)は、生物の高等化や複雑化に伴って多くなる(図1)。特に、ヒトでは70%以上の遺伝子において選択的スプライシングが起こる。また、ヒト遺伝病の20-50%はスプライシングの異常に起因し、筋ジストロフィーや筋萎縮性側索硬化症といった難治性疾患も選択的スプライシングの破綻によるRNA病である(Nat. Rev. Gen. 17, 19-32, 2016など)。このため選択的スプライシング機構の解明は、生物進化の理解やヒト遺伝病の原因究明や治療法開発の鍵となる。選択的スプライシングに関わる因子は既に多数見いだされているが、いまだ統一的な概念の提唱には至っていない。加えて、Ca²⁺シグナルと mRNA 選択的スプライシングを結びつける知見はこれまではなかった。

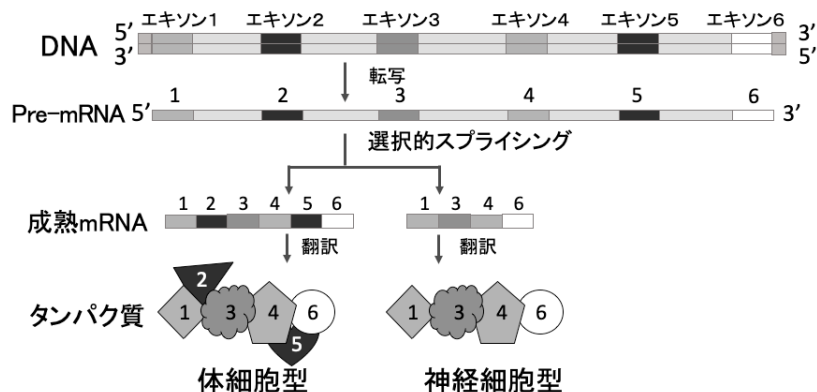


図1 選択的スプライシングによる生成されるタンパク質の例

(3) 申請者のこれまでの研究と研究構想に至った経緯

申請者は、mRNA プロセッシングに関する研究を行ってきた。その研究過程で、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、IP₃R1 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。そこでエクソンアレイ解析を行い、CHERP が筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの疾患関連遺伝子を含む様々な遺伝子の選択的スプライシングを制御していることを観察した。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 と強く相互作用することを見いだした。さらに重要なことに、CHERP は Ca²⁺代謝に関わる因子として同定されてきたことから、Ca²⁺濃度を変化させると相互作用する因子が変化した(図2)。これら一連の解析から、CHERP は、単に選択的スプライシングを制御する因子ではなく、Ca²⁺シグナルと連動して選択的スプライシングを制御する新規因子と考えている。現在考えている CHERP による選択的スプライシング制御のモデルは、「Ca²⁺シグナルに応答して CHERP は U2 snRNP や U2AF との相互作用からヒストンへと相互作用因子を変えることで、3' スプライス部位選択を制御する新規原理」を考えている。これは外界からの刺激に応答して選択的スプライシングを制御するという従来にない全く新しい概念で選択的スプライシングを作用させる原理である。

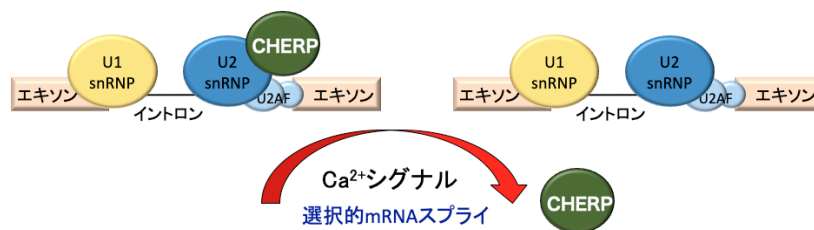


図2 Ca²⁺によるCHERPを介した選択的mRNAスプライシングの制御仮説

2. 研究の目的

本研究は、第1に、細胞内 Ca^{2+} シグナリングによる CHERP を介した選択的スプライシング制御の原理を明らかにすることで、シグナル伝達経路と選択的スプライシングとのクロストークを通じた遺伝子発現制御に新規概念を導入することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物細胞株と細胞培養法

培養細胞は、 56°C 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% CO_2 で培養した。また、ヒト培養細胞株として、ヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞を使用した。

(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 siRNA は CHERP 遺伝子の 5' UTR 領域を認識する。

(3) 培養細胞からの total RNA 抽出法

培養細胞を回収し、Sepsol-RNA I Super G (ナカライテスク社) を 1ml 加え、ボルテック スミキサーで 2 分間攪拌後、5 分間室温に静置した。次に $200\ \mu\text{l}$ 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 $50\ \mu\text{l}$ 加え、転倒混和して室温で 10 分間静置した。15000rpm 4°C 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°C で 6 分間遠心し、上清を除いた。沈殿を乾燥させ、RNA 用の water に再溶解した。その後 DNaseI 処理を行い、ゲノムに由来する産物を完全に消化して total RNA を抽出した。

(4) 逆転写反応

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 Random primer (9 mer) (TOYOBO 社) を用いて cDNA を合成した。

(5) PCR 反応

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。

(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。

(7) 次世代シーケンス解析

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。その後はシーケンス解析に出し、結果をゲノム状にマッピング、rMATS 等の解析を行った。

4. 研究成果

(1) CHERP ノックダウン効率の確認

Ca^{2+} による選択的スプライシング制御は CHERP を介したものであると考えている。そこで CHERP が制御する選択的スプライシングを解析するために CHERP ノックダウンの効率を確認した。細胞より totalRNA を回収して、逆転写反応を行なったのち、リアルタイム PCR を実施した。その結果、CHERP のノックダウンは約 90% であることを観察した。これはノックダウンの効率として十分であると判断されたので、引き続き次世代シーケンス解析を行うサンプルとした。

(2) 次世代シーケンス解析による CHERP が制御する選択的スプライシングの解析

次世代シーケンス解析データをゲノムにマッピングし、解析が良好であることを確認した。ついで、選択的スプライシングを解析する rMATS にて CHERP ノックダウンによる影響を観察した。その結果、典型的な選択的スプライシングの変化において、すべてが影響を受けていた (図 3)。CHERP による選択的スプライシング変化を確認したので、今後詳細な解析を行うことにしている。

(3) Ca^{2+} により発現が変化する遺伝子の検索と Ca^{2+} による誘導条件の検討

Ca^{2+} により発現が誘導される PPP1R15A や HSPA5 といった mRNA が報告されている (Autophagy,

10:1475-90 (2013)). この報告を元に、Ca²⁺による誘導条件の検討を行なった。その結果、タブシガールジン、A23187において良好な条件を見出した。見出した条件にて細胞を刺激し、totalRNAを回収した。このサンプルを次世代シーケンス解析に供した。現在、解析中である。

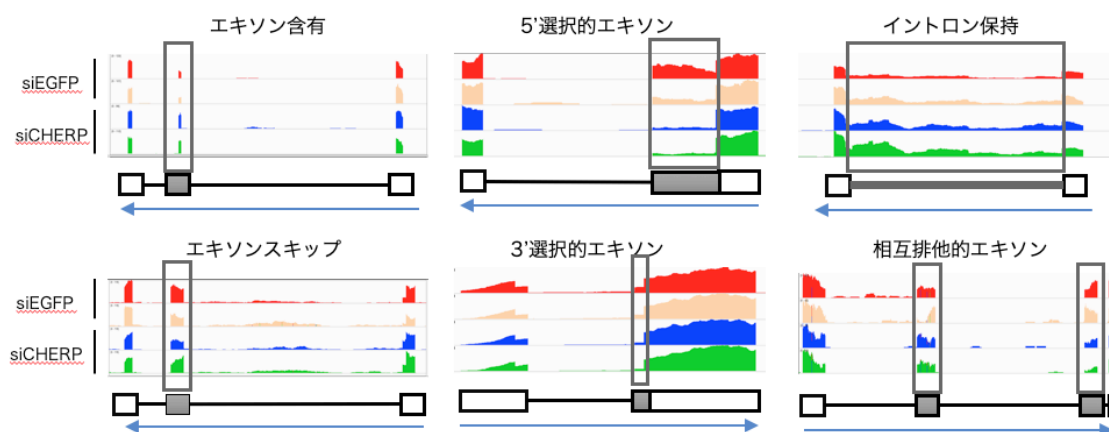


図3 CHERPによる選択的スプライシングの変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) Morimoto M, Mitsukawa M, Fujiwara C, Kawamura Y, Masuda S., Inhibition of mRNA processing activity from ginger-, clove- and cinnamon-extract, and by two ginger constituents, 6-gingerol and 6-shogaol., *Biosci Biotechnol Biochem.* 83, 498-501, 2019、査読有、doi: 10.1080/09168451.2018.1547107.
- (2) Okamura M, Yamanaka Y, Shigemoto M, Kitadani Y, Kobayashi Y, Kambe T, Nagao M, Kobayashi I, Okumura K, Masuda S. Depletion of mRNA export regulator DBP5/DDX19, GLE1 or IPPK that is a key enzyme for the production of IP6, resulting in differentially altered cytoplasmic mRNA expression and specific cell defect. *PLoS One*, 13, e0197165, 2018、査読有、doi: 10.1371/journal.pone.0197165
- (3) Kurata, M., Morimoto, M., Kawamura, Y., Mursi, I. F. A., Momma, K., Takahashi, M., Miyamae, Y., Kambe, T., Nagao, N., Narita, H., Shibuya, Y. and Masuda, S., Inhibition of mRNA Maturation by Compounds Which Have a Flavonoid Skeleton, *Biochem. Mol. Biol.* 2, 46-53, 2017、査読有、doi: 10.11648/j.bmb.20170204.13
- (4) 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.* 81, 551-554, 2017、査読有、doi: 10.1080/09168451.2016.1249451

〔学会発表〕(計 18 件)

- (1) 原田光太郎、池田侑弥、藤田賢一、増田誠司、「The identification of novel components interacting with selective mRNA exporter RNA helicase URH49」、17th International Student Seminar、京都、2019年3月
- (2) 光川瑞葵、森本茉莉、増田誠司、「Identification of the compound which inhibits the mRNA maturation process and its intercellular target proteins from Coffee」、17th International Student Seminar、京都、2019年3月
- (3) 原田光太郎、藤田賢一、増田誠司、「The identification of novel components interacting with selective mRNA exporter RNA helicase URH49」、2017年度生命科学系学会合同年次大会、横浜、2018年11月
- (4) 三宅俊太郎、増田誠司、「核内 mRNA の代謝阻害活性を持つ薬剤のスクリーニングおよびその作用機序の解析」、第41回日本分子生物学会、横浜、2018年11月
- (5) 藤田賢一、原田光太郎、引間孝明、小島正樹、三上文三、増田誠司、「UAP56とURH49による選択的 mRNA 輸送を決定づける分子機構の解明」、第20回日本 RNA 学会年会、大阪、2018年7月
- (6) 倉田雅志、高島裕之、瀬尾茂人、増田誠司、渋谷恭之「スプライシング阻害作用を持つ活性フラボノイドの作用機序の解明」、第72回 NPO 法人 日本口腔科学会学術集会、愛知県名古屋市ウイングあいち、2018年5月
- (7) 原田光太郎、藤田賢一、西野勝俊、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司、「RNA ヘリカーゼ URH49 の新規相互作用因子の同定および機能解析」、2018年度公益社団法人日本農芸化学会、名古屋、2018年3月
- (8) 三宅俊太郎、西野勝俊、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司、「核内 mRNA 代謝阻害活性を持つ化合物の探索とその分子基盤の解析」、日本農芸化学会 2018 大会、名古屋、2018年3月

- (9) 原田光太郎、藤田賢一、増田誠司「The identification of novel components interacting with selective mRNA exporter RNA helicase URH49」、16th International Student Seminar、京都、2018年2月
- (10) 三宅俊太郎、西村総一、増田誠司、「Screening of the compound that have mRNA maturation inhibitory activity and analysis of its function.」、16th International Student Seminar、京都、2018年2月
- (11) Yasutaka Yamanaka, Seiji Masuda、「CHERP controls gene expression through modulating alternative mRNA splicing」、16th International Student Seminar、京都、2018年2月
- (12) 藤田賢一、入江みどり、原田光太郎、伊藤慶紗、引間孝明、小島正樹、三上文三、増田誠司、「UAP56とURH49による選択的 mRNA 輸送制御を決定づける分子機構の解明」、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月
- (13) 入江みどり、藤田賢一、伊藤慶紗、引間孝明、小島正樹、三上文三、増田誠司、「選択的 mRNA 核外輸送に機能する UAP56ならびに URH49 の立体構造解析による遺伝子発現調節機構の解明」、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月
- (14) 原田光太郎、藤田賢一、増田誠司、「The identification of novel components interacting with selective mRNA exporter RNA helicase URH49」、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月
- (15) 三宅俊太郎、西村総一、藤原奈央子、増田誠司、「mRNA 成熟阻害活性を持つ薬剤のスクリーニングおよびその作用機序の解析」、2017年度生命科学系学会合同年次大会、神戸、2017年12月
- (16) 藤田賢一、入江みどり、原田光太郎、増田誠司、「多様化した DEAD box helicases である UAP56とURH49による選択的 mRNA 輸送を司る分子基盤」、第19回日本RNA学会年会、富山、2017年7月
- (17) Yasutaka Yamanaka, Seiji Masuda、「CHERP controls gene expression through modulating alternative mRNA splicing」、第19回日本RNA学会、2017年7月
- (18) Masashi Kurata, Yasuko Senga, Yasuyuki Shibuya, Seiji Masuda、「The elucidation of the mechanism by which flavonoids inhibit mRNA processing」、第71回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2017年4月26 - 28日

〔図書〕(計1件)

- (1) Mursi IFA and Masuda S, Chapter 9 “The production of recombinant proteins from mammalian cells using RNA element.” p131-150, “Applied RNA Bioscience” edited by Masuda S and Izawa S, Springer ISBN:978-981-10-8371-6, 2018、査読有

〔その他〕

ホームページ

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

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

<http://www.bunshioutou.lif.kyoto-u.ac.jp/masuda/ホーム.html>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。