

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22280

研究課題名（和文）活性フラボノイドによる選択的mRNAスプライシング制御の分子機構解明と応用展開

研究課題名（英文）Molecular mechanism of alternative mRNA splicing regulation by active flavonoids and its application

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）：食品成分よりアピゲニンとルテオリン（活性フラボノイド）に強いmRNAスプライシング阻害活性を持つことを見いだした。そこでNGS解析を実施し、活性フラボノイドが様々な遺伝子の選択的スプライシングに大きく影響していることを示した。スプライシングが阻害されているイントロンの特徴を解析したところ、標的イントロンの長さは短く、GC含有率は高く、そしてスプライスサイトスコアが低い配列をもっていた。次いでミニ遺伝子を作製して上記の検証を行った。その結果、活性フラボノイドは弱いスプライスサイトをもちイントロンに対し、イントロン保持すなわちスプライシング阻害を引き起こしていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「食品成分が選択的スプライシングを制御する」ことは、これまでの概念にはなかったことである。加えて、活性フラボノイド以外にもスクリーニングで選択的スプライシングを生じさせる化合物を生成単離した。このことから選択的スプライシングを制御する化合物は他にも広く食品中に存在すると考えられた。本研究は、今後食品成分による選択的スプライシング制御機構の迅速な解析のための適切な解析プラットフォーム環境として有用となることを示した。

研究成果の概要（英文）：Apigenin and luteolin (active flavonoids) have strong inhibitory activity of mRNA splicing. To survey affected introns by active flavonoid treatment, we performed NGS analysis and detected significant changes in the alternative mRNA splicing of various genes. The characteristics of the target introns had shorter length, higher GC content, and lower splice site score. The reporter-gene was then generated to verify the above observations. The results showed that active flavonoids caused intron retention and resulted in splicing inhibition, for introns with weak splice sites.

研究分野：食品分子生物学

キーワード：選択的mRNAスプライシング アピゲニン ルテオリン 次世代シーケンス解析

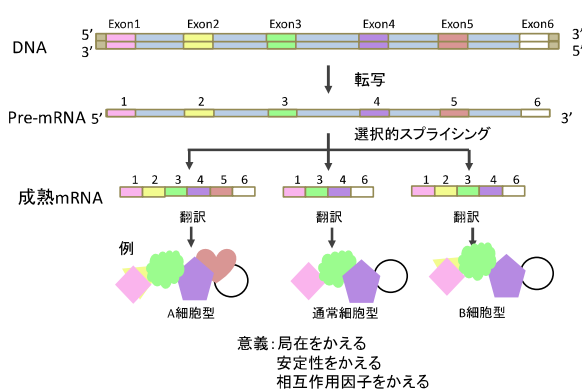
## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 食品成分に由来する生理活性化合物の遺伝子発現制御解析の現状

食品成分には実に様々な生理活性を持つことが明らかにされてきている。中には細胞の遺伝子発現を促進する化合物も見出されている。ただ従来の解析法は、単一あるいは少数の特定遺伝子の発現促進で評価されてきた。一方、ヒトでは多くの遺伝子において選択的 mRNA スプライシング(以後、選択的スプライシング)が生じている。しかし、食品成分が遺伝子の選択的スプライシングに与える包括的效果については、これまで解析されていない。

### (2) 選択的 mRNA スプライシングの生物学的意義

次世代シーケンサー(NGS)が実用化され、途方もないスピードで多くの生物の全ゲノム配列が判明した。その結果、生物の持つ遺伝子の数と生物の複雑さには、相関関係はあるものの当初期待されていたほどではなかった。このためヒトを代表とする高等生物には「複雑さ」を実現するための制御システムが存在すると考えられてきた。その制御システムの1つが選択的スプライシングである。実際、選択的スプライシングは酵母ではほとんど見られず、生物の複雑さが増すにしたがって頻度高く観察される(図1)。特に、ヒトでは少なくとも80%以上の遺伝子において選択的スプライシングが起こると見積もられており、神経細胞や心筋細胞といった様々に分化した複雑な細胞機能を実現する鍵となるメカニズムの1つと理解されている。このため、選択的スプライシングを制御する内因性因子や薬剤は世界的に高い関心を集めている(*Genes Dev*, 32, 309-320, 2018, *Nat Med* 24, 497-504, 2018, *Cell*, 170, 312-323, 2017)。



### (3) 研究代表者の研究

ヒト培養細胞を用いて食品成分より核内 mRNA プロセッシング過程を阻害する化合物を探索してきた。その結果、フラボノイド類の中でセロリやパセリに多く含まれるアピゲニン、ルテオリン(活性フラボノイド)に強い mRNA プロセッシング阻害活性を持つことを見いだした。さらに細胞内標的タンパク質がスプライシングを制御する U2 snRNP や U5 snRNP であることを示した。これらの観察から、活性フラボノイドはスプライシングを阻害していると予想し、細胞全体の RNA を用いて NGS により包括的に解析した。その結果、予想していなかった現象も同時に観察した。それは、様々な遺伝子の選択的スプライシングにも大きな変化を検出したことである。「食品成分が選択的スプライシングを制御する」ことは、これまでの概念にはなかったことであり、研究代表者が初めての発見である。加えて、スクリーニングで別途見いだしたコーヒー由来の化合物 3CQL(特許出願 2016-011389)でも選択的スプライシングが生じる現象を観察した。この結果は、他にも様々な食品成分が選択的スプライシングを制御する活性を持つことを示唆するものであり、今後食品成分による選択的スプライシング制御機構の迅速な解析のためには、適切なプラットフォーム環境作りが欠かせない。

## 2. 研究の目的

本研究は、以下の2点を明らかにすることを目的とする。

- (1) 活性フラボノイドによる選択的スプライシングの分子機構を明らかにする。
- (2) この解析過程で確立した技術を用いて食品成分による選択的スプライシング制御の解析プラットフォームを構築する。

## 3. 研究の方法

### (1) 活性フラボノイドにより発現する選択的スプライシング分子種の網羅的解析

RNA サンプルを調製し、活性フラボノイドの標的として既に同定した遺伝子領域を指標として評価し、NGS 解析に供する。NGS 解析を実施後、選択的スプライシングの変化は rMATS 法にて解析する。rMATS は、選択的 5' エキソン、選択的 3' エキソン、エキソンスキップ、イントロン保持、相互排他的エキソンという選択的スプライシングの解析が可能である。実際に活性フラボノイドによって選択的スプライシングに変化が生じている様子を RT-PCR により確認する。

### (2) 活性フラボノイドによる選択的スプライシング制御の分子機構の解明

上記解析で候補となったイントロン保持の遺伝子領域について、その性質を解析することとし、ここでは長さ、GC 含量、5' スプライスサイトスコア、3' スプライスサイトスコア、BPS ス

コアについて解析する。さらに適切な応答を見せる遺伝子を選択してミニ遺伝子を作成し、ヒト培養細胞に導入する。導入細胞に活性フラボノイドを添加して選択的スプライシングが変化する様子を観察する。選択的スプライシングが変化した遺伝子について、上記のインフォーマティクス解析を行い、選択的スプライシングの原因を明らかにする。次に、活性フラボノイドによる制御を受けなくなる変異をミニ遺伝子に導入して選択的スプライシング制御のメカニズムを明らかにする。これらの解析により、活性フラボノイドが選択的スプライシングに与える影響を解析し、その分子機構を解明する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 活性フラボノイドにより発現する選択的スプライシング分子種の網羅的解析

サンプル調整から RNA seq、さらに rMATS 法にて選択的 5' エキソン、選択的 3' エキソン、エキソンスキップ、イントロン保持、相互排他的エキソンという選択的スプライシングの解析を行った結果を図 2 に示す。全ての選択的スプライシングが影響を受けていることが判明した。

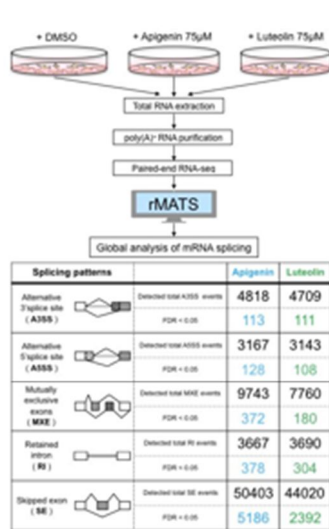


図2 活性フラボノイドによる選択的スプライシング変化の観察

そこで、最初にイントロン保持について解析した。アピゲニンとルテオリンで影響を受ける遺伝子がどの程度重なっているかを解析し、ベン図で表した。すると多くは共通の遺伝子であることが判明した (図 3 上)。RNA-seq の結果を IGV というツールで可視化したところ、特定のイントロンのスプライシング阻害を明確に観察した (図 3 中)。さらに実際にスプライシングが阻害されていることを確かめるプライマーを設計し、RT-PCR により、RNA seq の正確さを評価したところ、RNA seq を支持する結果を得た (図 3 下)。同様に選択的 5' エキソン、選択的 3' エキソン、エキソンスキップ、相互排他的エキソンについても RNA seq と RT-PCR により解析したところ、お互いを支持する結果を得た (図 4)。これらより、活性フラボノイドは、広範な選択的スプライシングを制御していることが判明した。

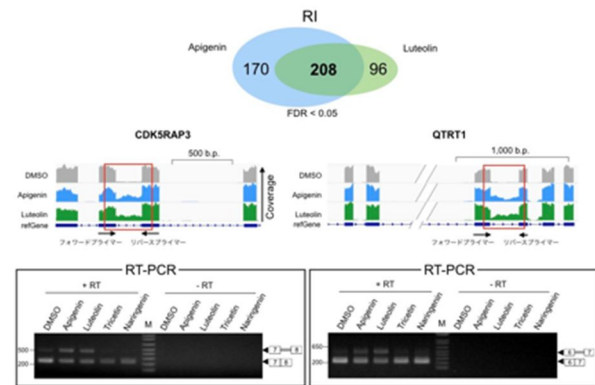


図3 活性フラボノイドによるイントロン保持の解析

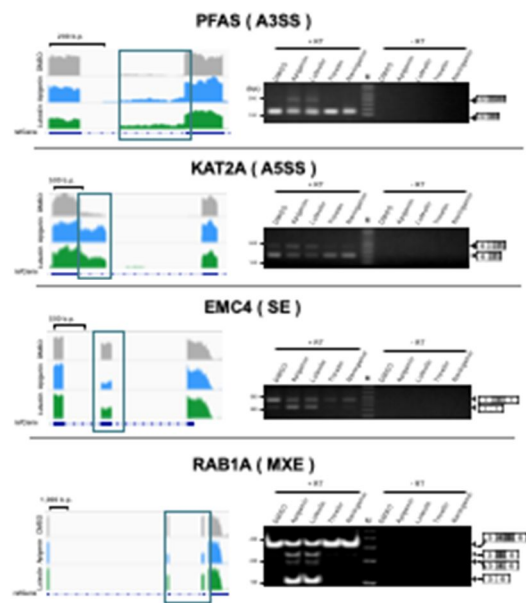


図4 その他の選択的スプライシングの解析

##### (2) 活性フラボノイドによる選択的スプライシング制御の分子機構の解明

活性フラボノイドがどのような塩基配列をもつイントロンに対しイントロン保持つまりスプライシング阻害を引き起こすかについて、長さや GC 含有率そして 5' および 3' スプライスサイトスコア、BPS スコアを解析した。その結果、スプライシングが阻害されているイントロンとして、標的イントロンの長さは短く、GC 含有率は高く、そしてスプライスサイトスコアが低い配列をもつことが明らかになった (図 5)。標的となっているイントロンの 5' / 3' スプライスサイトスコアは低いことに注目した。

そこで、ミニ遺伝子によるスプライシング解析を行うこととし、PLXNB1 と PSMA1 遺伝子に注目してそれぞれのミニ遺伝子を作成した (図 6 左)。例えば PLXNB1 ミニ遺伝子の WT において、標的となっているイントロンの 5' スプライスサイトスコアは 8.56 で 3' は 1.11 であった。変

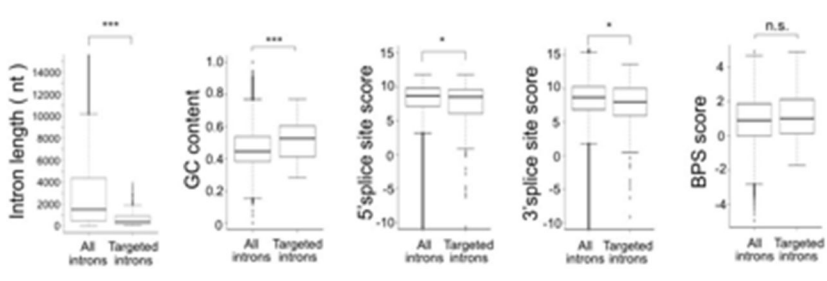


図5 イントンの特徴解析

two-sided Mann-Whitney U test  
\*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001  
n.s.: not significant

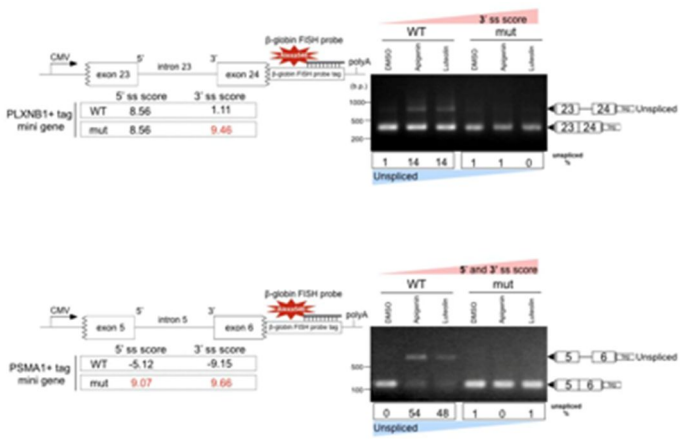


図6 イントロン保持の分子機構の解析

異型ではこの 3' スプライスサイトスコアを 9.46 に上昇させた mut を作成した。

それぞれのミニ遺伝子を導入し、活性フラボノイド処理を 24 時間行なったのちに、細胞から全 RNA を回収して RT-PCR を行った (図 6 右)。いずれのミニ遺伝子の場合にも

活性フラボノイドの添加により、野生型のミニ遺伝子を導入した場合はスプライシングが阻害されていることがわかる。一方、スプライスサイトスコア上昇させた変異型では、スプライシング阻害が解消されていることがわかった。

以上の解析から、活性フラボノイドは弱いスプライスサイトをもつイントロンに対し、イントロン保持すなわちスプライシング阻害を引き起こしていることを示した (図 7)。

(3)食品成分による選択的スプライシング制御の解析プラットフォームの構築

活性フラボノイド以外にもスクリーニングでコーヒー由来の化合物 3CQL (特許出願 2016-011389) でも選択的スプライシングが生じる現象を観察した。このことから選択的スプライシングを制御する化合物は他にも食品中に広く存在すると考えられる。

ここで開発した手法は、新たな食品成分による選択的スプライシング制御の分子機構解析の標準プラットフォームとなり、後に続く化合物の分子機構を効率よく解析する手法を提示することが出来たと評価している。

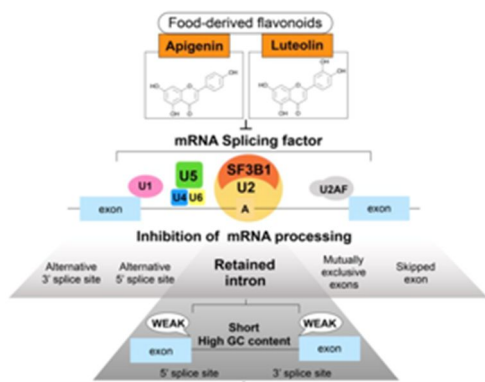


図7 活性フラボノイドによるスプライシング制御の分子機構

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 2件）

1. 著者名 Fujita Ken-ichi, Ishizuka Takaki, Mitsukawa Mizuki, Kurata Masashi, Masuda Seiji	4. 巻 21
2. 論文標題 Regulating Divergent Transcriptomes through mRNA Splicing and Its Modulation Using Various Small Compounds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2026 ~ 2026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21062026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurata Masashi, Fujiwara Naoko, Fujita Ken-ichi, Yamanaka Yasutaka, Seno Shigeto, Kobayashi Hisato, Miyamae Yusaku, Takahashi Nobuyuki, Shibuya Yasuyuki, Masuda Seiji	4. 巻 22
2. 論文標題 Food-Derived Compounds Apigenin and Luteolin Modulate mRNA Splicing of Introns with Weak Splice Sites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 336 ~ 352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.11.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 倉田雅志、高島裕之、増田誠司、渋谷恭之
2. 発表標題 フラボノイドの抗腫瘍効果；スプライシング阻害による白板症治療薬への応用に向けて
3. 学会等名 日本口腔外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田誠司、志岐拓哉
2. 発表標題 mRNA核外輸送を制御するDBP5の核膜孔への配位機構
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三宅 俊太郎、増田 誠司
2. 発表標題 阻害剤を用いたmRNA代謝制御解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宅 俊太郎、増田 誠司
2. 発表標題 核内mRNA代謝制御シグナルの解析-ミトコンドリア呼吸鎖IIIの阻害剤はなぜmRNA代謝に影響するのか-
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学大学院生命科学研究科分子応答機構学  <a href="http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/?post_type=labos&amp;p=160">http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/?post_type=labos&amp;p=160</a>          分子応答機構学ホームページ  <a href="http://www.bunshioutou.lif.kyoto-u.ac.jp">http://www.bunshioutou.lif.kyoto-u.ac.jp</a></p>
---

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
研究分担者	瀬尾 茂人  (Senoo Shigeto)  (30432462)	大阪大学・情報科学研究科・准教授    (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------