

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291003

研究課題名(和文) mRNA前駆体の組織特異的転写後プロセシングの制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanisms for tissue-specific post-transcriptional pre-mRNA processing.

研究代表者

黒柳 秀人 (KUROYANAGI, Hidehito)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：30323702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：転写とスプライシングの両方を制御する新奇因子LST-3が発現遺伝子のプロモーター領域に結合することを明らかにし、共沈するタンパク質を多数同定して、スプライシング制御機構を明らかにした。線虫のトロポミオシンをコードするlev-11遺伝子の組織特異的選択的スプライシングパターンを明らかにした。線虫における選択的スプライシング制御機構についての総説を発表した。TU-tagging法による線虫での組織特異的新生RNA標識法の課題を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We revealed binding regions of LST-3 genome wide and mechanisms for splicing regulation by LST-3. We have analyzed tissue-specific alternative splicing patterns of the lev-11 gene, encoding tropomyosin, in *C. elegans*. We published a review article on alternative splicing regulation in *C. elegans*. We tried TU-tagging to label nascent RNAs in tissue-specific manners in living worms.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現 新生RNA 線虫 組織特異性 転写後プロセシング mRNA CHIP-seq 代謝標識

## 1. 研究開始当初の背景

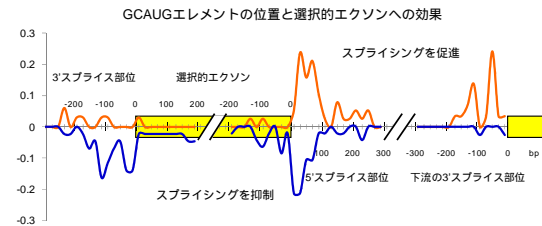
mRNA 前駆体の選択的転写後プロセッシング: 真核生物の mRNA 前駆体の選択的プロセッシング(スプライシング、ポリ A 付加)はタンパク質の多様性を創出する重要な遺伝子発現機構である。ヒトの遺伝子の約 95%が何らかの選択的プロセッシングを受けて複数の成熟 mRNA アイソフォームを産生しており、そのうちの多くが組織・細胞種特異的なアイソフォームの発現パターンを示すこと (Nature 456: 470, 2008) さまざまな遺伝性疾患や癌とスプライシング制御やポリ A 付加部位の異常が関連していることから、タンパク質をコードする遺伝子の転写後プロセッシング段階での遺伝子発現制御機構の解明は発生生物学にとっても基礎医学にとっても重要な課題である (Nat Rev Mol Cell Biol 14: 153, 2013)。

mRNA 前駆体の転写後プロセッシングの制御は配列特異的に結合する制御因子によって行われており、ゲノム配列情報から主要な組織のスプライシングパターンをある程度の精度で予測できる (Nature 465: 53, 2010)。近年、クロマチン構造やヒストン修飾などのエピジェネティックな変化や RNA ポリメラーゼ II (Pol II) による転写の速度が選択的スプライシングに影響する例が報告されており、転写とプロセッシングは密接に共役していると考えられる (Cell 152: 1252, 2013)。最近では、新生 RNA を細胞内で標識して大規模シーケンス解析する global run-on アッセイ (Science 322: 1845, 2008) や nuclear run-on アッセイ (Science 339: 950, 2013) により Pol II による転写や新生 RNA の動態がゲノムワイドに解析できるようになった。しかし、後生動物における組織特異的プロセッシングの制御機構は主に培養細胞を用いて解析されており、個体レベルで内在性遺伝子の転写後プロセッシングの進行を解析した報告はほとんどない。

転写後プロセッシング研究のモデル生物としての線虫: 線虫 (*C. elegans*) は体細胞数が約 1,000 個と少ないがタンパク質遺伝子の約 25% で選択的プロセッシングが起こると見積もられており (Genome Res, 21: 342, 2011) 転写後プロセッシングによる遺伝子発現制御機構の遺伝学的解析に適している。しかし、個体の小ささゆえに解剖して組織ごとに RNA を調製するのが困難なことから、選択的プロセッシングの発生段階依存性についての報告はあるものの組織特異性について網羅的に解析した例はまだない。

選択的プロセッシング研究における応募者の研究成果: 応募者は、10 ページにも記述するように、蛍光タンパク質を用いて、生物が生きたまま選択的プロセッシングパターンを可視化する方法を開発した。そして、線虫をモ

デルとした遺伝学的、生化学的な解析により組織特異的な選択的プロセッシングの制御因子として ASD-1, FOX-1, ASD-2, SUP-12, UNC-75, LST-3 を同定した。さらに、野生型と制御因子変異体の mRNA の大規模シーケンス (mRNAseq) 解析により、ASD-1, FOX-1, UNC-75 について標的エクソンをそれぞれ新規に多数同定し、シスエレメントを同定した。その結果、これらの因子はシスエレメントの相対的位置によって制御因子の役割が異なることを見出した (図は RBFOX ファミリーの ASD-1/FOX-1 の例)。



## 2. 研究の目的

本研究課題では、mRNA 前駆体が組織特異的に選択的プロセッシングを受けて多様な成熟 mRNA が産生されるための転写後プロセッシング制御機構を個体レベルで明らかにすることを目的とする。そのために、モデル生物である線虫を用いて、(1) 各組織における組織特異的プロセッシング制御因子による mRNA 前駆体プロセッシング制御機構の解析と (2) Pol II と会合する新奇の制御因子 **LST-3** による転写と選択的スプライシングの制御機構の解明を並行して進める。

(1) においては、**TU-tagging** 法の導入により、線虫の生体における RNA の組織特異的な標識法を確立し、線虫の組織特異的選択的 mRNA プロセッシングをゲノムワイドに明らかにする。また、各組織における新生 mRNA 前駆体の転写後プロセッシングを経時的に解析する。

(2) においては、LST-3 が結合するクロマチン領域をゲノムワイドに明らかにし、リン酸化 **Pol II** による転写との関係を明らかにする。また、LST-3 と複合体を形成して協働して転写やスプライシングを制御する因子を同定し、機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

A. TU-tagging による線虫の生体における RNA の組織特異的な標識法と濃縮法の確立

B. 線虫の組織特異的選択的 mRNA プロセッシングの網羅的な解析

C. TU-tagging による新生 mRNA の組織特異的な標識と転写後プロセッシングの解析

D . LST-3 が結合するクロマチン領域のゲノムワイドな同定および Pol II との関係の解明

E . LST-3 と生体内で複合体を形成し転写やプロセシング制御で協働するタンパク質の同定

F . プロセシング制御因子による組織特異的 mRNA プロセシングの制御機構の解明

G . LST-3 による mRNA 前駆体のスプライシング制御機構の解明

#### 4 . 研究成果

計画 A-C として、*T. gondii* のウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ (UPRT) を組織特異的に発現するトランスジェニック線虫を作製して 4-チオウラシル (4-TU) 添加により新生 RNA を生体で組織特異的に標識・濃縮する TU-tagging 法の確立と応用を目指していた。*T. gondii* UPRT を体壁筋特異的または神経系特異的に発現する安定発現株の作製までは順調に進んだ。しかし、線虫ではショウジョウバエや哺乳類と異なり、UPRT を発現していない野生型株でも短い標識時間で 4TU が全身に効率よく取り込まれてしまい、計画どおりに新生 RNA を組織特異的に標識できなかった。そのため、研究期間を延長してこの問題の解決に努めた。ウラシルの代謝経路の酵素の相同遺伝子を線虫で検索し、可能なものは変異体を *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) 等から取り寄せ、4TU が新生 RNA に取り込まれにくい変異体をスクリーニングした。そして、それらの二重変異体でさらに UPRT を組織特異的に発現する線虫株を作製したが、それでも短い標識時間で 4TU が効率よく全身の新生 RNA に取り込まれてしまった。一方、抗がん剤でもある 5-フルオロウラシルが線虫に対して毒性を示すには食餌の大腸菌の代謝酵素が関わっていると報告された (Cell 169: 442, 2017) ことからその変異体大腸菌株を取り寄せて与えてみたが、やはり短い標識時間で 4TU が効率よく全身の新生 RNA に取り込まれてしまった。そこで、この計画については後継の科研費課題で引き続き条件検討を行うこととした。

計画 D として、抗 LST-3 抗体によるクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、「先進ゲノム支援」の支援を受けて大規模シーケンス解析を行った。その結果、LST-3 は、転写抑制の標的である *lst-3* 遺伝子自身のプロモーター領域だけでなく、ほぼすべての発現遺伝子のプロモーター領域に強く結合することが明らかとなった。また、スプライシング制御の標的となる遺伝子だけでなく、ほぼすべての遺伝子の本体部分にもある程度結合していることが明らかとなった。

計画 E として、ホルムアルデヒド固定した核からクロマチン画分を可溶化後に抗 LST-3 抗体で免疫沈降して質量分析を行い、LST-3 と共沈降したタンパク質を数十種類同定した。それらには、転写に関わる因子、スプライシングに関わる因子、代謝に関わる因子など多様なタンパク質が含まれていた。

計画 F として、組織特異的 mRNA プロセシングの制御機構の解明を行った。線虫のトロポミオシンをコードする *lev-11* 遺伝子のスプライスバリエーションを詳細に解析し、新たに見出したエクソン 7a を含む新たなアイソフォームとして LEV-110 を同定し、頭部体壁筋でのみ発現することを論文として発表した。また、*lev-11* 遺伝子のエクソン 4a/4b、エクソン 5a/5c/5b、エクソン 9a の組織特異的選択性についても蛍光スプライシングレポーターを作製して明らかにし、論文を投稿中である。これまでの研究成果や他の研究グループからの論文報告を踏まえて、線虫の mRNA プロセシング制御 (組織特異性、発生段階依存性、ノンコーディング mRNA の産生と品質管理による発現量の制御、遺伝学的解析方法、他の生物との比較など) についての総説を発表した。

計画 G として、LST-3 のスプライシング制御の標的である *lst-3* 自身の遺伝子のエクソン 5 のスプライシング制御機構の解析を行った。エクソン 5 の 5' スプライス部位は GA であったことから、作製したスプライシングレポーターミニ遺伝子の当該部位の配列を GT または GC に改変したところ、野生型背景 (LST-3 存在下) でも LST-3 によるスプライシング制御が見られなくなった。一方、新生 RNA を標識する核 run-on アッセイでは、*lst-3* 変異体で *lst-3* 遺伝子のイントロン 4 と 5 がいずれも転写と共役して素早く除去されていることが明らかとなった。これらの結果から、LST-3 は、弱いスプライス部位を持つエクソンが転写と共役してスプライシングされるのを抑制することで適切なスプライシング制御を可能にしていると考えられた。

LST-3 による転写とスプライシングの制御機構については、上述の結果をまとめた論文を執筆中である。

#### 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 7 件)

Rie Murayama, Mariko Kimura-Asami, Marina Togo-Ohno, Yumiko Yamasaki-Kato,

Taeko K. Naruse, Takeshi Yamamoto, Takeharu Hayashi, Tomohiko Ai, Katherine G. Spoonamore, Richard J. Kovacs, Matteo Vatta, Mai Iizuka, Masumi Saito, Shotaro Wani, Yuichi Hiraoka, Akinori Kimura and Hidehito Kuroyanagi. Phosphorylation of the RSRSP stretch is critical for splicing regulation by RNA-Binding Motif Protein 20 (RBM20) through nuclear localization. **Scientific Reports**. (査読有) 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-26624-w.

Dawn E. Barnes, Eichi Watabe, Kanako Ono, Euiyoung Kwak, Hidehito Kuroyanagi, Shoichiro Ono. Tropomyosin isoforms differentially affect muscle contractility in the head and body regions in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Molecular Biology of the Cell**. (査読有) 29: 1075-1088, 2018. DOI: 10.1091/mbc.E17-03-0152.

Wani, S. and Kuroyanagi, H. An emerging model organism *Caenorhabditis elegans* for alternative pre-mRNA processing *in vivo*. **WIREs RNA**. (査読有) e1428, 2017. DOI: 10.1002/wrna.1428.

Masahiro Tomioka, Yasuki Naito, Hidehito Kuroyanagi & Yuichi Iino. Splicing factors control *C. elegans* behavioural learning in a single neuron by producing DAF-2c receptor. **Nature Communications**. (査読有) 2016. DOI: 10.1038/ncomms11645.

Takei S, Togo-Ohno M, Suzuki Y, Kuroyanagi H. Evolutionarily conserved autoregulation of alternative pre-mRNA splicing by ribosomal protein L10a. **Nucleic Acids Research**. (査読有) 44: 5585-5596, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw152.

Kuwasako K, Takahashi M, Unzai S, Tsuda K, Yoshikawa S, He F, Kobayashi N, Güntert P, Shirouzu M, Ito T, Tanaka A, Yokoyama S, Hagiwara M, Kuroyanagi H. Muto Y. RBFox and SUP-12 sandwich a G base to cooperatively regulate tissue-specific splicing. **Nature Structural & Molecular Biology**. (査読有) 21: 778-786, 2014. DOI: 10.1038/nsmb.2870.

Kuroyanagi H., Takei S, Suzuki Y. Comprehensive analysis of mutually exclusive alternative splicing in *C. elegans*. **Worm**. (査読有) 3: e28459, 2014. DOI: 10.4161/worm.28459.

[学会発表](計15件)

Hidehito Kuroyanagi 他. A novel multi-domain protein CCAR-1 regulates transcription and co-transcriptional splicing in *C. elegans*. The 23rd annual meeting of the RNA Society (RNA2018), 2018.

和仁翔太郎. *C. elegans* 代謝関連遺伝子のスプライシング制御における食餌の影響. 東京地区線虫勉強会, 2018.

渡部栄地. Genome-Wide Kinetic Analysis of Pre-mRNA Processing in Living Animals. 東京地区線虫勉強会, 2018.

渡部栄地 他. 個体レベルで行う mRNA 前駆体プロセシングの動態の解析. ConBio2017 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会), 2017.

Eichi Watabe 他. Genome-wide kinetic analysis of pre-mRNA processing in living animals. CSHL Meeting on 40 YEARS OF mRNA SPLICING: FROM DISCOVERY TO THERAPEUTICS, 2017.

渡部栄地 他. 個体レベルで行う mRNA 前駆体プロセシングの動態の解析, 第 19 回日本 RNA 学会年会, 2017.

和仁翔太郎 他. *C. elegans* 代謝関連遺伝子のスプライシング制御における食餌の影響. 第 19 回日本 RNA 学会年会, 2017.

渡部栄地. 生体内 mRNA 前駆体プロセシングの動態の解析. 東京地区線虫勉強会, 2017.

Hidehito Kuroyanagi. "Non-coding mRNAs" from protein coding genes through alternative pre-mRNA splicing. 19<sup>th</sup> Tokyo RNA Club, 2016.

Eichi Watabe 他. Spatial and temporal analysis of nascent pre-mRNAs in living animals. The 21st annual meeting of the RNA Society (RNA2016), 2016.

渡部栄地 他. 個体レベルで行う組織特異的転写後プロセシングの空間的・時間的動態の解析. 冬の若手ワークショップ 2016@山中湖, 2016.

黒柳秀人. mRNA 前駆体の転写とスプライシングを自己制御する因子の解析. 東京地区線虫勉強会, 2015.

Hidehito Kuroyanagi. RBFox and SUP-12 cooperatively regulate muscle-specific alternative splicing to determine ligand-binding specificity of FGF

receptors in *C. elegans*. RIKEN Symposium/15 th Tokyo RNA Club “ Noncoding RNA regulation ”, 2014.

桑迫香奈子 他. 選択的スプライシング制御因子 ASD-1 と SUP-12 による協働的な RNA 認識の構造基盤. 第 16 回日本 RNA 学会年会, 2014.

Hidehito Kuroyanagi. Cooperative regulation of tissue-specific alternative splicing by multiple splicing factors determines ligand-binding specificity of FGF receptors. The 9th International Symposium of the Institute Network, 2014.

〔図書〕(計 2 件)

黒柳秀人. 第 9 章第 4 節. 転写と転写後の共役. 遺伝子発現制御機構 クロマチン, 転写制御, エピジェネティクス (田村 隆明・浦 聖恵 編著、東京化学同人) 2017 年 4 月 3 日.

黒柳秀人. 第 26 章. デコイ ncRNA. ノンコーディング RNA RNA 分子の全体像を俯瞰する (廣瀬 哲郎・泊 幸秀 編、化学同人) 2016 年 7 月 15 日.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/end/research/>  
<https://www.milive-plus.net/newleader/049/>  
<https://ncrna.jp/blog/item/370-rouge>  
<http://first.lifesciencedb.jp/archives/9218>  
<https://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/production-of-a-molecule-for-memory-of-salt-concentration.html>

プレスリリース : 2018 年 6 月 11 日.

高校生キャリア研修受入 : 高田高等学校 (三重県), 2016 年.

オープンキャンパス : 司会・発表, 2016 年.

出張講義 : 東京都立日比谷高等学校, 2015 年.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

黒柳 秀人 (KUROYANAGI, Hidehito)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号 : 30323702