

令和 元年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2018

課題番号：15KK0252

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（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Mechanisms of tissue-specific pre-mRNA processing(Fostering Joint International Research)

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） 12,000,000円

渡航期間： 7ヶ月

研究成果の概要（和文）：多細胞モデル動物である線虫*C. elegans*を用いて、ゲノム上の全遺伝子の全イントロンについて、mRNA前駆体として転写されてからスプライシングによって除去されるまでの経時変化を追跡し、個々のイントロンの除去（スプライシング）に要する時間を初めて個体レベルで明らかにした。また、個々の遺伝子のメッセンジャーRNA（mRNA）の寿命についても、個体レベルでゲノムワイドに明らかにし、mRNAの寿命が短いグループや長いグループにはそれぞれ特徴的な遺伝子群が含まれていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多細胞生物は1つの遺伝子からmRNA前駆体のプロセシング（加工）方法を変化させることで多様なmRNAひいては多様なタンパク質を作っている。しかし、mRNAの加工パターンが多様であることは明らかになっていたが、加工の進行過程におけるmRNA前駆体の経時変化については、ほとんど解析されていなかった。本研究により個々のイントロンの除去など各プロセシング段階の速度が個体レベルでゲノムワイドに明らかになったことで、組織的特異的にmRNAを作り分ける過程やその制御のしくみの解明がより一層進むと期待される。

研究成果の概要（英文）：We utilized *C. elegans* as a model organism to analyze temporal patterns of pre-mRNA processing genome wide. We determined the half-lives of each intron as well as of each mRNA in living multicellular organism. The half-lives vary from less than one minute to more than hours. We determined features of introns/mRNAs that correlated with the half-lives. This fundamental information about the dynamics of pre-mRNA processing will help understanding regulation mechanisms for tissue-specific alternative processing in *C. elegans* and higher organisms.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現制御 RNAプロセシング 線虫 新生RNA 転写 mRNA前駆体 イントロン 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

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。選択的プロセッシングにおいては、さまざまな制御因子（RNA 結合タンパク質）がそれぞれのシスエレメントに配列特異的に結合することにより、スプライシングやポリ A 付加部位での切断が正または負に制御される。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 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。しかし、後生動物における選択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、内在性遺伝子の転写後プロセッシングの制御機構を個体レベルで解析した報告はほとんどなかった。

研究代表者は、蛍光タンパク質を用いて、生物が生きの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個体レベルでの遺伝学的、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進化的に保存された RBFox ファミリーなどを同定し、成熟 mRNA の大規模シーケンシング（RNAseq）解析により制御因子の標的エクソンを多数同定しシスエレメントを同定した。さらに、イントロンが短いという線虫の特徴を活かし、一部のイントロンのみが除去されたプロセッシングの途中段階の RNA の量を RT-PCR 法により半定量的に野生型と制御因子変異体間で比較解析した。これらの解析結果を総合して、選択的スプライシングの際のイントロン除去の順序がある程度決まっており制御因子はそのうちの特定のステップのスプライシングを促進または抑制する、というモデルをさまざまな遺伝子で示した。しかし、これら内在性遺伝子の組織特異的プロセッシング制御モデルは、個体レベルでの解析に基づいたものではあったが、全身の細胞をまとめて RNA を抽出して解析しているため厳密に個々の組織の RNA のプロセッシング過程を追跡したものではなく、また定常状態における RNA 量の比較に基づいているため、安定だがそれ以上プロセッシングされない終末 RNA 産物を解析している可能性もあった。そのため、個体での mRNA 前駆体のプロセッシング動態を組織特異的かつ経時的に解析する方法の確立が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、多様な成熟 mRNA が組織特異的に産生される転写後プロセッシングの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) 新生 RNA を個体レベルで組織特異的に標識する方法を確立し、各種組織の選択的 mRNA プロセッシングパターンをゲノムワイドに明らかにすることを目指す。(2) 野生型およびプロセッシング制御因子変異体で新生 mRNA 前駆体を標識して経時的に抽出し、個体レベルにおける mRNA の成熟過程と制御因子の機能を明らかにすることを目指す。また、線虫で確立した方法を基に(3) 哺乳類においても同様の解析を行い、転写後プロセッシング制御機構を検証する。

3. 研究の方法

(1) 線虫の細胞質・細胞核の分画法の検討：同調飼育した L1 期幼虫の虫体を液体窒素で凍結して乳鉢で擣り潰しさらにダウンスホモジナイザーでホモジナイズしてから遠心することで細胞質と細胞核を分離し、さらに細胞核を尿素水溶液で処理することで核質画分とクロマチン画分に分画してそれぞれの画分から全 RNA を抽出し、リボソーム RNA を除去してから RNAseq 解析を行った。

(2) 線虫への TU-tagging 法の導入：TU-tagging 法は、寄生性の原生動物 *Toxoplasma gondii* のウラシルホスホリボシルトランスフェラーゼ (UPRT) がウラシルに加えて 4-チオウラシル (4TU) にもリボース-5-リン酸を転移できることを利用して、特異的プロモーターで *T. gondii* UPRT を発現させた細胞種でのみ新生 RNA を標識して精製し、細胞種特異的に遺伝子発現を解析する方法である。線虫の体壁筋または神経系で特異的に *T. gondii* UPRT を発現するトランスジェニック線虫株を作製し、新生 RNA を個体レベルで組織特異的に標識・精製する方法を検討した。

(3) 代謝標識による新生 mRNA 前駆体の経時変化の解析：野生型線虫株の同調した L1 期幼虫に 4-チオウリジン (4SU) を投与して 5, 10, 30, 90 分後に核画分を回収し、さらにクロマチン画分を分画して全 RNA を精製し、さらにチオ標識 RNA を精製して、新学術領域研究「先進ゲノム支援」の支援を受けて RNAseq 解析を行った。得られたシーケンスデータを参照ゲノムマッピングし、各遺伝子の各イントロンについて、スプライシングされた後のエクソン エクソン境界リードとスプライシングされていないエクソン インtron境界リードを計数した。さらに、各種の公開プログラムを利用して、各 mRNA の生成速度と半減期、各イントロンの半減期を推定した。各種スプライシング制御因子変異体株についても、4SU で 20 分間代謝標識して新生 RNA を精製し、同様に RNAseq 解析とマッピングを行った。なお、RNAseq データからのスプライシング状態の解析および野生型と変異体の比較は、UCLA の Yi Xing 教授およびその研究室の大学院生が開発した未発表のプログラムを利用して行った。

(4) 核 Run-On による転写途中 mRNA 前駆体の標識と解析：L1 幼虫期に同調飼育した野生型線虫株の虫体から 1)の方法で細胞核を回収し、界面活性剤存在下で 4-チオ UTP を含む NTP を加えることで、RNA ポリメラーゼにより転写されている途中であった RNA のみを試験管内で標識し、全 RNA の抽出後にチオ標識 RNA を精製した。さらに、リボソーム RNA とポリ A 鎖を持つ RNA を除去してから、新学術領域研究「先進ゲノム支援」の支援を受けて全長シーケンシング解析を行い、参照ゲノムにマッピングして、各リードの 5' 末端、3' 末端の位置とスプライシングパターンを解析した。

4. 研究成果

(1) 線虫の細胞質・細胞核の分画法の検討

マーカータンパク質を用いた検討では、細胞質、核質、クロマチンの各画分を適切に分離できていると考えられた。しかし、RT-PCR および RNAseq による RNA の解析では、核内タンパク質のほとんどがスプライシングやポリ A 鎖付加が完了した成熟 mRNA であることが明らかとなった。これは、線虫では想定以上に成熟 mRNA が核内に滞留していること、尿素処理では RNA 結合タンパク質が結合した RNA を巻き込んで不溶化してしまいプロセシング途中の RNA 以外にも多くの RNA が「クロマチン」画分に残存してしまったことが原因と考えられた。したがって、この細胞分画法だけでは新生 RNA を十分に濃縮できないことが確認された。

(2) 線虫への TU-tagging 法の導入

哺乳類培養細胞を用いた予備実験では、*T. gondii* UPRT を発現させない場合は 20 分間の 4TU 添加で RNA がほとんど標識されず、*T. gondii* UPRT を発現させた場合には新生 RNA が標識されて精製・濃縮できることを確認した。しかし、線虫では *T. gondii* UPRT を発現させない野生型株でも 10 分以内のたいへん早い段階で新生 RNA が効率よく標識されてしまった。これは、線虫では哺乳類やショウジョウバエとは違いウラシル代謝関連酵素のいずれかが 4TU をよい基質として早期にチオ UTP まで代謝して RNA に取り込んでいるためと考えられた。そこで、ウラシル代謝に関わる酵素の線虫相同遺伝子の変異体を取り寄せあるいはゲノム編集で作製して、4TU による新生 RNA の標識が抑制されるか検討した。その結果、20 分間の 4TU 添加で標識されてしまう新生 RNA 量が野生型に比べて大きく低下した変異体を特定することができた。現在はこの変異体に組織特異的プロモーターで *T. gondii* UPRT を発現させたトランスジェニック線虫株を用いて、TU-tagging 法により組織特異的に新生 RNA を標識できるか検討中である。

(3) 代謝標識による新生 mRNA 前駆体の経時変化の解析

ゲノムの全イントロンについてのプロセシング動態の解析から、発現している遺伝子のイントロンうち約 1 万 7 千個は 5 分間という短い時間の代謝標識でもイントロンリードが検出されないほどスプライシングが速く完了することが分かった。これらの大多数は 100 塩基以下の短いイントロンであった。残りのうち約 1 万 6 千個はスプライシング完了割合の経時変化から半減期を推定することができ、8 分弱を中央値とし 1 分から 100 分超まで幅広い分布を示した。これらの半減期を基に、隣接するイントロンの除去順序を推定し、いくつかの組について実際に想定された順序で除去が起こることを RT-PCR 法により実験的に確認した。また、イントロンのスプライシングに影響を与える要素（イントロンの長さ、各スプライス部位の出現頻度、遺伝子内の位置）を明らかにした。

(4) mRNA の安定性の解析

新生 RNA の RNAseq でエクソン部分にマッピングされたリードの経時変化と細胞質 RNA の RNAseq データによる定常状態の RNA 量を基に、各 mRNA の生成速度と半減期を推定した。さらに、一部の遺伝子について 4SU で 24 時間代謝標識した後に 4SU を除去してからチオ標識 mRNA が減少していく過程を RT-qPCR で定量することにより mRNA の半減期を実験的に測定し、RNAseq データからの推定値とよく合致することを確認した。mRNA の半減期は 36 分を中央値として数分程度から 10 時間超まで幅広く分布しており、mRNA が不安定な遺伝子グループと安定性が高い遺伝子グループの GO 解析の結果、それぞれに特徴的な遺伝子が濃縮していることが明らかになった。また、mRNA の安定性と遺伝暗号（コドン）の使用頻度にも関連性があることが明らかになった。

(5) 線虫 *lev-11* 遺伝子のスプライスバリエーションの解析

米国 Emory 大学の斧正一郎博士と共同で、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 RT-PCR により網羅的に解析し、2 つの新奇アイソフォームを含む 6 種類のアイソフォームで使われる選択的エクソン (3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 5c, 7a, 7b, 9a) の組織特異的な選択性を蛍光レポーターの作製により明らかにした。このうちエクソン 7a を含む新たなアイソフォーム LEV-110 は頭部体壁筋でのみ発現しており、エクソン 7a 変異体とエクソン 7b 変異体ではアセチルコリン受容体アゴニストとされるレバミゾールに対する耐性の表現型が頭部体壁筋と体部体壁筋で異なることを明らかにした。

(6) 転写途中の mRNA 前駆体の解析

核 Run-On 法により調製した転写途中の mRNA 前駆体の全長シーケンシング解析から、RNA ポリメ

ラーゼの転写位置とスプライシングの完了率の関係が多細胞生物で初めて明らかになった。また、リード数が多い遺伝子については、隣り合うイントロンの組におけるスプライシングの順序についても、解析することができた。

(7) 哺乳類スプライシング制御因子 RBM20 の解析

家族性拡張型心筋症患者で RSRSP という特定の配列にアミノ酸置換変異が見つかるスプライシング制御因子 RBM20 による心筋特異的な選択的スプライシングの制御機構について解析を行い、RSRSP 配列中の 2 つのセリン残基が共にリン酸化されること、そのリン酸化が RBM20 の核移行に必須であることを見出した。そして、ゲノム編集により拡張型心筋症患者型変異のノックインマウスを作製し、RSRSP 配列のアミノ酸置換変異が *Rbm20* 遺伝子欠損ラットと同様に心筋特異的なスプライシング制御の異常を示すことを確認して、患者型変異が RBM20 のスプライシング制御因子としての機能を欠損させることを明らかにした。現在は、このノックインマウスの表現型の詳細な解析を行っている。なお、この研究の過程では、海外共同研究者の D. Black 教授の研究室の博士研究員らからマウス臓器からの細胞核の回収方法や染色方法の指導を受けた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Watabe Eichi, Ono Shoichiro, Kuroyanagi Hidehito. Alternative splicing of the *Caenorhabditis elegans lev-11* tropomyosin gene is regulated in a tissue-specific manner. *Cytoskeleton*. 75: 427~436, 2018. doi: 10.1002/cm.21489.
2. Murayama Rie, Kimura-Asami Mariko, Togo-Ohno Marina, Yamasaki-Kato Yumiko, Naruse Taeko K., Yamamoto Takeshi, Hayashi Takeharu, Ai Tomohiko, Spoonamore Katherine G., Kovacs Richard J., Vatta Matteo, Iizuka Mai, Saito Masumi, Wani Shotaro, Hiraoka Yuichi, Kimura Akinori, Kuroyanagi Hidehito. Phosphorylation of the RSRSP stretch is critical for splicing regulation by RNA-Binding Motif Protein 20 (RBM20) through nuclear localization. *Scientific Reports*. 8: 8970, 2018. doi: 10.1038/s41598-018-26624-w.
3. Barnes Dawn E., Watabe Eichi, Ono Kanako, Kwak Euiyoung, Kuroyanagi Hidehito, Ono Shoichiro. Tropomyosin isoforms differentially affect muscle contractility in the head and body regions of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell*. 29: 1075~1088, 2018. doi: 10.1091/mbc.E17-03-0152.
4. Watanabe Takeshi, Kimura Akinori, Kuroyanagi Hidehito. Alternative Splicing Regulator RBM20 and Cardiomyopathy. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 5: 105, 2018. doi: 10.3389/fmolb.2018.00105.
5. Wani Shotaro, Kuroyanagi Hidehito. An emerging model organism *Caenorhabditis elegans* for alternative pre-mRNA processing *in vivo*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 8: e1428, 2017. doi: 10.1002/wrna.1428.

[学会発表](計 14 件)

1. 黒柳秀人. トロポミオシンをコードする *lev-11* 遺伝子の選択的スプライシング制御. 東京地区線虫勉強会. 2019 年 1 月.
2. 渡部栄地, 黒柳秀人. 動物個体における mRNA 前駆体プロセッシング動態の解析. 第 41 回日本分子生物学会年会. 2018 年 11 月.
3. Hidehito Kuroyanagi, Kensuke Ihara, Marina Ohno-Togo, Akinori Kimura and Tetsuo Sasano. Phosphorylation of RBM20 on the RSRSP stretch, a hot spot of mutations in dilated cardiomyopathy, is critical for splicing regulation in the mouse heart. The 2nd Joint Australia-Japan/Japan-Australia joint RNA meeting 2018, Sapporo, Hokkaido, 2018 年 11 月.
4. 渡部栄地, 黒柳秀人. Genome-wide Kinetic Analysis of Pre-mRNA Processing in Living Animals. 線虫研究の未来を創る会. 2018 年 9 月.
5. 村山里枝, 木村-浅見まり子, 都甲-大野麻理奈, 山崎-加藤裕美子, 成瀬妙子, 山本健, 林文晴, 藍智彦, Katherine G. Spoonamore, Richard J. Kovacs, Matteo Vatta, 飯塚舞, 齋藤ますみ, 和仁翔太郎, 平岡優一, 木村彰方, 黒柳秀人. RSRSP 配列のリン酸化は RBM20 の核内移行とスプライシング制御に必須である. 第 20 回日本 RNA 学会年会, ホテルフクラシア大阪ベイ, 大阪市, 2018 年 7 月.
6. 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 年 3 月.
7. 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 年 1 月.
8. 渡部栄地, 黒柳秀人. 個体レベルで行う mRNA 前駆体プロセッ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), 神戸市、2017年12月。

9. Eichi Watabe, Hidehito Kuroyanagi. Genome-wide kinetic analysis of pre-mRNA processing in living animals. CSHL Meeting on 40 YEARS OF mRNA SPLICING: FROM DISCOVERY TO THERAPEUTICS. 2017年10月。

10. 渡部栄地、黒柳秀人. 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, 富山市、2017年7月。

11. 和仁翔太郎、黒柳秀人. 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年7月。

12. Rie Murayama, Mariko Kimura, Yumiko Yamasaki-Kato, Mai Iizuka, Marina Togo-Ohno, Hidehito Kuroyanagi. Phosphorylation of an RNA-binding protein RBM20 on an RSRSP stretch, whose missense mutations cause familial dilated cardiomyopathy, is required for proper nuclear localization and splicing regulation. The 22nd Annual Meeting of the RNA Society. 2017年5~6月。

13. 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, 東京大学浅野キャンパス、東京都文京区、2017年1月。

14. Hidehito Kuroyanagi. "Non-Coding mRNAs" from Protein-Coding Genes through Alternative Pre-mRNA Splicing. 19th Tokyo RNA Club, 東京大学浅野キャンパス、東京都文京区、2016年4月。

〔図書〕(計 2件)

1. 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。

2. 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〕

東京医科歯科大学難治疾患研究所フロンティア研究室遺伝子発現制御学

<http://www.tmd.ac.jp/end/>

RNAの加工パターンを動物が生きたまま観察する手法を開発。遺伝子発現のしくみに迫る 黒柳秀人先生 東京医科歯科大学 <専門分野: 分子生物学> みらいぶプラス

www.milive-plus.net/newleader/049/

新学術領域研究「ノンコーディングRNAネオタクソノミ」研究成果紹介

<https://ncrna.jp/blog/item/370-rouge>

6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名: Douglas L. Black

ローマ字氏名: Douglas L. Black

所属研究機関名: カリフォルニア大学ロサンゼルス校

部局名: MIMG

職名: Professor

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名: Yi XING

ローマ字氏名: Yi XING

研究協力者氏名: 斧 正一郎

ローマ字氏名: ONO Shoichiro

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。