

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03181

研究課題名(和文)動物の生体における組織特異的mRNAプロセシングの進行過程の解明

研究課題名(英文)Tissue-specific pre-mRNA processing in living animals

研究代表者

黒柳 秀人(KUROYANAGI, HIDEHITO)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30323702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：線虫をモデル多細胞生物として、個体レベルでの転写途中の新生mRNA前駆体を代謝標識し精製する方法、および生体内新生mRNA前駆体の標識・精製する方法を確立した。そして、mRNA前駆体の品質管理機構を欠損する線虫変異体株から得られた新生mRNA前駆体の長鎖シーケンシング解析により、mRNA前駆体の選択的プロセシング機構と共役する品質管理機構に依存して遺伝子発現制御が行われる遺伝子をゲノムワイドに明らかにした。また、それらの遺伝子のうち、mRNA前駆体のスプライス部位の塩基修飾による選択的スプライシングの制御で遺伝子発現がされる例を全生物を通じて初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mRNA前駆体のプロセシング動態および品質管理機構と共役する遺伝子発現制御が多細胞生物の個体レベルで明らかになるのは初めてである。哺乳類では個体レベルで同様の方法を適用しても同様の結果を得ることは実質的に困難である。また、転写後の塩基修飾が直接的にスプライシングに影響を与える例を始めて見出したものである。本研究成果は、哺乳類を含む他の多細胞動物における転写と共役したmRNAの転写後プロセシングによる遺伝子発現制御機構を考察する上で基礎となる重要な知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：We developed new methods to label nascent precursor messenger RNAs (pre-mRNAs) in vivo and successfully purified them by using a nematode worm *C. elegans* as a model multicellular organism. With the methods, we purified pre-mRNAs from a mutant worms strain defective in mRNA surveillance system and subjected them to long-read cDNA sequencing. We successfully identified genes whose expression levels are regulated at the pre-mRNA processing level coupled with the surveillance system genome wide. Among them was a gene whose expression level was regulated by nucleotide modification at the very splice acceptor site.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現制御 新生RNA 線虫 スプライシング 転写後プロセシング 塩基修飾 代謝標識 長鎖シーケンシング解析

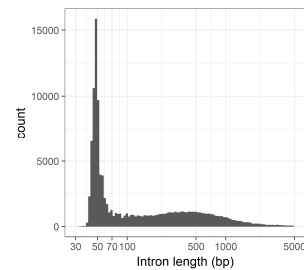
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

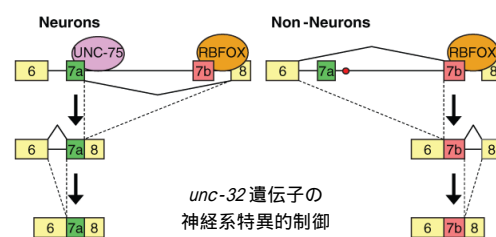
mRNA 前駆体の選択的プロセッシング: 真核生物の mRNA 前駆体の選択的プロセッシング (スプライシング、ポリ A 付加等) はタンパク質の多様性を創出する重要な遺伝子発現機構である。ヒトの遺伝子の約 95% が何らかの選択的プロセッシングを受けて複数の成熟 mRNA バリエントを産生しており、そのうちの多くが組織・細胞種特異的なバリエントの発現パターンを示すこと、さまざまな遺伝性疾患や癌とスプライシング制御やポリ A 付加部位の異常が関連していることから、転写後プロセッシング段階での遺伝子発現制御機構の理解は生物学および基礎医学にとって重要な課題である。

転写と共役した mRNA 前駆体プロセッシング: mRNA 前駆体のプロセッシングの制御は主に配列特異的に結合する制御因子に担われており、ゲノムの塩基配列情報から哺乳類の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。転写とプロセッシングは密接に共役しており、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) による転写速度が選択的スプライシングに影響する。Pol II がエクソンに差し掛かるごとに転写伸長が一時停止してスプライシングの完了を保障するモデルも提唱されている。しかし、後生動物における転写と共役した mRNA プロセッシングは主に哺乳類培養細胞を用いて解析されており、個体レベルで新生 mRNA 前駆体自体を網羅的に解析した報告はほとんどない。

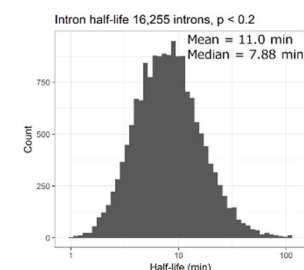
転写後プロセッシング研究のモデル生物としての線虫: 線虫 (*C. elegans*) は体細胞数が約 1,000 個と少ないが、タンパク質遺伝子は哺乳類とほぼ同じ約 20,000 個あってイントロンに富む。過去の RNA-seq のデータを集積した解析によれば、閾値 5% とした場合でも 23.5% の遺伝子で選択的プロセッシングによるバリエントが存在する (Genome Res, 27: 2120, 2017)。かつては形態や行動の変異体の抑圧変異体のスクリーニングでスプライソソームタンパク質の遺伝子が偶然に同定されていた程度だったが、イントロンの大半が 1,000 塩基以下と短い線虫の特徴 (上図) を活かして代表者が選択的 mRNA プロセッシングパターンを生体で可視化する方法を開発したことで、mRNA 前駆体プロセッシング自体を対象とする研究が可能となった。



選択的スプライシングにおけるイントロン除去の順序: 代表者は、一部のイントロンだけが除去されたプロセッシング途上 mRNA 前駆体の量をスプライシング制御因子変異体と野生型との間で比較することで、選択的スプライシングを受けるエクソンの前後のイントロンのスプライシングの順序や制御因子の役割を推定できることを示した (Genes Dev, 2008)。そして、さまざまな遺伝子の選択的スプライシングについて、制御因子とシスエレメントに加えイントロン除去の順序まで含めた制御モデルを提唱した (右図)。これらの例から、イントロンの除去順序は選択的スプライシング事象毎にある程度定まっていること、スプライシング制御因子によりその順序が変化することで結果的に異なるパターンへとプロセッシングされることが明らかとなった。



イントロン除去動態のゲノムワイドな解析: 代表者は、前項の知見を受けて線虫のイントロンの寿命のゲノムワイドな解析を行った。線虫に 4-チオウリジンを与えて新生 RNA を代謝標識し、5、10、30、90 分後に全身の細胞核の尿素不溶性画分からチオ標識 RNA を精製して RNA-seq 解析を行い、エクソンリードとイントロンリードの比率の経時変化から個々のイントロンの半減期を算出した。発現が検出された約 10,000 個の遺伝子の全約 60,000 イントロンのうち約半数は 5 分間の代謝標識試料でもイントロンリードがほとんど検出されないほど寿命が短く、それらの大半は 100 塩基以下の特に短いイントロンだった。残りのうちの半数で、イントロン毎に大きく異なる半減期が算出され (下図)、選択的スプライシングを受けるエクソンに隣接するイントロンでは寿命が長い傾向が確認された。この半減期を基に隣り合うイントロンの組の間でスプライシングの順序を推定でき



ることを RT-PCR で確認した。また、神経系特異的スプライシング制御因子 UNC-75 の欠損が個々のイントロン除去動態に与える影響を明らかにした。

エクソン定義とイントロン定義：哺乳類ではイントロンが非常に長く相対的にエクソンが短いため、エクソンにスプライシング因子が結合して U1, U2 snRNP を呼び込むことでまずエクソンが定義される。一方、イントロンが短い線虫では 5' と 3' のスプライス部位の塩基配列を U1 snRNP と U2AF が認識することでイントロンが定義されてスプライシングされると考えられる。

代表者は、これまでに得たスプライシング制御因子変異体のうち *ccar-1* 変異体では、*unc-32* 遺伝子エクソン 4 の相互排他性が崩れて多重包含が起こることを見出した。RNA-seq 解析の結果、他の相互排他的エクソンでも多重包含が見られ、カセットエクソンでももっぱら包含が増える方向に変化していた。この観察は、シスエレメントに配列特異的に結合する組織特異性の制御因子が標的遺伝子によってスプライシングを正にも負にも制御するのは大きく異なる。普遍的に発現する CCAR-1 には *ccar-1* 遺伝子自身のエクソン 5 をスキップさせるスプライシングの自己制御機能があるが、標的エクソンの下流に当たるイントロン 5 は線虫で唯一の GU ではなく GA で始まるたいへん弱い 5' スプライス部位を持つこと、*ccar-1* 変異体ではこのイントロン 5 と共にイントロン 4 のスプライシングも促進されることを見出している。一方、CCAR-1 のヒト相同タンパク質 CCAR1 は、スプライソソームの A 複合体（触媒反応の前に mRNA 前駆体上に一過的に形成される複合体）に特異的な構成因子とされているが機能は未知である。これらのことから、線虫の少なくとも一部の選択的エクソンの包含にはエクソン定義を必要とし、CCAR-1 はエクソン認識の閾値を上げて弱いエクソンの認識を制限することで選択的スプライシングの質を制御する、との仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究では、線虫の生体で組織特異的に RNA を代謝標識して濃縮する手法を開発し、主要組織における mRNA の RNA-seq 解析を行って、線虫における組織特異的選択的プロセシングの概要を明らかにする。さらに、転写途中の新生 mRNA 前駆体を組織特異的に標識・精製して全長シーケンス解析を行い、転写と共役した mRNA プロセシングの進行過程と組織特異的選択的プロセシングパターンとの関連性を明らかにする。また、組織特異的スプライシング制御因子の変異体を用いて同様の解析を行い、各制御因子が各組織の選択的プロセシングに与える影響を明らかにする。一方、普遍的に発現してエクソンの不要な包含を抑制する進化的に保存された制御因子 CCAR-1 の機能解明を通じて、様々な組織で共通するスプライシング制御の分子基盤を明らかにする。これらの解析を通して、この生物種における選択的 mRNA プロセシングの制御機構を、転写と共役したプロセシングの動的進行過程に対する制御という観点から、体系的に理解することを目指す。

3. 研究の方法

(1). 線虫生体内で組織特異的に RNA を代謝標識する TU-tagging 法の確立：線虫では 4-チオウラシル (4-TU) が短時間で効率的に RNA に取り込まれる。応募者はウラシルのサルベージ経路の酵素の変異体を手あるいはゲノム編集で作製してスクリーニングし、シチジン/ウリジノーリン酸キナーゼをコードする *F40F8.1* の変異体では 4-TU がほとんど RNA に取り込まれないことを見出した。そこで、*F40F8.1* 変異体の特定の組織に *F40F8.1* cDNA を発現させるトランスジェニック線虫株を作製した。これらの線虫株に 4-TU を与えて新生 RNA を代謝標識することで、組織特異的に新生 mRNA を濃縮できることを確認し、TU-tagging 法として確立した。

(1). 品質管理機構を欠損する線虫変異体株の新生 mRNA の調製：線虫の品質管理機構 nonsense-mediated mRNA decay (NMD) を欠損する *smg-2* 変異体を用いて 4-TU で新生 mRNA を代謝標識し、精製した。

(2). 新生 mRNA の大規模シーケンス解析

(2). 組織特異的 mRNA のシーケンス解析

(1)で調製した新生 mRNA については、RNA-seq 解析の準備を行っている。

(2) . 新生 mRNA の長鎖シーケンス解析

(1) *smg-2* 変異体の新生 mRNA については、全長のスプライシングパターンを明らかにし、野生型と比較するため、Oxford Nanopore Technology 社の直接 RNA シーケンシング解析を行った。

(3) . 生物情報学的解析による品質管理機構と共役した選択的スプライシングにより遺伝子発現制御を受ける遺伝子の網羅的同定。

(2) の *smg-2* 変異体の全長 cDNA のシーケンス解析および以前に行っていた *smg-2* 変異体および野生型株の RNA-seq 解析、さらに、公開されている野生型株の全長直接 RNA シーケンシング解析のデータを基に、スプライシングパターンの定量的比較、終止コドンの推定と 3' 非翻訳領域の長さの推定、品質管理機構で除去される可能性について推定を行った。

(4) . RT-PCR によるイントロン除去の順序の検証

(3)の解析の結果として推定される NMD によって制御されると判断された遺伝子について、野生型と *smg-2* 変異体の mRNA の RT-PCR 解析で検証した。

(5) . *sams* 遺伝子のスプライシング制御機構の解析

選択的スプライシングと共役する品質管理機構により遺伝子発現が制御を受ける、RNA 結合タンパク質以外の遺伝子として、代謝酵素である S-アデノシルメチオニン合成酵素を選び、RT-PCR およびウェスタンブロット法により、発現制御機構の探索を行った。

4 . 研究成果

4 (1) . TU-tagging 実験手法の確立

線ウラシルのサルベージ経路の酵素の変異体を入手あるいはゲノム編集で作製してスクリーニングし、シチジン/ウリジン-リン酸キナーゼをコードする遺伝子の変異体では 4-TU がほとんど RNA に取り込まれないことを見出した。そこで、変異体の特定の組織に cDNA を発現させることで、組織特異的に発現するレスキュー株を作製した。4-TU による代謝標識と精製を行った結果、その組織特異的に mRNA が濃縮できることを確認し、線虫で TU-tagging ができるとのコンセプトの証明をすることができた。さらに、組織特異的 RNA の解析を進めている。

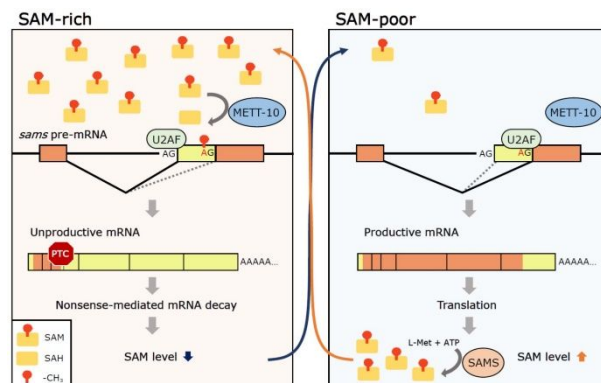
4 (2) . mRNA 品質管理機構と共役した mRNA 前駆体プロセッシングにより制御される遺伝子の網羅的同定

mRNA の品質管理機構である nonsense-mediated mRNA decay (NMD) が不全である *smg-2* 変異体を用いて新生 RNA を標識・精製し、長リード次世代シーケンサーである Nanopore MinION を用いて全長 RNA 配列を直接シーケンシング解析し、野生型の mRNA との比較を行った結果、正常なら NMD で分解されてしまう mRNA スプライスバリエーションを発現する遺伝子 259 個を同定した。

4 (3) . *sams* 遺伝子のスプライシング制御機構の解析

上記で同定した 259 遺伝子のうち多くは、潜在的に選択的スプライシングを自己制御する可能性がある RNA 結合タンパク質であったが、残りの遺伝子には代謝酵素の遺伝子が有意に濃縮されていた。実際に、RT-PCR によりそれらの遺伝子が選択的スプライシングと共役した品質管理機構の制御を受けていることも確認した。そこで、それらのうち、S-アデノシルメチオニン合成酵素をコードする *sams-3*, *sams-4*, *sams-5* 遺伝子について、どのような条件で選択的スプライシングが制御されるか検討した。すると、摂食と絶食のサイクルによって大きく変動することを mRNA の RT-PCR 解析で確認した。さらに、S-アデノシルメチオニン合成酵素の阻害剤や *sams* 変異体を用いることで、これらの遺伝子の選択的ス

プライシングが間接的な自己制御を受けることを見出した。そこで、S-アデノシルメチオニンを基質として用いる各種のメチル化酵素の中からこのプライシングの自己制御に関わるものを探索し、最終的に snRNA メチル化酵素をコードする *mett-10* 遺伝子の変異体で *sams* 遺伝子の選択的プライシング制御が全く行われなくなることを、RT-PCR およびウェスタンブロット法で確認した。さらに、東京大学大学院工学系研究科の鈴木勉教授と共同で、組換え METT-10 タンパク質が試験管内で *sams* 遺伝子の mRNA 前駆体の 3' スプライス部位の AG の A を 6 位のアミノ基を特異的にメチル化することを確認した。そこで、抗 m⁶A 抗体により RNA 免疫沈降や、内在性 *sams* 遺伝子の直接 RNA シーケンシング解析のデータと試験管内で調製した非修飾および m⁶A 修飾した *sams* mRNA 前駆体の生データを比較し、機械学習を組み合わせることで、内在性の *sams* mRNA の 3' スプライス部位が特異的かつほぼ完全に m⁶A 修飾されていることを明らかにした。これらの結果は、代謝酵素の遺伝子が自身の mRNA 前駆体を塩基修飾することで選択的プライシングを間接的に制御し、自身の発現量を負にフィードバックする初めての例であり、また、スプライス部位の AG の m⁶A 修飾が選択的プライシングに直接的に影響することをすべての生物を通じて初めて示した例となった（右図）。



4 (4) . 総説の執筆

線虫のさまざまな研究分野についての知見をそれぞれを専門とする研究者が整理して執筆する電子書籍 WormBook の編者から依頼を受けて、米国 Indiana 大学の Heather A. Hundley 博士、同カリフォルニア大学 Santa Cruz 校の Joshua A. Arribere 博士と共に、線虫の mRNA の編集、プロセッシング、品質管理についての章を執筆した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Watabe Eichi, Togo Ohno Marina, Ishigami Yuma, Wani Shotaro, Hirota Keiko, Kimura Asami Mariko, Hasan Sharmin, Takei Satomi, Fukamizu Akiyoshi, Suzuki Yutaka, Suzuki Tsutomu, Kuroyanagi Hidehito	4. 巻 40
2. 論文標題 m6A mediated alternative splicing coupled with nonsense mediated mRNA decay regulates SAM synthetase homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e106434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020106434	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 Jahan Momotaj, Iwasa Hiroaki, Kuroyanagi Hidehito, Hata Yutaka	4. 巻 26
2. 論文標題 Loss of Caenorhabditis elegans homologue of human MOB4 compromises life span, health life span and thermotolerance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 798 ~ 806
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12891	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 Ju Jue, Aoyama Tomohiko, Yashiro Yuka, Yamashita Seisuke, Kuroyanagi Hidehito, Tomita Kozo	4. 巻 51
2. 論文標題 Structure of the Caenorhabditis elegans m6A methyltransferase METT10 that regulates SAM homeostasis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 2434 ~ 2446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkad081	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 黒柳 秀人	4. 巻 94
2. 論文標題 ナンセンスコドン介在的mRNA分解（NMD）と共役した選択的スプライシングによる遺伝子発現の制御	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 868 ~ 874
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940868	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 Watabe Eichi, Togo Ohno Marina, Ishigami Yuma, Wani Shotaro, Hirota Keiko, Kimura Asami Mariko, Hasan Sharmin, Takei Satomi, Fukamizu Akiyoshi, Suzuki Yutaka, Suzuki Tsutomu, Kuroyanagi Hidehito	4. 巻 40
2. 論文標題 m ⁶ A mediated alternative splicing coupled with nonsense mediated mRNA decay regulates SAM synthetase homeostasis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e106434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020106434	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Eichi Watabe, Marina Togo-Ohno, Yuma Ishigami, Keiko Hirota, Akiyoshi Fukamizu, Yutaka Suzuki, Tsutomu Suzuki and Hidehito Kuroyanagi
2. 発表標題 Alternative splicing through m6A modification at a 3' splice site for SAM synthetase homeostasis
3. 学会等名 26th Annual Meeting of the RNA Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eichi Watabe, Marina Togo-Ohno, Yuma Ishigami, Keiko Hirota, Akiyoshi Fukamizu, Yutaka Suzuki, Tsutomu Suzuki and Hidehito Kuroyanagi
2. 発表標題 Alternative splicing through m6A modification at a 3' splice site for SAM synthetase homeostasis
3. 学会等名 23rd International C. elegans Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eichi Watabe, Marina Togo-Ohno, Yuma Ishigami, Keiko Hirota, Akiyoshi Fukamizu, Yutaka Suzuki, Tsutomu Suzuki and Hidehito Kuroyanagi
2. 発表標題 Alternative splicing through m6A modification at a 3' splice site for SAM synthetase homeostasis
3. 学会等名 26th Annual Meeting of the RNA Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Eichi Watabe, Marina Togo-Ohno, Yuma Ishigami, Keiko Hirota, Akiyoshi Fukamizu, Yutaka Suzuki, Tsutomu Suzuki and Hidehito Kuroyanagi
2. 発表標題 Alternative splicing through m6A modification at a 3' splice site for SAM synthetase homeostasis
3. 学会等名 23rd International C. elegans Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 日本遺伝学会 黒柳秀人 (分担執筆)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 690
3. 書名 遺伝学の百科事典	

1. 著者名 日本遺伝学会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 690
3. 書名 遺伝学の百科事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>琉球大学大学院医学研究科生化学講座 https://biochem.med.u-ryukyu.ac.jp/research/detail/120 東京医科歯科大学プレスリリース https://www.tmd.ac.jp/files/topics/55271_ext_04_2.pdf 琉球大学大学院医学研究科生化学講座 http://biochem.med.u-ryukyu.ac.jp/news/detail/975</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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------