

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2009～2013

課題番号：21228003

研究課題名(和文) スプライシング因子の新機能に関する化学遺伝学研究

研究課題名(英文) Chemical Genetics on Novel Functions of Splicing Factors

研究代表者

吉田 稔 (Yoshida, Minoru)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・主任研究員

研究者番号：80191617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 157,500,000円、(間接経費) 47,250,000円

研究成果の概要(和文)：Spliceostatin A (SSA) は抗がん抗生物質FR901464 の化学的に安定な誘導体であり、研究代表者らはSSAがスプライシング因子SF3bに特異的に結合する世界初のスプライシング阻害剤であることを明らかにしてきた。SSAを用いることでスプライシング因子やイントロンの新しい機能の同定につながると考えられる。そこで本研究はSSAによって引き起こされる多様な表現型の作用機構を解析し、スプライシング因子の未知の役割の解明を目指した。その結果、pre-mRNA核内保持、転写伸長、ポリA付加、核内非コードRNAの局在制御にスプライシング因子が関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Spliceostatin A (SSA) is a chemically stable derivative of anticancer natural product FR901464, which we identified as the first splicing inhibitor that binds the splicing factor SF3b. SSA provides a unique opportunity to analyze novel function of splicing factors and introns. This project aims to elucidate unknown roles of splicing factors by analyzing the mechanisms by which SSA induces a variety of phenotypes. In consequence, we demonstrated that splicing factors targeted by SSA are involved in the regulation of pre-mRNA nuclear retention, transcriptional elongation, polyadenylation, and subcellular localization of nuclear non-coding RNAs.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：スプライシング インترون 転写 核-細胞質間輸送 非コードRNA エピジェネティクス 転写終結
マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは抗癌活性物質のケミカルバイオロジー研究の過程で、スプライシングを阻害し、イントロン配列がタンパク質に翻訳されるといふ驚くべき現象を見いだした。すなわち、抗癌剤候補化合物として発見された微生物代謝産物 FR901464 の安定誘導体 spliceostatin A (SSA) を用いて、FR901464 がどのようなメカニズムで抗癌活性を示すかを解析したところ、スプライシング因子複合体 SF3b に結合してスプライシング反応を阻害することがわかった。スプライシング反応の小分子阻害剤は世界初の発見であり、この化合物の登場により、イントロンやスプライシング反応の機能を効率よく検証する環境が整った。

2. 研究の目的

研究を開始した時点において、SSA を細胞に加えると、核内に繫留されていた pre-mRNA が細胞質へと輸送され、細胞質で翻訳されて異常なタンパク質を作ることが明らかとなっていた。また、SSA 存在下では、核内に大量に存在する複数のノンコーディング RNA (ncRNA) の局在や安定性が変化するという予備的な観察結果を得ていた。これらの結果は、スプライシング反応が mRNA のプロセッシングに関わるだけでなく、pre-mRNA や ncRNA の局在監視機構や安定性制御にも関わっていることを示していた。そこで本研究では、SSA を手がかりにスプライシング因子が制御する生理現象を解析し、スプライシング反応因子やイントロンが持つ新しい機能を解明する「イントロン生物学」を確立することを目指した。

3. 研究の方法

研究項目 (1) mRNA 監視機構における SF3b の役割および (2) 転写とクロマチン調節における SF3b の役割については、主として細胞内 mRNA の発現、スプライシング、細胞内局在が SSA 処理でどのように変化するかをゲノムワイドで解析するため、DNA マイクロアレイ、エクソンアレイ、および RNA-seq 解析を行った。RNA-seq については、pre-mRNA の核外移行を観察するため、核と細胞質に分画して解析を行った。研究項目 (3) ncRNA 調節における SF3b の役割については、スプライシング因子が作用しうる配列 (イントロンの 5'側のドナー配列、ブランチ部位配列、イントロンの 3'側のアクセプター配列) に注目し、これらの配列がそれぞれの RNA の制御に与える影響を解析した。また、各種 RNA 結合ドメインを持つタンパク質をノックダウンしたときの効果についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) mRNA 監視機構における SF3b の役割
mRNA 監視機構をモニターするレポータ

一遺伝子に変異を導入した実験から、SSA によるスプライシングおよび監視機構の阻害効果はブランチ部位の配列の強さに依存することを見いだした。そこで SSA によって発現や細胞内局在が変化する転写産物をゲノムワイドに探索するためアレイ解析を行ったところ、血管新生因子 VEGF を含む多くの遺伝子における発現変化を観察することができた。また、RNA-seq による全 RNA 解析を行ったところ、スプライシングが非常に強く抑制されて転写物そのものが激減したものが約 6%、逆に増加したものが約 3% 検出された。また、細胞質と核内での RNA の比較を行うと、約 20% の遺伝子でスプライシングの抑制が検出され、約 10% の遺伝子でその一部が細胞質に漏出していることが明らかになった。以上の結果は、SSA によるスプライシング阻害効果は均一ではなく、にブランチ部位の配列の違いによって遺伝子ごとに異なることを示している。このことががん細胞選択的な増殖阻害の原因の一つと考えられる。

(2) 転写とクロマチン調節における SF3b の役割

短時間の SSA 処理細胞中の新生 RNA をタイリングアレイで解析した結果、SSA 処理細胞では転写伸長が阻害され、RNA ポリメラーゼ II が途中で停止する例が観察された。このことは、スプライシング異常を検知すると、転写を停止させる未知の機構が存在し、スプライシングの完了を監視する役割があることが示唆された。

また、ウイルスプロモーターや IL-8 プロモーターなど、SSA で転写が活性化されるプロモーターの解析を行ったところ、ERK および NF- κ B 経路を介してこれらのプロモーターが活性化することが明らかになった。

さらに長時間の SSA 処理によってグローバルなヒストン H3K9 のメチル化の上昇が観察された。興味深いことに、この作用は miRNA の生成に必須な Dicer のノックダウンによって消滅した。したがってスプライシング阻害の結果、生成される miRNA の分子種の中にヒストン修飾を制御するものが含まれている可能性が示唆された。

(3) ncRNA 調節における SF3b の役割

Xist は哺乳類のメス個体で見られる X 染色体の不活性化に関わる ncRNA で、転写産物は不活性化されるべき X 染色体全体を覆い尽くし、そこにエピゲノム修飾に関わる酵素群を引き込むことで、染色体レベルでの遺伝子発現抑制を実現している。しかし、Xist の染色体局在機構はほとんどわかっていない。そこで、SSA 処理によって Xist の発現量が低下することをヒントに、多くのスプライシング因子が持つ RRM ドメインや RGG ドメインを有するタンパク質に対するカスタム siRNA ライブラリーを作製し、それらのタンパク質をノックダウンしたときに Xist の局在が変化するかどうかについて検討を行った。その結

果、予想していたスプライシング因子ではないものの、核マトリクスの構成成分として知られていた hnRNP U が Xist の染色体局在を制御していることが明らかとなった。一方、Gomafu RNA については、自身のもつブランチ部位様の配列に SF3b ではなく、SF1 が結合していることが明らかになった。

Malat1 RNA は RNA ポリメラーゼ II で転写される極めて発現量の多い長鎖 ncRNA で、スプライシング因子の貯蔵庫である核スペckルに局在し、がん細胞の転移能や血清刺激に応答した細胞増殖を制御していると報告されている。Malat1 RNA が SSA 処理によって著しく不安定化することを見いだした。そのメカニズムを明らかにするために Malat1 RNA の挙動を詳細に調べたところ、SSA 処理後に転写産物の 5' 側にある潜在的なポリ A 付加配列が活性化され、そこで異常な切断が起きていることが明らかとなった。興味深いことに、この異常な切断に先立って Malat1 RNA は核スペckルから離脱する。スプライシング因子 U1 snRNP は、潜在的なポリ A 付加配列の活性を抑制することが知られているので、U1 snRNP と Malat1 との相互作用を観察したところ、SSA 処理によって結合が低下することがわかった。この結果は、スプライシング反応が停止することによって、U1 snRNP を含むスプライシング因子が核スペckルに保持され、巨大スペckルを形成する一方で、Malat1 RNA がスペckルから離脱し Malat1 RNA 上に結合している U1 snRNP が欠乏することで、潜在的なポリ A 付加配列が活性化されるという可能性を示唆する。さらに、SSA 処理した細胞での遺伝子発現を、前述の RNA-seq を用いて詳細に解析したところ、Malat1 以外にも潜在的なポリ A 付加配列が活性化されて異常な転写産物が作られる遺伝子が多数ある事実が明らかとなった。

以上の結果、スプライシング反応には、SF3b や U1 snRNP といったスプライシング因子の機能を適切に調節し、pre-mRNA の核内保持、転写伸長の監視、細胞にとって有害な潜在的なポリ A 付加配列を広範に抑制するという予想外の機能があることが明らかとなった。また、miRNA の生成を介したヒストン修飾の制御にも関与する可能性も明らかになった (図 1)。

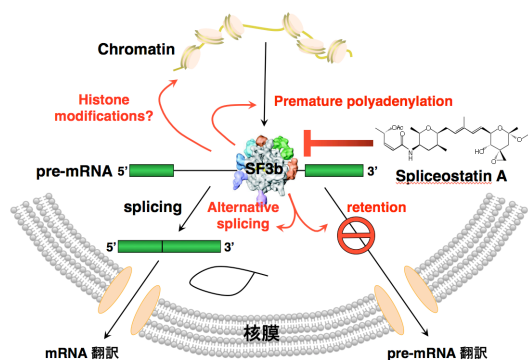


図 1. スプライシング因子の新たな機能

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 30 件)

原著論文

- ① Khan, K., Schneider-Poetsch, T., Ishfaq, M., Ito, A., Yoshimoto, R., Mukaida, N., and Yoshida, M. Splicing inhibition induces gene expression through canonical NF- κ B pathway and extracellular signal-related kinase activation, *FEBS Lett.* 588, 1053-1057, 2014. 査読有, doi:10.1016/j.febslet.2014.02.018
- ② Koga, M., Satoh, T., Takasaki, I., Kawamura, Y., Yoshida, M., and Kaida, D. U2 snRNP is required for expression of the 3' end of genes, *PloS One* 9, e98015, 2014. 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0098015
- ③ Yoshimoto, R., Okawa, K., Yoshida, M., Ohno, M., and Kataoka, N. Identification of a novel component C2ORF3 in the lariat-intron complex: lack of C2ORF3 interferes with pre-mRNA splicing via intron turnover pathway, *Genes Cells* 19, 78-87, 2014. 査読有, doi:10.1111/gtc.12114
- ④ Barry, G., Briggs, J. A., Vanichkina, D. P., Poth, E. M., Beveridge, N. J., Ratnu, V. S., Nayler, S. P., Nones, K., Hu, J., Bredy, T. W., Nakagawa, S., Rigo, F., Taft, R. J., Cairns, M. J., Blackshaw, S., Wolvetang, E. J., and Mattick, J. S. The long non-coding RNA Gomafu is acutely regulated in response to neuronal activation and involved in schizophrenia-associated alternative splicing, *Mol. Psychiatry* 19, 486-494, 2014. 査読有, doi:10.1038/mp.2013.45
- ⑤ Matsushita, K., Tamura, M., Tanaka, N., Tomonaga, T., Matsubara, H., Shimada, H., Levens, D., He, L., Liu, J., Yoshida, M., and Nomura, F. Interactions between SAP155 and FUSE-binding protein-interacting repressor bridges c-Myc and P27Kip1 expression, *Mol. Cancer Res.* 11, 689-698, 2013. 査読有, doi:10.1158/1541-7786
- ⑥ Fustin, J. M., Doi, M., Yamaguchi, Y., Hida, H., Nishimura, S., Yoshida, M., Isagawa, T., Morioka, M. S., Kakeya, H., Manabe, I., and Okamura, H. RNA-methylation-dependent RNA processing controls the speed of the circadian clock, *Cell* 155, 793-806, 2013. 査読有, doi:10.1016/j.cell.2013.10.026
- ⑦ Nishimoto, Y., Nakagawa, S., Hirose, T.,

- Okano, H. J., Takao, M., Shibata, S., Suyama, S., Kuwako, K., Imai, T., Murayama, S., Suzuki, N., and Okano, H. The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis, *Mol. Brain* 6, 31, 2013. 査読有, doi:10.1186/1756-6606-6-31
- ⑧ Matsushita, K., Kajiwara, T., Tamura, M., Satoh, M., Tanaka, N., Tomonaga, T., Matsubara, H., Shimada, H., Yoshimoto, R., Ito, A., Kubo, S., Natsume, T., Levens, D., Yoshida, M., and Nomura, F. SAP155-mediated splicing of FUSE-binding protein-interacting repressor serves as a molecular switch for c-myc gene expression, *Mol. Cancer Res.* 10, 787-799, 2012. 査読有, doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0462
- ⑨ Naganuma, T., Nakagawa, S., Tanigawa, A., Sasaki, Y. F., Goshima, N., and Hirose, T. Alternative 3'-end processing of long noncoding RNA initiates construction of nuclear paraspeckles, *EMBO J.* 31, 4020-4034, 2012. 査読有, doi:10.1038/emboj.2012.251
- ⑩ Nakagawa, S., Ip, J. Y., Shioi, G., Tripathi, V., Zong, X., Hirose, T., and Prasanth, K. V. Malat1 is not an essential component of nuclear speckles in mice, *RNA* 18, 1487-1499, 2012. 査読有, doi:10.1261/rna.033217.112
- ⑪ Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Yamada, Y., Morizane, A., Takahashi, J., Ayaki, T., Ito, H., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Suzuki, S., Watanabe, D., Hioki, H., Kaneko, T., Makioka, K., Okamoto, K., Takuma, H., Tamaoka, A., Hasegawa, K., Nonaka, T., Hasegawa, M., Kawata, A., Yoshida, M., Nakahata, T., Takahashi, R., Marchetto, M. C. N., Gage, F. H., Yamanaka, S., and Inoue, H. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells, *Sci. Transl. Med.* 4, 145ra104, 2012. 査読有, doi:10.1126/scitranslmed.3004052
- ⑫ Furumai, R., Ito, A., Ogawa, K., Maeda, S., Saito, A., Nishino, N., Horinouchi, S., and Yoshida, M. Histone deacetylase inhibitors block NF- κ B-dependent transcription by interfering with RNA polymerase II recruitment, *Cancer Sci.* 102, 1081-1087, 2011. 査読有, doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01904.x
- ⑬ Hasegawa, M., Miura, T., Kuzuya, K., Inoue, A., Ki, S. W., Horinouchi, S., Yoshida, T., Kunoh, T., Koseki, K., Mino, K., Sasaki, R., Yoshida, M., and Mizukami, T. Identification of SAP155 as the target of GEX1A (Herboxidiene), an antitumor natural product, *ACS Chem. Biol.* 6, 229-233, 2011. 査読有, doi:10.1021/cb100248e
- ⑭ Schmidt, U., Basyuk, E., Robert, M.-C., Yoshida, M., Villemin, J.-P., Auboeuf, D., Aitken, S., and Bertrand, E. Real-time imaging of cotranscriptional splicing reveals a kinetic model that reduces noise: implications for alternative splicing regulation, *J. Cell Biol.* 193, 819-829, 2011. 査読有, doi:10.1083/jcb.201009012
- ⑮ Martins, S. B., Rino, J., Carvalho, T., Carvalho, C., Yoshida, M., Klose, J. M., Almeida, S. F. d., and Carmo-Fonseca, M. Spliceosome assembly is coupled to RNA polymerase II dynamics at the 3' end of human genes, *Nat. Str. Mol Biol.* 18, 1115-1123, 2011. 査読有, doi:10.1038/nsmb.2124
- ⑯ Tsuiji, H., Yoshimoto, R., Hasegawa, Y., Furuno, M., Yoshida, M., and Nakagawa, S. Competition between a noncoding exon and introns: Gomafu contains tandem UACUAAC repeats and associates with splicing factor-1, *Genes Cells* 16, 479-490, 2011. 査読有, doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01502.x
- ⑰ Nakagawa, S., Naganuma, T., Shioi, G., and Hirose, T. Paraspeckles are subpopulation-specific nuclear bodies that are not essential in mice, *J. Cell Biol.* 193, 31-39, 2011. 査読有, doi:10.1083/jcb.201011110
- ⑱ Furukawa, K., Abe, H., Tamura, Y., Yoshimoto, R., Yoshida, M., Tsuneda, S., and Ito, Y. Fluorescence detection of intron lariat RNA with reduction-triggered fluorescent probes, *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 12020-12023, 2011. 査読有, doi:10.1002/anie.201104425
- ⑲ Hasegawa, Y., Brockdorff, N., Kawano, S., Tsutui, K., and Nakagawa, S. The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of Xist RNA, *Dev. Cell* 19, 469-476, 2010. 査読有, doi:10.1016/j.devcel.2010.08.006
- ⑳ Furumai, R., Uchida, K., Komi, Y., Yoneyama, M., Ishigami, K., Watanabe, H., Kojima, S., and Yoshida, M. Spliceostatin A blocks angiogenesis by inhibiting global gene expression including VEGF, *Cancer Sci.* 101, 2483-2489, 2010. 査読有, doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01686.x

総説

- ⑲ Nakagawa, S. and Kageyama, Y. Nuclear lncRNAs as epigenetic regulators-beyond skepticism. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 215-222, 2014. 査読有, doi:10.1016/j.bbaggm.2013.10.009
- ⑳ Nakagawa, S. and Hirano, T. Gathering around Firre. *Nat. Struct Mol. Biol.* 21, 207-208, 2014. 査読有, doi:10.1038/nsmb.2782
- ㉑ Kaida, D., Schneider-Poetsch, T., and Yoshida, M. Splicing in oncogenesis and tumor suppression, *Cancer Sci.* 103, 1611-1616, 2012. 査読有, doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02356.x
- ㉒ Ip, J. Y. and Nakagawa, S. Long non-coding RNAs in nuclear bodies. *Dev. Growth Differ.* 54, 44-54, 2012. 査読有, doi:10.1111/j.1440-169X.2011.01303.x
- ㉓ Nakagawa, S. and Hirose, T. Paraspeckle nuclear bodies--useful uselessness? *Cell Mol. Life Sci.* 69, 3027-3036, 2012. 査読有, doi:10.1007/s00018-012-0973-x
- ㉔ Nakagawa, S. and Prasanth, K. V. eXIST with matrix-associated proteins. *Trends Cell Biol.* 21, 321-327, 2011. 査読有, doi:10.1016/j.tcb.2011.02.001
- ㉕ Nakagawa, S. [Emerging world of nuclear long noncoding RNAs]. *Seikagaku* 82, 42-46, 2010. 査読有.
- ㉖ Hasegawa, Y. and Nakagawa, S. Revisiting the function of nuclear scaffold/matrix binding proteins in X chromosome inactivation. *RNA Biol.* 8, 735-739, 査読有, doi:10.4161/rna.8.5.16367, 2011.
- ㉗ Schneider-Poetsch, T., Usui, T., Kaida, D., and Yoshida, M. Garbled messages and corrupted translations, *Nature Chem. Biol.* 6, 189-198, 2010. 査読有, doi:10.1038/nchembio.326
- ㉘ 吉田 稔 微生物由来抗がん活性物質の作用機序研究から明らかになった新しい創薬標的, バイオサイエンスとインダストリー 68, 8-14, 2010. 査読無.

[学会発表] (計 3 4 件)

- ① 吉田 稔 「天然由来抗がん物質の作用機構から明らかになったスプライシングとエピジェネティクスとの機能相関」第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、2013 年 10 月 4 日.
- ② Shinichi Nakagawa, "Functional analysis of nuclear long noncoding RNAs", Riboclub 2013, Cheribourg, Canada, Sep. 25, 2013.
- ③ Minoru Yoshida, "Opening new frontiers through chemical genetics of natural products", Charles E. Dohme memorial lecture 2012, Baltimore, USA, Nov. 28, 2012.

- ④ Shinichi Nakagawa, "An Architectural Long Noncoding RNA NEAT1 Controls Corpus Luteum Formation in an Age-Dependent Manner", Keystone Symposia "Non-Coding RNAs", Snowbird, Utah USA, April 3, 2012.
- ⑤ Shinichi Nakagawa, " Functional analyses of nuclear enriched abundant long noncoding RNAs" 第 34 回日本分子生物学会年会シンポジウム、横浜、2011 年 12 月 16 日.
- ⑥ Shinichi Nakagawa, "Nonessentials for nothing?-Nuclear bodies paraspeckles are not essential for animal's life" 第 63 回日本細胞生物学会大会シンポジウム、札幌、2011 年 7 月 29 日.
- ⑦ Minoru Yoshida, "Mode of action of an anticancer agent that inhibits pre-mRNA splicing", The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, USA, Dec. 17, 2010.
- ⑧ Minoru Yoshida, Ryohei Furumai, Daisuke Kaida "Chemistry and biology of spliceostatin A: An antitumor agent that inhibits pre-mRNA splicing", Fall 2009 ACS National Meeting (The 238th ACS National Meeting), Washington, DC, USA, Aug. 18, 2009.

[その他]

ホームページ等

http://www.riken.jp/research/labs/chief/chem_genet/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 稔 (YOSHIDA, Minoru)

独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・主任研究員

研究者番号：80191617

(2) 研究分担者

中川 真一 (NAKAGAWA, Shinichi)

独立行政法人理化学研究所・中川 RNA 生物学研究室・准主任研究員

研究者番号：50324679

(3) 連携研究者

古米 亮平 (FURUMAI, Ryohei)

独立行政法人理化学研究所・基幹研究所・基礎科学特別研究員

研究者番号：30450414