

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料 〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2021～2025
課題番号：21H05042
研究課題名：RNA結合タンパク質の病的相分離の統合的理解
研究代表者氏名（ローマ字）：萩原 正敏（HAGIWARA Masatoshi）
所属研究機関・部局・職：京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：10208423

研究の概要：

RNAは遺伝情報の中間処理を行うため、DNAと比較して遙かに多彩で動的な制御を受けている。本研究では、種々のRNA結合タンパク質と標的RNAが、液-液相分離によって複合的に遺伝子発現を制御するという仮説の下、病的相分離という新しい視点から、ウイルス感染、転移がん、遺伝病等に伴う遺伝子発現の異常について分子病態に新解釈を提起することを目指す。

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：RNA結合蛋白質、液-液相分離、RNAプロセッシング

1. 研究開始当初の背景

液-液相分離は化学分野では古くから知られた現象であるが、特に近年、KHドメインやRRM（RNA recognition motif）とLCドメインの双方を有する複数のRNA結合タンパク質が濃度依存的に相転移を起こしてハイドロゲル上の分巢集合体を形成するなど、細胞内のRNP下流形成モデルが示され、RNAバイオロジーの新しい研究対象として注目されるようになった。

RRMとSerとArgを反復するRSドメインを有するSRタンパク質は核スペckルに集積し、液滴を形成している可能性が高い。RSドメインは液-液相分離におけるLCドメインの条件に一致し、その可動性はリン酸化修飾により制御を受けることが知られる。我々の創製したSRタンパク質のリン酸化を制御する化合物は、RNA結合タンパク質のリン酸化状態を変えることによって、液滴の分散⇄集合に影響を与えている可能性があるが、SRタンパク質のリン酸化状態と液-液相分離状態、液-液相分離状態がRNAスプライシングに与える影響については定かではない。

RNAの転写を司るRNAポリメラーゼII（RNAPII）も液-液相分離構造を形成することが明らかとされている（*Nature* 572, 2019）。即ち、細胞内の遺伝子の発現制御やスプライシング等のRNAプロセッシングが液-液相分離構造制御を介してさまざまに調節されていることが想定される。我々はこれまでにRNA結合タンパク質SFPQがCDK9およびRNAPIIと相互作用して転写伸長を制御していることを見出しているが、RNAPIIを含む液-液相分離構造を形成する分子やその役割については未だ明らかでない。

また、多種類のタンパク質や核酸が高濃度で存在する核内では、さまざまなRNP顆粒が不均一に存在する。このことは、悪性腫瘍、ウイルス感染、トリプレットリピート病などの転写・RNAプロセッシング異常を伴う幅広い疾患で液滴形成の異常・病的相分離が分子病態に寄与することを示唆するが、液-液相分離状態の変化が疾患病態に与える影響は未だに明らかでなく、液-液相分離状態への介入がその遺伝子発現異常と、それに起因する病態を改善しうるかについては全く検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、我々が開発してきた技術・化合物と、液-液相分離を細胞内で観察・介入するケミカルバイオロジーの新しい研究手法を駆使して、新しい視点からSRタンパク質のリン酸化依存的スプライシング制御機構の新断面を開き、遺伝性疾患、ウイルス感染、がん等に伴う遺伝子発現の異常について病的相分離という新しい観点から分子病態に新解釈を提起することを目指す。近年勃興してきた液-液相分離による遺伝子発現制御機構の新解釈が、これらの疾患の分子病態をどこまで説明出来るのか、またその病的液-液相分離の是正が、新たな創薬理論となり得るのかという学術的「問い」に挑戦する。

3. 研究の方法

本研究では、RNA結合タンパク質のリン酸化状態などの変化が静電作用による液-液相分離状態の閾値を変え、RNAスプライシングや転写制御に与える影響を検証する。また種々の疾患の分子病態を核内のRNA結合タンパク質とRNAから成る液滴の相分離異常の観点から解析し、病的相分離について全体像の理解を目指す。本研究は、大きく(A)SRタンパク質ファミリーの液-液相分離とスプライシング制御、(B)RNAPII結合タンパク質の液-液相分離と転写・RNAプロセッシング制御、(C)病的状態での遺伝子発現異常と液-液相分離異常の連関、の3項目からなる。

(A)においては主要なSRタンパク質をGFP融合タンパク質として産生・精製し、塩濃度・温度・添加剤等による相分離変化について検討し、SRタンパク質の液-液相分離性状を確認する。引き続き、細胞内におけるSRタンパク質ファミリーの液-液相分離について核スペckルの融合などの液滴・相分離変

化を観察し、SR タンパク質の液-液相分離のリン酸化依存性について、活性型、不活性型の CLK、および CLK 阻害剤 TG003 および活性化剤 RECTAS を加えて液滴形成変化について検討する。

(B)においては、中心分子である SFPQ について液滴形成能を確認し、全長 SFPQ、ドメインを区切った変異体の検討から液-液相分離における重要領域の特定を行う。また、Sfpq の精製蛋白質を用いた in vitro での液-液相分離評価を進め、Sfpq の作る液-液相分離の詳細な解析のために、Sfpq 近傍に位置する液滴成分を精製し、質量分析および RNA-seq 解析からタンパク質と RNA の複合体組成を網羅的に解析することで、その包括的なプロファイルを明らかにする。

(C)については、トリプレットリピート病と液-液相分離異常について検討するため、筋緊張性ジストロフィー-I 型 (DM1) の CTG 異常伸張リピートと、RNA 結合タンパク質 MBLN および CUG-BP1 との液滴形成について検討し、分子病態に関する液-液相分離の変化を検討するとともに、それを正常化する化合物による DM1 新規治療薬の可能性を検討する。ウイルス疾患や、種々の転移がんモデルにおいて、SR タンパク質の発現とスプライシング異常、そのリン酸化抑制による液-液相分離状態の変化の与える影響について検討し、液-液相分離異常を SR タンパク質リン酸化抑制剤などによって是正することで、癌細胞の増殖・転移抑制効果を検証する。

4 . これまでの成果

SR タンパク質 SRSF1 の液-液相分離状態を in vitro 再構成系を構築することに成功し、その制御により COVID19 のようなウイルス感染症や悪性腫瘍に対する効果的な薬剤を開発できる可能性が見出された。また CDK9 阻害剤である FIT-039 を作用させることで、マウスモデルで KSHV 陽性腫瘍細胞の増殖の顕著な抑制が認められたため、FIT-039 がウイルス依存的な悪性腫瘍治療薬になり得る可能性が見出された。これによって、本研究から病的な液-液相分離状態の正常化を図る創薬を実現できる可能性が大きくなっている。

5 . 今後の計画

精製 SRSF1 タンパク質を用いた液-液相分離の in vitro 再構成系を構築することが出来たので、in vitro で観察された液-液相分離のリン酸化依存的制御機構が、in vivo でも重要な役割を果たしていることを実証し、その異常に起因する病態を改善する方策を見出すことが次の課題となる。また、Sfpq の機能異常による液-液相分離構造の異常と、それによる転写・RNA プロセッシング制御の変化を解析し、正常な液-液相分離構造の生理機能の解明と、病的液相分離構造による細胞機能の異常を明らかにする。転写・RNA プロセッシングを制御する RNAPII を含む流動性の高い液-液相分離構造内の分子複合体を免疫沈降と質量分析により網羅的に同定して、分子制御メカニズムを明らかにしてさらに転写・RNA プロセッシングの新たな分子制御メカニズムの解明を行う。トリプレットリピート病の核内 RNA-RNA 結合タンパク質の相互作用について解析し、我々の保有するリン酸化制御化合物がその核内構造へ与える影響と、治療薬としての開発可能性について検討する。KSHV ウイルス遺伝子の転写調節を CDK9 経路に依存した RNAPII の液-液相分離状態を変化させる、新しいカポジ肉腫阻害剤の可能性が見出されたため、その実用化に向けた検討を開始する。また CLK による SR タンパク質のリン酸化と機能を亢進する薬剤 RECTAS によって、ガン細胞のネオ抗原の発現が高められる可能性が見出されたため、RECTAS をがん免疫増強剤として実用化できる可能性について検討する。

6 . これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Sakamoto T, Ajiro M, Watanabe A, Matsushima S, Ueda K, Hagiwara M. Application of the CDK9 inhibitor FIT-039 for the treatment of KSHV-associated malignancy. *BMC Cancer*. 2023;23(1):71.
2. Matsushima S, Ajiro M, Iida K, Chamoto K, Honjo T, Hagiwara M. Chemical induction of splice-neoantigens attenuates tumor growth in a preclinical model of colorectal cancer. *Sci Transl Med*. 2022;14(673):eabn6056.
3. Kanemitsu E, Zhao X, Iwaisako K, Inoue A, Takeuchi A, Yagi S, Masumoto H, Ohara H, Hosokawa M, Awaya T, Aoki J, Hatano E, Uemoto S, Hagiwara M. Antagonist of sphingosine 1-phosphate receptor 3 reduces cold injury of rat donor hearts for transplantation. *Transl Res*. 2022;S1931-5244(22)00245-6
4. Li S, Yoshizawa T, Shiramasa Y, Kanamaru M, Ide F, Kitamura K, Kashiwagi N, Sasahara N, Kitazawa S, Kitahara R. Mechanism underlying liquid-to-solid phase transition in fused in sarcoma liquid droplets. *Phys Chem Chem Phys*. 2022;24(32):19346-19353.
5. 武内章英 遺伝子発現における RNA 結合タンパク質の多彩な機能 (総説) *実験医学増刊 センทรัลドグマの新常識* 2022;141-148.
6. 粟屋智就 スプライス異常を標的とした新しいコンセプトによる稀少疾患治療法の開発 (総説) *脳と発達* 2021;53(4):277-282.

7 . ホームページ等

<https://www.anat1dadb.med.kyoto-u.ac.jp/>